

板を用いることで、絨毛 M 細胞の混入を極力防げるものと考えられた。さらに、コレラトキシン投与により絨毛 M 細胞が誘導されることが明らかとなり、絨毛 M 細胞を効率よく単離することも可能となった。このことは、解析対象とする細胞画分(パイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞、上皮細胞)の由来を十二指腸・空腸上皮層に統一できることを意味する。

このように調製された各細胞画分を検証するために DNA マイクロアレイ法による包括的発現遺伝子解析を行った。その結果、パイエル板 M 細胞特異的遺伝子として既知の PGRP-S、Sgnc-1、annexin V の発現はパイエル板 M 細胞画分のみであり、本研究で確立された単離法の信頼性を示している。

確立された各細胞画分の発現遺伝子プロファイルは既知遺伝子のみならず、多くの未報告遺伝子も含まれている。その中にはワクチンデリバリーの際に標的となり得る候補分子も含まれていると考えられる。つまり、本研究の成果は、ワクチンデリバリーシステムの構築に対して重要な知見を与えるものである。

## E. 結論

本研究では、パイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞を個々に単離する方法を確立した。さらに、パイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞細胞、上皮細胞における発現遺伝子プロファイルが構築された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tamagawa H, Hiroi T, Mizushima T, Ito T, Matsuda H, and Kiyono H. Therapeutic effects of roxithromycin in interleukin-10-deficient colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2007. (in press)
2. Kunisawa J, Takahashi I, and Kiyono H. Intraepithelial lymphocytes: their shared and

divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol. Rev.* 2007. (in press)

3. Kunisawa J, Kurashima Y, Gohda M, Higuchi M, Ishikawa I, Ogahara I, and Kiyono H. Sphingosine 1-phosphate regulates peritoneal B cell trafficking for subsequent intestinal IgA production. *Blood* 2007. (in press)
4. Kim N, Knisawa J, Kweon MN, Eog Ji G, and Kiyono H. Oral feeding of *Bifidobacterium bifidum* (BGN4) prevents CD4<sup>+</sup> CD45RB (high) T cell-mediated inflammatory bowel disease by inhibition of disordered T cell activation. *Clin. Immunol.* 2007. (in press)
5. Maddaloni M, Staats HF, Mierzejewska D, Hoyt T, Robonson A, Callis G, Kozaki S, Kiyono H, McGhee JR, Fujihashi K, and Pascual DW. Mucosal vaccine targeting improves onset of mucosal and systemic immunity to *Botulinum* neurotoxin A. *J. Immunol.* 177 : 5524-5432. 2007.
6. Nochi T, and Kiyono H. Innate immunity in the mucosal immune system. *Curr Pharm Des.* 12 : 4203-4213. 2006.
7. Duverger A, Jackson RJ, van Ginkel FW, Fischer R, Tafaro A, Leppla SH, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR, and Boyaka PN. *Bacillus anthracis* edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens. *J. Immunol.* 176 : 1776-1783. 2006.
8. Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, Takeda Y, Kiyono H, McGhee JR, and Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular

- trafficking. *J. Immunol.* 177 : 3045-3054. 2006.
9. Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Tang BG, Seoh JY, Lipp M, Kiyono H, Miyasaka M. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* 176 : 803-810. 2006.
  10. Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Takamura K, Park EJ, Kaisho T, Tanaka N, Kurono Y, and Kiyono H. Uniqueness of lymphoid chemokine requirement for the initiation and maturation of NALT organogenesis. *J. Immunol.* 177 : 4276-4280. 2006. (Cutting Edge)
  11. 吉田理人、五十嵐脩、寺原和孝、清野 宏. 絨毛 M 細胞の形態と機能. *臨床免疫.* 45:236-242. 2006.
  12. 廣井隆親、塚越百合子、清野 宏 粘膜系好酸球様樹状細胞による免疫寛容制御. *感染と免疫* 221-230 2007.
2. 学会発表
1. Kiyono H. 粘膜ワクチン開発へ向けて:新しい展開. The 79th Annual meeting of Japanese Society for Bacteriology. Kanazawa. Japan. March 2006.
  2. Kiyono H. 粘膜免疫を応用した感染症ワクチン開発戦略. The 80<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Association for Infectious Diseases. Tokyo. April 2006.
  3. Kurashima Y, Kunisawa J, Gohda M, Higuchi M, Shimizu M, and Kiyono H. Different roles of sphingosine 1-phosphate in the regulation of mobility of mast cells and eosinophils in peritoneal and intestinal compartments. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 12<sup>th</sup>. 2006.
  4. Kiyono H. M cell targeted mucosal vaccine. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13<sup>th</sup>. 2006.
  5. Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Shimizu M, and Kiyono H. Sphingosine-1-phosphate-mediated regulatory T cell trafficking in the large intestinal epithelium. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13<sup>th</sup>. 2006.
  6. Takayama N, Igarashi O, Kweon MN, and Kiyono H. Peyer's patch NKT and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell mediated mucosal regulatory network for the control of intestinal allergy. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 13<sup>th</sup>. 2006.
  7. Gohda M, Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Shimizu M, and Kiyono H. Regulation of peritoneal B cell mobility to intestine and subsequent production of the intestinal IgA by sphingosine -1- phosphate. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14<sup>th</sup>. 2006.
  8. Terahara K, Igarashi O, Gotoh Y, Nochi T, Yuki Y, Hiroi T, Kiyono H. Induction of villous M-cells by intestinal environmental factors. *Immunology* 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14<sup>th</sup>. 2006.

