

200822014A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 21 (2009) 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) 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 清野宏・木村（佐藤）あゆ子・合田（高村）薫・森倉一朗	5
ii) TLR5 の獲得免疫における役割に関する研究 大阪大学微生物病研究所 審良静男	13
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	17
iv) 摂取食餌料が軌道炎症に及ぼす影響に関する研究 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	23
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
V. 研究成果の刊行物・別冊（主なもの）	33

I. 構成員名簿

平成 20 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

粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御に関する研究

研究代表者 清野 宏

東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野 教授

研究分担者 審良 静男 (大阪大学微生物病研究所 教授)

川内 秀之 (島根大学耳鼻咽喉科教室 教授)

南野 昌信 (株式会社ヤクルト本社中央研究所 主席研究員)

A. 研究目的

アレルギー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・臨床的最先端的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。本年度はアレルギー取り込みの場である呼吸器と腸管粘膜において、ケモカイン(CCL19/CCL21)、粘膜型CD11c⁺そしてpIgRがアレルギーを含めた抗原特異的免疫応答や炎症惹起とそのコントロールにおける自然免疫・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。

B. 方法

清野(東大)は粘膜免疫機構に関する研究領域において先導的な役割を担っている。分担研究者である阪大・審良は各種Toll-like receptorの発見を初めとする自然免疫関連分子に関する最先端の研究を進めている。また島根大・川内は呼吸器免疫という観点から臨床を含むアレルギー疾患に関する研究を展開している。ヤクルト・南野は常在細菌による粘膜免疫の発達と制御について先進的な研究を行ってきた。本研究においては、これら各分野で独創的な研究を展開している先導的研究者からなる学術協同研究体制を確立し、「粘膜免疫・外的環境因子・アレルギー」の三者間相互作用の解明という共通目標に向けて包括的な研究を推進している。本年度は清野班と川内班は呼吸器におけるアレルギー疾患としてアレルギー性鼻炎におけるリンフォイドケモカイン(CCL19/CCL21)の役割について検討を進めた。さらに、現在注目されている舌下免疫療法の基礎的検討も行った。審良班と南野班は腸管免疫に焦点をあて、その特徴を反映する粘膜系CD11c⁺細胞の基礎的解明と食物摂取量の腸内フローラへの影響ならびにアレルギー発症への関与について検討を進めた。

C. 結果

1) アレルギー性鼻炎における粘膜免疫の関与
p/t マウスはコントロール野生型マウスと比較してアレルギー症状が重篤であった。これらのマウスにおいて、野生型マウスと比較してNALTおよび顎下リンパ節におけるCD8 α ⁺CD11b⁺ミエロイド系樹状細胞数とTh2細胞数が増加し、かつTregの数が減少していた。野生型マウスの顎下リンパ節より調製したミエロイド系樹状細胞は、*in vitro*でnaïve T細胞をTh2細胞へ分化誘導し、この応答はTregにより抑制された。p/tマウスにCCL19およびCCL21をコードするプラスミドDNAを経鼻投与するとミエロイド系樹状細胞数が減少し、OVA特異的IgE産生が抑制されてアレルギー症状が抑えられた。一方、鼻粘膜上皮層にM細胞の特徴を有する細胞が発見され、抗原取り込み能も確認された。さらに舌下免疫療法の可

能性についてはOVAの舌下免疫療法モデルにおいて、OVA舌下投与群ではいずれの投与時期においてもコントロール群と比較して血清中の抗原特異的IgE値の有意な減少が認められた。また、OVA舌下投与群では脾臓および頸部リンパ節由来のリンパ球からのTh2サイトカイン産生が有意に抑制された。

2) 腸管免疫の基礎的解明と食物摂取のアレルギーへの関与

腸管粘膜固有層(レア)に存在するCD11c⁺細胞は、2種類の樹状細胞(DC)、マクロファージ、好酸球の4つのサブセットからなることが分かり、CD11c^{hi}CD11b^{hi}のLPDCが特異的にTLR5を発現していることを同定した。LPDCは、脾臓の樹状細胞と異なりレチノイン酸を産生する特殊な能力を持ち、LPにおけるIgA産生形質細胞の分化や、抗原特異的なCD4⁺ヘルパーT_H1細胞とT_H-17細胞の分化をTLRの刺激依存的に誘導出来ることを明らかにした。この様な基礎的に重要な腸管免疫を制御する細胞群の同定だけでなく、臨床的応用性の高い食事コントロールによるアレルギー発症制御への可能性を示唆する。興味ある結果も得た。食餌量を自由摂取量の60%に制限することにより、OVAの経鼻投与で誘発される気道炎症反応が改善した(BALFに回収される好酸球の減少、BALF中IL-4レベルの低下、血清中IgEレベルの低下)。

