

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 20 (2008) 年 3 月

—目次—

I. 構成員名簿	1
II. 総括研究報告書	
粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御 東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 炎症免疫学分野 清野宏	3
III. 分担研究者報告書	
i) 食物アレルギーにおける粘膜免疫と腸内フローラの関わり：スフィンゴリン1リン酸 による食物アレルギー誘導性細胞の遊走制御に関する研究 東京大学医科学研究所 清野宏・國澤純	10
ii) 自然免疫を介したアレルギー制御 大阪大学微生物病研究所 審良静男	16
iii) 花粉症における粘膜免疫と腸内フローラとの関わりについての研究：アレルギー性鼻 炎モデルマウスの作製と、自然免疫系を介した気道アレルギー治療戦略の構築 島根大学医学部耳鼻咽喉頭科 川内秀之	20
iv) 分泌型IgAの欠損による小腸上皮細胞間T細胞の増加機構に関する研究 株式会社ヤクルト本社中央研究所 応用研究Ⅱ部 免疫研究室 南野昌信	26
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
V. 研究成果の刊行物・別冊（主なもの）	34

I. 構成員名簿

平成19年度 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業
粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

構成員名簿

	氏名	職名	所属	所属施設の所在地
主任	清野 宏	教授	東京大学医科学研究所 感染・免疫部門炎症免疫学分野	〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
分担	審良 静男	教授	大阪大学微生物病研究所 自然免疫学分野	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1
分担	川内 秀之	教授	島根大学医学部 耳鼻咽喉科教室	〒693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1
分担	南野 昌信	副主席 研究員	株式会社ヤクルト本社 中央研究所 応用研究Ⅱ部 免疫研究室	〒186-8650 東京都国立市谷保 1796

Ⅱ. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー等・疾患予防研究事業）

総合研究報告書

粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

主任研究者：清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

分担研究者：審良 静男 大阪大学微生物病研究所 教授

分担研究者：川内 秀之 島根大学医学部 耳鼻咽喉科 教授

分担研究者：南野 昌信 株式会社ヤクルト・中央研究所 副主席研究員

研究要旨： アレルゲンが取り込まれる呼吸器・消化器粘膜において作動している粘膜免疫機構が異種抗原に対して積極的（排除）と消極的（寛容）免疫応答を誘導・制御している。この制御破綻がアレルギー発症に関与することは容易に想像がつく。つまり、粘膜面では粘膜免疫・外的環境因子（例、腸内フローラ）・アレルギーが三次元的相互作用をしているが、それに関して体系的な実験的検証を試みた例はない。本研究計画では、粘膜免疫（東大・清野）、自然免疫（阪大・審良）、アレルギー（島根大・川内）、腸内フローラ（ヤクルト・南野）の分野における基礎・臨床的最先端の研究チームの共同研究により、その解明にせまり、粘膜免疫を基盤とした新世代アレルギー予防・治療戦略構築への基盤確立を目指している。本年度はアレルゲン取り込みの場である腸管粘膜において、脂質メディエーター、TLR そして pIgR がアレルゲンを含めた抗原特異的免疫応答惹起における自然免疫・獲得免疫誘導両相に関わっていることが明らかとなってきた。

A. 研究目的

粘膜免疫機構がアレルゲンを代表とする異種抗原に対し示す積極的排除、無視・無応答といった「正と負」の免疫制御機構の破綻がアレルギー発症に関わる事は容易に想像される。一方で、粘膜免疫の発達・維持・制御には宿主側要因のみならず、常在細菌や食品成分などの外的環境因子が影響を与えていることが知られているが、これら三者間(粘膜免疫・外的環境因子・アレルギー)相互作用についての実験的検証を試

みたものは非常に少ない。本研究では現在まで漠然と考えられていた外的環境因子と粘膜系自然・獲得免疫機構との相互作用について、アレルギー疾患との関連という観点から体系的解析を加えることで、粘膜免疫関連環境改善によるアレルギー性疾患の予防・治療に結びつく新規治療戦略を提唱する為の基礎事実を積み上げることを目的とする。