9. Yuki Y, Takagi H, Nochi T, Yang L, Hiroi T, Takaiwa F, and **Kiyono H**. Development of a rice-based oral vaccine. Immunology 2006, Annual Meeting of The American Association of Immunologists. Massachusetts, USA. May 14<sup>th</sup>. 2006.
  10. Terahara K, Igarashi O, Yoshida Y, Nochi T, Goto G, Taguchi F, Beauchemin N, and **Kiyono H**. Novel CEACAM 1 splice variants expressed by murine small intestinal epithelium. The 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and the 11<sup>th</sup> FAOBMB Congress. Kyoto, Japan. Jun 17<sup>th</sup>. 2006.
  11. **Kiyono H**. Mucosal decision for immunity, tolerance and infection. 2<sup>nd</sup> the Biomolecule Secretion Research Symposium. Seoul. Korea. October 2006.
  12. **Kiyono H**. 粘膜免疫:免疫とアレルギーの接点. The 43th Annual meeting of Japanese Society of Pediatric Allergy and Clinical immunology. Chiba. November 2006.
  13. **Kiyono H**. Mucosal antigen uptake network : A key for the development of mucosal vaccine. US-Japan Cooperative Medical science Program, 19<sup>th</sup> Joint Meeting of the AIDS Panels. Kagoshima. December 2006.
  14. 國澤純、倉島洋介、樋口森生、合田昌史、**清野宏**. Sphingosine 1-phosphate receptor differently regulates naïve and activated intraepithelial T lymphocytes. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
  15. 高山尚子、五十嵐脩、権美那、**清野宏**. Role of NKT cells for the formation of a mucosal regulatory network in the control of intestinal allergy. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
  16. 樋口森生、國澤純、倉島洋介、合田昌史、**清野宏**. Cytokine regulation of epithelial cell-mediated innate and acquired phases of antigen presentation. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
  17. 野地智法、幸義和、依田昌樹、魚住明央、寺原和孝、金銅瑩、福山聡、五十嵐脩、**清野宏**. Immunological and biochemical characterization of M-cell by newly established monoclonal antibody. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
  18. 魚住明央、野地智法、依田昌樹、幸義和、五十嵐脩、柴田宏昭、**清野宏**. Identification and characterization of non-human primate M-cells. 第36回日本免疫学会総会・学術総会, 大阪市, 大阪府, 12月13日, 2006.
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
- 特許取得 なし
  - 実用新案登録 なし
  - その他 なし

## ドラッグデリバリー・システムの開発のための自然免疫機構の解析

分担研究者 竹田 潔 九州大学生体防御医学研究所 教授

研究要旨：腸管免疫系において重要な役割を果たすことが近年明らかになってきた TLR を介した自然免疫系の活性化の制御機構を解析した。その結果、TLR を介した NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子が存在し、遅期誘導型遺伝子の発現を核に発現する I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ BNS が抑制することを見出した。さらに、早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子の発現誘導機構を解析した。早期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が常に開いており転写制御因子が刺激後迅速にアクセスしやすい構造となっている。一方、遅期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激により構造変換を受けて開き、転写制御因子がアクセスできるようになる。このことが、遺伝子発現に時間を要する原因であることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子のプロモーターのクロマチン構造変換に関わる分子として、I $\kappa$ BNS と同じ I $\kappa$ B 分子 I $\kappa$ Bzeta を同定した。今後も、自然免疫系の活性制御機構を解析し、新規アジュバントの開発に向けた基礎的基盤を提供したい。

### A. 研究目的

自然免疫系が、Toll-like receptor (TLR) ファミリーメンバーにより、病原微生物の生体内侵入を感知し、自然免疫系の活性化のみならず抗原特異的な獲得免疫系の活性化をも誘導することが、明らかになってきた。しかし、TLR を介した自然免疫系の活性化は、その制御機構が破綻すると、慢性炎症性腸疾患などの慢性炎症を引き起こすことも明らかになっている。このように、腸粘膜において自然免疫系の重要性がクローズアップされている。通常、腸粘膜 M 細胞の直下で自然免疫系担当細胞が病原微生物をはじめとした外界異物の侵入を感知し免疫応答を繰り広げるものと考えられる。そこで腸粘膜における免疫応答機構を明らかにするため、自然免疫系の活性制御機構に標的を絞り、その分子機構を解析し、腸粘膜 M 細胞を介したドラッグデリバリーシステムの開発に資することを本研究の目的とする。

### B. 研究方法

自然免疫系の活性制御機構を解析する過程で、大腸に局在する自然免疫担当細胞は、TLR 刺激に不応答になっていることを見出し、さらにこれら細胞に選択的に発現している遺伝子として I $\kappa$ BNS を同定した。そして、I $\kappa$ BNS の機能解析から、TLR 刺激による NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現には早期誘導型と遅期誘導型があり、I $\kappa$ BNS は遅期誘導型の遺伝子発現を NF- $\kappa$ B の活性を制御することにより抑制していることを見出している。そこで、自然免疫系の活性制御機構をさらに解析するため、TLR 刺激による NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。まず、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、TRIF 依存性のシグナルが入る状況で早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子発現を解析した。さらに、早期誘導型遺伝子として MIP2 遺伝子、遅期誘導型遺伝子として Lcn2 遺伝子を代表とし、

各遺伝子プロモーターへの転写制御因子群のリクルートをクロマチン免疫沈降法で解析した。また、各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。

また、同じ核に発現する IκB 分子 IκBzeta の遅期誘導型遺伝子の発現誘導における役割を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

