

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 石川博通 慶應義塾大学医学部教授

免疫関連病者用食品の開発，評価法の確立のための基礎研究として、新しく発見した腸管リンパ組織クリプトパッチ (CP)におけるリンパ球発達分化機構について解析した。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。また、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を明らかにした。これらから 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。

A. 研究目的

平均的成人の粘膜表面積は 400m<sup>2</sup> に達し、その約 80% を占めるのが腸管粘膜である。食餌由来の雑多な外来抗原やトキシン、アレルギー起因物質、病原微生物などが絶え間なく侵入する腸管は最も危険な生体部位であり、普段から全末梢リンパ球の 60~70% が集結する腸管免疫組織 (GALT) によって防御されている。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。

研究結果

1) 正常造血幹細胞 (n-SC) を 6-GyX 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

(CP 及びパイエル板 [PP] を欠如する) に移入すると、まず移入後 7 日目 (7 DAR) の腸管粘膜に n-SC 由来の CD11c<sup>+</sup>ストローマ細胞の小集積が出現し、10 DAR では同所に n-SC 由来の c-kit<sup>+</sup>細胞を確認することが出来た。その後、数日間に、CD11c<sup>+</sup>と c-kit<sup>+</sup>両細胞の集積 (cryptopatch : CP) が数や大きさともに増大するとともに、14 DAR では新生 CP 周辺の絨毛上皮層に n-SC 由来の TCR<sup>-</sup>リンパ球が初めて検出可能となった。引き続き 17 DAR では、すべての絨毛上皮層に n-SC 由来のリンパ球が出現したものの、そのほぼすべては TCR<sup>-</sup>リンパ球であった。その後徐々に、n-SC 由来の TCR<sup>+</sup>リンパ球、すなわち IEL が増加し、60 DAR では大多数が n-SC 由来の TCR<sup>+</sup> IEL へと変異した。さらに、これらの n-SC 由来 TCR<sup>+</sup> IEL を解析した結果、TCRαβ<sup>+</sup>、TCRγδ<sup>+</sup>及び CD8αα<sup>+</sup>細胞集団の割合や総数は nude マウスの TCR<sup>+</sup> IEL と一致することが判明した。これに反し、リンパ節や脾臓では n-SC 由来の T 細胞が検出限界以下であることを確認するとともに PP の再構築はまったくみられなかった。

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> α<sub>β</sub><sup>-</sup>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、すなわち CD44<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> TN (TN; CD3<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) リンパ球やこれらから CD44<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> TN へと発達分化途上のリンパ球細胞表面マーカーと良く一致する。CD44<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>未分化胸腺リンパ球には T 細胞へと運命決定されたものが含まれており、胎児型 (germline)

TCR 遺伝子の mRNA が検出される。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、TCRγ鎖や TCRβ鎖遺伝子の germline mRNA を検出することができた。

以上、1)、2) で得られた新知見によって、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。

#### D. 考察

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。今後は IEL 発達分化過程における抗原受容体 (TCR) の選択機構や上皮層における成熟 IEL の生理的機能解明が重要であり、これによって腸管粘膜最前線に分布する IEL の全貌を理解することが可能となろう。IEL の生理的機能解明は病者用食品開発の基盤としても不可欠である。

#### 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→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→成熟 αβ-及びγδ-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 ( $\gamma c^{-Y}$ )?  
*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

# アレルギー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

分担研究者 河野陽一 千葉大学小児科・教授

## 研究要旨

重篤な食物アレルギーの根本的な治療法はない。従来から行われている吸入アレルギーによる減感作療法は、食物アレルギーの場合にはアナフィラキシー反応を惹起するために不適當である。そこで、IgE抗体は結合できないが、T細胞は応答するT細胞エピトープによる減感作療法が新たな治療法として期待される。本研究では、鶏卵中の主要なアレルギーであるオボアルブミンの主要T細胞エピトープによる減感作がオボアルブミンに対するIgE抗体の産生を抑制しうるか否かをマウスを用いて検討した。その結果、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。

## A. 研究目的

気管支喘息、花粉症などの吸入アレルギーによるアレルギー疾患の治療法として、アレルギー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ギー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。アレルギー上の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ギー特異的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ギー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ギーであるオボアルブミンを完全フロイントアジュバントとともに腹腔内に2回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10 µgまたは100 µgを合計3回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。免疫1週間後にマウスを屠殺して、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(図1)。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(図2)。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(図3)。

