

## 一般演題 14

*In vitro* ヒト M細胞モデルによる M細胞標的型組換え細菌の評価Evaluation of M-cell Targeted Genetically Modified Bacteria  
by *in vitro* Human M-cell Model○榊田和彌<sup>1</sup>, 五十君静信<sup>1,2</sup><sup>1</sup>岐阜大学大学院連合獣医学研究科, <sup>2</sup>国立医薬品食品衛生研究所

【目的】 抗原特異的な腸管粘膜免疫は主にM細胞が抗原を取り込むことにより惹起される。そのためM細胞を標的としたワクチン抗原の投与は、効果的な免疫誘導が期待される。*In vivo*ではヒトのM細胞は数が少なく、初代培養も困難なため、*in vitro*でM細胞標的分子の選抜に利用可能なヒトM細胞系が望まれている。本研究では培養細胞を用い*in vitro*ヒトM細胞モデルを作成し、その機能評価を行った。また、M細胞によるワクチン抗原の効率的な取り込みを目的としM細胞を標的とする遺伝子組換え乳酸菌を作出し、その抗原運搬体としての評価を行った。

【方法】 ヒトM細胞モデルはC2BBel細胞とRaji B細胞の共培養により作成した。M細胞モデルとしての評価は単層膜に発現するM細胞マーカーの検出、機能面は単層膜を介した微粒子の透過を指標に評価した。また、M細胞モデルの特異的な透過能を検討するため、M細胞への侵入因子である *Yersinia* Invasin を発現する組換え大腸菌を作成し、その透過菌数の変化をM細胞モデルにより検討した。M細胞を標的とする抗原運搬体はInvasinを発現する *Lactobacillus casei* IGM393株を作出し、M細胞モデルを用いてその接着菌数、取り込み菌数、透過菌数を評価した。

【結果】 Raji細胞と共培養後のC2BBel細胞の単層膜は、ヒトM細胞マーカー sialyl Lewis A抗原の発現量が上昇した。また、共培養後の単層膜では微粒子、及び *L. casei* の透過が促進された。また、Invasin発現する大腸菌は非発現株に比べ、M細胞モデルによる透過菌数が増加した。一方、Invasinを発現する *L. casei* はM細胞モデルへの接着菌数は増加したが、透過菌数は増加しなかった。

【考察】 Raji細胞との共培養によりC2BBel細胞の単層膜はヒトM細胞マーカーの発現が上昇し、微粒子及び細菌の単層膜を介した透過能を示した。また、大腸菌を宿主とした場合M細胞への侵入因子を認識し、*in vivo*でも見られる透過の促進が観察された。作成したモデルはM細胞様の表現形質及び機能を示すことから、*in vitro*におけるヒトM細胞モデルとしての利用が期待される。一方、Invasinを発現する *L. casei* のM細胞モデルによる透過菌数は大腸菌とは異なる結果が得られた。

## 一般演題 15

## 粘膜系M細胞の微生物取り込みと抗原特異的免疫応答誘導における役割の解析

## The role of M cells as an Gateway for Bacterial Antigens in Mucosal Tissues Plays on Antigen-specific Immune Responses

○佐藤あゆ子, Kim Dong-Yong, 福山 聡, 清野 宏  
東京大学医科学研究所

**【目的】** 腸管内に存在する抗原は小腸パイエル板上皮細胞層 (FAE) に存在するM細胞を介して取り込まれ, M細胞およびパイエル板内に存在する免疫担当細胞により自然・獲得免疫応答が誘導される。このことから, M細胞は腸管粘膜免疫応答の抗原門戸であると考えられてきた。このM細胞は, パイエル板FAEのみならず, 小腸絨毛上皮細胞層にも存在することが見いだされ, パイエル板M細胞と同様にタンパク質および微生物抗原を取り込む能力があることが確認されており, 共生細菌との相互作用による宿主恒常性の維持と病原性細菌に対する防御免疫応答を制御する機構への関与についての解明が待たれている。腸管への入り口である鼻腔咽頭関連組織も常に外来抗原に曝されており, その抗原取り込みシステムと常在菌/病原菌との関連も重要な課題である。本研究では, 鼻腔粘膜組織上皮細胞層において外来抗原取り込みに重要な役割を果たすM細胞が存在することを見だし, その免疫応答への関与について詳細に解析し, 腸管におけるM細胞と比較検討した。