### C. 研究結果

MyD88 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による NF-κB 依存性の遺伝子の発現は障害されている。しかし、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 刺激すると TRIF 依存性の一見無意味なシグナルが活性化される。そこで、MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、早期誘導型と遅期誘導型の各遺伝子の mRNA の発現誘導をリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、遅期誘導型の遺伝子は MyD88 欠損マクロファージでは全く誘導されないが、早期誘導型の遺伝子はかなり減弱しているもののかすかに誘導された。このかすかな早期誘導型遺伝子の発現は、MyD88/TRIF 二重欠損マクロファージでは全く認められなかった。このように、早期誘導型遺伝子は、極めて発現誘導されやすく、一見無意味なシグナルが入ることによって、かすかに誘導されることが明らかになった。次に、早期誘導型、遅期誘導型遺伝子としてそれぞれ MIP2, Lcn2 遺伝子を代表として取り上げ、各遺伝子プロモーターへの、NF-κBp65 サブユニット、RNA

polymerase II, TBP のリクルートをクロマチン免疫沈降法により解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターへのこれら転写制御因子群のリクルートは刺激後 180 分より認められ、MyD88 欠損マクロファージでは全く認められない。一方、早期誘導型遺伝子のプロモーターへは、刺激後 15 分ときわめて早い時間から認められ、さらに MyD88 欠損マクロファージでも有意に認められた。この結果から、早期誘導型遺伝子のプロモーターは、転写制御因子がきわめてアクセスし易い状態であることが明らかになった。

そこで、次に各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターではヒストン H3 のメチル化は認められず、TLR 刺激 180 分から観察された。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターでは、メチル化が刺激以前から常に見られた。この結果から、早期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が常に開いた状況にあり、その結果転写制御因子がアクセスし易く、遺伝子発現が早期に誘導されることが明らかになった。一方、遅期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激によって構造変換を受け、転写制御因子がアクセスされやすくなること、そしてこのことが、遺伝子発現が遅れるメカニズムであることが明らかになった。

次に、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造変換に関与する分子について解析を行った。これまでに IκBNS と同じ核に発現する IκB 分子である IκBzeta が遅期誘導型遺伝子の発現に関与していることを示したきた。実際、IκBzeta 欠損マクロファージでは、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現が障害されている。IκBzeta は TLR 刺激により早期に誘導される遺伝子の一つである。そこでマクロファージに IκBzeta を常時発現させ、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現を解

析した。IkBzeta を発現させたマクロファージでは、遅期誘導型遺伝子の発現誘導が早く観察されるようになった。また、遅期誘導型遺伝子プロモーターへの転写制御因子のリクルート、メチル化の誘導も早く観察されるようになった。これらの結果から、IkBzeta は、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造を変換させることにより遺伝子発現の誘導に関与していることが明らかになった。

#### D. 考察

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- $\kappa$ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類される。遅期誘導型の遺伝子プロモーターはクロマチン構造が閉じていて、TLR 刺激により構造変換を受け、転写制御因子がアクセスする。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造は常に開いている。このことが、早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子群に分けられるメカニズムであることが考えられる。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IkBzeta が関与することも明らかになった。しかし、IkBzeta 自身には、クロマチン構造を変換させる酵素活性はない。IkBzeta と相互作用し、クロマチン構造を変換させる分子の同定をさらに行っていきたい。このように、自然免疫系の活性制御機構を解析し、その制御技術基盤を確立し、有効なアジュバントの創出に寄与したい。

#### E. 結論

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- $\kappa$ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類されるが、この相違は各遺伝子プロモーターのクロマチン構造の違いによることが明らかになった。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン

構造の変換に IkBzeta が関与することも明らかになった。

#### F. 研究成果

##### 1. 論文発表

1. Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., and Takeda, K.: TLR-dependent induction of IFN- $\beta$  mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 177, 7059-7066 (2006).
2. Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* in press
3. Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.: Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat. Immunol.* 7, 962-970 (2006).
4. Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S.: Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c<sup>+</sup> lamina

- propria cells. *Nat. Immunol.* 7, 868 - 874 (2006).
5. Yoshimatsu, T., Kawaguchi, D., Oishi, K., Takeda, K., Akira, S., Masuyama, N., and Gotoh, Y.: Non-cell-autonomous action of STAT3 in maintenance of neural precursor cells in the mouse neocortex. *Development* 33, 2553-2563 (2006).
  6. Miyatsuka, T., Kaneto, H., Shiraiwa, T., Matsuoka, T. A., Yamamoto, K., Kato, K., Nakamura, Y., Akira, S., Takeda, K., Kajimoto, Y., Yamasaki, Y., Sandgren, E. P., Kawaguchi, Y., Wright, C. V., and Fujitani, Y.: Persistent expression of PDX-1 in the pancreas causes acinar-to-ductal metaplasia through Stat3 activation. *Genes Dev.* 20, 1435-1440 (2006).
  7. Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A., and Kikutani, H.: Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 615-622 (2006).
  8. Nakamura, K., Miyagi, K., Koguchi, Y., Kinjo, Y., Uezu, K., Kinjo, T., Akamine, M., Fujita, J., Kawamura, I., Mitsuyama, M., Adachi, Y., Ohno, N., Takeda, K., Akira, S., Miyazato, A., Kaku, M. and Kawakami, K.: Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47, 148-154 (2006).
  9. Yu, Q., Tang, C., Xun, S., Yajima, T., Takeda, K. and Yoshikai, Y.: MyD88-dependent signaling for IL-15 production is important for the development of CD8aaand TCRgd intestinal intraepithelial T lymphocytes. *J. Immunol.* 176, 6180-6185 (2006).
  10. Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto, Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Notohara, K., Katayose, K., Okamura, H., Kahn, C. R., Noda, T., Takeda, K., Akira, S., Inui, A. and Kasuga, M.: Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab.* 3, 267-75 (2006).
  11. Kinoshita, D., Hirota, F., Kaisho, T., Kasai, M., Izumi, K., Bando, Y., Mouri, Y., Matsushima, A., Niki, S., Han, H., Oshikawa, K., Kuroda, N., Maegawa, M., Irahara, M., Takeda, K., Akira, S. and Matsumoto, M.: Essential role of I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  in thymic organogenesis required for the establishment of self-tolerance. *J. Immunol.* 176, 3995-4002 (2006). Santos, L. L., Milenkovski, G. P., Hall, P. H., Leech, M., Sharma, L., Takeda, K., Akira, S., Kitching, A. R., and Morand, E. F.: IL-18 is redundant in T-cell responses and in joint inflammation in antigen-induced arthritis. *Immunol. Cell Biol.* 84, 166-173

