

200904003A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 22 (2010) 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	7
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	15
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
V. 研究成果の刊行物・別冊（主なもの）	25

I . 構成員名簿

平成 21 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	拠点長 教授	大阪大学免疫学フロンティア センター 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

II. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
研究報告書

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（大阪大学免疫学フロンティア研究センター 拠点長、
大阪大学微生物病研究所 教授）
川内 秀之（島根大学医学部耳鼻咽喉科 教授）

A. 研究目的

アレルゲンの主要取り込み部位となり、かつ多くのアレルギー疾患の発症部位ともなっている粘膜組織においては、粘膜免疫システムが存在し、異種抗原に対する排除と寛容・共生を巧みに制御している。粘膜免疫システムの破綻がアレルギー発症に関与することが様々な研究から示されている。その一方で、これまでの研究から粘膜免疫の発達・制御に腸内フローラを始めとする外的環境因子を介した刺激が必要であることが示唆されているが、外的環境因子を介した粘膜免疫制御とアレルギー疾患との三次元的相互作用に関する体系的な実験的検証はほとんど無いのが現状である。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）の分野における基礎・臨床的最端的研究チームによる共同研究により、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。本年度は腸管免疫において重要な免疫誘導組織として機能しているパイエル板における腸内フローラ形成とそれに関わる宿主側因子の同定、さらには宿主側因子を標的としたターゲティング分子の作製、腸内フローラを介した自然免疫シグナルを受け取り免疫制御の司令塔として機能する抗原提示細胞の各サブセットの機能解析、自然免疫シグナルを介した刺激とアレルギー症状との関連について検討を行った。

B. 研究方法

- 1) パイエル板内に存在する常在細菌の解析
パイエル板組織における常在細菌を解析する目的でパイエル板組織を摘出し、16S rRNA クローンライブラリ法とFISH法により腸内細菌ゲノム情報を基盤にした腸内フローラ構成・分布解析を行った。さらにパイエル板から樹状細胞を回収し、パイエル板存在細菌の樹状細胞への取り込みを解析した。
- 2) 腸管抗原取り込み機構解明へ向けたGP2 特異的抗体の樹立と機能解析
マウスGP2を発現する遺伝子を強制発現したHeLa細胞を作製し、ラットに免疫した。定法に従いハイブリドーマを作製した後、各ハイブリドーマが産生する抗体のGP2に対する反応性をGP2発現CHO細胞と非発現CHO細胞の反応性を比較することで決定した。作製できたGP2抗体はWhole mount染色法によりパイエル板をはじめとする腸管組織における反応性を確認した。
- 3) 腸管樹状細胞サブセットにおけるTLR・ケモカイン受容体の発現解析
マウス腸管から定法に従い、粘膜固有層細胞を単離し、各樹状細胞サブセットにおけるCX3CR1の発現について、CX3CR1特異的抗体を用いたフローサイトメトリーにて発現を検討した。
- 4) マウスアレルギー性鼻炎・花粉症モデルとヒト病態との類似性の検証

TLRとそのリガンドの観点からアレルギー反応相におけるグラム陰性菌由来LPSの影響について検討する目的で、Alumを用いた卵白アルブミン (OVA) の腹腔内投与による全身感作後、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。本実験においては、正常マウスに加えTLR2やTLR4を欠損したマウスを用い、LPSはOVAと同時に点鼻投与した。

C. 結果

1) パイエル板内に存在する常在細菌の解析

16S rRNAクローンライブラリ法ならびにFISH法を用いてパイエル板内における常在細菌を解析したところ、パイエル板内部においては*Alcaligenes*と呼ばれる菌が普遍的かつ優勢的に存在していた。板樹状細胞の内部に存在していることが判明した。さらに無菌マウスから得られた樹状細胞に*Alcaligenes*を作用させると、IgA産生増強サイトカインであるIL-6の産生が増強していた。

2) 腸管抗原取り込み機構解明へ向けたGP2特異的抗体の樹立とGP2欠損マウスを用いた機能解析

パイエル板にはM細胞と呼ばれる抗原取り込み細胞が存在する。吸収上皮細胞との機能的差異を検討する目的でマイクロアレイ解析を行ったところ、GP2と呼ばれる分子がM細胞において強く発現していることが判明した。GP2の発現を確認する目的で樹立した抗体は細胞株に強制発現させたGP2を認識するだけでなく、パイエル板M細胞に発現するGP2を認識した。またGP2欠損マウスを用いた解析から、GP2は細菌上に発現しているFimHを認識すること、ならびにGP2欠損マウスではFimH発現細菌に対する免疫応答が減弱することが示された(理化学研究所RCAI・大野博司研究室との共同研究)。