B. 研究方法

粘膜免疫、自然免疫、腸内フローラ・食品、アレルギーなどの各分野で基礎・臨床の観点から先導的基盤研究を推進している研究グループが集結し、それぞれの研究から得られた最新研究成果を統合させ、腸内フローラを初めとする外的環境因子による粘膜免疫の制御とアレルギー疾患との相関について分子・細胞・個体レベルで解明していくことが、アレルギー疾患を根本から解明していく上で必要であると考えられる。その目標達成のために、粘膜免疫（東大・清野）、自然免疫（阪大・審良）、アレルギー（島根大・川内）、腸内フローラ（ヤクルト・南野）の各分野で基礎・臨床的最先端の研究を推進している四研究チームからなる学術的共同研究体制を確立した。本年度各研究チームは1)食物アレルギーにおける粘膜免疫と腸内フローラの関り：スフィンゴシン1リン酸による食物アレルギー誘導性細胞の遊走制御に関する研究、2)自然免疫を介したアレルギー制御：腸管粘膜固有層のCD11c⁺細胞による獲得免疫の活性化に関する研究、3)花粉症における粘膜免疫と腸内フローラの関り：通年性アレルギー性鼻炎およびスギ花粉症の動物モデルの作製と治療戦略の確立、4)腸内フローラのアレルギーへの関与の研究：分泌型IgAの欠損による小腸上皮細胞間T細胞の増加機構に関する研究を推進した。

（倫理面への配慮）

本研究における動物実験については独立法人国立大学実験動物施設協議会指針に基づき各関連研究機関実験動物委員会が定め

る指針に従って行われた。

C. 研究結果

- 1) 脂質メディエーターである S1P とその受容体 (S1P1) を介したシグナルを阻害することで食物アレルギー発症を抑制する結果を得た。
- 2) 腸管粘膜固有層に存在する CD11c⁺細胞は TLR5 を発現し、フラジェリンにより活性化され Th1 応答誘導能があることがわかった。
- 3) 溶連菌製剤 OK-432 が TLR2 を介して単核球を活性化し IL-12 産生をとおして Th2 応答を抑制する事が示唆された。
- 4) 粘膜免疫の中核をなす分泌型 IgA 形成に必須の pIgR 欠損が腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) の選択的動員に関与するという新知見を得た。

D. 考察

アレルギーの侵入に恒常的に暴露されている腸管粘膜において、脂質メディエーター、TLR2、TLR5 そして pIgR が、アレルギーを含めた抗原特異的免疫応答誘導に深く関わっている事を強く示唆する結果を得た。また、それら各種レセプターを介した制御をすることでアレルギー特異的免疫応答を自然免疫誘導相・獲得免疫誘導相の両相でコントロールできる可能性も示唆された。

E. 結論

本計画を推進する4研究者による研究は「粘膜免疫・自然免疫」を基軸としてアレ

ルゲンを含めた外的環境因子に対する免疫応答解明に向けて順調な滑り出しをした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

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.

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.

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.

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.

McGhee JR, Kunisawa J, and **Kiyono H**. Gut lymphocyte migration: we are halfway 'home'. *Trends Immunol.* 28 : 150-153. 2007.

Fukuyama S, and **Kiyono H**. Neuroregulator RET initiates Peyer's-patch tissue genesis. *Immunity* 26 : 393-395. 2007..

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.

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.

Takamura K, Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Kawamura A, **Kawauchi H**, and **Kiyono H**. Regulatory role of lymphoid chemokine CCL19 and CCL21 in the control of allergic rhinitis. *J. Immunol.* 179 : 5897-5906. 2007.