(2006).

12. Owaki, T., Asakawa, M., Kamiya, S., Takeda, K., Fukai, F., Mizuguchi, J. and Yoshimoto, T.: IL-27 suppresses CD28-mediated IL-2 production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J. Immunol.* 176, 2773-2780 (2006).

## 2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006. 9. 3-6, Hyogo, Japan
2. Kiyoshi Takeda, Innate immune responses against mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program, 41<sup>st</sup> Tuberculosis and leprosy research conference, 2006. 7. 19-21, Kagoshima, Japan
3. Kiyoshi Takeda, Role of TLR in innate and acquired phase of IBD. 2006 SMI Annual Meeting, 2006. 6. 1, San Francisco, USA
4. Kiyoshi Takeda, Nuclear IκB protein-mediated regulation of innate immune responses at the intestinal mucosa (symposium), 第36回日本免疫学会学術集会、2006. 12. 11-13、大阪
5. 香山尚子、竹田潔, Epigenetic regulation of Toll-like receptor-dependent gene expression. 第36回日本免疫学会学術集会、2006. 12. 11-13、大阪
6. 財賀大行、竹田潔, Lipocalin 2 mediates anti-mycobacterial immune responses. 第36回日本免疫学会学術集会、2006. 12. 11-13、大阪
7. 古賀律子、竹田潔, IFN-beta-dependent innate immune response against *Trypanosoma cruzi*, 第36回日本

免疫学会学術集会、

2006. 12. 11-13、大阪

8. 竹田潔, 自然免疫系によるトリパノソーマ原虫の感染制御機構, 第59回日本寄生虫学会、2006. 10. 28、福岡
9. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構 (シンポジウム), 第2回食品免疫学会、2006. 10. 23、東京
10. 竹田潔, 自然免疫系の活性制御機構 (特別講演), 第43回補体シンポジウム、2006. 8. 19、福岡
11. 竹田潔, 粘膜免疫の今後の展望 (イブニングセミナー), 第43回日本消化器免疫学会総会、2006. 8. 3-4、青森
12. 竹田潔, 自然免疫系による炎症制御, 日本動脈硬化学会、2006. 7. 13-14、東京
13. 竹田潔, I型IFNによる細胞内寄生性原虫の感染防御機構, 第71回インターフェロンサイトカイン学会、2006. 7. 7-8、兵庫

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## ドラッグ・デリバリー材料の改良と開発

分担研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所  
生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

**研究要旨：**ステロイド、タクロリムス、bis-phosphonate などの薬剤のドラッグデリバリー材料として、ポリ乳酸からなる生体吸収性の微粒子を作製した。ポリ乳酸をジクロロメタン(O)に溶解後、水溶性薬物を含む水溶液(W<sub>1</sub>)と混合することにより、W<sub>1</sub>/O エマルジョンを形成させた。さらに、得られた W<sub>1</sub>/O エマルジョンをポリビニルアルコール水溶液(W<sub>2</sub>)中に分散させることにより、(W<sub>1</sub>/O)/W<sub>2</sub> エマルジョンを形成させた。ジクロロメタンを蒸発させることにより、薬物が均一に内部に包埋されたポリ乳酸からなる微粒子を作製することができた。得られた薬物包埋ポリ乳酸微粒子について、光学顕微鏡を用いた観察ならびに in vitro における薬物の徐放試験を行った。作製条件を変化させることにより、ポリ乳酸微粒子の粒子径は変化した。また、in vitro での薬物放出挙動を調べたところ、微粒子の粒子径とポリ乳酸の種類によって薬物放出速度は変化した。異なる大きさの微粒子をマウスに経口投与したところ、直径 5 μm より小さい粒子が腸粘膜 M 細胞から取り込まれ、脾臓へデリバリーされていることがわかった。さらに、前年度に引き続き、ステロイド包埋ポリ乳酸微粒子の臨床応用を目的として、ラージスケールかつクリーンな環境で粒子径が 5 μm のポリ乳酸微粒子が調製できるように、その方法についてより詳しい検討を行った。

### A. 研究目的

本研究の目的は、腸粘膜 M 細胞を標的とした、ステロイド、タクロリムス、bis-phosphonate などの薬剤の徐放化のためのドラッグデリバリーシステム(DDS)素材を研究開発することである。この DDS システムのポイントは、目的の部位に薬物を到達させた後、徐放化することである。このためには、薬物のキャリアである粒子のサイズあるいは分解性などをコントロールすることが不可欠である。本研究では、ポリ乳酸からなる生体吸収性の微粒子をデザイン、作製するとともに、臨床応用へ向けたポリ乳酸微粒子の調製方法について検討した。前者に対しては、ポリ乳酸微粒子の作製と微粒子のサイズ、ならびに内部に包埋(内包)した薬物の徐放性の評価を行っている。まず、粒子作製時における条件を変化させ、その条件が