3) 腸管樹状細胞サブセットにおけるTLR・ケモカイン受容体の発現解析

腸管固有層のCD11c陽性細胞は、2種類の

樹状細胞 (CD11c^{hi}CD11b^{low}とCD11c^{hi}CD11b^{hi})、マクロファージ (CD11c^{int}CD11b^{int})、好酸球 (CD11c^{int}CD11b^{hi})の4つのサブセットからなる。管腔抗原を取り込む抗原提示細胞にはCX3CR1が発現することが知られているが、その発現細胞に関する詳細な情報は得られていない。本研究から、上記の4種類のCD11c陽性細胞のうち、CX3CR1はCD11c^{hi}CD11b^{hi}樹状細胞には発現しておらず、CD11c^{int}CD11b^{int}のマクロファージに特異的に発現していることが判明した。さらにCX3CR1陽性CD11c^{int}CD11b^{int}マクロファージは、IL-10を産生する抑制性のマクロファージで、誘導型制御性T細胞を強力に誘導した。

4) マウスアレルギー性鼻炎・花粉症モデルとヒト病態との類似性の検証

野生型であるC3H/HeNマウスでは、アレルギー反応相におけるLPSの同時点鼻投与により、くしゃみの回数、好酸球浸潤、Th2型サイトカイン産生の増強が観察された。これらのLPSの影響はTLR4欠損マウスでは認められなかった。またノーザンブロット法にて各ヒト由来細胞株で様々なTLRの発現を調べたところ、ヒト単球の細胞株(U937)ではTLR2, TLR4, TLR6, TLR9のいずれも発現していたが、気道粘膜上皮細胞の細胞株(CCL30, A549)では、LPS刺激で誘導的にTLR2, TLR3, TLR6を発現してくるが、TLR4, TLR9については発現を認めなかった。

D. 考察

*Alcaligenes*の存在はパイエル板以外の絨毛部位には認められなかったことから、パイエル板に何らかの特異的取り込み機構が存在することが示唆された。*Alcaligenes*のFimH依存性については今後の検討課題であるが、*Alcaligenes*がパイエル板に特異的に存在し、かつその一部は樹状細胞に取り込まれ、IgA産生を始めとする腸管免疫の発達に関わっているという今回の知見は、免疫の発達における腸内フローラの影響とアレルギー

一発症との関連において新たな機軸からの免疫制御を示唆する興味深いものである。また、本研究において樹立することが出来た GP2 特異的抗体を用いることで、パイエル板 M 細胞を標的としたアレルギー粘膜免疫療法の開発へと発展させることが出来ると期待される。

腸内フローラを介した抗原刺激を認識し免疫応答を制御する抗原提示細胞については、これまでいくつかのサブセットが知られていた。そのうちのひとつとしてケモカイン受容体である CX3CR1 を発現する細胞は腸管管腔の抗原を補足することが示唆されていた。今回の研究から、CD11c^{int}CD11b^{int}のマクロファージが CX3CR1 を特異的に発現し、また IL-10 を高産生することで誘導型制御性 T 細胞を強力に誘導することが示された。このことは管腔抗原の取り込みにおいては、GP2 発現 M 細胞を介したパイエル板への取り込み経路と CX3CR1 発現 CD11c^{int}CD11b^{int}マクロファージを介した経路が存在することを意味している。さらには本研究から TLR を介した刺激がアレルギー疾患の制御において重要であることも示されたことから、各取り込み経路の違いとそこから生じる自然免疫応答の差異、さらにはアレルギー疾患との関連について、腸内フローラの種類の違いも含め、今後さらなる解明が必要であると考えられる。

近年、特に乳幼児期における免疫系の発達とアレルギー発症との関連が強く示唆されていることから、今後は *Alcaligenes* を始めとする腸内フローラの形成とその取り込みに関わる GP2 陽性 M 細胞や抗原提示細胞群の分化、さらにはそれに引き続く免疫応答について、乳幼児期における粘膜免疫系の発達とアレルギー疾患との関連を含めて詳細に解明していくことが最も重要な検討課題であると考えられる。

E. 結論

- 1) 本研究において、パイエル板の内部に *Alcaligenes* と呼ばれる菌が優勢的に存在しているという新知見が得られた。
- 2) パイエル板に存在する抗原取り込み細胞である M 細胞に特異的に発現している GP2 が、FimH 発現細菌の取り込みを担っていることを見いだした。
- 3) CD11c^{int}CD11b^{int}のマクロファージが抗原取り込みに関与する細胞に発現することが示唆されている CX3CR1 を特異的に発現し、また IL-10 を高産生することで誘導型制御性 T 細胞を強力に誘導することが示された。
- 4) 細菌由来の TLR リガンド分子がアレルギー反応の憎悪に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 なし

