

100U/ml ペニシリン G、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン、5 X 10<sup>-5</sup>M の 2-メルカプトエタノール、2mM の L-グルタミンおよび 10%FCS を含有する RPMI1640 培地を用いた。

#### 腸管上皮細胞の調製

マウスは 5 週齢の BALB/c マウスまたは 7 週齢の OVA-TCR Tg マウスを用いた。小腸上皮細胞の調製および培養は、本章第一節と同様の方法で行った。

#### サイトカインの測定

IFN- $\gamma$  の濃度は第一章と同じ方法で調べた。IL-7 の ELISA は、Sharma らの方法に従って以下のように行った。また、IL-2 の ELISA は、以下の方法で行った。2  $\mu$ g/ml のマウス抗ヒト/マウス IL-7 抗体 (Genzyme、Cambridge、MA、USA) または 1  $\mu$ g/ml のラット抗マウス IL-2 抗体 (JES6-1A12 ; PharMingen) を含む 0.1M 炭酸水素ナトリウム (pH8.2) を 96 ウェルプレートに 1well 当たり 100  $\mu$ l ずつコーティングし、4°Cで一晩静置した。0.1% の Tween 20 を含む PBS で 4 回洗浄した。IL-7 の ELISA については、10%OVA と 3%PEG6000 を含む PBS を、IL-2 の ELISA については、5%の FCS と 3%の PEG6000 を含む PBS をプレートに加え、室温で 30 分間静置し、プレートをブロッキングした。洗浄後、IL-7 の ELISA は、3%PEG6000 と 0.1%の Tween 20 を含む PBS で、IL-2 の ELISA は、3%PEG6000 を含む PBS で希釈したサンプルを 1well 当たり 100  $\mu$ l

ずつプレートに加え、室温で 2 時間静置した。4 回洗浄後、抗マウス IL-7 (R&D Systems、Minneapolis、MN、USA) 抗体またはビオチン標識抗マウス IL-2 (JES6-5H4 ; PharMingen) 抗体をプレートに加え、室温で 2 時間静置した。IL-7 の ELISA は、洗浄後、適当に希釈したビオチン標識抗ヤギ IgG (Zymed) 抗体をプレートに 1well 当たり 100  $\mu$ l ずつ加え、遮光して室温で 15 分間静置した。洗浄後、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを 3%PEG6000 含有 PBS で希釈し、1well 当たり 100  $\mu$ l ずつ加えた。遮光して 1 時間室温で静置し、4 回洗浄後、1mg/ml の 4-ニトロフェニルリン酸を含むジエタノールアミンバッファー (pH9.8) を 96 ウェルプレートに 1well 当たり 100  $\mu$ l ずつ加え、遮光して室温で 1 時間静置した。その後、5N の水酸化ナトリウムを 1well 当たり 20  $\mu$ l ずつプレートに加え、反応を停止した。対照波長 490nm、測定波長 405nm で吸光度を測定した。

#### 統計

結果は、平均値 $\pm$ SE で示した。統計計算は、Student's t test で解析し、 $p < 0.05$  を有意とした。

#### C-2 (3) 結果

#### IL-2 レセプターおよび IL-7 レセプターの発現

最近の研究で、IL-2/IL-2 レセプターおよび IL-7/IL-7 レセプターを通したシグナ

ルが、TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞の発達に欠かせないということが明らかとなっている。また、IL-2 レセプターは T 細胞の活性の重要な指標でもある。そこで、我々は経口摂取されたヌクレオチドが BALB/c マウスと OVA-TCR Tg マウスの IEL の IL-2 レセプターと IL-7 レセプターの発現に与える影響について検討した。その結果、BALB/c マウスと OVA-TCR Tg マウスともに、IEL の TCR  $\alpha$   $\beta$  陽性 T 細胞あるいは TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞中の IL-2 レセプター陽性 T 細胞の割合は、それぞれ両群間でほとんど差が見られなかった。同様に、TCR $\alpha$   $\beta$  陽性 T 細胞あるいは TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞中の IL-7 レセプター陽性 T 細胞の割合も、それぞれ両群間でほぼ同じ値であった (表 5)。

#### BALB/c マウスの IEL のサイトカイン産生

IL-2 は TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞の分化や発達に重要な役割を果たすことが知られている。そこで、ヌクレオチドの投与によって、TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞の割合が上昇する機構を検討するため、我々は、抗 CD3  $\epsilon$  抗体で刺激した BALB/c マウスの IEL のサイトカイン (IL-2 と IFN- $\gamma$ ) 産生に与える影響を検討した。また、サイトカイン産生を調べることで、経口摂取されたヌクレオチドが IEL の活性に与える影響も検討できる。その結果、IEL による IL-2 と IFN- $\gamma$  産生にはほとんど差が見られなかった (図 14)。なお、抗 CD3  $\epsilon$  抗体で IEL を刺激しない場合、サイトカイン産生は認められなかった (データ省略)。

#### OVA-TCR Tg マウスの IEL の OVA 刺激に対するサイトカイン産生

さらに、OVA-TCR Tg マウスの IEL の OVA 刺激に対する IFN- $\gamma$  と IL-2 産生を検討した。その結果、OVA 刺激に対する IL-2 産生は、ヌクレオチド投与群で有意に高くなった。また、OVA 刺激に対する IFN- $\gamma$  産生も、ヌクレオチド投与群で高くなる傾向が見られた (図 15)。

#### 小腸上皮細胞の IL-7 産生

上記の結果により、ヌクレオチドの経口摂取が IEL の IL-2 レセプターおよび IL-7 レセプターの発現にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。IL-2 産生については、OVA-TCR Tg では、ヌクレオチドの影響が見られたものの、BALB/c マウスではほとんどヌクレオチドの影響は見られなかった。そこで、ヌクレオチドの投与による TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞の割合の上昇する機構を検討するため、さらに経口摂取されたヌクレオチドが BALB/c マウスと OVA-TCR Tg マウスの小腸上皮細胞の IL-7 産生に与える影響を検討した。その結果、BALB/c マウスおよび OVA-TCR Tg マウスともに、小腸上皮細胞の IL-7 産生は、NT(+) 食群の方が、NT(-) 食群に比べて有意に高くなった (図 16)。

#### D-2 (3) 考察

ヌクレオチドの摂取により、腸管上皮細胞の活性が上昇することがこれまでに報告されている。腸管上皮細胞は TCR $\gamma$   $\delta$  陽性

表5 ヌクレオチドを摂取したマウスのIELのIL-2レセプター (IL-2R) とIL-7レセプター (IL-7R) の発現に与える影響

|                          | BALB/c (%) |           | OVA-TCR Tg (%) |            |
|--------------------------|------------|-----------|----------------|------------|
|                          | NT (-)食    | NT (+)食   | NT (-)食        | NT (+)食    |
| TCR αβ陽性T細胞 <sup>a</sup> |            |           |                |            |
| IL-2R+                   | 5.8 ± 0.8  | 8.4 ± 0.8 | 18.5 ± 1.8     | 18.3 ± 2.2 |
| IL-7R+                   | 5.9 ± 0.8  | 7.9 ± 1.0 | 4.6 ± 0.4      | 4.8 ± 0.5  |
| TCR γδ陽性T細胞 <sup>a</sup> |            |           |                |            |
| IL-2R+                   | 5.4 ± 0.7  | 6.6 ± 0.5 | 9.9 ± 1.6      | 7.9 ± 1.5  |
| IL-7R+                   | 4.1 ± 0.2  | 5.2 ± 0.3 | 3.7 ± 0.4      | 2.7 ± 0.3  |