粒子サイズに与える影響について調べた。次に、作製した薬物包埋ポリ乳酸微粒子からの薬物の放出挙動について検討した。一方、後者に対しては、ラージスケール、かつヒトへの投与に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製法の検討を行った。

本研究の成果によって、腸粘膜 M 細胞への選択的な薬物のデリバリーと徐放化による効果的な薬物治療が可能となり、腸疾患治療への新たな可能性を開くことが期待できる。

### B. 研究方法

本研究では、生体吸収性高分子である、L-乳酸とグリコール酸との共重合体(PLGA)(乳酸:グリコール酸=50:50 重量平均分子:10,000)、ならびにポリ-D,L-乳酸(PDLLA) (重量平均分子

量:20,000)を用いた。薬物としては、水溶性ステロイド(デカドロン)を用いた。デカドロン包埋 PLGA 微粒子ならびに PDLLA 微粒子は W/O/W ダブルエマルジョンを用いた液中乾燥法により作製した。すなわち、PLGA および PDLLA (100 mg)をジクロロメタン 2 ml に溶解させ、デカドロン水溶液 30  $\mu$ l を加えて、超音波照射を 15 秒間行った。得られた W/O エマルジョンを異なる重合度をもつポリビニルアルコール (PVA) 水溶液 (重合度 250-1800、1 wt%、4 ml) に加え、ホモジナイズ処理 (8200 rpm、10 秒) 後、200 ml の PVA 水溶液中に分散させることにより W/O/W エマルジョンを形成させた。得られた W/O/W エマルジョンを 2 日間、室温で維持することで溶媒を蒸散させる、液中乾燥法により、デカドロン包埋ポリ乳酸微粒子を作製した。得られた微粒子は蒸留水で洗浄後、凍結乾燥した。本研究では、界面活性剤として用いた PVA の重合度(ユニチカ(株)から供与 ケン化度 = 78 ~ 88%) および PLGA のジクロロメタン溶液の濃度を変化させた。得られた微粒子サイズ分布を光学顕微鏡で調べた。また、微粒子を生理食塩水中にて振とうし、上清中に放出されたデカドロンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量することによって、微粒子からの薬物の徐放性を評価した。次に、同様の方法で、蛍光物質であるクマリンを含有した PDLLA 微粒子を作製した。これらの微粒子をマウスに経口投与した後の体内分布について調べた。

臨床応用を目指したラージスケールかつヒトへの投与に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製法の検討を行った。上述した粒子作製法の 5 倍容のスケールアップを行い、ホモジナイズ時間、ならびに超音波照射時間が微粒子

の収率ならびに粒子系に与える影響について検討した。一方、クリーンな環境として、病院薬剤部に設置されている経口投与薬剤の調剤に使用されている調剤室を利用した。その室内で、これまでの実験室とは異なる環境で微粒子の作製ができるように、微粒子作製器具および必要装置を整えらるとともに、微粒子作製操作上、必要となる事項について詳しく検討した。

### C. 研究成果

PVA の重合度ならびに PLGA の溶液濃度が微粒子サイズに与える影響を調べたところ、用いる PVA の重合度が大きくなるとともに、得られた微粒子サイズは増加することがわかった。PVA 水溶液の表面張力を測定したところ、PVA の重合度の低下とともに表面張力が小さくなる傾向が認められた。すなわち、表面張力の低下とともに、より大きな表面積をもつ直径の小さな PLGA 溶液滴が水中で安定に形成され、その結果、微粒子の粒子サイズが小さくなったと考えられる。一方、PLGA の濃度の低下とともに、得られた粒子サイズは小さくなった。これは、PLGA 溶液の粘度の低下が原因である。デカドロン包埋 PLGA 微粒子の走査型電子顕微鏡写真を示す。表面が平滑な真球の粒子が作製できていることがわかった。得られた異なる粒子径 (平均粒子サイズ 4、10、および 15  $\mu$  m) の微粒子からのデカドロン *in vitro* における徐放性を調べたところ、粒子径が小さいほど薬物の放出速度が速いことがわかった。また、デカドロン *in vivo* の徐放パターンに、高分子の分子量が影響を与えていることがわかった。分子量の増加とともに、薬物の徐放は抑制され、より長い期間の徐放化が可能となった。これは、分子量の

増加とともに、微粒子の分解が遅くなり、それにもなつて、包埋されているデカドロン放出が抑制されたことが原因であると考えられる。

次に、平均粒子サイズが 3、5、および 10  $\mu\text{m}$  のクマリン包埋 PLGA および PDLLA 微粒子のマウスへの経口投与 1 週間後、脾臓の凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、粒子サイズ 3  $\mu\text{m}$  の微粒子のみが脾臓で確認され、より大きなサイズをもつ粒子は異なった体内分布を示した。平均粒子径が 5  $\mu\text{m}$  以上になると腸粘膜局所にとどまり、その部位で薬を徐放化することがわかった。