D. 考察

1) アレルギー制鼻炎の制御

リンパ球系ケモカインCCL19およびCCL21は、NALTおよび顎下リンパ節において、Th2型応答を誘導するCD8 α ⁺CD11b⁺ミエロイド系樹状細胞の数を制御することによってTh2型の応答を抑制し、上気道におけるアレルギー応答の抑制維持に関与していることが示された。さらに、鼻粘膜M細胞の気道系アレルギー発症への関与の可能性が示唆された。舌下免疫療法についてもその有動性を示唆する結果が得られ、メカニズムも含めてその基礎的解析が重要である。

2) 腸管免疫とアレルギー制御

腸管の細胞は単離が非常に困難なため、どのような細胞が免疫応答を開始しアレルギーをはじめとする多種多様な抗原に対する免疫応答を誘導するか全く分かっていなかった。しかも、腸管では免疫を抑制する細胞が存在すると考えられてきたので、小腸に病原細菌の侵入を認識して強力に自然免疫応答を誘導する細胞が存在しているということは大きな驚きであった。今後はこのユニークなCD11c⁺細胞による食物アレルギーの制御に関する研究への応用が期待される。

マウスモデルを用いて、摂取食餌量の制限が気道炎症を軽減することを示した。近年、臨床試験で摂取カロリーの制限がアレルギー症状を改善することが報告されており、本研究の結果はそれらの結果を支持している。

E. 結論

本研究より、CCL19およびCCL21は、気道系アレルギーの制御において制御性ケモカインとして働いていることが示され、これらケモカインを用いた樹状細胞の遊走制御がアレルギー性鼻炎治療の新しい戦略となり得ることが示された。また、NALTおよび鼻粘膜のM細胞によるタンパク質抗原の取り込み能についての詳細な解析が、それを利用したアレルギー対策を視野に入れたワクチン開発にも重要である。

腸管免疫とアレルギーの関わりについては粘膜系CD11c⁺細胞が、粘膜免疫の要であるIgAとTh1型細胞誘導に重要であることが明らかとなり、その細胞を標的としたアレルギー制御の可能性を提示した。さらに、食餌量の制限がアレルギー発症を予防する可能性が示された。

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：

研究代表者：清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

研究協力者：木村（佐藤）あゆ子 日本予防医学協会リサーチレジデント

合田（高村）薫 島根大学医学部医員

森倉一朗 島根大学医学部大学院生

研究要旨：アレルギー性鼻炎の感作、発症機序の解明や予防、治療戦略の究明には、全身における免疫機構のみならず、気道局所の粘膜免疫機構を検討することが重要である。ケモカイン CCL19 および CCL21 を欠損した *plt* マウスにアレルギー性鼻炎を発症させると、野生型と比較してアレルギー応答が亢進されることを示した。これらのケモカインは CCR7 を発現した制御性 T 細胞の所属リンパ節へのリクルートメントに必要であり、ミエロイド系樹状細胞により誘導される Th2 環境の誘導を制御していた。本研究より、CCL19 および CCL21 は、気道系アレルギーの制御において制御性ケモカインとして働いていることが示され、これらケモカインを用いた樹状細胞の遊走制御がアレルギー性鼻炎治療の新しい戦略となり得ることが示された。一方、鼻粘膜上皮層に M 細胞の特徴を有する細胞が発見され、今後の詳細な解析が、M 細胞標的型アレルギー性鼻炎ワクチン開発にも重要であると考えられる。

A. 研究目的

花粉症をはじめとするアレルギー性鼻炎の病態の成立までには、遺伝的な素因を背景としながら、生後の種々の外来環境因子への暴露により感作され、発症に至る過程がある。アレルギー性鼻炎の感作、発症機序の解明や予防、治療戦略の究明には、全身における免疫機構のみならず、気道局所の粘膜免疫機構を検討することが重要である。