<sup>a</sup> TCR αβ+IELまたはTCR γδ+ IEL中のIL-2R陽性およびIL-7R陽性細胞の割合 (%)、平均値 ± SE

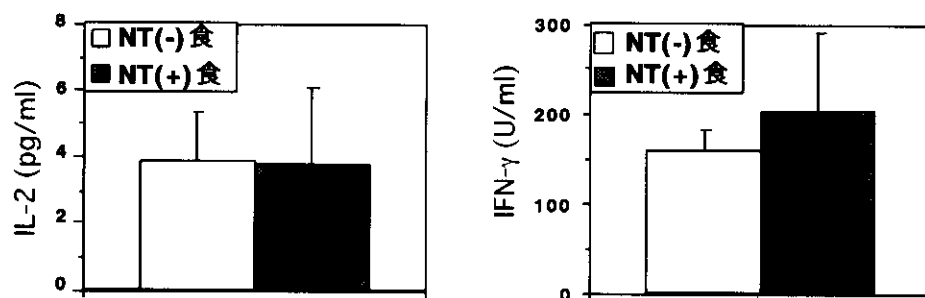


図14 ヌクレオチドの経口摂取が抗CD3抗体刺激下のIELのサイトカイン産生 (IL-2とIFN-γ産生) に与える影響

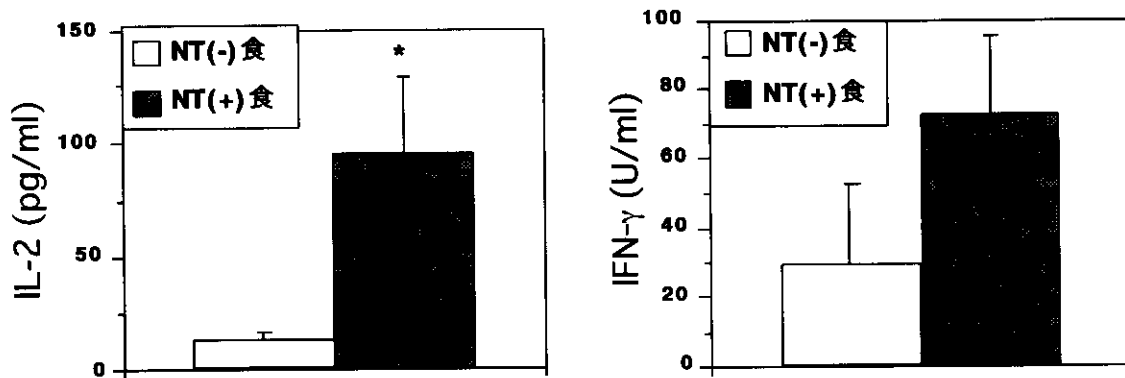


図15 ヌクレオチドの経口摂取がIELのOVA特異的なサイトカイン産生 (IL-2とIFN-γ産生) に与える影響 \*p<0.05

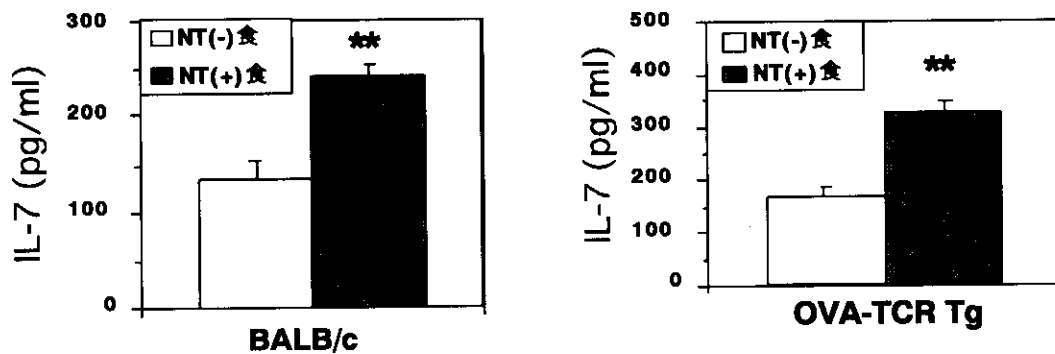


図16 ヌクレオチドの経口摂取が小腸上皮細胞のIL-7産生に与える影響 \*\*p<0.01

T 細胞の発達や分化に重要な役割を果たす。腸管上皮細胞は IL-7 を産生することが知られているが、IL-7 レセプターまたは IL-7 のノックアウトマウスでは、IEL 中に TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞がほとんど存在しない。近年、Laky らは、IL-7 ノックアウトマウスから、腸管上皮細胞特異的に IL-7 を発現するマウスを作成した。彼らはこのマウスの IEL のサブセットを調べたところ、IEL 中に TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞が存在することを明らかにした。これらの結果は、腸管上皮細胞が産生する IL-7 や IEL 中の IL-7 レセプターを通じたシグナルが IEL 中の TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞の発達分化に重要な役割を果たしていることを示している。本研究結果では、ヌクレオチドの投与により、IL-7 レセプターは変化しなかったものの、腸管上皮細胞の IL-7 産生の上昇が認められた。以上より、第二節で示した IEL の TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞の割合の上昇は、腸管上皮細胞の IL-7 産生の上昇により、誘導されたものであるという可能性が示唆された。本研究の結果は、細胞間相互作用や液性因子を通じた IEL や腸管上皮細胞の相互作用が、IEL（特に TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞）や腸管上皮細胞の分化に重要であるという仮説を支持している。さらに、本研究は両細胞間の相互作用に、食品成分であるヌクレオチドが影響を及ぼしうることを示した初めての報告である。

IL-2 や IL-2 レセプターのノックアウトマウスの研究から、IL-2/IL-2 レセプターを通じたシグナル伝達系も直接、TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞の発達分化に影響を与えることが示唆されている。IL-2 レセプターの $\beta$ 鎖の

ノックアウトマウスまたは IL-2 のノックアウトマウスでは、IEL の TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞が減少することが報告されている。しかし、経口摂取されたヌクレオチドは、CD3  $\epsilon$  で刺激した BALB/c マウスの IEL の IL-2 の発現に全く影響を与えなかった。また、IEL の IL-2 レセプター陽性細胞の割合については、ヌクレオチド摂取の影響が全く見られなかった。以上より、ヌクレオチドの経口摂取により、BALB/c マウスにおいては、IL-2/IL-2 レセプターを通じたシグナル伝達系は変化せず、IL-2/IL-2 レセプターのシグナルは、ヌクレオチドが TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞の割合を高める機構に関与していないことが示唆された。さらに、経口摂取されたヌクレオチドは、BALB/c マウスにおいては、IL-2 レセプター陽性細胞の割合やサイトカイン産生が変化しないことから、BALB/c マウスの IEL の活性に直接影響を与えていないことが考えられる。

一方、OVA-TCR Tg マウスの IL-2 レセプターの発現は両群間でほとんど差が見られなかったものの、OVA 特異的な IL-2 産生については、BALB/c マウスと異なり、ヌクレオチドによる増強効果が認められた。また、OVA-TCR Tg マウスの OVA 特異的な IFN- $\gamma$  産生についても、その発現がヌクレオチドの経口摂取で上昇する傾向が認められた。以上より、OVA-TCR Tg マウスでは、IL-2 の上昇が、TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞の割合の上昇に寄与している可能性も考えられる。また、OVA-TCR Tg マウスの IFN- $\gamma$  産生もヌクレオチドの投与で上昇していたことから、OVA-TCR Tg マウスの IEL の活

性は、ヌクレオチドの投与で高くなることが示唆された。これより、ヌクレオチドの投与によって、BALB/c マウスと OVA-TCR Tg マウスの IEL のサイトカイン産生に与える影響が異なっていた。