Ⅲ.分担研究報告書

研究課題：粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

研究代表者：所属機関 東京大学医科学研究所

氏名 清野宏

アレルギーが取り込まれる呼吸器・消化器粘膜において異種抗原に対する積極的・消極的免疫応答が誘導・制御されている。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。本年度、清野（東大）は、16SrRNA遺伝子クローンライブラリー法を用いて、全身系免疫組織には全く認められない *Alcaligenes* が小腸パイエル板組織内と樹状細胞内に存在していることを明らかにした。この *Alcaligenes* が樹状細胞によるIgA産生増強サイトカインであるIL-6の産生を増強するという結果から、IgA産生応答により腸管内の恒常性維持に寄与している可能性が示唆された。また、GP2と呼ばれる分子がパイエル板M細胞に特異的に発現していることをマイクロアレイ解析で見いだした。審良（阪大）は、腸管粘膜固有層に存在するCD11c陽性の4つのサブセットについて解析し、CX3CR1⁺CD11c^{int}CD11b^{hi}のマクロファージがIL-10を産生し、誘導型制御性T細胞を強力に誘導することを明らかにした。川内（島根大）は、アレルギー性鼻炎マウスモデルを用いてアレルギー反応相におけるLPSの同時点鼻投与によりアレルギー性鼻炎症状が増悪することを明らかにした。

A. 研究目的

アレルギーの主要取り込み部位となり、かつ多くのアレルギー疾患の発症部位ともなっている粘膜組織においては、粘膜免疫システムと呼ばれるユニークな免疫機構が存在し、異種抗原に対する排除と寛容・共生を巧みに制御している。粘膜免疫システムの破綻がアレルギー発症に関与することが様々な研究から示されている。その一方で、これまでの研究から粘膜免疫の発達・制御に腸内フローラを始めとする外的環境因子を介した刺激が必要であることが示唆されているが、外的環境因子を介した粘膜免疫制御とアレルギー疾患との三次元的相互作用に関する体系的な実験的検証はほとんど無いのが現状である。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）の分野における基礎・臨床的最端的研究チームによる共同研究により、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きた。

本年度は腸管免疫において重要な免疫誘導組織として機能しているパイエル板における腸内フローラ形成とそれに関わる宿主側因子の同定、さらには宿主側因子を標的としたターゲティング分子の作製、腸内フローラを介した自然免疫シグナルを受け取り免疫制御の司令塔として機能する抗原提示細胞の各サブセットの機能解析、自然免疫シグナルを介した刺激とアレルギー症状との関連について検討を行った。

B. 研究方法

1) パイエル板内に存在する常在細菌の解析

パイエル板組織における常在細菌を解析する目的でパイエル板組織を摘出し、16S rRNA クローンライブラリー法と FISH 法により腸内細菌ゲノム情報を基盤にした腸内フローラ構成・分布解析を行った。

さらにパイエル板から樹状細胞を回収し、パイエル板存在細菌の樹状細胞への取り込みを解析すると共に、無菌マウスから得られた樹状細胞を用い、樹状細胞内に存在する細菌を作用させた際の免疫学的影響について検討した。

2) 腸管抗原取り込み機構解明へ向けた GP2 特異的抗体の樹立

マウス GP2 を発現する遺伝子を強制発現した HeLa 細胞を作製し、ラットに免疫した。定法に従いハイブリドーマを作製した後、各ハイブリドーマが産生する抗体の GP2 に対する反応性を GP2 発現 CHO 細胞と非発現 CHO 細胞の反応性を比較することで決定した。作製できた GP2 抗体は Whole mount 染色法によりパイエル板をはじめとする腸管組織における反応性を確認した。

3) 腸管樹状細胞サブセットにおける TLR・ケモカイン受容体の発現解析

マウス腸管から定法に従い、粘膜固有層細胞を単離し、各樹状細胞サブセットにおける CX3CR1 の発現について、CX3CR1 特異的抗体を用いたフローサイトメトリーにて発現を検討した。

4) マウスアレルギー性鼻炎・花粉症モデルとヒト病態との類似性の検証

TLR とそのリガンドの観点からアレルギー反応相におけるグラム陰性菌由来 LPS の影響について検討する目的で、Alum を用いた卵白アルブミン (OVA) の腹腔内投与による全身感作後、OVA を 21 から 28 日まで反復点鼻投与して OVA に対するアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製した。本実験においては、正常マウスに加え TLR2 や TLR4 を欠損したマウスを用い、LPS は OVA と同時に点鼻投与した。さらにヒト単球細胞株 (U937) や気道粘膜上皮細胞株 (CCL30, A549) の

TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 の発現をノーザンブロット法にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子組み換え生物を用いた研究である。従って、「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」並びに「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守するために、国立大学法人動物実験施設協議会指針に基づき、各大学にて設置されている遺伝子組換え安全委員会及び実験動物委員会の審査を受けた上で、またその管理の下、研究活動を実施した。