**【方法】** BALB/cマウスの鼻腔粘膜組織をM細胞特異的抗体を用いて免疫組織染色により解析した。また, タンパク質抗原や微生物を経鼻投与し, M細胞の抗原の取り込み能について解析した。さらに, 腸管におけるパイエル板に相当する鼻腔咽頭関連リンパ組織 (NALT) を欠損している  $Id2^{-/-}$ マウスを用いて, 経鼻投与された微生物に対する特異的抗体産生応答誘導について解析した。

**【結果】** マウス鼻腔粘膜単層上皮細胞層には, パイエル板やNALTに存在するM細胞と同様な特徴である短く疎な微絨毛を有する  $NKM16-2-4^{+}UEA-1^{+}WGA^{-}$ 細胞が存在していた。これらの細胞は, 他の呼吸上皮細胞や嗅上皮細胞と比較してOVAなどのタンパク質抗原およびサルモネラや溶連菌などの微生物抗原を効率良く取り込む能力を有していた。 $Id2^{-/-}$ マウスを用いた解析により, 経鼻投与された微生物に対する特異的抗体産生応答がNALT非依存的に誘導される機構が存在することが明らかとなった。

**【考察】** マウス鼻腔粘膜M細胞は, 鼻腔咽頭関連粘膜組織における抗原門戸であり, 末梢および粘膜組織における抗原特異的免疫応答誘導に重要な役割を果たしていることが示された。

## 一般演題 16

## 粘膜系樹状細胞と腸内細菌による小腸パイエル板T細胞領域の形成維持機構

## Maintenance of T Cell Retention in the Interfollicular Region of Peyer's Patches by Dendritic Cells and Commensal Bacteria

○柴田納央子<sup>1,2</sup>, 小幡高士<sup>1</sup>, 後藤義幸<sup>1</sup>, 石川いずみ<sup>1</sup>, 佐藤慎太郎<sup>1</sup>, 国澤 純<sup>1,2</sup>, 清野 宏<sup>1,2</sup><sup>1</sup>東京大学医科学研究所 炎症免疫学分野, <sup>2</sup>東京大学大学院新領域創成科学研究科

【目的】共生細菌や病原性細菌, 食餌性抗原といった多種多様な抗原に常時曝されている腸管には, 粘膜免疫システムと呼ばれる独自の免疫システムが存在し, 各種抗原に対する免疫学的排除と寛容を行っている. パイエル板は腸管に存在する代表的リンパ組織であり, 抗原特異的免疫応答を誘導する誘導組織として機能している. 組織構造学的にパイエル板は, 抗原取り込み専門細胞であるM細胞が存在する上皮細胞層とその直下に位置し樹状細胞が多く存在するドーム領域, 主にB細胞が集積するリンパ濾胞, 樹状細胞とT細胞が観察される濾胞間領域の4つの領域から構成されている. これらの構造によりパイエル板においては, M細胞を介し腸管管腔より取り込まれた抗原が, 直下に存在する樹状細胞により捕捉処理されT細胞やB細胞に提示されることで抗原特異的免疫応答が誘導される. これらの連続的免疫誘導反応には, 精密な細胞分布制御による微細構造構築と維持が必要不可欠であるが, その詳細なメカニズムについては多くが未解明である. 本研究では, パイエル板における免疫担当細胞の分布制御について, 抗原の捕捉と提示を行うことで抗原特異的免疫応答誘導において中核的役割を担っている樹状細胞と, 腸管における主要な常在抗原の一つである腸内細菌に焦点をあて, その役割を詳細に検討した.

【方法】ジフテリア毒素の投与により樹状細胞が消失するCD11c-ジフテリア毒素受容体トランスジェニックマウス及び腸内細菌の存在しない無菌マウスを用い, 樹状細胞消失時及び腸内細菌非存在下でのパイエル板内免疫担当細胞分布の変化について免疫組織染色法, 定量的PCR法, ならびにFACS法による解析を行った.