OVA-TCR Tg マウスに OVA を多量に長期間投与し続けると、そのマウスは死亡することがある。また、OVA-TCR Tg マウスに限らず、通常の動物でも、生体外の抗原が生体内に入ることにより、抗原抗体反応が起こり、これがアナフィラキシー反応を引き起こし、ショック症状を起こすことがあることが知られている。従って、OVA-TCR Tg マウスに OVA を自由摂取させることで、OVA に対する抗体が生体内で多量に作られるが、このとき OVA-TCR Tg マウスに通常の状態よりストレスがかかっている可能性が考えられる。これによって、ヌクレオチドの必要性が高まり、OVA-TCR Tg マウスにヌクレオチドを投与することにより、IEL のサイトカイン産生能が上昇するものと考えられる。これに対し、BALB/c マウスは生体内で、特定の抗体が多量に作られることもなく、OVA-TCR Tg マウスに比べれば、大きなストレスがかかっていないと考えられる。従って、ヌクレオチドは BALB/c マウスの IEL のサイトカイン産生に対しては影響を与えないものと考えられる。

IEL の胸腺外分化の機構は明らかでない。最近の研究で、IL-2/IL-2 レセプターや IL-7/IL-7 レセプターを通したシグナル伝達系の他に、別の因子が胸腺外分化に関与していることが示唆されている。例えば、IL-15、interferon regulatory factor 1 および

protein tyrosine kinases p56/ck や p59fyn が IEL の発達分化に関与していることが報告されている。しかし、TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 CD8  $\alpha$   $\alpha$  陽性 T 細胞の割合を増加させ、TCR $\alpha$   $\beta$  陽性 CD8  $\alpha$   $\alpha$  陽性 T 細胞の割合を減少させる因子は、まだ同定されていない。ヌクレオチドの経口摂取が、上述のような因子を通して、TCR $\gamma$   $\delta$  陽性 T 細胞と TCR  $\alpha$   $\beta$  陽性 T 細胞の割合を変えている可能性も考えられる。例えば、Lin らは、CD3-CD8+IEL が、胸腺外の IEL の分化における中間体であり、胸腺外分化した IEL の発達は、腸管上皮で、CD3-CD8-から CD3-CD8+を通して CD3+TCR $\gamma$   $\delta$ +CD8  $\alpha$   $\alpha$ +T細胞に変わることを証明した。CD3-CD8-から CD3-CD8+を通して CD3+TCR $\alpha$   $\beta$ +CD8  $\alpha$   $\alpha$ +T細胞に変わる経路を、彼らは発見していないが、もしこの経路が存在すれば、ヌクレオチドが CD3-CD8+細胞に影響を与え、TCR $\gamma$   $\delta$ +CD8  $\alpha$   $\alpha$ +T細胞と TCR $\alpha$   $\beta$ +CD8  $\alpha$   $\alpha$ +T細胞の比率に影響を与えている可能性が考えられる。

マウスの腸管には、1000~1500 個のリンパ球から成る細胞小集積（クリプトパッチ）が粘膜固有層の crypt 側に存在することが報告されている。このクリプトパッチが IEL の分化に影響を与えるという報告もある。Oida らは、サイトカインレセプターの  $\gamma$  鎖を変異させたマウスを解析した。このマウスにはクリプトパッチは存在せず、胸腺外分化する CD8  $\alpha$   $\alpha$  陽性細胞が消失していた。これゆえ、経口摂取されたヌクレオチドはクリプトパッチにも影響を与えている可能性がある。

腸内菌叢の存在もまた IEL のサブセットや機能に密接に関わっていることが知られている。Umesaki らは、無菌マウスに腸内菌を定着させると、IEL 特に TCR $\alpha\beta$  陽性 T 細胞の数が増えることを報告している。Takeuchi らもまた、無菌マウスに比べて、通常の飼育条件で飼育したマウスの IEL 中の TCR $\gamma\delta$  陽性 T 細胞の比率は減少することを示した。一方、ヌクレオチドの経口摂取は、腸内菌叢に影響を与えることが知られている。ヌクレオチドを添加した人工乳を摂取した乳児の糞便は、通常的人工乳を投与した乳児に比べて、*Bifidobacterium* の割合が高く、*Enterobacterium* の割合が低いことが示唆されている。このように、腸内菌叢の変化を通して、ヌクレオチドの経口摂取は、IEL のサブセットを変える可能性も考えられる。

### E-2 (3) 結論

ヌクレオチドの経口摂取により、腸管上皮細胞の TGF- $\beta$  および IL-7 産生が促進される。この IL-7 産生の上昇により、IEL の TCR  $\gamma\delta$  陽性 T 細胞の割合が増加することが考えられる。さらに、IEL の TCR $\gamma\delta$  陽性 T 細胞の割合の増加や腸管上皮細胞の TGF- $\beta$  産生の上昇により、腸管の IgA 産生が上昇する可能性が考えられる。我々の研究は、初めて食品成分が IEL と腸管上皮細胞との相互作用、すなわち両細胞が形成する粘膜内でのイントラネットに影響を与えることを明らかにするとともに、これが腸管の IgA 産生の上昇に結びつく可能性を示した。

### F 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) S. Nagafuchi, S. Hachimura, M. Totsuka, T. Takahashi, M. Goto, T. Yajima, T. Kuwata, S. Habu and S. Kaminogawa, Dietary nucleotides can up-regulate antigen-specific Th1 immune responses and suppress antigen-specific IgE responses in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122, 33-41 (2000)
- (2) S. Nagafuchi, M. Totsuka, S. Hachimura, M. Goto, T. Takahashi, T. Yajima, T. Kuwata and S. Kaminogawa, Dietary nucleotides increase the proportion of a TCR  $\gamma\delta^+$  subset of intraepithelial lymphocytes (IEL) and IL-7 production by intestinal epithelial cells (IEC); implications for modification of cellular and molecular cross-talk between IEL and IEC by dietary nucleotides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (7), 1459-65 (2000)

#### 2. 学会発表

- (1) 永淵真也、八村敏志、戸塚護、後藤真生、垣生園子、上野川修一、ヌクレオチドの経口摂取が Th1/Th2 バランスに与える影響。日本農芸化学会 1999 年度大会講演要旨集, p146 (1999)
- (2) 永淵真也、高橋毅、垣生園子、八村敏志、戸塚護、上野川修一、経口投与されたヌクレオチドが小腸上皮内リンパ球のサブセットとサイトカイン産生に与える影響。

日本免疫学会総会・学術集会記録第 29 巻,  
p174 (1999)

(3) 村上龍二、永淵真也、八村敏志、高橋毅、  
上野川修一、戸塚護、ヌクレオチドが小腸  
上皮細胞のサイトカイン産生に与える影響.