Andersen-Nissen E, Hawn TR, Smith KD, Nachman A, Lampano AE, Uematsu S, **Akira S**, and Aderem A. Tlr5^{-/-} Mice Are More

- Susceptible to *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *J. Immunol.* 178 : 4717-4722. 2007.
- Shim DH, Chang SY, Park SM, Jang H, Carbis R, Czerkinsky C, Uematsu S, **Akira S**, and Kweon MN. Immunogenicity and protective efficacy offered by a ribosomal-based vaccine from *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine.* 25 : 4828-4836. 2007.
- Saha S, Takeshita F, Matsuda T, Jounai N, Kobiyama K, Matsumoto T, Sasaki S, Yoshida A, Xin KQ, Klinman DM, Uematsu S, Ishii KJ, **Akira S**, and Okuda K. Blocking of the TLR5 activation domain hampers protective potential of flagellin DNA vaccine. *J. Immunol.* 179 : 1147-1154. 2007.
- Hawn TR, Berrington WR, Smith IA, Uematsu S, **Akira S**, Aderem A, Smith KD, and Skerrett SJ. Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*. *J. Immunol.* 179 : 6981-6987. 2007.
- Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, Kumar A, Aitken JD, Sitaraman SV, Neish AS, Uematsu S, **Akira S**, Williams IR, and Gewirtz AT. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* 117 : 3909-3921. 2007.
- Yamazaki K, Shimada S, Kato-Nagaoka N, Soga H, Itoh T, and **Nanno M**. Accumulation of intestinal intraepithelial lymphocytes in association with lack of polymeric immunoglobulin receptor. *Eur.J.Immunol.* 35:1211-1219. 2005.
- Tamura M, Shikina T, Morihana T, Hayama M, Kajimoto O, Sakamoto A, Kajimoto Y, Watanabe O, Nonaka C, Shida K, and **Nanno M**. Effects of probiotics on allergic rhinitis induced by Japanese cedar pollen: Randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 143:75-82. 2007.
- (学会発表)
- 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.
- 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Kiyono H. Mucosal Mindedness for Productive Immunity and Vaccine. 6th Annual Systems Integration in Biodefence, U.S.A. August 13th, 2007.

Kiyono H. New Gravitation in Mucosal Immunology: from Organogenesis to Allergy. International Symposium on Immune Regulation in Clinical Disease, Korea, November 2007.

Akira S. Dunham Lecturer, U.S.A. April 24th-26th, 2007.

Ishii K, and **Akira S.** Innate Recognition Receptors and Signalling Pathways. the first congress of the Society of Innate Immunity, U.S.A. May 13th-16th, 2007.

Akira S. Pathogen Recognition by Mammalian Innate System. 19th FAOBMB Seoul Conference, Korea, May 27th-30th, 2007.

Akira S. TLR-dependent and independent anti-viral responses. International Conference on Immunology 2007, China, Jul 12th-15th, 2007.

Akira S. Toll-like receptors in microbial and viral defence. Innate Immunity and Its Interface with Adaptive Immunity 2007, France, September 2th-5th, 2007.

Kawauchi H. Treatment: animal models. World Immune Regulation Meeting, Davos, Switzerland, April 13th, 2007.

Yamada T, and **Kawauchi H.**, et al. Cytokine Profile of Nasopharyngeal T Cells in Ag-specific Mucosal Immune Response. 9th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, Florida, U.S.A. June 5th, 2007.

Kawauchi H. Role of Toll-Like Receptors in Persistent Inflammation of Upper Respiratory Tract and its Clinical Implication. 9th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, Florida, U.S.A. June 7th, 2007.

Kawauchi H. Allergic Rhinitis: Pathogenesis, diagnosis, treatment. What's the current thinking. 12th Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, December 7th, 2007.

Gohda K, and **Kawauchi H.**, et al. Regulatory role of lymphoid chemokine CCL19 and CCL21 in the control of allergic rhinitis. 12th Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, December 5th-8th, 2007

Tongu M, **Kawauchi H.**, et al. Mucosal immunity of nasopharynx: study of long term T cell memory. 12th Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, December 5th-8th, 2007.