【結果と考察】ジフテリア毒素投与24時間後には樹状細胞の消失が, パイエル板をはじめとする2次リンパ組織で確認された. これら樹状細胞が消失したパイエル板での免疫担当細胞分布について組織学的解析を行ったところ, B細胞が集積するリンパ濾胞や活性化B細胞が集積する胚中心の形成には変化が認められなかったが, 濾胞間T細胞領域の形成不全が認められた. これらの結果と相関し, 濾胞間T細胞領域の大部分を占めるナイーブT細胞数が有意に減少する一方で, リンパ濾胞に存在する活性化T細胞数には変化が認められなかった. 同様に樹状細胞を消失させたマウスの腸間膜リンパ節, 脾臓においてはT細胞領域が正常に形成されたことから, 樹状細胞の消失により観察されるT細胞領域の形成不全は, パイエル板に特有であることが示された. さらにこれまでの研究から, 樹状細胞とナイーブT細胞の濾胞間T細胞領域への誘引を主に担っている因子として, 濾胞間T細胞領域に存在するストローマ細胞により分泌されるケモカイン, CCL19/CCL21が考えられてきたが, 免疫組織染色法及び定量的PCR法による解析の結果, 樹状細胞消失後もストローマ細胞は濾胞間T細胞領域に存在し, ストローマ細胞由来CCL19/CCL21の発現量にも変化が見られなかった. また無菌マウスのパイエル板においては正常なT細胞領域の形成が観察されたことから, パイエル板特異的なT細胞領域の形成機構は腸内細菌非依存的であることが示され, パイエル板濾胞間T細胞領域の形成には, これまで提唱されてきたようなストローマ細胞由来のケモカインCCL19/CCL21による細胞誘引メカニズムだけではなく, 樹状細胞による, 腸内細菌非依存的なナイーブT細胞動態制御機構が関与することが示唆された.

## 一般演題 17

## TLR刺激に対するパイエル板樹状細胞の免疫応答性の解析

## Immune Response of Peyer's Patch Dendritic Cells to TLR Ligands

○輪島隼一, 上滝隆太郎, 塩河亜弥, 八村敏志

東京大学大学院農学生命科学研究科 食の安全研究センター

**【目的】** 腸管においてIgAおよびT細胞応答は、病原性微生物の侵入を防ぎ、腸内フローラを制御し、またプロバイオティクスの効果発現に重要である。これに関し、腸管に存在する樹状細胞 (DC) が中心的な役割を担うことが明らかになってきている。また、DCはToll様受容体 (TLR) を介して微生物を認識し、様々な免疫反応を制御している。そこで本研究では、腸管に存在するパイエル板樹状細胞 (PP DC) に着目し、TLR刺激に対して誘導されるIgA産生誘導因子およびT細胞分化誘導因子について解析した。

**【方法】** CpGオリゴDNA (CpG), LPS, リポタイコ酸 (LTA), ペプチドグリカン (PG), リポペプチド Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (P3C) を用いてPP DCおよび脾臓 (SPL) DCを刺激し、その際のIgA産生やT細胞分化誘導に関連する免疫調節因子のmRNA発現を比較した。また、CpG, P3Cを同時に加えた場合について検討した。さらに、蛍光セルソーターを用いて細胞表面分子発現によりPPDCを各サブセットに分画し、CpG, P3Cに対する応答性を調べた。

**【結果】** PP DCはCpG, P3Cに対して強い応答性を示し、この特定のリガンドに対する選択的な反応性はSPL DCにおいては観察されなかった。さらに、PP DCにおいてIL-6, Aldh1a2 (レチノイン酸 (RA) 変換酵素), Ebi3 (IL-27サブユニット) 発現はCpG, P3Cのどちらの刺激によっても誘導されたが、p40 (IL-12/23サブユニット), p28 (IL-27サブユニット) 発現はCpG刺激のみ、IL-10, p35 (IL-12サブユニット), p19 (IL-23サブユニット) 発現はP3C刺激のみによって誘導されるといったように、PP DCはTLRリガンド特異的な応答性を示した。また、P3CはCpG刺激したPP DCによる免疫応答性を抑制した。さらに、PP DCサブセット間の比較については、PP CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup>細胞群が、TLR刺激に対し高い応答性を有していた。

**【考察】** 本研究により、PP DCの特定のサブセットがTLR刺激に対して選択的に応答し、IgA産生やT細胞の分化誘導に関与していることが示唆された。このような微生物成分に対する腸管DCの特異的な応答性が、腸内共生菌、プロバイオティクスによる免疫調節にとって重要であると考えられる。