日本農芸化学会 2000 年度大会講演要旨集,  
p282 (2000)

(4) 永淵真也、八村敏志、戸塚護、志田寛  
高橋毅、矢島高二、桑田有、上野川修一、  
ヌクレオチドの経口摂取が腸管 IgA 抗体産生  
に与える影響. 日本農芸化学会 2000 年度大  
会講演要旨集, p282 (2000)



### 3. パイエル板樹状細胞により誘導される腸管免疫応答の解析

#### A. 研究目的

経口投与された抗原に対しては、腸管において免疫グロブリン A (IgA) 産生応答などの免疫応答が誘導され、全身免疫系とは異なる応答を示すことが知られている。抗原の経口投与により IL-5, IL-6, TGF- $\beta$  がパイエル板において誘導されることが知られている。成熟 B 細胞は BCR として IgM と IgD を細胞表面に発現し、抗原刺激を受けると IgM のみ発現するようになる。さらにこのとき刺激を受けるときの環境により、IgM, IgG, IgA, IgE のどのタイプの抗体を産生するかが決定される。TGF- $\beta$  は IgA へのアイソタイプスイッチを誘導する分子であり、IL-5 および IL-6 は IgA 産生細胞の分化・成熟に重要なサイトカインである。IgA 産生応答に抗原特異的 T 細胞の活性化や抑制が重要であると考えられているが、抗原特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞が外来のタンパク質抗原に対して応答する場合は MHC class II 分子を細胞表面に発現した抗原提示細胞による抗原提示を受けることが必須である。近年、パイエル板の抗原提示細胞により誘導された T 細胞は脾臓などの他の組織の抗原提示細胞により誘導された T 細胞とは異なる応答をすることが明らかとなった。パイエル板の抗原提示細胞の機能が他の組織の抗原提示細胞と異なっていることは IgA 産生など腸管固有の免疫応答を誘導するために重要である。抗原提示細胞には、樹状細胞・マクロファージ・B 細胞があるが、中でも樹状細胞は抗原提示能が高く、免疫応答の方向性を決定するのに重要な役割を担っていると言

われている。さらに、近年、パイエル板樹状細胞が IgA 産生を誘導することが報告された。しかしながら、そのメカニズムについては報告が無く、不明である。本研究では、パイエル板樹状細胞に着目して、その免疫応答誘導能およびサイトカイン産生について末梢における免疫応答を担っていると考えられる脾臓の樹状細胞と比較した。

これらの実験系により食品、食品成分の腸管免疫応答に対する影響を観察することが可能となり、免疫関連病患者用食品の評価系の開発につながると期待できる。

#### B. 研究方法

BALB/c マウスのパイエル板および脾臓を摘出し、それぞれをコラゲナーゼ溶液中で攪拌することにより細胞を調製した。次に、Optiprep (GIBCO BRL) を用いた密度勾配遠心法により樹状細胞を濃縮した。そして、セルソーターを用いて CD11c<sup>+</sup> / B220<sup>-</sup> のポピュレーションとして樹状細胞を 98% 以上の純度で分離した。

まず、未刺激のパイエル板樹状細胞および脾臓樹状細胞の細胞表面分子の発現を比較した。次に、パイエル板樹状細胞と脾臓樹状細胞の異なる系統のマウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞に対する増殖誘導能を比較した。

さらに、OVA 323-339 特異的 I-A<sup>d</sup> 拘束性 TCR を発現するトランスジェニックマウス OVA23-3 から調製した未感作 CD4<sup>+</sup> T 細胞を用いてパイエル板樹状細胞および脾臓樹状細胞を抗原提示細胞とした場合に誘導されるサイトカイン分泌応答を比較した。次にパイエル板樹状細胞および脾臓樹状細胞を T 細胞からの刺激を想定して、

CD40 の架橋または PMA + カルシウムイオノフォー A23187 で刺激し、48 時間後の IL-6 産生量を ELISA により測定した。次に IL-6 mRNA の発現についても特異的プローブを用いた定量 RT-PCR により調べた。最後にパイエル板樹状細胞の 3 つのポピュレーション (CD11b<sup>+</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>) のうちどのポピュレーションが IL-6 を高発現しているのかを調べた。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いはすべて大学の定めるガイドラインを順守して行った。

### C. 研究結果

パイエル板樹状細胞と脾臓樹状細胞の細胞表面分子の発現を比較した結果、パイエル板樹状細胞の方がわずかに MHC class II, CD86, CD40, CD44 分子の発現が脾臓樹状細胞と比較して高いことが明らかとなった (図 1)。また、樹状細胞の成熟マーカーである DEC-205 の発現についてはパイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して高発現している細胞が多く、このことからパイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞より成熟している細胞が多いことが示唆された。CD8 $\alpha$  についてはどちらも発現が高い細胞と低い細胞が見られその割合には差がなく、CD11b については高発現している細胞の割合が脾臓樹状細胞の方がパイエル板樹状細胞と比較して多いことが示された (図 1)。

次に、パイエル板樹状細胞と脾臓樹状細胞の異なる系統のマウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞に対する増殖誘導能を比較した結果、パイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較してより高い増殖誘

導能を示した (データ略)。

パイエル板樹状細胞および脾臓樹状細胞を抗原提示細胞とした場合に誘導されるサイトカイン分泌応答を比較した結果、パイエル板樹状細胞を抗原提示細胞として用いた場合、脾臓樹状細胞と比較して高い IFN- $\gamma$ , IL-6 の産生が認められた (図 2)。

次にパイエル板樹状細胞を抗原提示細胞として用いたときに産生が認められた IL-6 が樹状細胞により誘導されて T 細胞が産生しているものなのか、それとも樹状細胞自体が産生するものなのかを確認するために、パイエル板樹状細胞および脾臓樹状細胞を刺激し、48 時間後の IL-6 の産生量を測定した。その結果、いずれの刺激をした場合もパイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して IL-6 の産生が高いことが明らかとなった (図 3)。この結果により IL-6 に関しては T 細胞のみならず、パイエル板樹状細胞も産生していることが明らかとなった。また、IL-6 mRNA の発現についても調べた結果、同様な刺激に対して、パイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して IL-6 mRNA の発現量が高いことが明らかになった (データ略)。さらに未刺激のパイエル板樹状細胞および脾臓樹状細胞の IL-6 RNA の発現量についても調べた結果、未刺激の状態でもパイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較して IL-6 mRNA の発現が高いことが明らかとなった (データ略)。

最後に、パイエル板樹状細胞を CD11b および CD8 $\alpha$  の 2 つの細胞表面マーカーを用いてさらに分離し、IL-6 の産生量を調べた結果、CD11b<sup>+</sup>細胞の方が CD11b<sup>-</sup>細胞と比較して IL-6 を高産生しており、CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>細胞の方が

CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>細胞より IL-6 を高産生していることが示された。従って、パイエル板樹状細胞の3つのポピュレーションのうち CD11b<sup>+</sup>/CD8 $\alpha$  細胞が IL-6 を高産生していることが明らかとなった(図4)。

#### D. 考察

パイエル板樹状細胞と脾臓樹状細胞の異なる系統のマウスの CD4<sup>+</sup> T 細胞に対する増殖誘導能を比較した結果、パイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較してより高い増殖誘導能を示した。その原因としては、パイエル板樹状細胞の MHC class II 分子の発現が脾臓樹状細胞と比較して高く、より多くの T細胞レセプターと結合することができるため強いシグナルを伝達できること、また CD86, DEC-205 分子などの成熟マーカーの発現も高く、パイエル板樹状細胞の方が脾臓樹状細胞と比較してより成熟していることなどが考えられる。

CD11b<sup>+</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>細胞は腸管腔側に存在する円柱上皮細胞 (FAE) 直下にある円蓋部 (SED) に多くすることが知られている。したがって、本研究では、SED に存在する DC すなわち、M細胞を介してパイエル板に取り込まれた抗原に最初に出会う DCにより IL-6 が高産生されることが明らかとなった。IL-6 は B細胞が IgA産生細胞に分化・成熟するのに必要なサイトカインであり、パイエル板 CD11b<sup>+</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> 樹状細胞が IL-6 を産生することにより IgA産生に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

以上の結果より、パイエル板樹状細胞の抗原提示能は脾臓樹状細胞と異なることが示され、パイエル板特有の

免疫応答に関与していると考えられる。また、パイエル板において抗原が侵入してきた場合、樹状細胞が IL-6 を産生し、効率よく IgA産生を誘導する機構が備わっていることが示唆された。本研究の実験系により食品、食品成分の腸管免疫応答に対する影響を観察することが可能となり、免疫関連病者用食品の評価系の開発に有用と考えられる。