鼻腔咽頭リンパ組織(NALT)は、吸入抗原を取り込む能力をもつM細胞を有しており、取り込まれた抗原に対する粘膜組織および全身における免疫応答の誘導と制御において中心的な役割を担っていると考えられているが、上気道において誘導されるアレルギー応答における役割については明らかとなっていなかった。

一方、アレルギー性鼻炎は、抗原特異的IgE産生および好酸球などの炎症性細胞の

浸潤などの Th2 型の応答により惹起される病気である。産生された抗原特異的 IgE がマスト細胞や好塩基球の Fcεレセプターに結合し、抗原がそれらのレセプターをクロスリンクするとヒスタミンなどの顆粒放出が誘導される。同時に、CCL5、CCL11、CCL17などのケモカインが産生され、さらなる好酸球や Th2 細胞をリクルートして後期アレルギー応答が誘導される。このようにケモカインはアレルギー性鼻炎の発症に重要な役割を果たしている。しかしながら、ケモカイン CCL19 及び CCL21 は、リンパ球系細胞の移動に関与しており、リンパ球の適切な組織内での局在と恒常性維持、さらにはリンパ組織の構造維持にも重要であるが、CCL19 及び CCL21 のアレルギー応答誘導における役割は明確ではなかった。

そこで本研究では、ケモカイン CCL19/CCL21 に着目し、これらが鼻腔咽頭組織における T 細胞依存性アレルギー鼻炎の発症制御に関与しているか検討した。また、NALT 以外の鼻粘膜上皮細胞層にも抗原の取り込み能を有する M 細胞が存在するかどうか検討した。

B. 研究方法

ケモカイン CCL19 及び CCL21 欠損マウスである *plt* マウスおよび野生型マウスにオバルブミン(OVA)をアジュバントとともに 1 週間毎に 3 回腹腔内投与し、最後の免疫の 1 週間後から 2 週間毎日 OVA を経鼻投与した。アレルギー症状については、くしゃみと鼻掻の回数、血清中 OVA 特異的

IgE レベルとヒスタミンレベル、鼻中隔底部への好酸球の浸潤により評価した。Th2 応答がどの組織で誘導されているか調べるため、上記マウスの NALT、Nasal Passage、顎下リンパ節、脾臓より T 細胞を調製し、Th2 型サイトカインの産生能を調べた。また *plt* マウスにおけるアレルギー症状の変化の機構を調べるため、各組織における Treg 数および樹状細胞数、さらに樹状細胞の Th2 応答誘導能および Treg の Th2 応答抑制能について調べた。最後にケモカイン CCL19/CCL21 のアレルギー性鼻炎発症における役割について調べるため、*plt* マウスに CCL19 および CCL21 をコードするプラスミド DNA を経鼻投与し、アレルギー症状、OVA 特異的 IgE 産生応答、Treg 細胞数、樹状細胞数への変化を評価した。

また、鼻粘膜に M 細胞が存在するかについて、鼻粘膜組織を電子顕微鏡や免疫染色によって解析し、抗原の取り込み能についても調べた。

C. 研究結果

plt マウスはコントロール野生型マウスと比較してアレルギー症状が重篤であった。これらのマウスにおいて、野生型マウスと比較して NALT および 顎下リンパ節 における CD8α⁺CD11b⁺ミエロイド系樹状細胞数と Th2 細胞数が増加し、かつ Treg の数が減少していた。野生型マウスの顎下リンパ節より調製したミエロイド系樹状細胞は、*in vitro* で naïve T 細胞を Th2 細胞へ分化誘導し、この応答は Treg により抑制された。*plt* マ

ウスに CCL19 および CCL21 をコードするプラスミド DNA を経鼻投与するとミエロイド系樹状細胞数が減少し、OVA 特異的 IgE 産生が抑制されてアレルギー症状が抑えられた。

一方、鼻粘膜上皮層に M 細胞の特徴を有する細胞が発見され、抗原取り込み能も確認された。

D. 考察

リンパ球系ケモカイン CCL19 および CCL21 は、NALT および 顎下リンパ節において、Th2 型応答を誘導する CD8 α CD11b⁺ ミエロイド系樹状細胞の数を制御することによって Th2 型の応答を抑制し、上気道におけるアレルギー応答の抑制維持に関与していることが示された。さらに、鼻粘膜 M 細胞の気道系アレルギー発症への関与の可能性が示唆された。

E. 結論

本研究より、CCL19 および CCL21 は、気道系アレルギーの制御において制御性ケモカインとして働いていることが示され、これらケモカインを用いた樹状細胞の遊走制御がアレルギー性鼻炎治療の新しい戦略となり得ることが示された。また、NALT および鼻粘膜の M 細胞によるタンパク質抗原の取り込み能についての詳細な解析が、それを利用したワクチン開発にも重要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

Chang SY, Cha HR, Uematsu S, Akira S, Igarashi O, **Kiyono H**, Kweon MN. Colonic patches direct the cross-talk between systemic compartments and large intestine independently of innate immunity. *J Immunol.*180(3):1609-18. 2008.