C. 研究結果

1) パイエル板内に存在する常在細菌の解析

16S rRNA クローンライブラリ法ならびに FISH 法を用いてパイエル板内における常在細菌を解析したところ、パイエル板内部においては *Alcaligenes* と呼ばれる菌が優勢的に存在していた。これは飼育環境によらず一定で各マウス業者から購入したマウスや異なる施設で飼育したマウスにおいて普遍的に認められた。パイエル板から樹状細胞を回収し *Alcaligenes* の存在を調べたところ、*Alcaligenes* の一部がパイエル板樹状細胞の内部に存在していることを示唆する結果が得られた。さらに無菌マウスから得られた樹状細胞に *Alcaligenes* を作用させると、IgA 産生増強サイトカインである IL-6 の産生が増強していた。

2) 腸管抗原取り込み機構解明へ向けた GP2 特異的抗体の樹立

パイエル板には M 細胞と呼ばれる抗原取り込み細胞が存在する。吸収上皮細胞との機能的差異を検討する目的でマイクロアレイ解析を行ったところ、GP2 と呼ばれる分子が M 細胞において強く発現し

ていることが判明した。GP2 の発現を確認する目的で、抗 GP2 抗体を作製した。新たに樹立できた抗体は細胞株に強制発現させた GP2 を認識するだけでなく、パイエル板 M 細胞に発現する GP2 を認識することが可能であった。

3) 腸管樹状細胞サブセットにおける TLR・ケモカイン受容体の発現解析

腸管固有層の CD11c 陽性細胞は、2 種類の樹状細胞 (CD11c^{hi}CD11b^{low} と CD11c^{hi}CD11b^{hi})、マクロファージ (CD11c^{int}CD11b^{int})、好酸球 (CD11c^{int}CD11b^{hi}) の 4 つのサブセットからなる。管腔抗原を取り込む抗原提示細胞には CX3CR1 が発現することが知られているが、その発現細胞に関する詳細な情報は得られていない。本研究から、上記の 4 種類の CD11c 陽性細胞のうち、CX3CR1 は CD11c^{hi}CD11b^{hi} 樹状細胞には発現しておらず、CD11c^{int}CD11b^{int} のマクロファージに特異的に発現していることが判明した。さらに CX3CR1 陽性 CD11c^{int}CD11b^{int} マクロファージは、IL-10 を産生する抑制性のマクロファージで、誘導型制御性 T 細胞を強力に誘導した。

4) マウスアレルギー性鼻炎・花粉症モデルとヒト病態との類似性の検証

野生型である C3H/HeN マウスでは、アレルギー反応相における LPS の同時点鼻投与により、くしゃみの回数、好酸球浸潤、Th2 型サイトカイン産生の増強が観察された。これらの LPS の影響は TLR4 欠損マウスでは認められなかった。またノーザンブロット法にて各ヒト由来細胞株で様々な TLR の発現を調べたところ、ヒト単球の細胞株 (U937) では TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 のいずれも発現していたが、気道粘膜上皮細胞の細胞株 (CCL30, A549) では、LPS 刺激で誘導的に TLR2, TLR3, TLR6 を発現してくるが、

TLR4, TLR9 については発現を認めなかった。また培養ヒト鼻粘膜上皮細胞における検討結果では、mRNA レベルでも TLR4 に特異的な遺伝子発現を認めなかった。

D. 考 察

Alcaligenes の存在はパイエル板以外の絨毛部位には認められなかったことから、パイエル板に何らかの特異的取り込み機構が存在することが示唆された。*Alcaligenes* がパイエル板に特異的に存在し、かつその一部は樹状細胞に取り込まれ、IgA 産生をはじめとする腸管免疫の発達に関わっているという今回の知見は、粘膜免疫系の誘導・制御さらに発達における腸内フローラの影響とアレルギー発症との関連において新たな機軸からの免疫制御を示唆する興味深いものである。また、本研究において樹立することが出来た GP2 特異的抗体を用いることで、パイエル板 M 細胞を標的とした経口免疫寛容を利用したアレルギー粘膜免疫療法の開発へと発展させることが出来ると期待される。

腸内フローラを介した刺激を認識し免疫応答を制御する抗原提示細胞については、これまでいくつかのサブセットが知られていた。そのうちのひとつとしてケモカイン受容体である CX3CR1 を発現する細胞は腸管管腔の抗原を補足することが示唆されていた。今回の研究から、CD11c^{int}CD11b^{int} のマクロファージが CX3CR1 を特異的に発現し、また IL-10 を高産生することで誘導型制御性 T 細胞を強力に誘導することが示された。このことは管腔抗原の取り込みから処理・提示のプロセスにおいては、GP2 発現 M 細胞を介したパイエル板への取り込み経路と CX3CR1 発現 CD11c^{int}CD11b^{int} マクロファージを介した経路の関与が示唆され、その連携など今後の検討が期待される。さら

には本研究から TLR を介した刺激がアレルギー疾患の制御において重要であることも示されたことから、各取り込み経路の違いとそこから生じる自然免疫応答の差異、さらにはアレルギー疾患との関連について、腸内フローラの種類の違いも含め、今後さらなる解明が必要であると考えられる。