#### G 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 佐藤 あゆ子, 八村敏志, 上野川修一. 「樹状細胞と粘膜免疫」アレルギー・免疫 7:17-21, 2001.

##### 2. 学会発表

1) 佐藤あゆ子, 橋口昌章, 好田正, 八村敏志, 上野川修一「パイエル板樹状細胞の誘導するサイトカイン産生応答の解析」日本農芸化学大会大会, 東京, 2000年4月

2) The role dendritic cells play in the cytokine responses in Peyer's patches: Ayuko SATO, Masaaki HASHIGUCHI, Satoshi HACHIMURA and Shuichi KAMINOGAWA. The 13TH ANNUAL MEETING OF JAPANESE ASSOCIATION FOR ANIMAL CELL TECHNOLOGY (JAACT'2000), in Fukuoka, November 17-21, 2000

3) 佐藤あゆ子, 橋口昌章, 八村敏志, 上野川修一. 「パイエル板樹状細胞のサイトカイン産生能の解析」日本免疫学会学術集会, 仙台, 2000年11月

4) 佐藤あゆ子, 橋口昌章, 八村敏志, 上野川修一「パイエル板樹状細胞の IL-6 産生能の解析」日本農芸化学学会大会, 京都, 2001年3月

— PP DC  
 — SP DC

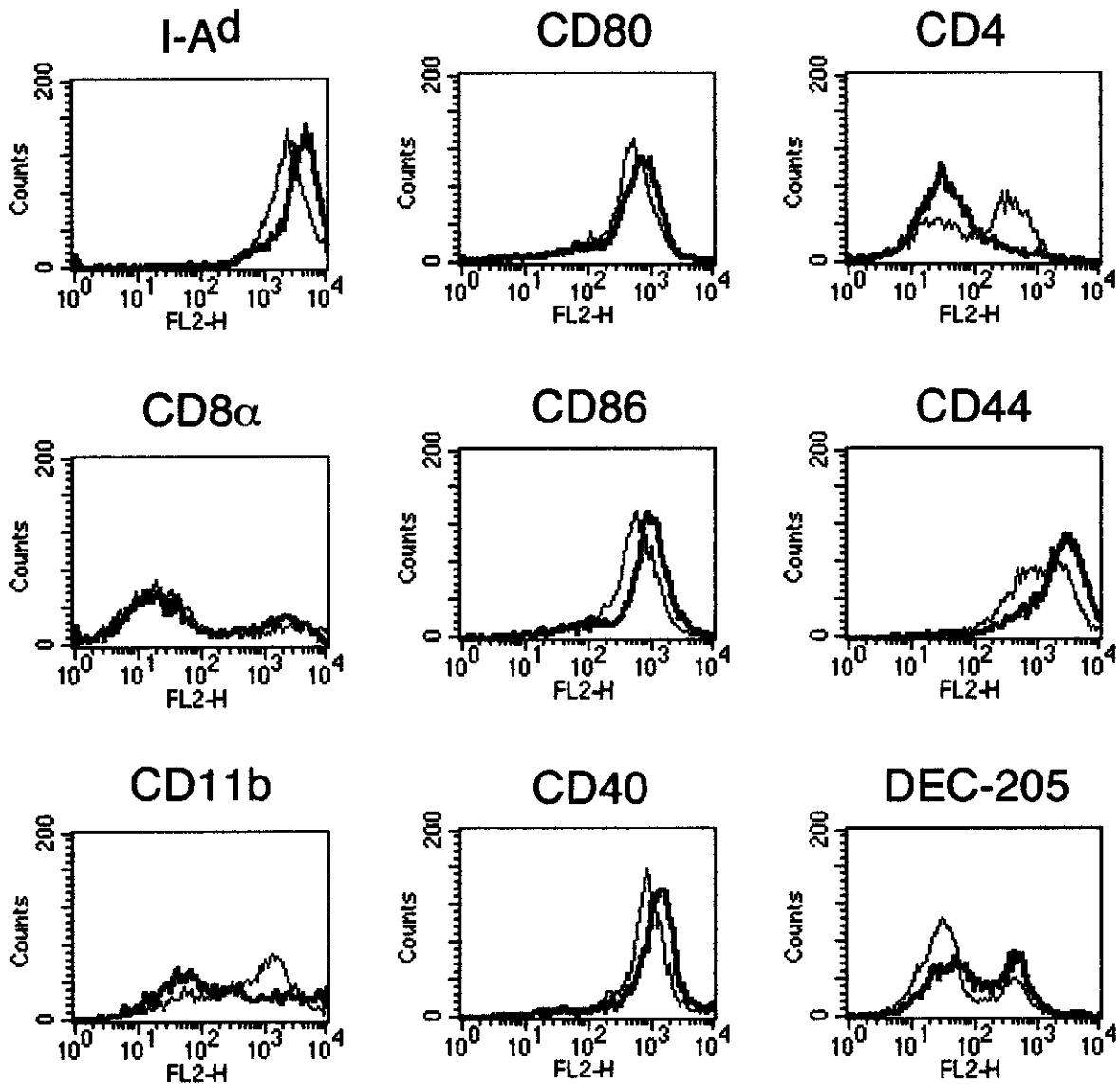


図1 パイエル板および脾臓樹状細胞の発現する細胞表面分子の比較

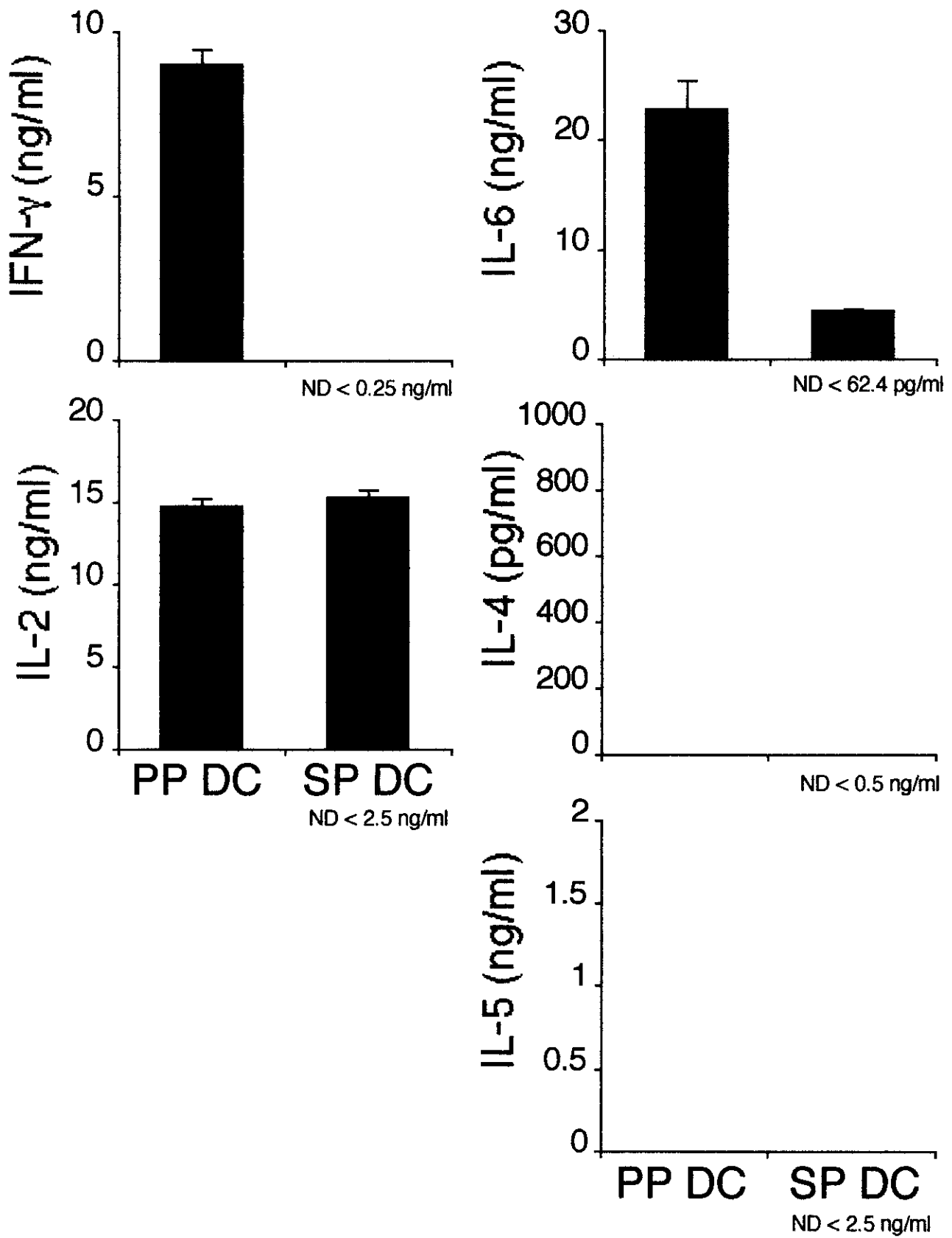


図2 パイエル板および脾臓樹状細胞を抗原提示細胞として用いた時のサイトカイン産生応答の比較

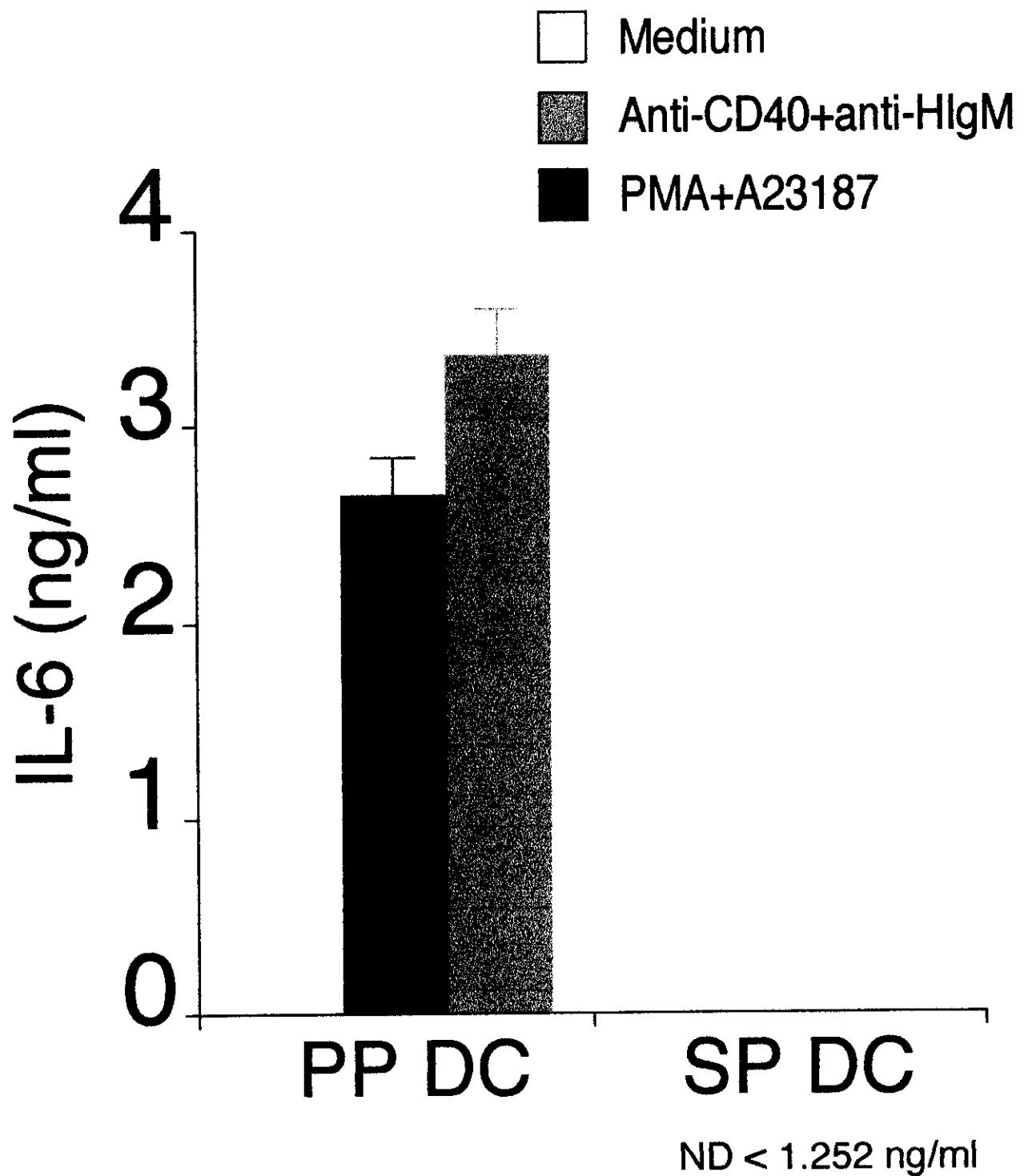


図3 パイエル板および脾臓樹状細胞による IL-6 産生

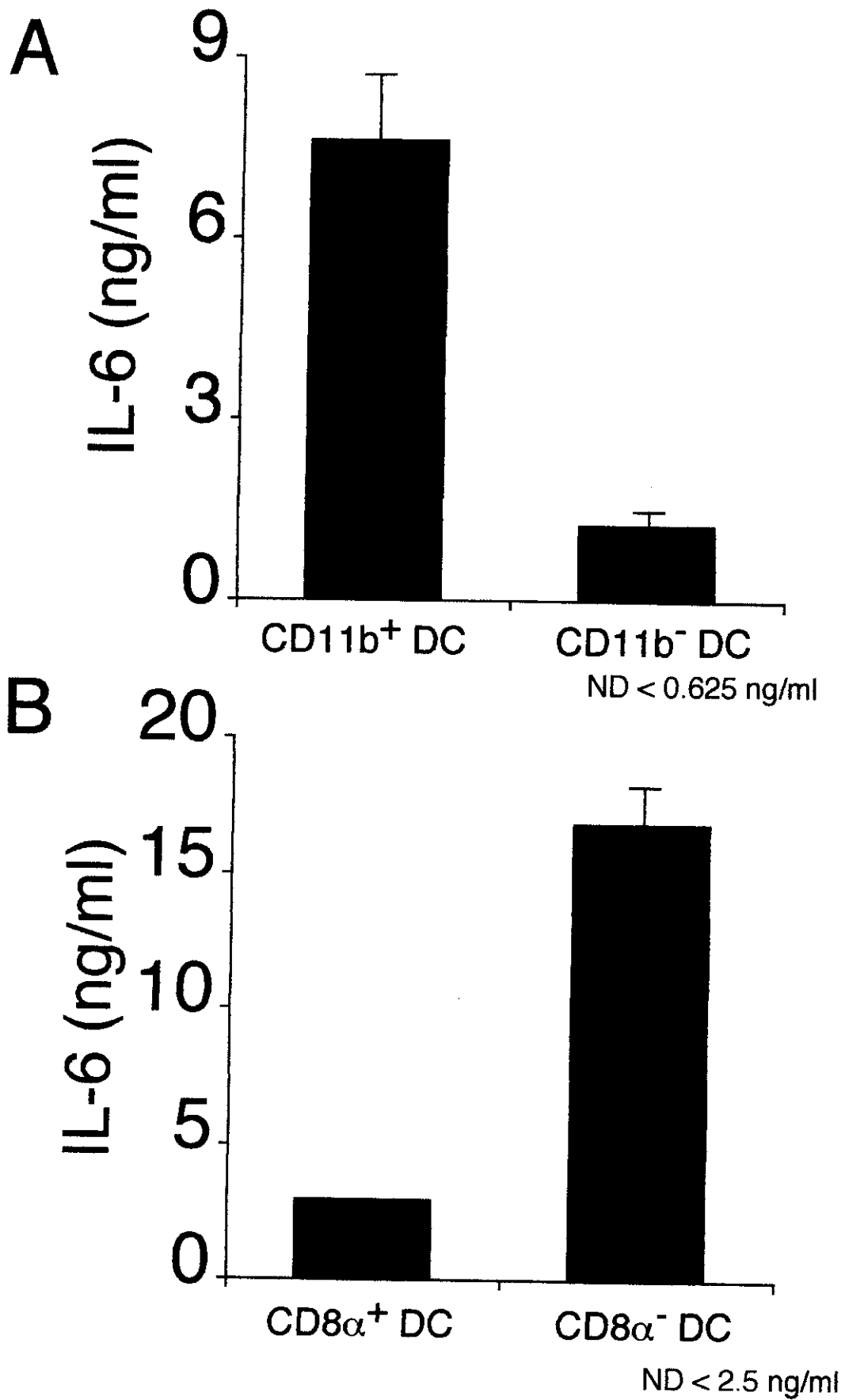


図4 パイエル板樹状細胞 IL-6 産生能の異なるサブセット間における比較

#### 4. 腸管免疫細胞を利用した免疫関連病者用食品の評価法の開発のための基礎研究

##### A. 研究目的

マウスの GALT には独特のリンパ球発生器官が存在することを見出し、cryptopatch (CP) と命名した。この発生器官におけるリンパ球発達分化機構を追究することによって GALT の特殊性について分子・遺伝子レベルでの解明を行い、腸管粘膜免疫防御の制御に向けた技術の確立を旨とし、これによって免疫関連病者用食品の評価法の開発を目的とする。

##### B. 研究方法

T 細胞抗原レセプター (TCR) や各種サイトカイン遺伝子を gene targeting の手法で破壊したミュータントマウスの腸管リンパ組織 (主として CP や上皮細胞間 T 細胞、すなわち IEL) の発達分化や腸管粘膜免疫防御を追究する。

(倫理面への配慮)

実験動物の取り扱いはすべて大学の定めるガイドラインを順守して行った。

##### C. 研究結果

1) 正常造血幹細胞を CP 及びパイエル板を欠如する X 線照射胸腺欠損サイトカインレセプター $\gamma$ 鎖遺伝子改変 (nude  $\gamma^{-/-}$ ) マウスに移入すると、CD11c<sup>+</sup>樹状ストローマ細胞集積、同集積における SC 由来 c-kit<sup>high</sup> T 前駆細胞の発達分化 (CP の形成)、CP 周辺絨毛上皮層における c-kit<sup>-</sup> TCR<sup>-</sup> IEL の出現を経て、成熟 $\alpha\beta$ -及び $\gamma\delta$ -IEL の発達が認められた。