Kunisawa J, Gohda M, Kurashima Y, Ishikawa I, Higuchi M, **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate-dependent trafficking of peritoneal B cells requires functional NF{ κ }B-inducing kinase in stromal cells. *Blood.* 2008.

Ooi EL, Verjan N, Hirono I, Nochi T, Kondo H, Aoki T, **Kiyono H**, Yuki Y. Biological characterisation of a recombinant Atlantic salmon type I interferon synthesized in *Escherichia coli*. *Fish Shellfish Immunol.*24(5):506-13. 2008.

Kurashima Y, Kunisawa J, **Kiyono H**. Applicable strategies for the mucosal immune system in the regulation of allergic diseases. *Arerugi.*57(2):87-94. 2008.

Chang SY, Cha HR, Igarashi O, Rennert PD,

- Kissenpfennig A, Malissen B, Nanno M, **Kiyono H**, Kweon MN. Cutting edge: langerin+ dendritic cells in the mesenteric lymph node set the stage for skin and gut immune system cross-talk. *J Immunol.* 180(7):4361-5. 2008.
- Gohda M, Kunisawa J, Miura F, Kagiya Y, Kurashima Y, Higuchi M, Ishikawa I, Ogahara I, **Kiyono H**. Sphingosine 1-phosphate regulates the egress of IgA plasmablasts from Peyer's patches for intestinal IgA responses. *J Immunol.* 180(8):5335-43. 2008.
- Momoi F, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yuki Y, **Kiyono H**, Yamamoto M. Nasal Vaccination with Outer Membrane Protein of *Porphyromonas gingivalis* and Nontoxic Chimeric Enterotoxin Adjuvant Induces Long-Term Protective Immunity with Reduced IgE Antibodies. *Infect Immun.* 2008.
- Ooi EL, Verjan N, Haraguchi I, Oshima T, Kondo H, Hirono I, Aoki T, **Kiyono H**, Yuki Y. Innate immunomodulation with recombinant interferon-alpha enhances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis virus. *Dev Comp Immunol.* 2008.
- Kobayashi T, Takahashi K, Nagai Y, Shibata T, Otani M, Izui S, Akira S, Gotoh Y, **Kiyono H**, Miyake K. Tonic B cell activation by Radioprotective105/MD-1 promotes disease progression in MRL/lpr mice. *Int Immunol.* 20(7):881-91. 2008.
- Verjan N, Ooi EL, Nochi T, Kondo H, Hirono I, Aoki T, **Kiyono H**, Yuki Y. A soluble nonglycosylated recombinant infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) G-protein induces IFNs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 25(1-2):170-80. 2008.
- Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, **Kiyono H**, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 9(7):769-76. 2008.
- Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, Nochi T, Pontes GS, Hase K, Ohno H, Kurokawa S, Mejima M, Takayama N, Yuki Y, Lowe AW, **Kiyono H**. Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol.*

15;180(12):7840-6. 2008.

Caipang CM, Verjan N, Ooi EL, Kondo H, Hirono I, Aoki T, **Kiyono H**, Yuki Y. Enhanced survival of shrimp, *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* from white spot syndrome disease after oral administration of recombinant VP28 expressed in *Brevibacillus brevis*. *Fish Shellfish Immunol.* 2008.

Kunisawa J, Nochi T, **Kiyono H**. Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends Immunol.* 2008.

Fehervari Z, **Kiyono H**. The mucosa: at the frontlines of immunity. *Trends Immunol.* 2008.

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 shingosine 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.

特記事項なし。

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.

