M細胞を標的とした粘膜関連リンパ組織への効果的な蛋白質の送達技術の開発

特集 バイオ素材による創薬とDDS

野地智法・清野 宏*

Development of effective protein delivery system to mucosa-associated lymphoid tissues (MALT) with M cell-targeting technology

In mucosa-associated lymphoid tissues (MALT), such as Peyer's patches and nasopharynx-associated lymphoid tissues, all types of immunocyte including dendritic cells, T cells, B cells and others are present and form the mucosal immune network against invasion of luminal pathogenic bacteria or virus. M cells are known to be antigen-sampling cells located in the follicle-associated epithelium (FAE) of MALT and play an important role as gateway of mucosal epithelial barrier. In this review, we shed light on the recent progress of protein antigen delivery system to MALT with M cell-targeting technology for the creation of new generation of mucosal vaccine.

バイエル板や鼻咽頭関連リンパ組織を代表とする粘膜関連リンパ組織(MALT)には、樹状細胞やT細胞、B細胞などのすべての免疫担当細胞が集結することで、粘膜組織に侵入する病原細菌やウイルスに対する防御免疫システムを構築している。これらのMALTを覆う上皮層(follicle-associated epithelium: FAE)は特殊に分化しており、そこには外来抗原の取り込みを専門に行うM細胞が存在し、粘膜免疫システムにおける抗原門戸細胞として機能している。本稿では、このM細胞を標的としたMALTへの効果的な蛋白質送達技術を解説し、さらにはそれを基盤とした粘膜ワクチン開発に関する最近の展望を紹介する。

*Tomonori Nochi・Hiroshi Kiyono**

key words: M cells, mucosal vaccine, mucosal immune system

消化器や呼吸器などの粘膜組織に発達する免疫システムを総称して、われわれは粘膜免疫システムとよんでいる。“粘膜免疫学”という学問が1970年代に提唱されてから今日まで、全身免疫システムには存在しない粘膜免疫システムの特殊性が数多く報告され、食餌性栄養素の吸収や、酸素吸収を主たる機能とする消化器・呼吸器ならではの免疫防御システムの存在が明らかにされてきた^{1,2)}。

粘膜免疫システムは、粘膜組織に侵入した外来抗原に対し、抗原特異的液性ならびに細胞性の両免疫応答を全身組織のみならず粘膜組織に誘導することから、インフルエンザやエイズなどの粘膜感染症に対する予防ワクチンとして、この粘膜免疫システムを応用した“経口”“経鼻”投与型の粘膜ワクチンが昨今非常に注目されている^{1,2)}。

本稿では、効果的な粘膜ワクチンを開発すべく、

筆者らが最近開発したM細胞標的システムをM細胞の免疫生物学的特性と併せて紹介することで、MALTへの蛋白質(ワクチン抗原など)の送達技術の重要性を解説する。

粘膜免疫システムの特殊性と、抗原取り込み細胞としてのM細胞の機能的役割

粘膜組織は、食餌性抗原などの有益物質と、病原性微生物などの有害微生物を瞬時に見分け、時には積極的な(正の)免疫応答を誘導することで生体防御システムを構築し、また時には消極的な(負の)免疫応答(免疫寛容)を誘導することで不必要な免疫応答を回避するための免疫制御システムを発達させている^{1,2)}。この粘膜組織に備わる正の免疫を利用した粘膜感染症に対する予防ワクチンや、負の免疫を利用したアレルギー疾患に対する予防・治療ワクチンは、注射型ワクチンに代わる次世代型ワクチンとして、最近非常に注目されている^{1,2)}。

* Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo 東京大学医科学研究所感染・免疫部門炎症免疫学分野

図1 M細胞の細胞生物学的特徴

M細胞は隣接する上皮細胞と比較して微絨毛が短く疎であり、また樹状細胞やリンパ球といった免疫担当細胞を抱え込むポケット構造を発達させている。粘膜免疫システムは、M細胞を介して取り込んだ外来抗原に対し、抗原特異的免疫応答を全身組織のみならず粘膜組織に誘導する。

粘膜免疫システムは、消化器ではパイエル板や孤立リンパ小節、呼吸器では鼻咽頭関連リンパ組織や扁桃・アデノイドといったMALTを覆うFAEに散在するM細胞より取り込まれた外来抗原に対し、抗原特異的免疫応答を誘導する(図1)^{1,2)}。M細胞の発生分化に関しては、サルモネラ菌の感染によりその数が増加することや⁴⁾、パイエル板のFAEで高発現するケモカインの一つとして知られるMip3α/CCL20の受容体(CCR6)を欠損したマウスでは、その数が減少する⁵⁾ことなどが知られているが、今日まで完全解明には至っていない。