2) 通常マウスの腸管リンパ組織を精査したところ、CP にのみ c-kit<sup>high</sup> Lin<sup>-</sup>リンパ球が優勢に分布し、これらは IL-7R<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> Thy-1<sup>+/-</sup> CD4<sup>+/-</sup> CD25<sup>low/-</sup>  $\alpha\beta\gamma^{-}$ 表面形質を保持することが判明した。これらの細胞表面マーカーは胸腺内における最も未分化なリンパ球と良く一致するまた、CP の c-kit<sup>high</sup> Lin<sup>-</sup>未分化リンパ球を RT-PCR 法で検索した結果、TCR $\gamma$ 鎖や TCR $\beta$ 鎖遺伝子の germline mRNA を検出することができた。

##### D. 考察

以上、1)、2) で得られた新知見によって、CP には胸腺に分布する最も未分化ではあるが、すでに T 細胞への分化が決定づけられたリンパ球に一致する T 前駆細胞が存在することや、これらの T 前駆細胞から IEL が発達分化することを明らかにした。CP は IEL へと発達分化する未分化 T 前駆細胞が集積する新しいマウス腸管リンパ組織であることの確証が得られた。

##### E. 結論

胸腺非依存性 IEL の発達分化が、造血幹細胞 (SC) 由来の CD11c<sup>+</sup>樹状ストローマ細胞集積 $\rightarrow$ 同集積における SC 由来 c-kit<sup>high</sup> T 前駆細胞の発達分化 (CP の形成) $\rightarrow$ CP 周辺絨毛上皮層における c-kit<sup>-</sup> TCR<sup>-</sup> IEL の出現 $\rightarrow$ 成熟 $\alpha\beta$ -及び $\gamma\delta$ -IEL の発達分化へと段階を踏むことが確かめられた。

##### F. 研究発表

1. 論文発表  
“国際誌”

1) Kanamori, Y., Suzuki, K., Oida, T. and Ishikawa, H.



- Gut-associated lymphoid tissue  
\_Cryptopatches\_ and intrainestinal  
development of murine T cells.  
**Mucosal Immunology Update**  
**8 : 3-5, 2000.**
- 2) Oida, T., Suzuki, K., Nanno, M.,  
Kanamori, Y., Saito, H., Kubota, E.,  
Kato, S., Itoh, M., Kaminogawa, S.  
and Ishikawa, H.  
Role of gut cryptopatches in early  
extrathymic maturation of intestinal  
intraepithelial T cells.  
**The Journal of Immunology**  
**164 : 3616-3626, 2000.**
- 3) Laky, K., Lefrançois, L., Lingenheld,  
E. G., Ishikawa, H., Lewis, J. M.,  