3. その他

特記事項なし。

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

TLR5 の獲得免疫における役割に関する研究

分担研究者：審良静男

大阪大学微生物病研究所自然免疫 職名 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 CD11c と CD11b の発現パターンから4つの群に分かれ、CD11c^{hi}CD11b^{hi} LPDC が特異的に TLR5 を発現していることを見出した。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 CD11c^{hi}CD11b^{hi} LPDC の獲得免疫の活性化における役割を解析することを目的とする。

B. 研究方法

粘膜固有層の樹状細胞(LPDC)の IgA 産生への寄与を解析するために、マウス腹腔から IgM⁺B 細胞を単離し、フラジェリン存在下または非存在下に LPDC と5日間共培養し、IgA 産生形質細胞の分化をフローサイトメトリーで解析した。また、LPDC のヘルパーT細胞への分化を調べるために、OT-II トランスジェニックマウスからナイーブ CD4⁺T 細胞を単離し、フラジェリン存在下または非存在下に LPDC と4日間共培養した。CD4⁺T 細胞を phorbol myristate acetate (PMA) と ionomycin で刺激し、IFN- γ と IL-4 の産生をフローサイトメトリーで解析した。

(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

粘膜固有層の CD11c⁺細胞は CD11c と CD11b の発現パターンから4つの細胞サブセットに分かれることが明らかになった。TLR5 は CD11c^{hi}CD11b^{hi} の LPDC にだけ特異的に発現していた。LPDC は IgA 産生形質細胞をフラジェリン刺激依存的に誘導した。さらに、LPDC はナイーブ CD4⁺T 細胞を、フラジェリン刺激依存的に Th1 細胞と Th17 細胞に分化させた。

D. 考察

LPDC は粘膜免疫に重要な IgA を産生する細胞や細胞性免疫に関わる Th1 細胞を強力に誘導した。LPDC は生体防御に関わる非常にユニークな細胞であり、経口粘膜ワクチンのための良い標的細胞になると考えられる。また、LPDC は昨今自己免疫疾患の発症に密接に関わると考えられ

ている Th17 細胞を誘導したことから、クローン病などの炎症性腸疾患の病態形成に関わる可能性も強く示唆される。今後のより詳細な解析が必要であろう。

E. 結 論

LPDC はフラジェリン刺激によってナイーブ B 細胞から IgA 産生形質細胞を誘導した。さらに CD4⁺T 細胞に作用してフラジェリン刺激依存的に Th1 細胞だけでなく Th17 細胞を誘導した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):684-91.
2. Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 2008 Jul;9(7):769-76.
3. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiraagi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med.* 2008 Jul 7;205(7):1601-10.

4. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature.* 2008 Nov 13;456(7219):264-8.
5. Takeuchi O, Akira S. RIG-I-like antiviral protein in flies. *Nat Immunol.* 2008 Dec;9(12):1327-1328.
6. Akira S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. *Immunol Rev.* 2009 Jan;227(1):5-8

学会発表

1. 審良静男、TLRと免疫疾患、第13回シェーグレン症候群セミナー、東京、May. 17, 2008.
2. 審良静男、自然免疫における病原体認識とシグナル伝達、日本分子生物学会第8回春季シンポジウム、北海道、May. 26-27, 2008.
3. 審良静男、自然免疫システムと腸管免疫、神戸免疫アレルギー談話会第20回記念 特別講演会、兵庫、June. 5, 2008.
4. 審良静男、自然免疫システムとアレルギー、第20回日本アレルギー学会春季臨床大会、東京、June. 12-13, 2008.
5. 審良静男、自然免疫：病原体認識とシグナル伝達、第12回京都分子血液フォーラム、京都、June. 21, 2008.
6. Akira S. The role of TLR5-expressing CD11c⁺ lamina propria cells in induction of adaptive immunity. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2008. 神奈川、June. 26-27, 2008.
7. Akira S. Toll-like receptors. Hannover Biomedical Research School. Germany, July. 10-11, 2008.

8. Akira S. CSF5 Immunogenetics. International Congress of Genetics 2008. Germany, Dec. 12-17, 2008.
 9. 審良静男、自然免疫による病原体認識機構、日本免疫学会 免疫サマースクール 2008、兵庫、Aug. 24-26, 2008.
 10. Akira S. Innate immune response in intestine. 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫、Sep. 8-10, 2008.
 11. 審良静男、腸管における自然免疫、第7回リウマチ膠原病・よつやセミナー、東京、Sep.13, 2008.
 12. Akira S. Atg 16L1, an autophagy protein, controls endotoxin-induced inflammasome activation. Toll 2008, Portugal, Sep.24-27, 2008.
 13. Akira S. Innate Immune Response in the Intestine. The 10th International Symposium on Dendritic Cells. 兵庫、Oct. 1-3, 2008.
 14. Akira S. Toll-like receptors: pathogen recognition and immune responses. Third Bernard Halpern Symposium of Immunology. France, Oct. 9-10, 2008.
 15. Akira S. Pathogen recognition and signaling pathway in innate immunity. Taiwan, Oct.17-20, 2008.
 16. 審良静男、自然免疫の最近の進歩、第53回日本生殖医学会総会・学術講演会、兵庫、Oct. 22-24, 2008.
 17. 審良静男、自然免疫：病原体認識とシグナル伝達、第67回日本癌学会学術総会、愛知、Oct.28-30, 2008.
 18. Akira S. Pathogen Recognition by innate immunity and its signaling. 日独免疫セミナー2008、福岡、Nov.1-3, 2008.
 19. Akira S. Pathogen Recognition: Receptors and Signaling. 第24回京都賞記念ワークショップ 基礎科学部門シンポジウム、京都、Nov.12, 2008.
 20. Akira S. Innate Immunity for Viral Infection. The 57th fall conference of the Korean Association of Immunologists. Korea, Nov.13-14, 2008.
 21. 審良静男、自然免疫とウイルス感染、第40回日本小児感染症学会総会・学術集会、愛知、Nov.15-16, 2008.
 22. 審良静男、Toll-Like Receptor と粘膜免疫、FIMF 合同フォーラム 2008、東京、Nov.20-21, 2008.
 23. 審良静男、自然免疫研究の最前線、第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、東京、Nov.29, 2008.
 24. Akira S. The role of Toll-like receptors in intestinal inflammation and immunity. The 38th Annual Scientific Meeting. Australia, Dec. 7-11, 2008.
 25. 審良静男、Toll-like receptor シグナル伝達、分子血管研究会、大阪、Jan.11, 2009.
- 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
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. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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)
分担研究報告書

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—

分担研究者：川内秀之
島根大学医学部耳鼻咽喉科 教授

研究要旨

上気道におけるアレルギーについて、全身免疫および粘膜免疫の両面から解明していくにあたり、その病態を感作に関わる誘導相と炎症局所での発症に関わる反応相に分け、アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて解析を行った。アレルギー性鼻炎に対する抗原特異的免疫療法としての舌下免疫療法について、マウスを用いたモデルを作製し、その効果および作用メカニズムについて検討した。

A. 研究目的

花粉症をはじめとするアレルギー性鼻炎の病態の成立までには、遺伝的な素因を背景としながら、生後の種々の外的環境因子への曝露により感作され、発症に至る過程がある。アレルギー性鼻炎の感作・発症機序の解明や予防・治療戦略の究明には、全身における免疫機構のみならず、気道局所の粘膜免疫機構を明らかにしていくことが必要不可欠である。

アレルギー性鼻炎の治療法の一つとして抗原特異的免疫療法、特に舌下免疫療法が近年注目されている。舌下免疫療法は、従来の注射型による減感作療法と同等の治療効果が得られることが報告されているが、抗原の投与量が多く、安全性の面などで課題が残る。また、そのメカニズムに関しても未だ一定の見解は得られていない。そこで我々はマウスを用いてアレルギー性鼻炎の舌下免疫療法モデルを確立し、その効果および作用メカニズムに関して検討する。

また、上気道粘膜上皮細胞から産生さ

れる IL-15 に着目し、気道アレルギー性炎症の病態やその制御における役割について、マウスアレルギー性鼻炎モデルで検討した。

B. 研究方法

卵白アルブミン (OVA) を水酸化アルミニウムゲルとともにマウスの腹腔内に投与して全身感作を行った後、OVA を反復点鼻投与して OVA に対するアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製した。また、舌下免疫療法モデルの作製には、鎮静下でマウスの舌下粘膜へ OVA 溶液を滴下する方法を用いた。より詳細なメカニズム解明のため、舌下粘膜への抗原の投与時期をアレルギーの誘導相の前 (感作前)、誘導相と反応相の間 (感作後)、反応相の後 (発症後) とに分けて検討した。最終点鼻後に血清を採取し、各種リンパ組織や鼻腔組織より細胞を単離して解析を行った。

(倫理面への配慮)