一方、ラージスケールでポリ乳酸微粒子を作製した場合、微粒子作製過程で形成される W/O および W/O/W エマルジョンの液滴のサイズを小さくする必要がある。そこで、それぞれのエマルジョンを形成させる条件、すなわち、超音波照射時間、およびホモジナイザー処理の時間を変化させて、得られた微粒子の粒子径を評価したところ、超音波照射時間 240 秒、ホモジナイザー処理時間 90 秒の場合、スモールスケールと同様に、平均粒子径が 5  $\mu\text{m}$  程度の粒子を得ることができた。また、このようにして条件検討したラージスケールでの微粒子の作製を病院薬剤部内の経口投与薬剤の調剤室で行うことを計画し、調剤室内で薬物包埋ポリ乳酸微粒子の作製が可能な体制を整えることができた。調剤室の空気清浄度はクラス 100,000 であり、調剤室と外界との間に、前室ならびにエアロック室を設けて、比較的クリーンな環境を整えることができた。加えて、5 倍容で微粒子作製が可能なガラス器具、攪拌プロペラモーターの組み合わせ、最適化を行い、条件を設定した。また、得られた粒子の凍結乾燥装置の設置と、これまでの実験

室での作製条件との同等性を保証するための試験を行った。また、微粒子の回収率を上げるための条件設定を行い、70-80%の収率を達成することが可能となった。

#### D. 考察

腸粘膜 M 細胞は、細菌などを消化することなく取り込み、腸粘膜リンパ装置の免疫担当細胞に効率よく送り込む細胞である。この腸粘膜リンパ装置は、免疫反応の中心であり、潰瘍性大腸炎、クローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) や移植医療における問題の一つである Graft versus Host Disease (GVHD) などの病態において、中心的な役割を果たしていることが知られている。これまでに、われわれは、腸粘膜 M 細胞が特定の大きさの粒子を特異的に取り込むことに着目し、生体吸収性高分子であるポリ乳酸からなる微粒子を利用して、経口および経腸的に投与した微粒子が M 細胞から取り込まれた後、腸粘膜リンパ装置に特異的に分布すること、また、投与した薬剤が血中には流出しないことを示してきた。これらの結果を踏まえ、より効果的に腸粘膜 M 細胞をターゲティング可能な DDS システムの構築とその臨床応用を目指したラージスケールでの生産方法を確立することが本研究の目的である。そこで、まず、生体吸収性高分子の分子量や PVA の重合度などの物理化学的性質を変化させることにより、粒子径の異なる微粒子を作製し、微粒子の粒子径が薬物の徐放性や腸粘膜 M 細胞に対するターゲティング能などに与える影響について検討した。その結果、粒子径が大きくなるにつれて、より持続的に薬物を放出することが可能である反面、腸粘膜 M 細胞に対するターゲティング能が低下すること

がわかった。本研究では、投与した薬物が腸粘膜 M 細胞に取り込まれることが Key であることから、薬物徐放性を維持しながら、腸粘膜 M 細胞に取り込まれる、粒子径が 5 μm 以下の微粒子を DDS 素材として選択した。

次に、粒子径が小さい薬物包埋粒子を大量生産するために、ラージスケールでの微粒子の調製を行った。微粒子の粒子径を規定する工程は、W/O ならびに W/O/W エマルジョンを形成させる条件、ならびに PVA 水溶液の表面張力である。これらの観点から、エマルジョン形成の条件ならびに用いる PVA の分子量を変化させることにより、ラージスケールでも粒子径が 5 μm 以下の微粒子を 70~80% の高収率で得ることができた。また、同時に、臨床応用に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製を行う設備を整えることができた。今後は、より高収率で目的の粒子径をもつ微粒子を得ることができるよう、作製法の最適化を進めていく。また、異なる包埋量の微粒子を作製し、薬物の徐放性や血中への流出量などを検討することにより、より効率よく薬物治療が可能な DDS 素材を開発していく予定である。

## E. 結論

作製条件を変化させることにより、異なる粒子径ならびに薬物徐放性をもつ生体吸収性微粒子を作製することがで

きた。薬物徐放性ならびに腸粘膜 M 細胞へのターゲティング能は、微粒子の粒子径に依存し、ターゲティング能という観点から、5 μm 以下の微粒子が腸粘膜 M 細胞へのドラッグデリバリーに有効であることがわかった。また、臨床応用を目指したラージスケールでのポリ乳酸微粒子の作製条件について検討した。本研究を通じて確立した方法に基づいて、臨床応用に耐えうるクリーンな環境で微粒子を作製できるように施設の準備を整えた。前年度、今年度で得られたラージスケールでの最適微粒子作製の検討結果に基づいて、今後は、より詳細な検討を進めることにより、企業との連携に基づいた微粒子作製技術の改良とその治療学的な評価を行っていく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yasukawa T, Ogura Y, Kimura H, Sakurai E, and Tabata Y: Drug delivery from ocular implants. *Expert Opinion Drug Delivery*, 3(2), 261-273 (2006)

### 2. 学会発表

該当なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 経口投与された抗原の抗原提示に関わる樹状細胞の特性について

分担研究者 若月芳雄 京都大学医学研究科加齢医学講座 講師

**研究要旨：** 経口から投与された抗原は投与量により、様々な機序を経て最終的に抗原に対する、全身的な低応答性を誘導する。大量の抗原が投与される場合は、腸管より抗原が吸収されて、肝臓でも抗原感作が起こり、全身的な低応答性が誘導されると考えるがその機序は不明である。そこで、肝臓で抗原提示を行う樹状細胞の役割を検討した。経口より投与された抗原は、門脈周囲、一部類洞に存在する CD11c 陽性細胞に捕捉され抗原提示され、肝臓内で Th1 反応を抑制 することが判明した。