Olson, S., Suzuki, K., Tigelaar, R. E.  
and Puddington, L.  
Enterocyte expression of IL-7 induces  
development of  $\gamma\delta$  T cells and Peyer's  
patches.  
**The Journal of Experimental**  
**Medicine 191 : 1569-1580,**  
**2000.**
- 4) Suzuki, K., Oida, T., Hamada, H.,  
Hitotsumatsu, O., Watanabe, M., Hibi,  
T., Yamamoto, H., Kubota, E.,  
Kaminogawa, S. and Ishikawa, H.  
Gut cryptopatches: Direct evidence of  
extrathymic anatomical sites for  
intestinal T lymphopoiesis.  
**Immunity 13 : 691-702, 2000.**
- 5) Kawaguchi-Miyashita, M., Shimada, S.,  
Kurusu, H., Kato-Nagao, N.,  
Matsuoka, Y., Ohwaki, M., Ishikawa,  
H. and Nanno, M.  
Role on indigenous enteric bacteria and  
resident TCR $\gamma\delta^+$  cells for development  
of colitis in TCR $\alpha$ -deficient mice.  
**European Journal of Immunology**  
**(in press) 2001.**
- “国内誌”
- 1) 石川博通.  
ウイルスに対する免疫  
免疫学イラストレイテッド (第 5  
版) : 221-228, 2000年.
- 2) 石川博通.  
細菌およびカビに対する免疫  
免疫学イラストレイテッド (第 5  
版) : 229-262, 2000年.
- 3) 浜田裕公, 石川博通.  
Oral toleranceをめぐると問題 (1) Oral  
toleranceとその誘導機序 a. 腸管粘  
膜免疫組織の面から【特集 消化管  
と免疫—最近の話題】  
*臨床消化器内科 15 : 281-289, 2000*  
年.
- 4) 鈴木健司, 種田貴徳, 石川博通.  
粘膜免疫とクリプトパッチ【特集  
粘膜免疫：最近の進展と疾患】  
*炎症と免疫 8 : 168-171, 2000年.*
- 5) 安保徹, 石川博通.  
肝臓vs腸管：古い免疫細胞にハマっ  
ています【対談】  
*ミクロスコピア 17) : 92-97, 2000*  
年.
- 6) 石川博通.  
腸管上皮内リンパ球と腸管免疫【健  
康指標プロジェクトシリーズ -  
24】  
*環境と健康 13 : 202-210, 2000年.*
- 7) 南野昌信, 石川博通.  
Intestinal Intraepithelial lymphocyte T  
cellsとcryptopatch【特集 消化管免  
疫】  
*G. I. Research 8 : 323-329. 2000年.*
- 8) 石川博通.  
cryptopatch  
*Bio Science 新用語ライブラリー 免  
疫 (第 2 版) 実験医学別冊 : 38-39,*  
*2000年.*

9) 金森豊, 種田貴徳, 鈴木健司, 石川博通.