M細胞は、隣接する上皮細胞と比較して形態学的に非常にユニークな特徴を有しており、微絨毛が短く疎であり、また樹状細胞やリンパ球などを抱え込むポケット構造を発達させている³⁾。またM細胞内には、リソソームなどの細胞内小器官がほとんど発達しておらず、取り込まれた外来抗原は、M細胞内でなんら分解修飾されることなく管腔側から基底膜側へと輸送され、ポケット内の免疫担当細胞に速やかに送達される^{1,2)}。

M細胞の抗原取り込みメカニズムに関しては、M細胞管腔側に発現するβ1インテグリンが、M細胞を介して侵入するエルシニア菌の侵入標的となっていることが知られているが⁶⁾、今日まで完全には解明されていない。

絨毛上皮層における外来抗原の侵入門戸

パイエル板は、マウスの小腸には8~12個しか存在せず、またパイエル板のFAE上におけるM細胞の頻度は約10%しか存在しない。一方で、パイエル板を人為的に欠損したマウスに蛋白抗原を経口投与すると、野生型マウスと同程度の免疫応答が誘導されることから⁷⁾、パイエル板M細胞に非依存的な外来抗原の侵入門戸の存在がこれまで示唆されてきた。

筆者らは、マウス小腸組織における抗原門戸細胞の存在を隈なく精査した結果、絨毛上皮層にも抗原取り込み能力を有したM細胞が存在することを見だし、これを“絨毛M細胞”と命名した⁸⁾。

絨毛M細胞は、パイエル板M細胞と同様に、マウスM細胞マーカーとして多用されている*Ulex europaeus* agglutinin-1(UEA-1)に陽性反応を示し、サルモネラ菌や大腸菌などの病原微生物に対する取り込み能力を有していた。またパイエル板M細胞と同様に、微絨毛が短く疎であり、また免疫担当細胞を抱え込むポケット構造を発達させており、その特性はパイエル板M細胞に類似していた。絨毛M細胞の発生分化に関する報告は今日まで皆無であるが、パイエル板を欠損したマウスにおいても絨毛M細胞は存在することが知られていることから、絨毛M細胞はパイエル板を介さない外来抗原の侵入門戸細胞として機能していることが推測された⁷⁾。

筆者らの最近の研究では、絨毛M細胞の分化は、腸内の環境変化(ストレス)によって誘導されることを見だししており、腸内環境に応じた抗原取り込みネットワークの存在が示唆されている(投稿中)。また最近の研究では、粘膜上皮層に直接樹状突起を伸ばし、管腔内の外来抗原を取り込む能力を有した樹状細胞の存在も明らかとなり^{9,10)}、腸管粘

図2 M細胞標的型粘膜ワクチンの概要

パイエル板M細胞や絨毛M細胞に特異的なモノクローナル抗体や親和性を有する分子をキャリア分子とし、それにワクチン抗原を結合させ経口もしくは経鼻投与することで、効果的に抗原特異的免疫応答を誘導する。

膜における抗原門戸が非常に複雑であることを示唆していた。

M細胞への効果的な蛋白質送達を目的としたM細胞特異的キャリア分子の探索

粘膜上皮層を構成する上皮細胞は、通常はtight junctionなどの接着結合により強固に連結されており、病原微生物などの侵入に対する第一線防御バリアを形成している。

一方で粘膜上皮層には、上述したとおり、パイエル板M細胞や絨毛M細胞といった抗原取り込み細胞が存在し、選択的に一部の外来抗原を取り込むことで、正の免疫もしくは負の免疫応答を誘導し、生体としての恒常性(ホメオスタシス)を維持している。粘膜感染症やアレルギー疾患に対する予防ワクチンを“経口”“経鼻”投与型の粘膜ワクチンとして開発する際には、このM細胞に効果的にワクチン抗原を標的投与することが、非常に重要である

(図2)¹¹⁾。

M細胞に対する親和性分子として、これまでマウスでは、 $\alpha(1, 2)$ 型フコースを認識するレクチンの一つであるUEA-1が多用されてきたが¹²⁾、UEA-1はM細胞に加え杯細胞にも特異性を示すことから、M細胞へのワクチン抗原のデリバリー効果を向上させるためにも、より特異性の高いキャリア分子の探索がこれまで望まれてきた。

筆者らは最近、マウスパイエル板よりUEA-1陽性細胞を単離精製する技術確立し、それをラットに免疫することで、M細胞特異的モノクローナル抗体(NKM 16-2-4)を樹立することに成功した¹³⁾。興味深いことに、NKM 16-2-4は、パイエル板M細胞に加え、絨毛M細胞にも特異性を有しており、また、鼻咽頭関連リンパ組織に存在するM細胞にも特異的に反応したことから、今日知られているすべてのM細胞に反応することが組織学的に明らかとなった¹³⁾。またその特異性は、特にM細胞の管腔側に強く認められ、M細胞標的型粘膜ワク

