

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 千葉 勉

平成 20(2008)年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発	----- 1
千葉 勉	
II. 分担研究報告	
1. M細胞の同定・単離法の確立に関する研究	----- 19
清野 宏	
2. 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	----- 25
竹田 潔	
3. ドラッグ・デリバリー材料の改良と開発	----- 29
田畑泰彦	
4. 腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発に 関する研究	----- 33
若月芳雄	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 37

腸粘膜 M 細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発

主任研究者 千葉 勉 京都大学医学研究科消化器内科学講座・教授

研究要旨：GVHD や炎症性腸疾患に対するより効果的かつ副作用の少ない薬剤を開発する目的で、腸粘膜 M 細胞を標的としたドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発をおこない、ヒトへの投与試験をおこなった。その結果以下の成績が得られた。（1）デキサメサゾン含有ポリ乳酸マイクロスフェア（PL-MS）の作製条件を変化させることにより、薬物徐放性及び腸粘膜 M 細胞へのターゲティング能を検討し、 3μ 以上 5μ m 以下の PL-MS が M 細胞へのターゲティングに有効であることを見出した。（2）臨床応用に耐えうるクリーンな環境におけるラージスケールでの PL-MS 作製体制を構築した。（3）PL-MS がターゲットとする M 細胞について、基礎的検討をおこない、パイエル板 M 細胞に特異的に発現する PGRP-S がパイエル板 B 細胞における IgA 産生を抑制的に制御して、抗原非特異的な抗体産生を抑制している可能性が示唆された。（4）炎症性腸疾患と深く関る Th17 細胞の発育、維持には必要な新たな常在菌由来物質の存在が示唆された。今後これらの制御も治療のターゲットとなりうると考えられた。（5）ステロイド含有 PL-MS の効果を高めるために、IL10 発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンの同時投与、およびステロイドに bifidobacterium lognam を同時に包埋して投与する方法を考案し、動物実験で DSS, TNBS 腸炎に対してその効果を検討した。その結果ステロイド PL-MS 単独の場合と比較してその腸炎抑制効果はより強力であった。（6）デキサメサゾン包埋 PL-MS を用いて 16 例の中等症以上の潰瘍性大腸炎患者に対して治療を行ったところ、4 週間で全員改善し、CAI スコアは平均 11.6 点から 6.7 へと改善した。

【分担研究者】

清野 宏

東京大学医科学研究所 教授

竹田 潔

大阪大学医学系研究科 教授

田畑泰彦

京都大学再生医科学研究所 教授

若月芳雄

京都大学医学研究科 講師

A. 研究目的

炎症性腸疾患や GVHD (Graft vs Host Disease)は、それぞれ自己の免疫細胞の異常反応や、移植された際に導入された血球細胞による異常な免疫反応により生じる炎症性の腸病変であるが、それぞれ食生活の欧米化を含めた環境の変化、および移植医療の普及、によってともに増加傾向にある。これらの疾患の治療においては現在、ステロイドをはじめとした免疫抑制

薬投与がその中心をなしている。しかしながらこれら免疫抑制薬は、全身に投与した場合その免疫抑制作用により感染症などの重篤な副作用を来しやすい。またこのために全身投与では薬剤を十分量投与できず、その結果期待される効果がえられない場合が多い。こうした問題を解決するためには、炎症の存在する腸粘膜へ特異的に薬物を集積させるドラッグデリバリーシステム (DDS) を確立することが必要となる。

腸粘膜 M 細胞は腸内細菌などの抗原を消化することなくそのまま腸粘膜に取り込ませて、パイエル板などのリンパ装置に存在する抗原提示細胞に抗原を提示させる細胞である。そこで私達は、この M 細胞が一定の大きさの粒子を特異的に取り込むことに着目して、ポリ乳酸マイクロスフェア (PL-MS) による M 細胞を標的とした DDS を確立した。今回この PL-MS に薬剤を包埋することによって、腸粘膜のリンパ装置に薬物を特異的に集積させる DDS の開発を試み、実際にヒトへの臨床試験をおこなった。