腸管cryptopatch (CP) における上皮細胞間Tリンパ球前駆細胞の発達分化

*Annual Review 免疫 2001 :205-210, 2000年.*

10) 石川博通, 浜田裕公, 西山康裕, 鈴木健司.

クリプトパッチ研究の展開【特集21世紀への旅立ち】

*アレルギー・免疫 7 :1603-1607, 2000年.*

## 2. 学会発表

1) 石川博通.

<特別講演;座長>私の提唱する未来免疫学.

*第339回日本無菌生物ノートバイオリロジー学会総会, 霞ヶ関, 2000年1月29日*

2) Yasuyuki Kai, Ichiro Takahashi, Daisuke Kishi, Hiroshi Tamagawa, Kazuyuki Yoshizaki, Kenji Suzuki, Hiromichi Ishikawa and Hiroshi Kiyono.

Does IL-6 play an important role in the development of colitis in mice with a truncated common cytokine  $\gamma$  chain ( $\gamma_c^{-N}$ )?

*Immunology 2000, Seattle WA USA, 2000年5月12日*

3) 石川博通.

<招待講演>腸管上皮内リンパ球と腸管免疫.

*第13回健康指標プロジェクト例会, 京都, 2000年5月20日*

4) 一松収, 金森豊, 長沼誠, 吉村泰典, 石井裕正, 渡辺守, 日比紀文, 石川博通.

ヒト胎児腸管粘膜におけるリンパ球集積の組織学的検討.

*第37回日本消化器免疫学会総会, 東京, 2000年8月3日*

5) Hiromichi Ishikawa.

< symposium ; Morphological approaches to T cell differentiation > Extrathymic development of intestinal T cell precursors in gut cryptopatches.

*XV International Symposium on Morphological Sciences, Kyoto, 2000年9月19日*

6) 石川博通.

<シンポジウム>腸管上皮内T細胞の発達分化と機能.

*免疫抗体・血清療法発見 110周年記念シンポジウム, 東京, 2000年11月9日*

7) 鈴木健司, 種田貴徳, 久保田英朗, 上野川修一, 石川博通.

マウス腸管リンパ組織cryptopatchの未分化T細胞 (CP-T) 解析と、CP-Tからの上皮間T細胞 (IEL) 発達分化.  
*第30回日本免疫学会総会・学術集会, 仙台, 2000年11月14日~16日*

8) 浜田裕公, 廣井隆親, 清野宏, 山元弘, 石川博通.

マウス腸管粘膜に分布するB細胞小集積.  
*第30回日本免疫学会総会・学術集会, 仙台, 2000年11月14日~16日*

9) 山崎元美, 矢島知治, 福井一人, 中丸幸一, 江崎俊彦, 中野雅, 金井隆典, 石川博通, 田邊将信, 竹内勤, 日比紀文, 渡辺守.

慢性大腸炎における腸管粘膜内IL-7/IL-7レセプターシグナルの異常.  
*第30回日本免疫学会総会・学術集会, 仙台, 2000年11月14日~16日*

10) 西山康裕, 石丸薫, 高橋秀実, 石川博通.

- $\gamma\delta$ 型上皮細胞間T細胞による腸管上皮細胞の再生統御。  
第30回日本免疫学会総会・学術集会,  
仙台, 2000年11月14日~16日
- 11) 増永陽平, 八村敏志, 伊藤聡美, 浜田裕公, 石川博通, 上野川修一.  
抗IL-7レセプター抗体投与により  
パイエル板を欠損したマウスにおける  
経口免疫寛容の誘導。  
第30回日本免疫学会総会・学術集会,  
仙台, 2000年11月14日~16日
- 12) 南野昌信, 島田進一郎, 宮下真理子,  
黒須宏之, 松岡良彰, 石川博通, 大脇真.
- T細胞抗原受容体 $\alpha$ 鎖欠損 ( $\alpha^{-/-}$ ) マウスの大腸炎発症における $\gamma\delta$ -T細胞の役割。  
第30回日本免疫学会総会・学術集会,  
仙台, 2000年11月14日~16日
- 13) 石川博通.  
<シンポジウム;腸管免疫と食物繊維及び関連物質>腸管免疫(上皮内T細胞を中心として): Over View.  
日本食物繊維研究会第5回学術集会,  
東京, 2000年11月17日~18日

## 5. アレルゲンペプチドによる食物アレルギーの治療に関する基礎的研究

### A. 研究目的

気管支喘息、花粉症などの吸入アレルゲンによるアレルギー疾患の治療法として、アレルゲンによる減感作療法が有効であることは知られている。しかしながら、食物アレルギーにおいてはアレルゲンによる減感作は重篤なアレルギー反応を惹起する可能性が高く、このような治療法は困難である。アレルゲン上のT細胞エピトープを含むペプチドによる減感作はアレルゲン特異的IgE抗体を架橋するおそれがなく、有効な減感作原となる可能性が指摘されている。そこで、本研究では食物アレルギーの治療としてのアレルゲンT細胞エピトープによる減感作療法の効果を動物モデルを用いて解析した。

### B. 研究方法

BALB/c マウスに鶏卵の主要なアレルゲンであるオボアルブミンを免疫してオボアルブミン特異的IgE抗体を誘導する系を用いた。BALB/c マウスにおける主要なオボアルブミンT細胞エピトープであるアミノ酸残基323-339に相当する合成ペプチドを合計経鼻投与したのちに、オボアルブミンの腹腔免疫を行った。その後、血清中のオボアルブミン特異的IgE抗体をサンドイッチELISA法によって測定した。また、脾臓細胞のオボアルブミンに対する増殖反応を検討した。

### C. 研究結果

オボアルブミンを経鼻投与したのちにオボアルブミンを腹腔免疫すると、生理食塩水を点鼻した対照群と比較して、脾臓細胞のオボアルブミンに対する増殖反応は抑制された。すなわち、経鼻投与によって免疫学的抑制が誘導されることを確認した。一方、323-339ペプチド投与によっては、まったくオボアルブミンに対する増殖反応は抑制されなかった。さらに、オボアルブミン特異的IgE抗体については増強が認められた。

### D. 考察

本研究では免疫学的寛容を誘導しようとして経粘膜投与を試みたが、結果としては抑制ではなくオボアルブミン特異的IgE抗体産生を促進してしまった。この原因としてはペプチドの投与経路、他により主要なT細胞エピトープが存在する可能性等が考えられる。

### E. 結論

オボアルブミンのアミノ酸残基323-339に相当する合成ペプチドの経鼻投与により、オボアルブミンに対するIgE抗体は抑制されず、かえって増強された。この結果は、食物アレルギーT細胞エピトープによる減感作においてはエピトープによってはかえってアレルギー反応を増強させてしまう可能性を示すと考えられる。今後、IgE抗体産生を抑制するT細胞エピトープの検索やその投与量、さらに投与経路などの解析が必要と思われる。