### A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎（以下炎症性腸疾患）の患者では特定の抗原特異性を有するTリンパ球の増加が腸管局所及び全身性に認められること、またそのTリンパ球機能を抑制するような免疫学的な処置により、実験腸炎を阻止ないし治療できること、さらに腸管腔内の主に微生物性抗原に対する宿主の細胞性免疫の調節異常が病原機序に大きく関わるということが報告されている。将来、炎症を惹起する抗原が同定できれば、これを、適切なドラッグデリバリーシステムを用いて経口から投与して、慢性炎症の成立・維持に関わるT細胞の機能を抑制 する治療法が考えられる。経口より投与された抗原の一部は腸管粘膜に存在するM細胞・樹状細胞により粘膜に付随したリンパ組織で抗原提示されるが、また相当量の抗原は門脈を経て肝臓に到達することを我々は報告している。一方、肝臓の門脈を経て肝内に移植された細胞は拒絶

反応を受けることなく長期にわたり生着すること、実験的に門脈を大静脈にバイパスすると、経口免疫寛容が起こらないことも知られている。

これらの事実は、経口から投与された抗原に対して成立する免疫学的低応答性の誘導・維持に肝臓も関与することを示唆していること、また将来、経口的に抗原を投与する場合の安全性を検討する必要があることから、我々は今回、免疫遺伝学的方法を用いて、抗原特異的な系で経門脈的に肝臓に到達する抗原を提示する樹状細胞の機能を解析した。

### B. 研究方法

卵白アルブミン(OVA)に特異的なT細胞抗原受容体を遺伝子導入により強制発現させたBALB/cマウスにOVA蛋白を経口より投与し、その局在を調べた。また抗原を投与したマウスの肝臓よりCD11c 陽性樹状細胞を精製しその機

能を、in vitro で、またナイーブな宿主に移入することにより、in vivo で調べた。

### C. 研究結果

経口から100mgのOVAを隔日に5回投与すると、肝臓内門脈周囲と一部類洞にCD11c陽性IAd陽性が集簇することが組織学的に認められた。多重染色フローサイトメトリーにて、CD11c, IAd, CD80, CD86は同一の細胞に染まり、F4-80陽性細胞(肝Kupper細胞)とは局在が異なり樹状細胞であると決定された。肝臓から精製された樹状細胞は、パイエル板あるいは脾臓由来の樹状細胞に比較してIL-12産生能は低下していた。OVA投与後のマウス肝臓より樹状細胞を精製し未感作マウスに移入したのちOVAで皮下免疫を行ったところ、OVA特異的なIgEの増加と総IgGの低下を認めた。この樹状細胞を用いてOVA特異的なT細胞をvitroで刺激すると、細胞増殖とIFN- $\gamma$ の産生を抑制しIL-4の産生を増強した。さらに、OVA特異的CD4T細胞を強制発現したマウスにリポゾーム包埋OVAを静注してTh1型免疫反応を肝臓で惹起するとマウスの肝細胞壊死(肝炎)が起こるが、このマウスに予め、OVAを経口投与した他のマウスの肝樹状細胞を移入しておく、肝炎は阻止された。このときの肝臓より精製したCD4T細胞のOVA特異的リンホカインを測定すると、IL-2, IFN- $\gamma$ の産生抑制とIL-4の産生増強が認められた。この現象と相関して肝臓内ではOVA特異的なCD4T細胞のアポトーシスの亢進が認められた。

### D. 考察

以上のことから、経口より抗原を投与すると一部抗原は肝門脈周囲と肝類洞内の樹状細胞に捕捉され局所で抗原特異的なT細胞に抗原提示してこれを活性化し、その結果おこる細胞死を惹起すること、同時にTh1型の細胞を除去してTh2型の細胞を賦活化するような反応を誘導することが示された。

### E. 結論

将来、炎症性腸疾患の原因となる抗原が同定され、これを適切なドラッグデリバリーシステムを用いて経口から投与することが可能になった暁には、抗原特異的なT細胞を体内から除去する、あるいはその反応性を抑制することが可能になる。このときに、腸管M細胞の捕捉を逃れて、腸管上皮より吸収された抗原の大部分は肝臓に到達する。今回の我々の検討により、肝臓の門脈周囲あるいは類洞内に存在する樹状細胞に抗原が捕捉されると、肝臓内でTh1型細胞の除去とTh2型細胞の選択がおこることが示された。このことはクローン病のようなTh1型細胞によりおこる慢性腸炎には炎症抑制に働くため治療上好都合であるが、一方潰瘍性大腸炎にとっては炎症の増悪あるいは抑制効果が認められない可能性が示唆された。すなわち腸管付随のリンパ組織で捕捉される以上の用量の抗原を投与することは潰瘍性大腸炎患者にとっては好ましくない可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Tomohiro Watanabe, Hiroaki  
Katsukura, Tsutomu Chiba, Toru  
Kita, and Yoshio Wakatsuki :  
Dietary Antigens Generate Liver  
Dendritic Cells Suppressing Th1  
type Hepatitis. ( in submission)

### 2. 学会発表

若月芳雄、勝倉浩昭、渡辺智裕、家  
森正志、森本正和、千葉 勉: 肝臓  
の免疫調節性 CD4T の誘導における  
自然免疫のはたす役割. 第43回日  
本消化器免疫学会、シンポジウム  
2007.8.3 弘前

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予 定を含む。）

該当無し

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル | 書籍全体の編集者 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|--------|----------|-----|------|-----|-----|-----|
| 該当なし |        |          |     |      |     |     |     |