近年、特に乳幼児期における免疫系の発達とアレルギー発症との関連が強く示唆されていることから、今後は *Alcaligenes* を始めとする腸内フローラの形成とその取り込みに関わる GP2 陽性 M 細胞や抗原提示細胞群の分化、さらにはそれに引き続く免疫応答について、乳幼児期における粘膜免疫系の発達とアレルギー疾患との関連を含めて詳細に解明していくことが最も重要な検討課題であると考えられる。

E. 結論

- 1) 本研究において、パイエル板の内部に *Alcaligenes* と呼ばれる菌が優勢的に存在しているという新知見が得られた。
- 2) パイエル板に存在する抗原取り込み細胞である M 細胞に特異的に発現している GP2 が同定された。
- 3) CD11c^{int}CD11b^{int} のマクロファージが抗原取り込みに関与する細胞に発現することが示唆されている CX3CR1 を特異的に発現し、また IL-10 を高産生することで誘導型制御性 T 細胞を強力に誘導することが示された。
- 4) 細菌由来の TLR リガンド分子がアレルギー反応の憎悪に関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表：60 件

原著論文による発表：1 件

それ以外（レビュー等）の発表：21 件

そのうち主なもの：

論文発表（国内）

合田 薫, 清野 宏, 川内秀之：アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける舌下免疫療法の治療効果および作用メカニズムの解明へむけて. 口腔・咽頭科 22(1)：31-33. 2009

佐藤あゆ子, 清野宏：粘膜免疫を基盤とした次世代アレルギー制御戦略 日本臨床 67(11)：2194-2199. 2009

佐藤あゆ子, 清野宏：新規アレルギー制御戦略としての粘膜免疫分子機構 ミノファージェンメディカルレビュー 55(1)：1-8. 2009

学会発表（国内）

頓宮美樹, 山田高也, 合田 薫, 清水保彦, 佐野千晶, 川内秀之：マウスを用いたアレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の治療効果および作用メカニズムについての検討. 第 17 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 千葉市, 2009 年 2 月 13 日

小幡高士, 清野宏：Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated symbiosis. 第 18 回東京免疫フォーラム, 東京大学医科学研究所, 2009 年 3 月 12 日

審良静男. 自然免疫と自己免疫病. 第 2

1 回日本アレルギー学会春季臨床大会.
岐阜. 2009年6月4日

2) 海外

口頭発表 : 24 件

原著論文による発表 : 40 件

それ以外 (レビュー等) の発表 : 13 件
そのうち主なもの :

論文発表 (海外)

Terahara K, Yoshida M, Taguchi F, Igarashi O, Nochi T, Gotoh Y, Yamamoto T, Tsunetsugu-Yokota Y, Beauchemin N, and Kiyono H. Expression of newly identified secretory CEACAM1 (α) isoforms in the intestinal epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383:340-6. 2009.

Kim D, Kim SH, Park EJ, Kim J, Cho SH, Kagawa J, Arai N, Jun K, Kiyono H, Kim S. Suppression of allergic diarrhea in murine ovalbumin-induced allergic diarrhea model by PG102, a water-soluble extract prepared from *Actinidia arguta*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 150:164-71. 2009.

Takahashi I, Nochi T, Yuki Y and Kiyono H. New horizon of mucosal immunity and vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 21:352-8. 2009.

Fujihashi K and Kiyono H. Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol.* 30:334-43. 2009.

Yuki Y, and Kiyono, H. Mucosal vaccines: novel advances in technology and delivery. *Exper. Rev. Vaccine* 8:

1083-1097. 2009.

Yuki Y, Tokuhara D, Nochi T, Yasuda H, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Kataoka N, Nakanishi U, Hagiwara Y, Fujihashi K, Takaiwa F, and Kiyono H. Oral MucoRice expressing double-mutant cholera toxin A and B subunits induces toxin-specific neutralising immunity. *Vaccine.* 27:5982-8. 2009.

Nagatake T, Fukuyama S, Kim DY, Goda K, Igarashi O, Sato S, Nochi T, Sagara H, Yokota Y, Jetten AM, Kaisho T, Akira S, Mimuro H, Sasakawa C, Fukui Y, Fujihashi K, Akiyama T, Inoue J, Penninger JM, Kunisawa J, and Kiyono H. Id2-, ROR γ t-, and LT β R-independent initiation of lymphoid organogenesis in ocular immunity. *J. Exp. Med.* ;206(11):2351-64. 2009.

Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, Akiba H, Yagita H, Kiyono H and Williams IR. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol.* 183:5738-47. 2009.

Nochi T, Yuki Y, Katakai Y, Shibata H, Tokuhara D, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nakanishi U, Ono F, Mimuro H, Sasakawa C, Takaiwa F, Terao K, Kiyono H. A rice-based oral cholera vaccine induces macaque-specific systemic neutralizing antibodies but does not influence pre-existing intestinal immunity. *J Immunol.* 183:6538-44. 2009.

Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, Yabashi A, Waguri S, Nakato G, Kimura S, Murakami T, Iimura M, Hamura K, Fukuoka S, Lowe AW, Itoh K, Kiyono H, and Ohno H. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462(7270):226-30. 2009.

Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, and Akira S. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. *Nature* 30;458(7242):1185-90. 2009.

Kawagoe T, Takeuchi O, Takabatake Y, Kato H, Isaka Y, Tsujimura T, and Akira S. TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. *Nat. Immunol.* 10:965-72. 2009.

Akira S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. *Immunol. Rev.* 227(1):5-8, 2009.

Obata T, Goto Y, Kunisawa J, Sato S, Sakamoto M, Setoyama H, Matsuki T, Nonaka K, Shibata N, Gohda M, Kagiya Y, Nochi T, Yuki Y, Fukuyama Y, Mukai A, Shinzaki S, Fujihashi K, Sasakawa C, Iijima H, Goto M, Umesaki Y, Benno Y, and Kiyono H: Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues and share a mucosal antibody-mediated

symbiosis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. Apr 1. 2010.

Paveglia SA, Allard J, Foster Hodgkins SR, Ather J, Bevelander M, Mayette Campbell J, Whittaker Leclair LA, McCarthy SM, van der Vliet A, Suratt BT, Boyson JE, Uematsu S, Akira S, Poynter ME. Airway Epithelial Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibits CD4+ T Cells During *Aspergillus fumigatus* Antigen Exposure. *Am. J. Respir. Cell. Mol Biol.* 2010.

学会発表 (海外)

Kiyono H. Mucosal Immunology of the gut: what are the barriers to the next generation of enteric in developing countries?, Session Discussant, Seattle, USA. February, 2009.

Kiyono H. World immune regulation Meeting III, "Mucosal decision for immunity, tolerance and vaccine". Lecture, Davos, Switzerland. March, 2009.

Kiyono H. The 13th International Conference on Emerging Infectious Diseases of the Pacific Rim: Focus on Enteric Diseases, Keynote Address, "Mucosal Immunity: A driving force for the development of New generation of oral Vaccine, Lecture, Kolkata, India. April, 2009.

Kiyono H. The 6th Extraordinary International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, "Mucosal Decision of immunity and tolerance for creation of symbiosis", Special

Lecture, Seoul, Korea. May, 2009.

Obata T, Gotoh Y, Shibata N, Sato S, Kunisawa J, and Kiyono H. Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut-associated lymphoid tissues for mucosal antibody-mediated symbiosis. The 96th annual Meeting of the American Association of Immunologists, Seattle, Washington, USA, May 8-12, 2009.

Kiyono H. 14th International Congress of Mucosal Immunology, "Rice-based Vaccine: New generation of mucosal Vaccine", Lecture, Boston, USA. July, 2009.

Kiyono H. 2nd European Congress of Immunology, "Mucosal harmony for immunity and tolerance in Vaccine development", Lecture, Berlin, Germany. September, 2009.

Kiyono H. U.S.-Japan Joint AIDS-Hepatitis Meeting, "New horizon of mucosal immunity and vaccines", Lecture, Portland, USA. September, 2009.

Kiyono H. 3rd Vaccine Global Congress, "New prospect for Vaccine development: MucoRice and MucoNanogel", Lecture, Singapore. October, 2009.

Kiyono H. Mucosal immunology Workshop, Session1 "Id2, RORgt, and LTbR independent initiation of TALT genesis in ocular immunity." and Session2 "Indigenous opportunistic bacteria inhabit mammalian gut associated

lymphoid tissues for gut immunity." , Trudeau Institute, New York, USA. October, 2009.

Kiyono H. China-Japan Reserch Collabotation on Emerging and Reemerging Infections: First Five Years and Future, "Novel mucosal Vaccine strategies against emerging and re-emerging infections" , Lecture, Beijing ,China. October, 2009.

Kiyono H. 12th Asia Pacific-International Molecular Biology Network (A-IMBN) Symposium, "MucoRice: New horizon for the development of oral Vaccine" , Lecture, Penang ,Malaysia. October, 2009.

Akira S. "TLRs and Inflammation." Keystone Symposia Conference: Pattern Recognition Molecules and Immune Sensors of Pathogens. Canada. Mar. 29, 2009.

Goda K, Yamada T, Tongu M, and Kawauchi H, and Aoi N. A murine model of allergic rhinitis with sublingual immunotherapy. Rhinology World 2009, Philadelphia, Pennsylvania, USA, April 15-19, 2009.