## 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。この原因としてはいくつかの可能性が考えられる。第1には、ペプチドの投与経路である。オボアルブミンの経鼻投与で抑制が得られていることから、本方法が免疫抑制を惹起することは明らかであるが、ペプチド投与の場合には抗原提示などの違いによって効果が得られないのかもしれない。実際、従来のペプチド減感作療法は皮内投与によって行われていることから、投与経路によっては抑制がかかる可能性もある。第2には、323-339がオボアルブミンの主要なT細胞エピトープと考えられてはいるものの、他により主要なT細胞エピトープが存在する可能性である。323-339ペプチドに対するオボアルブミン免疫マウス脾臓細胞の増殖反応のレベルは、オボアルブミンに対する増殖反応の半分以下であることからその可能性は高い(図1)。現在、オボアルブミンの全配列をカバーする合成ペプチドに対するオボアルブミン免疫マウス脾臓細胞の応答性を解析中であるが、すくなくとも323-339以外に2つのT細胞エピトープを同定している。これらのペプチドによる経鼻免疫抑制の有無について解析中である。

## 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。

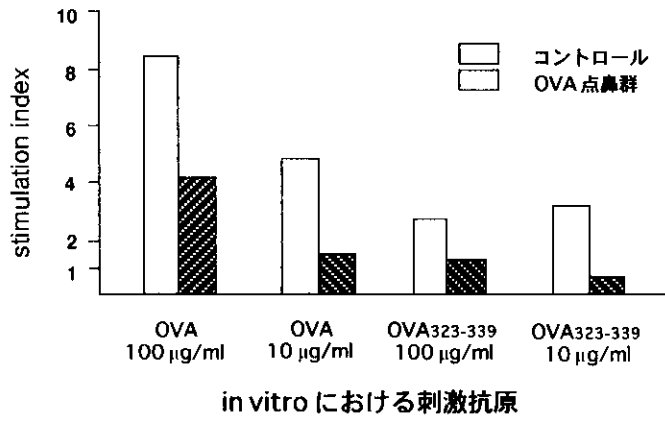


図1 オボアルブミン経鼻投与による脾臓細胞増殖反応の抑制

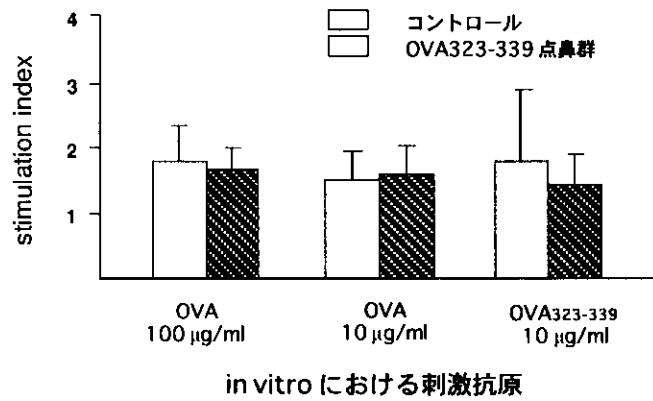


図2 オボアルブミン323-339ペプチド経鼻投与の脾臓細胞増殖反応への効果

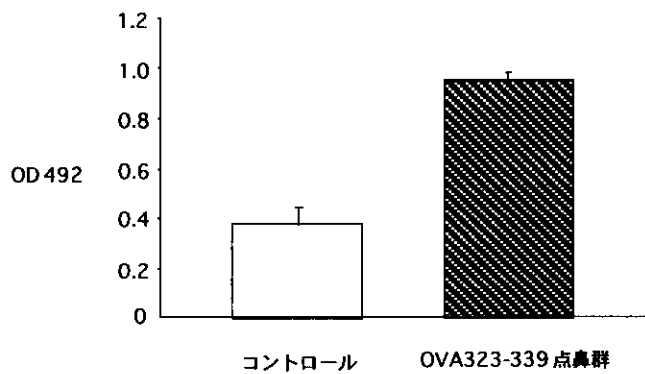


図3 オボアルブミン323-339ペプチド経鼻投与の抗オボアルブミンIgE抗体産生への効果

研究成果の刊行に関する一覧表

平成 12 年度 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
S. Nagafuchi ら	Dietary nucleotides can up-regulate antigen-specific Th1 immune responses and suppress antigen-specific IgE responses in mice.	Allergy Immunology	122	33-41	2000
S. Nagafuchi ら	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	1459-1465	2000
佐藤ら	樹状細胞と粘膜免疫	アレルギー・免疫	7	17-21	2000
K. Suzuki ら	Gut cryptopatches: direct evidence of extrathymic anatomical sites for intestinal T lymphopoiesis	Immunity	13	691-702	2000



20000710

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。