B. 研究方法

(1) PL-MS 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。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。ポリ-D,L-乳酸 (PDLLA) (重量平均分子量: 20,000) に水溶性ステロイド(デカドロン)を加え、W/O/W ダブルエマルジョンを作成した。得られた W/O/W エマルジョンを 2 日間室温で維持し、液中乾燥法によりステロイド包埋 PL-MS を作製した。本研究では、界面活性剤として用いた PVA の重合度および 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ステロイドを HPLC で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、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 (田畑)。

(2) 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(田畑)。

- (3) パイエル板のM細胞と、共同研究者の清野らの発見した絨毛M細胞について、これを回収してDNAアレイをおこない、M細胞特異的な分子として、細菌表層成分との結合分子と考えられるPeptidoglycan Recognition Protein S (PGRP-S)を得た。このPGRP-S KOマウスを作成し、M細胞反応レクチンであるUEA-1を用いてin situハイブリダイゼーション法および免疫組織学染色法により発現を確認した。また本マウスにMicrococcus luteusを経口感染

させた。さらにPGRP-Sの免疫生物学的機能をフローサイトメトリー、ELISA法、ウエスタンブロット法を用いた細胞内シグナルの活性化の測定、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織染色切片の観察により解析した(清野)。

- (4) 近年新たなヘルパーT細胞のサブセットとして同定されたTh17細胞は、炎症性腸疾患の発症にも深く関与していることが明らかになっている。Th17細胞は正常では種々のリンパ組織にはほとんど観察されないが、腸管の粘膜固有層に多数存在している。そこで、腸管粘膜固有層にTh17細胞を誘導しうる樹状細胞がないかを検討した。Toll-like receptor (TLR)を介したシグナルの消失するMyD88/TRIF二重欠損マウスや、腸内常在菌のいないgerm freeマウスを用いて、腸管粘膜固有層でのIL-17産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。大腸の粘膜固有層から、CD11c陽性樹状細胞を単離し、脾臓由来のナイーブCD4陽性細胞と共培養した後CD4T細胞を回収し、PMA+ionophore刺激によるIL-17発現をreal-time Q-PCR法で解析した。さらに、CD11c陽

性細胞の中で、CD70high, CD70low のサブセットを FACS ソーティングにより精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 陽性細胞と共培養し、CD4 T 細胞の PMA+ionophore 刺激による IL-17 発現を解析した。CD70high, CD70low 樹状細胞での IL-6 や TGF-beta 活性化に関わるインテグリン alphaV, beta8 の発現も解析した (竹田)。

- (5) ステロイド包埋 PL-MS の効果を増強するための手段として IL10 の発現プラスミドベクターをカチオン化ゲラチンと結合させて、これをステロイド包埋 PL-MS とともに投与して、その炎症性腸疾患に対する効果を動物実験で検討した。またステロイド包埋 PL-MS にプロバイオテイクスである *Bifidobacterium lognam* を同時に包埋し、本 PL-MS の炎症性腸疾患に対する効果をステロイド単独 PL-MS と比較した (千葉、若月)。
- (6) 5ASA 製剤および経口ステロイド剤にて緩解が得られていない中等症以上の潰瘍性大腸炎患者 (CAI スコア 4 点以上) を対象にデキサメサゾン包埋 PL-MS (10 μ g/ml PL-MS/kg bw) を一

日一回注腸投与して、その効果を検討した (千葉)。

C. 研究結果

- (1) 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した。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 溶液滴が安定に形成され、その結果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。得られた異なる粒子径 (平均粒子サイズ 4、10、および 15 μ m) の微粒子からのデカドロンの *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。

次に、平均粒子サイズが 3、5、および 10 μm 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 μm 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。腸管からの吸収効率は粒子径 3.5 μm あたりが最もよかったが、粒子径が 5 μm 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。

- (2) 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（超音波照射時間、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 μm 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。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。

- (3) (a) DNA マイクロアレイを用いた包括的遺伝子プロファイリングの結果から PGRP-S が M 細胞特異的に発現する遺伝子であることが示唆された。そこで *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、mRNA の発現を確認した。次に PGRP-S に対するポリクローナル抗体を作製し、タンパク質レベルの発現を調べたところ、パイエル板 M 細胞における発現を認めるが、絨毛 M 細胞には発現していないことが明らかとなった。
- (b) PGRP-S KO マウスを用いた解析により、PGRP-S が M 細胞の発生・分化ならびに抗原取り込み能に影響を与えることはなかった。しかしながら、グラム陽性菌であ