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

出願中

なし

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等予防・治療研究事業）
研究報告書

研究課題：粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

分担研究者：所属機関 大阪大学免疫学フロンティア研究センター・拠点長
大阪大学微生物病研究所自然免疫学・教授
氏 名 審良 静男

A. 研究目的

我々は細菌のフラジェリンを認識する Toll-like receptor 5 (TLR5) が腸管粘膜固有層の CD11c^{hi}CD11b^{hi} 樹状細胞に特異的に発現しており、自然免疫応答を誘導するとともに、液性免疫、細胞性免疫の誘導にも必須の役割を果たすことを報告した。過去の報告によると、粘膜固有層にはケモカイン受容体の CX3CR1 を発現し、上皮細胞間隙から抗原を取り込み免疫応答を惹起する樹状細胞が存在しているという報告があった。今回、CX3CR1 が CD11c^{hi}CD11b^{hi} 樹状細胞に発現しているかを検討した。

B. 研究方法

マウス腸管から粘膜固有層細胞を単離し、CX3CR1 の特異的抗体によってフローサイトメトリーにて発現を検討した。

C. 結果

LP の CD11c⁺細胞は、2種類の樹状細胞 (CD11c^{hi}CD11b^{low} と CD11c^{hi}CD11b^{hi})、マクロファージ (CD11c^{int}CD11b^{int})、好酸球 (CD11c^{int}CD11b^{hi}) の4つのサブセットからなる。CX3CR1 は CD11c^{hi}CD11b^{hi} 樹状細胞には発現しておらず、CD11c^{int}CD11b^{int} のマクロファージに特異的に発現していた。CD11c^{int}CD11b^{int} マクロファージは、IL-10 を産生する抑制性のマクロファージで、誘導型制御性 T 細胞を強力に誘導した。

D. 考 察

以前より、腸管管腔の抗原を捕捉する CX3CR1 陽性の樹状細胞が存在していることが報告されていた。しかしながら、今回の解析により粘膜固有層の CX3CR1 陽性細胞は樹状細胞ではなく、マクロファージであることが分かった。機能解析から、これらのマクロファージは抑制性の機能を有しており、腸管管腔の抗原を捕捉して免疫寛容を誘導していることが考えられ、アレルギー制御に応用性が考えられる経口免疫寛容の解明に繋がる成果である。

E. 結論

腸管粘膜固有層の CD11c^{hi}CD11b^{hi} 樹状細胞には CX3CR1 は発現しておらず、CD11c^{int}CD11b^{int} の抑制性マクロファージに特異的に発現していることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表：12 件

原著論文による発表：63 件

それ以外（レビュー等）の発表：10 件

審良静男. 自然免疫と自己免疫病. 第2
1 回日本アレルギー学会春季臨床大会.
岐阜. 2009 年 6 月 4 日

論文発表 (海外)

Matsushita K, Takeuchi O, Standley DM, Kumagai Y, Kawagoe T, Miyake T, Satoh T, Kato H, Tsujimura T, Nakamura H, and Akira S. Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay. Nature 30;458(7242):1185-90. 2009.

Kawagoe T, Takeuchi O, Takabatake Y, Kato H, Isaka Y, Tsujimura T, and Akira S. TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. Nat. Immunol. 10:965-72. 2009.

Akira S. Innate immunity to pathogens: diversity in receptors for microbial recognition. Immunol. Rev. 227(1):5-8, 2009.

Paveglio SA, Allard J, Foster Hodgkins SR, Ather J, Bevelander M, Mayette Campbell J, Whittaker Leclair LA, McCarthy SM, van der Vliet A, Suratt BT, Boyson JE, Uematsu S, Akira S, Poynter ME. Airway Epithelial Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibits CD4+ T Cells During Aspergillus fumigatus Antigen Exposure. Am. J. Respir. Cell. Mol Biol. 2010.

学会発表 (海外)

Akira S. "TLRs and Inflammation." Keystone Symposia Conference: Pattern Recognition Molecules and Immune Sensors of Pathogens. Canada. Mar. 29, 2009.

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

出願中

なし

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等予防・治療研究事業）
研究報告書

研究課題：粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

分担研究者：所属機関 島根大学医学部耳鼻咽喉科 教授

氏名：川内秀之

A. 研究目的

1) マウスアレルギー性鼻炎モデルでの舌下・嚥下免疫療法の機序の解明

舌下・嚥下免疫療法の機序を解明するため、マウスアレルギー性鼻炎モデルを用いて検討をおこなった。

2) マウスアレルギー性鼻炎・花粉症モデルとヒト病態との類似性の検証

我々は、マウスアレルギー性鼻炎・スギ花粉症モデルの病態の中で、過敏性の亢進における肥満細胞と好酸球の役割について検討してきた。これまで、TLR とそのリガンドの観点から誘導相における Th1 inducer である OK432 の影響と反応相における LPS の影響について検討してきた。今回は TLR2 や TLR4 遺伝子を欠損したマウスを用いて検討した。