表 1 M 細胞標的型粘膜ワクチンとその効果

キャリア分子	ワクチン抗原	投与方法	免疫効果	引用文献
NKM 16-2-4	破傷風トキソイド ボツリヌストキソイド	経口	血清 IgG 分泌型 IgA	13
UEA-1	HIV envelop(DNA)	経鼻	CTL	17
	HIV peptide (PLG 封入型)	経鼻 経口・経直腸	血清 IgG 分泌型 IgA	18
$\sigma 1$	HIV gp160(DNA)	経鼻	CTL	19
	OVA	経口	免疫寛容	20

チンのキャリア分子として必要な条件を満たしていた¹³⁾.

さらには、筆者らは最近、パイエル板より単離精製した NKM 16-2-4 陽性 M 細胞を、NKM 16-2-4 陰性の上皮細胞と比較した包括的遺伝子発現解析に供することで、パイエル板 M 細胞に特異的に発現する遺伝子として glycoprotein 2(GP2)を同定することに成功した¹⁴⁾. GP2 は GPI アンカー型の糖蛋白質であり、事実、新たに作製した GP2 特異的モノクローナル抗体(10F5-9-2)を用いた免疫組織学的解析を実施した結果、GP2 の発現はパイエル板 M 細胞の管腔側に限局して認められることが確認され、M 細胞標的型粘膜ワクチンの標的分子になりうる可能性を有していることが明らかとなった¹⁴⁾.

また Helander らは、 $\sigma 1$ とよばれるレオウイルスの膜表面分子が、M 細胞管腔側に発現する $\alpha(2, 3)$ 型シアル酸が修飾された糖蛋白質と結合することが、レオウイルスの M 細胞を介した感染に非常に重要であることを見だし、 $\sigma 1$ の M 細胞標的システムのキャリア分子としての応用性を見いだしている¹⁵⁾. さらに、最近のファージディスプレイ法を駆使した研究では、YQCSYTMPHPPV からなるペプチドが M 細胞に親和性を有することも明らかとなり¹⁶⁾, M 細胞への低分子キャリア体として、今後の研究開発が期待されている.

M 細胞標的型粘膜ワクチン開発の歴史とその効果

全身組織と粘膜組織に抗原特異的免疫応答を誘導可能な粘膜ワクチンの魅力が謳われて以来、上述し

たキャリア分子を用いた M 細胞標的型粘膜ワクチン開発に関する研究が積極的に進められている(表 1). UEA-1 をキャリア分子とした場合、UEA-1 に HIV のエンベロープをコードする遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを結合させ、それを経鼻投与することで、効果的な HIV 特異的な抗体産生および細胞傷害活性(CTL)が誘導される¹⁷⁾. また、HIV のエンベロープ蛋白の一部(ペプチド)を封入した poly lactide-co-glycolide(PLG)からなるマイクロ粒子の表面に UEA-1 を標識し、それを経鼻投与することで、高いレベルの抗原特異的抗体産生が誘導可能である¹⁸⁾.

筆者らは、M 細胞特異的モノクローナル抗体(NKM 16-2-4)に破傷風トキソイドやボツリヌストキソイドを結合させた M 細胞標的型粘膜ワクチンを開発し、それをマウスに経口投与することで、UEA-1 をキャリア分子とした場合よりも高いレベルの抗原特異的免疫応答が全身組織のみならず粘膜組織に誘導可能であることを実証することに成功した¹³⁾. また、ボツリヌス感染モデルを用い、その中和効果を精査した結果、M 細胞標的型ボツリヌストキソイドを予め経口投与することで、10,000 倍の LD₅₀ 量のボツリヌス毒素に対する完璧な防御免疫を誘導可能であることも明らかとなった¹³⁾. 一方、 $\sigma 1$ をキャリア分子とした場合、 $\sigma 1$ に HIV の gp160 をコードする遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを連結させ、それを経鼻投与することで、効果的なエイズウイルスに対する細胞性免疫を誘導可能である¹⁹⁾. また、最近の研究では、 $\sigma 1$ に卵白アルブミン(OVA)を結合させ、それを経口投与することで、効果的に OVA に対する経口免疫寛容を誘導