る *Micrococcus. luteus* で経口免疫すると、野生型マウスと比べ、パイエル板 B 細胞の活性化が PGRP-S KO マウスの方で強く、IgA も多く産生されることが分かった。また野生型のパイエル板 B 細胞を単離し、PGF 刺激下に IgA 産生を誘導すると、精製リコンビナント PGRP-S を加えたものは、IgA 産生が抑制された。またその際、PGRP-S が TLR2 シグナルの下流で NF- κ B の活性化を抑制していることが明らかになった。

- (4) IL-17 陽性 CD4 細胞は、脾臓、腸管リンパ節、パイエル板などのリンパ組織では 1%程度しか認められないが、小腸、大腸粘膜固有層では、15-30%もの CD4 細胞が IL-17 を産生していた。腸管の粘膜固有層の CD4 陽性細胞を精製し、Th17 細胞のマーカーである IL-17A, IL-17F, IL-22, Rorgt の mRNA の発現を real time Q-PCR で解析しても、これらの発現は腸管リンパ節由来の細胞よりも極めて高かった。TLR シグナルの消失する MyD88/TRIF doubleKO マウスでも、腸管の粘膜固有層の IL-17 産生細胞は正常マウスと同様に存在した。一方、腸管細菌叢のない germ free マウスでは、IL-17 産生 CD4 細胞

は激減していた。以上より Th17 細胞は腸内常在菌依存性、TLR 非依存性に誘導されることが示唆された。

次に、腸管粘膜固有層に Th17 分化を誘導する樹状細胞が存在している可能性を解析した。大腸粘膜固有層より、CD11c 陽性細胞を精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 T 細胞と 5 日間共培養し再刺激による IL-17 の発現を解析すると、脾臓の CD11c 陽性細胞と共培養した CD4 細胞では IL-17 の発現は誘導されないが、大腸粘膜固有層の CD11c 陽性細胞と共培養した細胞は IL-17 を強く発現していることが明らかになった。この結果から、腸管粘膜固有層の樹状細胞には、Th17 細胞の分化を誘導する活性があることが示唆された。次に腸管粘膜固有層の CD11c 陽性細胞を種々の細胞表面マーカーで染色した。その結果、腸管粘膜固有層の CD11c 陽性細胞は、脾臓の CD11c 陽性細胞と異なり、CD70low, CD70high のサブセットが存在していることが明らかになった。そこで、CD70low, CD70high 樹状細胞を大腸粘膜固有層より精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 T 細胞と 5 日間共培養し、再刺激による IL-17 の発現を解

析した。その結果、CD70^{low}細胞と共培養したT細胞では、IL-17の発現は誘導されないが、CD70^{high}樹状細胞と共培養したT細胞ではIL-17の発現が強く誘導された、またCD70^{high}樹状細胞は、CD70^{low}樹状細胞に比べて、IL-6やTGF-beta活性化に関わるインテグリンalphaV, beta8の発現が亢進していることが明らかになった。IL-6, alphaV, beta8の発現は、germ freeマウス由来のCD70^{high}細胞では、SPFマウスに比べて低下していた。これらの結果から、CD70^{high}樹状細胞は腸内常在菌によりIL-6, alphaV, beta8を発現し、Th17細胞分化を誘導することが示唆された。

- (5) DSS腸炎、およびTNBS腸炎マウスに対して、IL10発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンをステロイドPL-MSと同時に投与させた場合、ステロイドPL-MS単独投与に比較してその腸炎抑制効果は著明に増強し、同時に腸粘膜における種々の炎症性サイトカインの発現、炎症細胞浸潤は減少した。また同じDSS腸炎、TNBS腸炎マウスに対して、ステロイド包埋PL-MSにbifidobacterium lognamを同時

に包埋して投与すると、その腸炎の抑制効果はステロイド単独の場合と比較してより強力であった。その際腸粘膜のサイトカインプロファイルを検討すると、IFN γ およびIL17産生の低下、逆にIL4産生の増加が観察された。

- (6) 現在までに十分なインフォームドコンセントを得た後、ヒトへのステロイド包埋PL-MS投与を16例の潰瘍性大腸炎患者に対しておこなった。平均年齢は33歳(男9、女7例)で、全員全結腸型で、CAIスコアは平均11.6点であった。その結果4週間投与にて炎症は全例で改善傾向を示し、CAIスコアは6.7へと改善した。またステロイド投与量も18.5mgから9.2mgまで減量できた。さらに投与期間中、投与後も特にステロイド投与によると考えられる副作用は認めなかった。

D. 考察

今回私たちはまずPL-MSの改良を試みた。そして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を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 3μ 以上 $5\mu\text{m}$ 以下の微粒子を DDS 素材として選択した。

次に、前年度に引き続き、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 $5\mu\text{m}$ 以下の微粒子を 70~80% の高収率で得ることができた。加えて、粒子径と収率の再現性の確認を行った。また、臨床応用に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製設備内においても、同様の粒子作製が可能かどうかの確かめと、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に、作製法の最適化

を進めた。

このように改良したデキサメサゾン包埋 PL-MS を用いて 16 例の中等症以上の潰瘍性大腸炎患者に対して治療を行ったところ、4 週間で全員改善を示し、CAI スコアは平均 11.6 点から 6.7 へと改善した。またステロイド投与量も 18.5mg から 9.2mg まで減量できた。さらに投与期間中、投与後も特にステロイド投与によると考えられる副作用は認めなかった。以上からデキサメサゾン PL-MS は、潰瘍性大腸炎患者に対する、より副作用が少なく有効な治療法と考えられた。今後本薬剤を用いた大規模臨床試験、あるいは医師主導臨床治験を計画したいと考えている。

私たちはさらに、本ステロイド含有 PL-MS の効果を高めるために、IL10 発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンの同時投与、およびステロイド包埋 PL-MS に *bifidobacterium lognam* を同時に包埋して投与する方法を考案し、動物実験で DSS, TNBS 腸炎に対してその効果を検討したが、これらによる腸炎の抑制効果はステロイド PL-MS 単独の場合と比較してより強力であった。このことから今後ステロイド PL-MS にこれらを併用する方法もヒトで検討をおこなうことを計画している。

今回私たちは PL-MS がターゲット

とする M 細胞について、さらなる基礎的検討をおこなった。その結果 PGRP-S はパイエル板 M 細胞に発現し、絨毛 M 細胞には発現していないことから、両者を区別して単離する新しい指標となることが示唆された。またパイエル板 B 細胞における IgA 産生を抑制的に制御することにより、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞や T 細胞を介さない抗原非特異的な抗体産生を抑制している可能性が示唆された。分子生物学的に PGRP-S が TLR2 シグナルの下流で NF- κ B の活性化を抑制することにより IgA へのクラススイッチを制御していることも考えられた。

さらに腸炎発症における免疫機序の解析をおこなったところ、慢性炎症性腸疾患と深く関わる新たなヘルパー T 細胞サブセット Th17 細胞が、腸管粘膜固有層に多数存在しているが、これは腸管粘膜固有層に局在しているユニークな樹状細胞が Th17 細胞分化を常在菌依存性に誘導するためであることが明らかになった。この誘導は、常在菌依存性であるが、TLR 非依存的であり、今後、常在菌由来のどのような因子が Th17 細胞分化を司っているかを明らかにして行きたい。私たちは予備実験でこの細菌因子が ATP であることをつかんでいるが、今後本治療法を用いて、この経路を制御する方法も

考慮する必要がある。

以上、今回の研究において、デキサメサゾン含有 PL-MS の注腸投与がヒトのステロイド抵抗性潰瘍性大腸炎の治療に有効であることが示された。今後、基礎的研究、さらに本法の効果をさらに高める臨床的な検討が必要である。

E. 結論

- (1) 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 PL-MS を作製した。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という観点から、5 μ m 以下の粒子が M 細胞へのターゲッティングに有効であった。
- (2) 臨床応用を目指したラージスケールでの PL-MS の作製条件について検討し、臨床応用に耐えるクリーンな環境、ラージスケールでの PL-MS の作製体制を構築した。
- (3) PL-MS がターゲットとする M 細胞について、さらなる基礎的検討をおこない、M 細胞特異的に発現する PGRP-S がパイエル板 B 細胞における IgA 産生を抑制的に制御して、抗原非特異的な抗体産生を抑制している可能性が示唆された。

- (4) 炎症性腸疾患と深く関る Th17 細胞の発育、維持には常在菌の存在が必須であり、またその効果は TLR 非依存性であることから、Th17 分化における、新たな細菌由来物質の存在が示唆された。今後これらの制御も治療のターゲットとなりうると考えられた。
- (5) ステロイド含有 PL-MS の効果を高めるために、IL10 発現プラスミドを結合させたカチオン化グラチンの同時投与、およびステロイド包埋 PL-MS に *bifidobacterium lognam* を同時に包埋して投与する方法を考案し、動物実験で DSS, TNBS 腸炎に対してその効果を検討した。その結果ステロイド PL-MS 単独の場合と比較してその腸炎抑制効果はより強力であった。
- (6) デキサメサゾン包埋 PL-MS を用いて 16 例の中等症以上の潰瘍性大腸炎患者に対して治療を行った。4 週間で全員改善を示し、CAI スコアは平均 11.6 点から 6.7 へと改善した。以上からデキサメサゾン PL-MS は、潰瘍性大腸炎患者に対する、より副作用が少なく有効な治療法と考えられた。

F. 健康危険情報

主任研究者、分担研究者も含め、該当する危険情報はなかった。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Nanakin A, Fukui H, Fujii S, Sekikawa A, Kanda N, Hisatsune H, Seno H, Konda Y, Fujimori T, Chiba T: Expression of the REG IV gene in ulcerative colitis. *Lab Invest* 87:304-314:2007.
2. Nakase H, Yoshino T, Ueno S, Uza N, Mikami S, Matsuura M, Chiba T: Importance of early detection of cytomegalovirus infection in refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 13:364:2007.
3. Nakase H, Mikami S, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Inoue S, Kitamura H, Kasahara K, Yoshino T, Takeda Y, Chiba T: Rescue therapy with Tacrolimus for a patient with severe ulcerative colitis refractory to combination leukocytapheresis and high-dose of corticosteroid therapy. *Int Med* 46:717-720:2007.
4. Inoue S, Nakase H, Matsuura M, Ueno S, Uza N, Kitamura H, Mikami S, Tamaki H, Kasahara K, Chiba T: Open label trial of Clarithromycin therapy in

- Japanese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22:984-988:2007.
5. Matsuura M, Nakase H, Nakamura F, Ueda Y, Mikami S, Yoshino T, Ueno S, Uza N, Chiba T: Ileal ulcers induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Gastroenterol Hepatol* 22:1346:2007.
 6. Mikami S, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Sakurai T, Chiba T: Involvement of cytomegalovirus infection in the ileal lesions of the patient with Behcet's disease. *Inflamm Bowel Dis* 13:802-803:2007.
 7. Yoshino T, Nakase H, Ueno S, Uza N, Inoue S, Mikami S, Matsuura M, Ohmori K, Sakurai T, Nagayama S, Hasegawa S, Sakai Y, Chiba T: Usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis refractory to immunosuppressive therapies. *Inflamm Bowel Dis* 13:1516-1521:2007.
 8. Kasahara K, Nakase H, Uza N, Ueno S, Matsuura M, Mikami S, Inoue S, Chiba T: Administration of PEG-interferon to a patient with UC and chronic hepatitis C correlated with reduced colonic inflammation and reversal of peripheral T cell Th1/Th2 ratios. Case reports in *Gastroenterol* 2008(in press).
 9. Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, and Kiyono H. A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J. Exp. Med.* 204 : 2789-2796. 2007.
 10. Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Ishikawa I, Ogahara I, Kim N, Shimizu M, and Kiyono H. Sphingosine 1-phosphate dependence in the regulation of lymphocyte trafficking to the gut epithelium. *J. Exp. Med.* 204 : 2335-2348. 2007.
 11. Kurashima Y, Kunisawa J, Higuchi M, Gohda M, Ishikawa I, Takayama N, Shimizu M, and Kiyono H. Sphingosine 1-phosphate-mediated trafficking of pathogenic Th2 and mast cells for the control of food allergy. *J. Immunol.* 179 : 1577-1585. 2007.
 12. Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, and

- Kiyono H.** Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104 : 10986-10991. 2007.
13. Nagai S, Mimuro H, Yamamda T, Baba Y, Moro K, Nochi T, **Kiyono H.** Suzuki T, Sasakawa C, and Koyasu S. Role of Peyer's patches in the induction of Helicobacter pylori-induced gastritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104 : 8971-8976. 2007.
14. Fukuyama S, and **Kiyono H.** Neuroregulator RET initiates Peyer's-patch tissue genesis. Immunity 26 : 393-395. 2007.
15. Maikita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Yamamoto M, **Kiyono H.** and Watanabe M. Intestinal lamina propria retaining CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. J. Immunol. 178 : 4937-4946. 2007.
16. McGhee JR, Kunisawa J, and **Kiyono H.** Gut lymphocyte migration: we are halfway 'home'. Trends Immunol. 28 : 150-153. 2007.
17. Kunisawa J, Takahashi I, and **Kiyono H.** Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. Immunol. Rev. 215 : 136-153. 2007.
18. 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 109 : 3749-3756. 2007.
19. 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.
20. Nakamura, K., Miyazato, A., Gang, X., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., **Takeda, K.**, Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Suzuki, K., Fujita, J., Kaku, M., and Kawakami, K: Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. J. Immunol. in press
21. Nishimura, J., Saiga, H., Sato, S., Okuyama, M., Kayama, H., Kuwata, H., Matsumoto, S., Nishida, T., Sawa, Y., Akira, S., Yoshikai, Y.,

- Yamamoto, M., and Takeda, K. :
Potent antimycobacterial
activity of mouse secretory
leukocyte protease inhibitor. *J.*
Immunol. in press
22. Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai,
T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S.,
Duan, X., Chou, B., Ishida, H.,
Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K.,
J., Coban, C., Akira, S. Takeda,
K., Yasutomo, K., Torii, M., and
Himeno, K. : Malaria parasites
require TLR9 signaling for immune
evasion by activating regulatory
T cells. *J. Immunol.* in press
23. Yamamoto, M., Uematsu, S.,
Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato,
S., Kumar, H., Satoh, T., Saitoh,
T., Takeda, K., Ishii, K. J.,
Takeuchi, O., Kawai, T., and Akira,
S. : Enhanced TLR-mediated NF-IL6
dependent gene expression by
Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204,
2233-2239 (2007).
24. Sakamori, R., Takehara, T.,
Ohnishi, C., Tatsumi, T., Ohkawa,
K., Takeda, K., Akira, S., Hayashi,
N. : STAT3 signaling within
hepatocytes attenuates systemic
inflammatory response and
lethality in septic mice.
Hepatology 46, 1564-1573 (2007).
25. Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S.,
Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda,
K., and Watanabe, M. : Bone marrow
retaining colitogenic CD4⁺ T cells
may be a pathogenic reservoir for
chronic colitis.
Gastroenterology 132, 176-189
(2007).
26. Watanabe T, Katsukura H, Chiba T,
Kita T, Wakatsuki Y. Periportal and
sinusoidal liver dendritic cells
suppressing T helper type 1-mediated
hepatitis. *Gut* 2007 Oct;56(10):
1445-51.
27. Watanabe T, Kudo M, Chiba T,
Wakatsuki Y. Molecular mechanisms
of portal vein tolerance. *Hepatol Res.*
2007 Dec 6;
- 2) 学会発表
1. 吉野琢哉、仲瀬裕志、千葉 勉: 難治
性潰瘍性大腸炎におけるサイトメガ
ロウイルス感染 早期診断のための
real-timePCR 法の有用性について。
第 104 回日本内科学会講演会・一般
演題ポスターセッション, 2007.4.3,
大阪。
2. 仲瀬裕志、宇座徳光、千葉 勉: 免疫
抑制剤投与による難治性クローン病
患者に対する長期緩解維持効果。第
93 回日本消化器病学会総会・パネル
ディスカッション, 2007.4.21, 青森。
3. Takuya Yoshino, Hiroshi Nakase,
Satoko Inoue, Hiroshi Kitamura,

- Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Sakae Mikami, Minoru Matsuura, Tsutomu Chiba: The usefulness of quantitative real-time PCR assay for early detection of cytomegalovirus in patients with UC refractory to immunosuppressive therapies. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute • poster sessions, 2007.5.21, Washington DC.
4. Hiroshi Kitamura, Hiroshi Nakase, Yasuhiro Takeda, Takuya Yoshino, Katsuhiko Kasahara, Satoru Ueno, Norimitsu Uza, Satoko Inoue, Sakae Mikami, Minoru Matsuura, Yoshihiro Ishida, Kazuhiro Nagata, Tsutomu Chiba: The critical role of heat shock protein 47 in intestinal fibrosis associated with Inflammatory Bowel Diseases. Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute • oral sessions, 2007.5.23, Washington DC.
5. 武田康宏、仲瀬裕志、千葉 勉: 粘膜免疫制御の観点からみた *Bifidobacterium longum*(BB536)の IBD に対する治療機序の解明. 第 49 回日本消化器病学会大会・シンポジウム, 2007.10.18, 神戸.
6. Nochi T, Yuki Y, Takagi H, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, and Kiyono H. Development of needle-free vaccine: rice-based vaccine induced protective immunity against cholera toxin. The American Association of Immunologist (AAI), U.S.A. May 18th, 2007.
7. Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Gohda M, Ishikawa I, Ogahara I, Kim N, Shimizu M, and Kiyono H. Small and large intestinal intraepithelial T lymphocytes show distinct dependency on shingosine 1-phosphate. The American Association of Immunologist (AAI), U.S.A. May 18th, 2007.
8. Nagatake T, Fukuyama S, Kim DY, Takamura K, and Kiyono H. Presence of Id2- and ROR γ t-independent lymphoid tissue organogenesis. The American Association of Immunologist (AAI), U.S.A. May 18th, 2007.
9. Kiyono H. Airway Immunity: Uniqueness in Organogenesis Program and Antigen-Sampling

- System for Mucosal Vaccine Development. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.
10. Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Igarashi O, and Kiyono H. New generation of mucosal vaccine: Novel M cell specific carbohydrate-targeted vaccination is effective for the induction of antigen-specific immune responses. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.
 11. Kunisawa J, Higuchi M, Kurashima Y, Gohda M, Gotoh Y, Ishikawa I, Ogahara I, and Kiyono H. Microbe and sphingosine 1-phosphate regulate the trafficking of distinct subsets of large intestinal intraepithelial T lymphocytes. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.
 12. Gohda M, Kunisawa J, Kurashima Y, Higuchi M, Ishikawa I, Miura F, Ogahara I, and Kiyono H. A pivotal role of sphingosine 1-phosphate in the regulation of peritoneal B cell trafficking and subsequent intestinal IgA production. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.
 13. Tanaka N, Fukuyama S, Nagatake T, Takamura K, Kurono Y, and Kiyono H. CXCR5/CXCL13-independent nasal B1 cells for the induction of antigen-specific secretory IgA responses. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.
 14. Kurashima Y, Kunisawa J, Higuchi M, Gohda M, Ishikawa I, Ogahara I, and Kiyono H. Type 1 sphingosine 1-phosphate receptor-expressed intraepithelial regulatory T cells for the large but not small intestinal immunity. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.
 15. Takahashi I, Koh M, Park E, Fukuyama S, Tsuruda K, Shimazu A, Kawahara K, Tobiume K, and Kiyono H. Sustained intestinal MICA expression prevents Th1 and Th2 mediated colitis. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 10th, 2007.
 16. Igarashi O, Terahara K, Nochi T,