Yamada T, **Kawauchi H.**, et al. Mucosal immunity of nasopharynx: cytokine profile of nasopharyngeal T cells in Ag-specific mucosal immune response. 12th Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, December 5th-8th, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
出願中

(1)特願 2006-146012 「粘膜ワクチンアジュバントのスクリーニング方法」出願人：JST・大阪大学、発明者：審良 静男・植松智（出願日 2006 年 5 月 25 日）

(2)分泌型 IgA の分泌因子を認識する単クローン抗体及び該抗体を産生するハイブリドーマ（特願 2001-387362、平成 13 年 12 月 20 日出願）

(3)アレルギー性疾患予防・治療剤のスクリーニング方法（特願 2005-167810、平成 17 年 6 月 8 日出願）

(4)アレルギー性疾患予防・治療剤（特願 2005-167811、平成 17 年 6 月 8 日出願）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ.分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー等・疾患予防研究事業）

総合研究報告書（分担）

粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

分担研究項目：食物アレルギーにおける粘膜免疫と腸内フローラの関り：
スフィンゴシン 1 リン酸による食物アレルギー誘導性細胞の遊走制御に関する研究

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：國澤 純 東京大学医科学研究所 講師

研究要旨：腸管免疫システムの恒常性維持機構が破綻する事により食品由来アレルゲンに対するアレルギー応答が誘導される。腸管が取り込まれている環境を考慮するとそこには脂質の存在が浮かび上がってくる。そこで、免疫制御能を有している脂質メディエーター S1P に注目し、同メディエーターによる粘膜免疫を介したアレルギー誘導・制御への影響を検討した。最初に、S1P は腸管指向性リンパ球の移出・遊走制御に関与することを明らかにした。さらに、当研究室が開発した食物アレルギーマウスモデルを使ってアレルギー誘導性 Th2 型 T 細胞やマスト細胞が S1P レセプターを発現しており、腸管粘膜への移出・遊走制御にも S1P が関与し、その阻害によりアレルギー発症の抑制が可能なことを提示した。

A. 研究目的

腸管免疫システムの有する恒常性維持機構の破綻により発症する食物アレルギーは、患者の Quality of life を著しく低下させることから、治療法の早期開発が待望されている疾患の一つである。我々は自らが開発した食物アレルギーモデルを用いた研究から、食物アレルギーの発症には、アレルゲンの経口摂取に伴う活性化 T 細胞の全身免疫組織から大腸への浸潤が関与していることを見いだした（Kweon MN, J Clin Invest, 106(2):199-206, 2000 & Gut, 50(3):299-306, 2002）。また最近、我々は脂質メディエーターの一つであるスフィンゴシン 1 リン酸

(S1P) が腸管関連リンパ球の全身系免疫組織から腸管への遊走を制御していることを発見した（Kunisawa J, J Exp Med, 204:2335-48, 2007 & Blood, 109:3749-56, 2007）。これらの結果から、食物アレルギー発症時に観察される全身系免疫システムから大腸への病原性 T 細胞の遊走においても S1P が関与していると予想された。そこで本年度は、食物アレルギーにおける S1P の関与、ならびに S1P を標的とした新規食物アレルギー予防・治療戦略の開発を目的に研究を行った。

B. 研究方法

食物アレルギー発症時における脾臓 T 細胞の S1P 受容体の発現を定量的 PCR で測定した。さらに S1P 受容体の発現を抑制することが知られている免疫抑制剤 FTY720 を用い、S1P シグナルを遮断したマウスにおける食物アレルギーの発症について検討した。

C. 研究結果

脾臓 T 細胞における S1P 受容体の発現は、アレルギーの誘導過程において上昇した。この結果と相関し、食物アレルギー誘導時に FTY720 で処理をし、S1P を介したシグナルを遮断すると、全身系免疫組織で活性化された T 細胞の大腸への浸潤が阻害され、食物アレルギーの発症が抑制された。また食物アレルギーの発症が抑制されたマウスの大腸においては T 細胞に加え、マスト細胞の浸潤も阻害されていたが、血清中のアレルギー特異的 IgE の量には変化がなかった。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験については独立法人国立大学実験動物施設協議会指針に基づき、東京大学医科学研究所動物実験委員会が定める指針に従って行われた。

D. 考察

本研究よりアレルギー誘導性 T 細胞やマスト細胞などの遊走が S1P により制御されていることが示された。T 細胞の遊走においては、S1P 受容体の発現と相関することから、S1P が T 細胞に直接的に作用するこ

とが示唆された。一方、マスト細胞の遊走制御においてはマスト細胞が S1P 受容体を発現することに加え、マスト細胞の制御を行う IL-5 などの産生抑制も観察されたことから直接的作用と二次的作用の両方が関与していると考えられる。今後は、マスト細胞の S1P 依存的遊走制御機構の解明、ならびに食物アレルギー発症における T 細胞とマスト細胞の依存性の検討が重要であると考える。

E. 結論

本研究より、食物アレルギーの発症過程で観察される S1P 依存的病原性細胞の大腸への遊走制御が食物アレルギーに対する治療戦略となり得ることが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

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.