可能であることも報告されており²⁰⁾、M細胞を標的とした次世代型の粘膜ワクチンにより、アレルギー疾患に対する効果的な減感作療法が開発できるものと期待されている。

総括

全身組織に加え、粘膜組織での免疫応答を誘導可能な粘膜ワクチンの魅力が謳われてから数十年経過した今日、日本で実用化されている粘膜ワクチンは弱毒ウイルスを用いたポリオワクチンしか存在しない。それは、粘膜組織が絶えず外来抗原の侵入阻止を目的とした防御バリアを形成しており、ワクチン抗原などの外来抗原を簡単には粘膜組織内に取り入れられないことに起因する。一方で、われわれ生体の粘膜組織には、ごく少数ではあるがM細胞が分化発達し、抗原門戸細胞として機能することで、粘膜免疫システムを抗原特異的に活性化させる。

今後、このM細胞の免疫生物学的解析がさらに進むことで、抗原取り込みメカニズムの実態が解明され、さらには粘膜ワクチン開発に携わる研究者と、DDS研究に携わる研究者が交流することで、M細胞標的型粘膜ワクチン開発に向けた研究が加速することを期待したい。

文献

- 1) Kiyono H, Kunisawa J, McGhee JR, Mestecky J : The mucosal immune system. *Fundamental Immunology*. (ed. Paul WE), Lippincott-Raven, Philadelphia, 2008 (in press).
- 2) Kunisawa J, Nochi T, Kiyono H : Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends Immunol*, 2008 (in press).
- 3) Owen RL : Sequential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in the normal unobstructed mouse intestine : an ultrastructural study. *Gastroenterology* 72 : 440-451, 1977.
- 4) Savidge TC, Smith MW, James PS, Aldred P : Salmonella-induced M-cell formation in germ-free mouse Peyer's patch tissue. *Am J Pathol* 139 : 177-184, 1991.
- 5) Clark MA, Hirst BH, Jepson MA : M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* 66 : 1237-1243, 1998.
- 6) Lugering A, Floer M, Westphal S, Maaser C, Spahn TW : Absence of CCR6 inhibits CD4⁺ regulatory T-cell development and M-cell formation inside Peyer's patches. *Am J Pathol* 166 : 1647-1654, 2005.
- 7) Yamamoto M, Rennert P, McGhee JR, Kweon MN, Yamamoto S et al. : Alternate mucosal immune system : Organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol* 164 : 5184-5191, 2000.
- 8) Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K et al. : Intestinal villous M cells : an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 6110-6115, 2004.
- 9) Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G et al. : Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2 : 361-367, 2001.
- 10) Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S et al. : CX-3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307 : 254-258, 2005.
- 11) Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW : Keynote review : intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today* 10 : 1145-1157, 2005.
- 12) Sharma R, Schumacher U, Adam E : Lectin histochemistry reveals the appearance of M-cells in Peyer's patches of SCID mice after syngeneic normal bone marrow transplantation. *J Histochem Cytochem* 46 : 143-148, 1998.
- 13) Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K et al. : Novel M-cell-specific carbohydrate-targeted vaccination is effective for the induction of antigen-specific immune responses. *J Exp Med* 204 : 2789-2796, 2007.
- 14) Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, Nochi T, Pontes GS et al. : Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol* 180 : 7840-7846, 2008.
- 15) Helander A, Silvey KJ, Mantis NJ, Hutchings AB, Chandran K et al. : The viral I protein and glycoconjugates containing 2-3-linked sialic acid are involved in type 1 reovirus adherence to M cell apical surface. *J virol* 77 : 7964-7977, 2003.
- 16) Higgins LM, Lambkin I, Donnelly G, Byrne D, Wilson C et al. : In vivo phage display to identify M cell-targeting ligands. *Pharm Res* 21 : 695-705, 2004.
- 17) Wang X, Kochetkova I, Haddad A, Hoyt T, Hone DM et al. : Transgene vaccination using *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA-I) for targeted mucosal immunization against HIV envelop. *Vaccine* 23 : 3836-3842, 2005.
- 18) Manocha M, Pal PC, Chitalekhya KT, Thomas BE, Tripathi V et al. : Enhanced mucosal and systemic immune response with intranasal immunization of mice with HIV peptides entrapped in PLG microparticles in combination with *Ulex Europaeus*-I lection as M cell target. *Vaccine* 23 : 5599-5617, 2005.
- 19) Wang X, Hone DM, Haddad A, Shata MT, Pascual DW : M cell DNA vaccination for CTL immunity to HIV. *J Immunol* 171 : 4717-4725, 2003.
- 20) Suzuki H, Sekine S, Kataoka K, Pascual DW, Maddaloni M et al. : Ovalbumin-protein I M cell targeting facilitates oral tolerance with reduction of antigen-specific CD4⁺ T cells. *Gastroenterology*, 2008 (in press).