- Kurokawa S, Yuki Y, Domino SE, and Kiyono H. The $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase-1(FUT1) identifies typical follicle-associated epithelium (FAE) M cells. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 11th, 2007.
17. Terahara K, Igarashi O, Yoshida M, Nochi T, Gotoh Y, Yuki Y, and Kiyono H. Villous M cells show an intermediate gene expression profile between Peyer's patch M cells and enterocytes. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 11th, 2007.
18. Nagatake T, Fukuyama S, Kim DY, Takamura K, and Kiyono H. Tissue genesis of tear duct-associated lymphoid tissue is independent from the organogenesis-associated transcriptional gene regulation. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 11th, 2007.
19. Higuchi M, Kunisawa J, Gohda M, Kurashima Y, Ishikawa I, Miura F, Ogahara I, and Kiyono H. Impaired intestinal IgA responses by inhibiting sphingosine 1-phosphate-mediated B cell trafficking. 13th International Congress of Mucosal Immunology, Tokyo, July 11th, 2007.
20. Kiyono H. Mucosal Mindedness for Productive Immunity and Vaccine. 6th Annual Systems Integration in Biodefence, U.S.A. August 13th, 2007.
21. Kiyono H. Recent progress in the development of M-cell targeted vaccines. MPI Infection Biology Alumni Meeting, Berlin, August 16th, 2007.
22. Yuki Y, Nochi T, Takagi H, Yang, L, Masumura T, Mejima M, Matsumura A, Nakanishi U, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, and Kiyono H. A needle- and cold chain-free rice based vaccine against cholera toxin. Keystone Symposia, South Africa, October 10th, 2007.
23. Kiyono H. New Gravitation in Mucosal Immunology: from Organogenesis to Allergy. International Symposium on Immune Regulation in Clinical Disease, Korea, November 2007.
24. Kiyono H. The Mucosal Immune System for the Development of Needle and Cold Chain-Free Vaccine. Vaccine Congress in Amsterdam, Amsterdam,

- December 2007.
25. Kiyono H. NALT and GALT Horizons for Mucosal Immunity. The Korean Association of Immunobiologists 55th Fall Conference, Korea, November 6th, 2007.
 26. Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear I κ B proteins. 8th International Society of Exercise and Immunology Symposium, 2007.10.25, Sendai, Japan
 27. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, 2007. 10.29, Tsukuba, Japan
 28. 竹田潔, 自然免疫系による結核感染防御機構, 第60回日本細菌学会九州支部総会、2007.10.12、長崎
 29. Kiyoshi Takeda, Lipocalin 2 mediates host defense against Mycobacterial infection. 42th US-Japan Conference on Tuberculosis and leprosy, 2007.9.11-14, Henan, China
 30. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構第28回日本炎症・再生医学会、2007.8.2、東京
 31. 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
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
特許取得および実用新案登録など、該当なし。

腸粘膜 M 細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発

分担研究項目：M 細胞の同定・単離法の確立に関する研究

分担研究者： 清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

研究協力者： 武富孝治 東京大学医科学研究所 研究員

研究要旨：腸管の粘膜上皮層には抗原取り込み能を有する M 細胞が存在する。この M 細胞特異的に存在する遺伝子プロファイリングを作製し、その中の 1 つである Peptidoglycan Recognition Protein-S (PGRP-S) の M 細胞におけるタンパク質レベルでの発現ならびに M 細胞を介した粘膜免疫学的影響を解析した。PGRP-S は M 細胞の発生や機能には影響を与えないが、PGRP-S と結合する細菌表層成分 Peptidoglycan (PGN) を有するグラム陽性細菌で経口免疫すると、M 細胞を介した抗原特異的免疫誘導における B 細胞の活性化および IgA 産生を抑制的に制御していることが確認された。

A. 研究目的

腸管 M 細胞に特異的に発現する分子の同定とその機能および粘膜免疫に与える影響を解析する。当研究室 M 細胞遺伝子プロファイリングデータベースの中から細菌表層成分との結合分子と考えられる PGRP-S について検討を進めた。

luteus を絶食・胃酸中和後のマウスに経口投与した。

(発現解析)

M 細胞反応レクチンである UEA-1 を用いて *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織学染色法により発現を確認した。

(機能解析)

PGRP-S の免疫生物学的機能をフローサイトメトリー、ELISA 法、ウエスタンブロット法を用いた細胞内シグナルの活性化の測定、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織染色切片の観察により解析した。

B. 研究方法

(マウス)

8-12 週齢の BALB/c マウスおよび PGRP-S KO マウスを用いた。

(経口免疫)

PBS に混濁させた *Micrococcus*.