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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fukuyama S, and **Kiyono H**. Neuroregulator RET initiates Peyer's-patch tissue genesis. *Immunity* 26 : 393-395. 2007.
- Takamura K, Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Kawamura A, Kawauchi H, and **Kiyono H**. Regulatory role of lymphoid chemokine CCL19 and CCL21 in the control of allergic rhinitis. *J. Immunol.* 179 : 5897-5906. 2007.
- (学会発表)
- 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.
- 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 sphingosine 1-phosphate. The American Association of Immunologist (AAI), U.S.A. May 18th, 2007.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Kiyono H. Mucosal Mindedness for Productive Immunity and Vaccine. 6th Annual Systems Integration in Biodefence, U.S.A. August 13th, 2007.

Kiyono H. Recent progress in the development of M-cell targeted vaccines. MPI Infection Biology Alumni Meeting, Berlin, August 16th, 2007.

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, SouthAfrica, October 10th, 2007.

Kiyono H. New Gravitation in Mucosal Immunology: from Organogenesis to Allergy. International Symposium on Immune Regulation in Clinical Disease, Korea, November 2007.

Kiyono H. The Mucosal Immune System for the Development of Needle and Cold Chain-Free Vaccine. Vaccine Congress in Amsterdam, Amsterdam, December 2007.

Kiyono H. NALT and GALT Horizons for Mucosal Immunity. The Korean Association of Immunobiologists 55th Fall Conference, Korea, November 6th, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

特記事項なし。

3. その他

特記事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー等・疾患予防研究事業）

総合研究報告書（分担）

粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

分担研究項目：自然免疫を介したアレルギー制御：

腸管粘膜固有層の CD11c⁺細胞による獲得免疫の活性化に関する研究

分担研究者：審良 静男 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：Toll 様受容体は、様々な病原体を認識し免疫を活性化する自然免疫受容体群の 1 つである。TLR5 は細菌の鞭毛の構成タンパク質であるフラジェリンを認識する。TLR5 は、マウスにおいて腸管特異的に発現しており、とくに小腸粘膜固有層の CD11c⁺細胞に発現していることを見いだした。小腸粘膜固有層の CD11c⁺細胞はフラジェリンに反応して炎症性サイトカインを産生し、強い自然免疫応答を示した。小腸粘膜固有層の CD11c⁺細胞は複数の群に別れることが知られている。今回、我々は、全ての群の細胞を単離しどの群に TLR5 が発現しているかを検討する。さらに、それらの細胞がどのように獲得免疫を活性化するかを検討し、TLR5 の生体での機能を明らかにする。

A. 研究目的

小腸における TLR5 発現細胞を同定し、その獲得免疫における役割を明らかにする。

フラジェリンで刺激して自然免疫応答を検討した。さらに、TLR5 発現細胞における獲得免疫の活性化能を検討した。

B. 研究方法

小腸の粘膜固有層の細胞を単離し、樹状細胞マーカーである CD11c とマクロファージマーカーである CD11b で染色してフローサイトメトリー(FACS)で解析を行うと、4 群の細胞に分けられる。この 4 群の細胞のうち、どの群に TLR5 が発現しているかを調べるために、FACS sorting によりマウス小腸粘膜固有層から各群の細胞を単離し、mRNA を採取して TLR5 の発現を RT-PCR で検討した。同定した TLR5 発現細胞をフ

(倫理面への配慮)

マウスの実験は、微生物病研究所の倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

TLR5 は小腸粘膜固有層の CD11c⁺CD11b⁺細胞に特異的に発現していることが明らかになった。CD11c⁺CD11b⁺細胞はフラジェリンに反応して炎症性サイトカインの産生など自然免疫反応を誘導した。さらに、T 細胞に働きかけ、TLR5 依存