### 雑誌

| 発表氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名              | 巻(号)       | ページ        | 出版年  |
|---|---|-------------------|------------|------------|------|
| Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, <u>Chiba T</u> , Okazaki K   | Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn' s disease. | Inflamm Bowel Dis | 12 (1)     | 62-69      | 2006 |
| Kou T, Nakase H, Tamaki H, Kudo T, Nishio A, <u>Chiba T</u>   | Cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis diagnosed by quantitative real-time PCR analysis.   | Dig Dis Sci       | 51 (6)     | 1052-1055  | 2006 |
| Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, <u>Chiba T</u> | Human Thioredoxin-1 Ameliorates Experimental Murine Colitis in Association with Suppressed MIF Production.  | Gastroenterology  | 131 (4)    | 1110-1121  | 2006 |
| Uza N, Nakase H, Kuwabara H, Fujii S, <u>Chiba T</u>  | Cecal cancer associated with long-standing Crohn' s disease.  | Lancet            | 368 (9549) | 1842       | 2006 |
| Nakase H, Yoshino T, Ueno S, Mikami S, Matsuura M, <u>Chiba T</u>   | Importance of early detection of cytomegalovirus infection in refractory inflammatory bowel disease.  | Inflamm Bowel Dis |            | (in press) | 2007 |



|  |  |                         |     |            |      |
|--|--|-------------------------|-----|------------|------|
| Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Mikami S, Tamaki H, Kasahara K, <u>Chiba T</u>                                       | Open label trial of Clarithromycin therapy in Japanese patients with Crohn's disease.  | J Gastroenterol Hepatol |     | (in press) | 2007 |
| Nakase H, Mikami S, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kasahara K, Yoshino T, Takeda Y, <u>Chiba T</u>                            | Rescue therapy with Tacrolimus for a patient with severe ulcerative colitis refractory to combination leukocytapheresis and high-dose of corticosteroid therapy. | Int Med                 |     | (in press) | 2007 |
| Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, Takeda Y, <u>Kiyono H</u> , McGhee JR, and Fujihashi K. | A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking.   | J. Immunol.             | 177 | 3045-3054  | 2006 |
| Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Takamura K, Park EJ, Kaisho T, Tanaka N, Kurono Y, <u>Kiyono H</u> .   | Uniqueness of lymphoid chemokine requirement for the initiation and maturation of NALT organogenesis.  | J. Immunol.             | 177 | 4276-4280  | 2006 |
| Maddaloni M, Staats HF, Mierzejewska D, Hoyt T, Robonson A, Callis G, Kozaki S, <u>Kiyono H</u> , McGhee JR, Fujihashi K, Pascual DW.          | Mucosal vaccine targeting improves onset of mucosal and systemic immunity to botulinum neurotoxin A.   | J. Immunol.             | 177 | 5524-5432  | 2006 |
| Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Tang BG, Seoh JY, Lipp M, <u>Kiyono H</u> , Miyasaka M. | CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes.  | J. Immunol.             | 176 | 803-810    | 2006 |
| Duverger A, Jackson RJ, van Ginkel FW, Fischer R, Tafaro A, Leppla SH, Fujihashi K, <u>Kiyono H</u> , McGhee JR, Boyaka PN.                    | Bacillus anthracis edema toxin acts as an adjuvant for mucosal immune responses to nasally administered vaccine antigens.  | J. Immunol.             | 176 | 1776-1783  | 2006 |

|   |  |                 |         |           |      |
|---|--|-----------------|---------|-----------|------|
| Nochi T, <u>Kiyono H.</u>   | Innate immunity in the mucosal immune system.  | Curr Pharm Des. | 12      | 4203-4213 | 2006 |
| 吉田理人、五十嵐脩、寺原和孝、清野宏  | 絨毛M細胞の形態と機能  | 臨床免疫            | 45      | 236-242   | 2006 |
| Kunisawa J, Gohda M, <u>Kiyono H.</u>   | Uniqueness of the mucosal immune system for the development of prospective mucosal vaccine.                    | 薬学雑誌            | 127 (2) | 319-326   | 2007 |
| Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., <u>Takeda, K.</u> , and Akira, S. | Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. | Nat. Immunol.   | 7       | 868-874   | 2006 |
| Yamamoto, M., Okamoto, T., <u>Takeda, K.</u> , Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K. J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Akira, S.                                 | Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling.                       | Nat. Immunol.   | 7       | 962-970   | 2006 |

|   |   |                                       |          |         |      |
|---|---|---------------------------------------|----------|---------|------|
| Takegahara, N.,<br>Takamatsu, H.,<br>Toyofuku, T.,<br>Tsujimura, T.,<br>Okuno, T., Yukawa,<br>K., Mizui, M.,<br>Yamamoto, M.,<br>Prasad, D. V.,<br>Suzuki, K., Ishii,<br>M., Terai, K.,<br>Moriya, M.,<br>Nakatsuji, Y.,<br>Sakoda, S., Sato,<br>S., Akira, S.,<br><u>Takeda, K.</u> , Inui,<br>M., Takai, T.,<br>Ikawa, M., Okabe,<br>M., Kumanogoh, A.,<br>and Kikutani, H. | Plexin-A1 and its interaction with DAP12<br>in immune responses and bone homeostasis.                   | Nat. Cell<br>Biol.                    | 8        | 615-622 | 2006 |
| Nemoto, Y., Kanai,<br>T., Makita, S.,<br>Okamoto, R.,<br>Totsuka, T., <u>Takeda,</u><br><u>K.</u> , and Watanabe, M.  | Bone marrow retaining colitogenic CD4+ T<br>cells may be a pathogenic reservoir for<br>chronic colitis. | Gastroent<br>erology                  | 132      | 176-189 | 2007 |
| Tsutomu Yasukawa,<br>Yuichiro Ogura,<br>Hideya Kimura, Eiji<br>Sakurai, and<br><u>Yasuhiko Tabata</u>   | Drug delivery from ocular implants  | Expert<br>Opinion<br>Drug<br>Delivery | 3<br>(2) | 261-273 | 2006 |