3) ヒト気道粘膜における TLR の発現

上気道粘膜での TLR の発現とアレルギーや感染防御における関与を検討する目的で、ヒト気道粘膜における TLR の発現を調べた。

B. 研究方法

1) マウスアレルギー性鼻炎モデルでの舌下・嚥下免疫療法の機序の解明

卵白アルブミン(OVA)の腹腔内投与による全身免疫後、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。舌下免疫療法モデルの作製には麻醉下で舌下粘膜へ OVA を滴下する方法を用いた。またマウスの CCL19, CCL21 の cDNA をコードするプラスミドを作製し、アレルギ

一性鼻炎に対する抑制効果を検討した。

2) マウスアレルギー性鼻炎・花粉症モデルとヒト病態との類似性の検証

実験プロトコールは、Day0 と 7 に Alum を用いた OVA の腹腔内投与により全身感作したマウスから、Day14 に血清を採取し ELISA 法にて OVA 特異的抗体価を測定した。Day21 から 28 まで、OVA および LPS の点鼻を行い、最終点鼻直後より 5 分間くしゃみの回数を測定し、鼻粘膜組織を採取して組織学的検討を行った。OK432 は day0, 7 に 100 μ g 腹腔内投与した。

3) ヒト気道粘膜における TLR の発現

ノーザンブロット法にてヒトの単球の細胞株 (U937) では TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 いずれも発現していたが、気道粘膜上皮細胞の細胞株 (CCL30, A549) では、LPS 刺激で構成的に TLR2, TLR3, TLR6 を発現してくるが、TLR4, TLR9 については発現を認めなかった (PCR 法では、気道粘膜上皮細胞株において TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 に特異的な mRNA の発現を認めている)。培養ヒト鼻粘膜上皮細胞における検討結果では、mRNA レベルでも TLR-4 に特異的な遺伝子発現を認めなかった。

C. 結果

1) マウスアレルギー性鼻炎モデルでの舌下・嚥下免疫療法の機序の解明

OVA 投与群では、いずれの投与時期においても、血清特異的 IgE 抗体の有意な低下を認

めた。また、OVA 舌下投与群では、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。これらのリンパ節ではCD4+CD25+ T細胞数の増加は認めないものの、本細胞群のFoxp3 およびIL-10 特異的な mRNA の発現増強が認められた。OVA と CCL19/CCL21 プラスミドを同時投与した際には、脾臓の CD4 陽性 T 細胞からの Th2 型サイトカイン (IL-5) 産生の抑制効果の増強を認めた。

2) マウスアレルギー性鼻炎・花粉症モデルとヒト病態との類似性の検証

野生型である C3H/HeN マウスでは、OK-432 投与群で非投与群に比較して、血清 OVA 特異的 IgE、IgG1 が有意に低値を示し、IgG2a は有意に高値を示した。しかしながら、TLR2 欠損マウスでは、2 群間で有意差を認めなかった。脾臓 T 細胞におけるサイトカインは野生型の C3H/HeN マウスでは OK432 投与群で IL-4 が有意に低値を示し、IFN- γ が有意に高値を示していたが、TLR2 欠損マウスでは、2 群間で有意差を認めなかった。さらに、TLR 4 欠損マウスでは、野生型マウスで認められた反応相における LPS の同時点鼻投与の影響（くしゃみの回数、好酸球浸潤、Th2 型サイトカイン産生の増強）が有意に認められなかった。

E. 結論

1) マウスアレルギー性鼻炎モデルでの舌下・嚥下免疫療法の機序の解明

マウスアレルギー性鼻炎モデルにおいて、舌下免疫療法が有効な治療手段となりうることを確認した。さらに、その機序について、炎症局所における制御性 T 細胞が重要であることを証明した。現在、アレルゲンの投与ルートによる抑制効果の違いや CCL19 や CCL21 による制御性 T 細胞制御を介した機序について更なる検討を加えている。

2) マウスアレルギー性鼻炎・花粉症モデルとヒト病態との類似性の検証

OK432 が誘導相において TLR2 を介して単球系細胞より IL-12 産生を誘導することにより、抗原特異的 Th2 応答を制御していることが示唆された。さらに、反応相において LPS

が肥満細胞の TLR4 を介し IL-5 発現を誘導することによりアレルギー性炎症の増悪因子として作用することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表：10 件

原著論文による発表：0 件

それ以外（レビュー等）の発表：0 件

そのうち主なもの：

論文発表（国内）

合田 薫, 清野 宏, 川内秀之：アレルギー性鼻炎モデルマウスにおける舌下免疫療法の治療効果および作用メカニズムの解明へむけて. 口腔・咽頭科 22(1)：31-33. 2009

学会発表（国内）

頓宮美樹, 山田高也, 合田 薫, 清水保彦, 佐野千晶, 川内秀之：マウスを用いたアレルギー性鼻炎に対する舌下免疫療法の治療効果および作用メカニズムについての検討. 第 17 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 千葉市, 2009 年 2 月 13 日

2) 海外

口頭発表：0 件

原著論文による発表：0 件

それ以外（レビュー等）の発表：0 件

そのうち主なもの：

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

出願中

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし