

200/0808

厚生科学研究費補助金  
感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業

腸管免疫機構の特殊性を応用したアレルギーに対する  
新しい抑制戦略に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渡 辺 守

平成14（2002）年3月

# 目 次

研究班構成 .....	1
I. 総括研究報告	
腸管免疫機構の特殊性を応用したアレルギーに対する新しい抑制戦略 .....	3
渡辺 守	
II. 分担研究報告	
1. 腸内細菌由来成分に対する受容体の異常と腸管粘膜機構破綻メカニズムの解明 慢性炎症抑制から、アレルギー抑制を目指した解析 .....	9
渡辺 守	
2. 腸管局所免疫機構の特殊性を利用した治療法の開発 .....	12
石川博通	
3. ミラクルビーズを用いた食物性/腸内細菌性抗原・ペプチドに対応する 生体受容体の単離についての基礎的解析 .....	15
半田 宏	
4. 食物抗原・ペプチドによるアレルギー応答抑制機構の解明と治療応用 .....	18
日比紀文	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	23

# 研究班構成

「腸管免疫機構の特殊性を応用したアレルギーに対する  
新しい抑制戦略」研究班構成

主任研究者：渡辺 守 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科  
消化・代謝内科学分野 教授

分担研究者：石川博通 慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 教授

半田 宏 東京工業大学大学院生命理工学フロンティア  
創造共同研究センター、分子生物学 教授

日比紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授

# 総括研究報告

腸管免疫機構の特殊性を応用したアレルギーに対する新しい抑制戦略

主任研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化・代謝内科学分野 教授

研究要旨

本研究は腸管粘膜免疫に注目し、この調節機構を人為的に制御することにより、成人のアレルギー疾患の病態に応じた新規治療法の開発を目指すという新しい視点の研究であった。本年度の研究で、特殊な腸管粘膜免疫組織の存在、腸内細菌・ペプチドによる腸管粘膜免疫応答、食物抗原・ペプチドによる免疫応答抑制機構、個々の食物/腸内細菌抗原・ペプチドに対応する生体側受容体の単離の可能性が明らかとなった。従って、治療法開発の基盤となる「腸管粘膜免疫組織」、「腸内細菌」、「食物」およびそのインターアクションを検討するためのツールである「ミラクルビーズによる受容体単離法」に関する基礎的検討が終わった。来年度以降、少数の研究協力者を得て、新しい研究組織を構築し、アレルギー疾患の病態解明と、それに応じた新規治療法の開発に向けた研究を推進する予定である。

分担研究者

石川博通 慶應義塾大学微生物学、免疫学教授  
半田 宏 東京工業大学大学院生命理工学フロンティア創造共同研究センター、分子生物学教授  
日比紀文 慶應義塾大学内科、消化管細胞生物学教授

A. 研究目的

本研究はこれまでの「抗原特異的 IgE、高親和性 IgE 受容体、マスト細胞が病態形成を担う」というアレルギー疾患側からみた病因・病態の解明とは全く出発点を換え、食物アレルギーが成人におけるアレルギー疾患発症の誘因になる可能性があるという考え方を基盤とし、腸管粘膜免疫調節を人為的に制御することにより、成人のアレルギー疾患の病態に応じた新規治療法の開発を目指すという萌芽的研究である。本研究においてはブラックボックスであったヒト最大かつ最先端に位置する免疫組織である腸管粘膜免疫機構において主任研究者渡辺および分担研究者石川、日比らの研究組織が独自に見いだしてきた調節機構の考え方を導入するとともに、分担研究者の半田が開発した「ミラクルビーズ」を応用して、まず腸管における新しいアレルギー担当免疫組織、受容体の発見、免疫統御分子機構の存在等その特殊性を明ら

かとし、その特殊性を利用した新しいアレルギーに対する抑制戦略を実用化しようとする試みを行う。異分野共同研究者の独自の視点を集合させた本研究はトランスレーションリサーチとして、将来的には難病治療、自己免疫疾患抑制に対する創薬にも連なる道が開く独創的研究と考えている。その大要は、1) 腸管免疫組織特有の構築・作動の細胞・分子機構解明、2) 個々の食物/腸内細菌抗原・ペプチドに対応する生体側受容体の単離および受容体多型についての解析、3) 腸内細菌・ペプチドによる腸管粘膜及び全身性免疫の賦活機構解明とその応用技術開発、4) 食物抗原・ペプチドによる免疫応答抑制機構の解明とその応用技術開発からなっている。

B. 研究方法

- 1) 主任研究者渡辺は細菌に対する生体側の反応系である Toll-like レセプター (TLR) を介した Toll シグナルに着目し、IL-7/IL-7 レセプターを介した免疫調節機構の特殊性との関連性を追究することにより、生体応答の異常を解析した。
- 2) 分担研究者石川は腸内フローラと腸管粘膜内 T/B 細胞による腸管粘膜防御の役割を担う腸管上皮細胞ターンオーバーの統御を解析した。
- 3) 分担研究者半田は極めて高効率に生体受容体を分離精製することが可能である超微小 beads 担

体「ミラクルビーズ」に関する基礎的知見を蓄積した。

4) 分担研究者日比は経口抗原により誘導した Th2 型免疫反応が Th1 型免疫反応が主体と考えられている慢性腸炎治療に可能性かどうかを追究する目的で、マウス慢性腸炎モデルを用いて基礎検討を行った。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、マウスの実験に関しても国際社会がヒトの健康のためとはいえども、実験および飼育管理の過程において動物に対して不必要な苦痛を与えないように努めるという人道的な配慮を求めていることを十分認識し、東京医科歯科大学動物実験ガイドラインに沿って実施した。

### C. 研究結果

1) 主任研究者渡辺は腸管粘膜免疫にて重要な役割を果たす粘膜内リンパ球、IL-7 と腸内細菌フローラとの関連を TLR 関連の遺伝子ノックアウトマウスを用いて検討した結果、TLR を介したシグナルの中核的アダプター分子である MyD88 ノックアウトマウスのクリプトパッチ、パイエル板、粘膜内リンパ球の検討で 10 週令では正常な形成を認めしたが、離乳直後 3 週令のマウスにおいて、これらのリンパ装置の著しい発達不全を見いだした。また、主任研究者が確立した腸炎モデルである IL-7 トランスジェニックマウスにおいては慢性腸炎発症前のクリプトパッチおよび粘膜リンパ球はコントロールマウスに比し過形成であり、マクロファージ・樹状細胞における TLR2 および TLR4 受容体の発現の亢進を認めた。さらに endotoxin 活性抑制を有する抗 TLR4 抗体投与により、腸炎発症の部分的な抑制効果を 0-3 週の初期に認めたが、経過とともにその抑制効果は減弱した。

2) 分担研究者石川はこれまでに腸管上皮内 T 細胞 (IEL) の起源であるクリプトパッチ (CP) をマウス腸管粘膜内に同定したが、新にマウス小腸粘膜の腸管膜反対側に B 細胞の小集積を 100~200 ケ所見出し、これらが未だ報告されていないマウス小腸の孤立リンパ小節であることを明らかにした。次に、正常および各種遺伝子操作マウスの IEC 発達分化を解析し、正常マウスや T 細胞を欠損する  $\delta \times \beta^{-/-}$  マウスと比較して、B 細胞を欠損する  $\mu m^{-/-}$  マウスの腸管上皮細胞ターンオーバーは著しく亢進していることを見いだした。正常マウスで BrdU 陽性 IEC が絨毛の中央部に達する時点で、

$\mu m^{-/-}$  マウスではすでに絨毛先端まで移動していた。また、この  $\mu m^{-/-}$  マウスの著しく速い IEC ターンオーバーは抗生物質経口投与によって減速し、正常マウスのそれと同等となった。IL-7R<sup>-/-</sup>、*aly/aly* マウスの腸管上皮細胞ターンオーバーも正常マウスより有意に速いことや TCR- $\delta^{-/-}$  マウスの IEC ターンオーバーが逆に抑制される事実によって、種々の異なった免疫機能が IEC の恒常性を正又は負の方向に統御することが示された。

3) 分担研究者半田は、食餌性・腸内細菌性抗原・peptide の「ミラクルビーズ」への固定化、およびそれを用いた生体受容体精製の条件設定のためのモデル実験系として、低分子化合物である薬剤 (FK506) を固定化した beads をもちいて、その既知の受容体である FKBP の精製を試み、実際にヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞の粗細胞質抽出液から目的の FKBP を選択的に、しかも回収効率よく精製することを明らかとした。また、夾雑物の混入する粗抽出液から極微量の target を検出できるか否かを検討し、NF $\kappa$ B 阻害剤である受容体を固定化した beads をもちいて、Jurkat 細胞の粗核抽出液から、前もって目的物を濃縮することなく、1回の affinity 精製により 3 種類の異なる受容体を単離することが可能であった。しかも、精製した受容体 Ref-1 による NF $\kappa$ B に対する還元活性は保持されていた。

4) 分担研究者日比は卵白アルブミン (OVA) TCR トランスジェニックマウスへ単回の OVA 経口投与を行うことにより、経口免疫寛容が誘導できるが、さらに継続投与することにより、強い Th2 型免疫反応が優位となるとともに、アレルギー性大腸炎の発症が誘導された。本モデルを、Th1 型免疫反応が深く関わる CD4+CD45RB<sup>high</sup> リンパ球移入による慢性大腸炎発症モデルに適応したところ、Th1 型サイトカイン産生の抑制とともに腸炎発症抑制効果を認めた。

### D. 考察

1) 主任研究者渡辺の研究により、腸内細菌に対する生体応答に IL-7 分子の関与が示唆され、また、腸内細菌に対する応答には既存の TLR、MyD88 以外の生体側細胞受容体が関与している可能性が示唆され、新しい受容体の単離を目指す研究が必要であることが明らかとなった。本研究は腸管粘膜免疫におけるアレルギー担当免疫組織、免疫統御分子機構の存在等その特殊性を明らかとし、その特殊性を利用した新しいアレルギーに対する抑

制戦略を実用化するものであり、本年度はそのプロトタイプとして、腸管粘膜機構における生体のホメオスタシス維持に必須である腸内細菌と生体側免疫機構の相互応答、およびその異常による慢性腸管炎症の発症が明らかとなった。

2) 分担研究者石川の研究により、マウス小腸にも孤立リンパ小節が存在し、これらはパイエル板と同等の機能を担う GALT であること、また、腸管粘膜 B 細胞は腸内フローラによる腸管上皮細胞ターンオーバー促進を統御することが確認された。本研究は食物由来の雑多な外来抗原やアレルギー起因物質/腸内フローラが腸管機能や免疫システムを特異的・非特異的に賦活している相互作用、すなわち食物質/腸内フローラ/免疫システムにおける密接な機能的連結に注目したものであり、本年度は腸内フローラと腸管粘膜内 T/B 細胞による腸管粘膜防御の役割を担う腸管上皮細胞ターンオーバーの統御が明らかとなった。

3) 分担研究者半田は従来の affinity beads より単位容積あたり数千倍以上のリガンドを固定化でき、極めて高効率に生体受容体を分離精製することが可能である超微小 beads 担体「ミラクルビーズ」により、腸管上皮細胞に発現する食餌性・腸内細菌性抗原の生体受容体を単離するため、本年度の研究ではこの「ミラクルビーズ」の関する基礎的知見を蓄積することを目的とした。beads への target 分子固定化に際しては、その立体構造を考慮し、適当な長さの spacer を挿入する必要性が明らかとなり、食餌性・腸内細菌性抗原・peptide の beads への固定化に際する重要な基礎的知見が得られた。更に、従来の affinity 精製では、非特異的吸着が極めて多かったために、煩雑な生成過程を反復し、前もって夾雑物を除去し、目的物を濃縮する必要があったが、「ミラクルビーズ」では、夾雑物の多い細胞粗抽出液からでも、直接、回収効率よく、しかも活性を保持した状態で affinity 精製することが可能であり、食餌性・腸内細菌性抗原受容体の探索にも十分応用可能な、極めて強力な手法であることが確認された。

4) 分担研究者日比はまず Th1/Th2 型免疫反応のバランスを人為的に制御することにより、腸管粘膜での正常あるいは病的免疫反応を統御するアプローチにつき解析した。食物アレルギーにより誘導される Th2 型免疫反応が健常状態に引き起こされるとアレルギーという病態に直結すると考えた。本年度の研究より、Th1 型免疫反応が主体と考えられている慢性腸炎治療に、Th1 免疫反応抑

制をターゲットにするのではなく、むしろ経口抗原により Th2 型免疫反応誘導したを強く誘導することが有効であった本年度の成績は、きわめて独創的な研究成果である。さらにこれら結果は分担研究者半田らが食餌抗原に対する生体側受容体の分離同定に成功した場合、対応抗原の同定・精製から得られる抗原ペプチド配列、糖鎖修飾、立体構造などの情報が、食物アレルギー・全身性アレルギー疾患発症の分子メカニズムの解明に新たな知見を与えるのみならず、これらアレルギー疾患治療に連なる可能性を有すること、さらには、Th1 型免疫反応がその主座であると考えられてきた慢性腸炎治療にも広く応用しうると期待され、意義深いと考えられる。

## E. 結論

本研究はこれまでアレルギー疾患研究を専門としていなかった研究者によって構成されており、1990年代後半に多くのブレイクスルーがあった腸管粘膜免疫に注目し、この調節機構を人為的に制御することにより、成人のアレルギー疾患の病態に応じた新規治療法の開発を目指すという新しい視点の研究であった。平成 13 年度の研究で、既に、特殊な腸管粘膜免疫組織の存在、腸内細菌・ペプチドによる腸管粘膜免疫応答、食物抗原・ペプチドによる免疫応答抑制機構、個々の食物/腸内細菌抗原・ペプチドに対応する生体側受容体の単離の可能性が明らかとなっており、治療法開発の基盤となる、「腸管粘膜免疫組織」、「腸内細菌」、「食物」およびそのインターアクションを検討するためのツールである「ミラクルビーズによる受容体単離法」に関する基礎的検討が出そろったことになる。来年度以降、さらに少数の研究協力者を得て、新しい研究組織を構築し、アレルギー疾患の病態解明と、それに応じた新規治療法の開発に向けた研究を推進したい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(渡辺)

- 1) Kanai T, Watanabe M, et al.: IL-18 and Crohn's disease. *Digestion*. 63: 37-42, 2001.
- 2) Ohkusa T, Watanabe M, et al.: Improvement in atrophic gastritis and intestinal metaplasia in patients from whom *Helicobacter pylori* was eradicated. *Ann Int*



Med. 134: 380-386, 2001.

- 3) Inoue N, Watanabe M, et al.: Restricted VH gene usage in lamina propria B cells that produced anticolon antibody from patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 121:15-23, 2001.
- 4) Sawada T, Watanabe M, et al.: Colon cancer cell adhesion to endothelial E-selectin inhibits detachment of endothelial cells through activation of beta(1)-integrin. *Biochem Biophys Res Commun*. 286: 20-27, 2001.
- 5) Kanai T, Watanabe M, et al.: Macrophage-derived IL-18 mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohns disease. *Gastroenterology*. 121: 875-888, 2001.

〈石川：国外誌〉

- 1) Kawaguchi-Miyashita M, Shimada S, Kurusu H, Kato-Nagaoka N, Matsuoka Y, Ohwaki M, Ishikawa H and Nanno M: An accessory role of TCR $\gamma\delta^+$  cells in the exacerbation of inflammatory bowel disease in TCR $\alpha$  mutant mice. *European Journal of Immunology*. 31 : 980-988, 2001.
- 2) Bannai M, Kawamura T, Naito T, Kameyama H, Abe T, Kawamura H, Tsukada C, Watanabe H, Hatakeyama K, Hamada H, Nishiyama Y, Ishikawa H, Takeda K, Okumura K, Taniguchi M and Abo T: Abundance of unconventional CD8 $^+$  natural killer T cells in the large intestine. *European Journal of Immunology* 31: 3361-3369, 2001.
- 3) Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Kiyono H, Yamamoto H and Ishikawa H: Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *The Journal of Immunology* 168 : 57-64, 2002.
- 4) Nishiyama Y, Hamada H, Nonaka S, Yamamoto H, Nanno M, Katayama Y, Takahashi H, and Ishikawa H: Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes. *The Journal of Immunology* 168 : 2626-2633, 2002.

〈石川：国内誌〉

- 1) 清野宏, 石川博通, 名倉宏: 中山書店 2001年3月. 序論: 清野宏, 石川博通, 名倉宏 編. *粘膜免疫 腸は免疫の司令塔*
- 2) 石川博通: 中山書店 2001年3月. *腸管粘膜の生体防衛を考える. 粘膜免疫 腸は免疫の司令塔: 31-48.*

- 3) 石川博通: 昭和堂 2001年10月. *腸管上皮内リンパ球と腸管免疫. シリーズ21世紀の健康と医生物学 からだを守る: 1-20.*
- 4) 浜田裕公, 西山康裕, 石川博通: クリプトパッチ—腸管上皮細胞間T細胞 (IEL) の腸管粘膜での発達分化—. *医学のあゆみ* 199 ( 1 ): 49-52, 2001年10月.
- 5) 石川博通, 西山康裕, 浜田裕公: 腸管上皮内T細胞の発達分化とクリプトパッチ. *免疫2002 (臨時増刊号 Molecular Medicine)* 38 : 136-141, 2001年11月.
- 6) 南野昌信, 石川博通: 粘膜免疫とケモカイン. *分子細胞治療 (CELLULAR MOLECULAR MEDICINE)* 2 ( 6 ): 28 (584) -33 (589), 2001年12月.
- 7) 南野昌信, 石川博通: 分子メカニズムからみた腸管免疫機構. *BIO Clinica* 17 ( 1 ): 18-22, 2002年1月.

〈半田〉

- 1) K Kataoka, S Shioda, K Yoshitomo-Nakagawa, H Handa and M Nishizawa: Maf and Jun nuclear oformation. *J Boil Chem* 276 : 36849-36856, 2001.
- 2) K Kataoka, H Handa and M Nishizawa: Induction of cellular anti-oxidative stress genes through heterodimeric transcription factor Nrf2/smallMafby anti-rheumatic gold (I) compounds. *J Boil Chem* 276 : 34074-34081, 2001.
- 3) Y Yamaguchi, J Filipovska, K Yano, A Furuya, N Inukai, T Narita, T Wada, S Sugimoto, M.M.Konarska and H Handa: Stimulation of RNA polymerase II elongation by Hepatitis delta antigen. *Science* 293 : 124-127, 2001.
- 4) Y Yamaguchi, T Narita, N Inukai, T Wada and H Handa: SPT Genes: Key players in the regulation of transcription, chromatin structure and other cellular processes. (review) *J Biochem* 129 : 185-191, 2001.
- 5) K-I.Ishizu, H Watanabe, S-I.Han, S-N .Kanesashi, M Hoque, H Yajima, K Kataoka and H Handa: The roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly by virus-like particles composed of SV40 VP1 capsid protein. *J Viro* 75 : 61-72, 2001.

〈日比〉

- 1) Kobayashi K, Hibi I, et al.: Detection of Fc $\gamma$  binding protein antigen in human sera and its relation with autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 79 (3): 229-235, 2001.
- 2) Asakura H, Hibi I, et al.: Efficacy of treatment with chimeric monoclonal antibody (Infliximab) to tumor necrosis factor- $\alpha$  for Crohn's disease in

Japan: evaluation by rapid turnover proteins, and radiologic and endoscopic findings. J Gastroenterol Hepatol.16 (7): 763-769, 2001.

- 3) Kanauchi O, Hibi T, et al.: Dietary fiber fraction of germinated barley foodstuff attenuated mucosal damage and diarrhea, and accelerated the repair of the colonic mucosa in an experimental colitis. J Gastroenterol Hepatol.16 (2): 160-168, 2001.

## 2. 学会発表

〈渡辺：国内〉

- 1) 渡辺 守、山崎元美、矢島知治：腸管粘膜内浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞の選択的除去による慢性大腸炎治療の可能性。第 87 回日本消化器病学会（シンポジウム）。2001 年 4 月 18 日
- 2) 永山和宜、渡辺 守、日比紀文：IL7-/IL-7 レセプターを介した腸管粘膜内リンパ球増殖調節機構の異常による潰瘍性大腸炎の発症。第 87 回日本消化器病学会（ワークショップ）。2001 年 4 月 19 日
- 3) 金井隆典、戸塚輝治、渡辺 守：Toll-like Receptor シグナルを介在する MyD88 分子の腸管粘膜免疫における役割。第 87 回日本消化器病学会（シンポジウム）。2001 年 4 月 19 日
- 4) 渡辺 守、山崎元美、矢島知治：内視鏡下生検組織を用いた潰瘍性大腸炎における IL-7/IL-7 レセプター発現の計時的解析。第 61 回日本消化器内視鏡学会（ワークショップ）。2001 年 5 月 11 日
- 5) 渡辺 守：腸管粘膜内浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞を標的とした慢性大腸炎に対する細胞療法の試み。第 45 回日本リウマチ学会（シンポジウム）。2001 年 5 月 16 日
- 6) 渡辺 守、山崎元美、岡田英里子、松本智子、大島 茂、岡本隆一、戸塚輝治、金井隆典、矢島知治、日比紀文：腸管粘膜浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞移入による慢性大腸炎の惹起。厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性炎症性腸管障害に関する調査研究 H13 年第 1 回。2001 年 7 月 11 日
- 7) 岡本隆一、山崎元美、渡辺 守：小腸における上皮細胞由来 IL-7 による粘膜免疫応答の維持。第 43 回日本消化器病学会（シンポジウム）。2001 年 10 月 17 日
- 8) 金井隆典、山崎元美、渡辺 守：Toll-like Receptor(TLR)を介した腸管粘膜修復機。第 43 回日本消化器病学会（ワークショップ）。2001 年 10 月 19 日
- 9) 渡辺 守、岡本隆一、金井隆典：腸管上皮の再生、分化機序の解明と粘膜修復への応用。厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 平成 13 年度第 1 回

研究会。2001 年 12 月 26 日

- 10) 山崎元美、松本智子、岡田英里子、岡本隆一、中村哲也、金井隆典、矢島知治、日比紀文、田邊将信、竹内 勤、石川博通、渡辺 守：腸管粘膜浸潤 IL-7 レセプター高発現細胞による慢性大腸炎発症。第 39 回日本消化器免疫学会総会。2002 年 3 月 7 日

〈渡辺：国外〉

- 1) Yamazaki M, Watanabe M, et al. : Decrease of interleukin-7-induced apoptosis of IL-7 receptor intestinal mucosal lymphocytes in chronic inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. DDW 2001. 2001.5.22
- 2) Watanabe M, et al. : Selective elimination of IL-7 receptor mucosal lymphocytes ameliorated established chronic colitis. DDW 2001. 2001.5.23
- 3) M Watanabe : Mucosal IL-7/IL-7 receptor dependent signals in the development of chronic intestinal inflammation. The 7th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity (シンポジウム) 2001.9.28

〈半田〉

- 1) 半田 宏：新規アフィニティ精製技術開発とそれからの展開。日本蛋白質科学会 第 1 回年会。大阪。平成 13 年 6 月 1-3 日
- 2) 半田 宏：創薬プロテオミクスの新戦略-Affinity beads の構築とその応用-。CBI (情報計算法学生物学会) 2001 年大会。東京。平成 13 年 7 月 25-27 日
- 3) H Handa : New Approach to Proteomics for Drug Discovery -Construction of New Affinity Beads and Its Application-. US-JAPAN Joint Symposium on Chemistry-Biology Interface Bioscience Symposium in Kumamoto University 2001.熊本。平成 13 年 7 月 27-28 日
- 4) 半田 宏：アフィニティビーズの開発と応用。第 19 回バイオテクノロジーシンポジウム。東京。平成 13 年 10 月 31 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
〈半田〉
  - 1) 特願 2001-294907 出願日 2001.09.27

「新規化合物、固定化物及び蛋白質のスクリーニング方法」

- 2) 特願 2001-380423 出願日 2001.12.13  
「免疫抑制剤標的分子の探索方法と免疫抑制剤標的分子を用いた新規免疫抑制剤探索方法」
- 3) 特願 2002-27156 出願日 2002.2.4  
「フェライト結合有機物質及びその製造方法」

# 分担研究報告

腸内細菌由来成分に対する受容体の異常と腸管粘膜機構破綻メカニズムの解明  
—慢性炎症抑制から、アレルギー抑制を目指した解析—

主任研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化・代謝内科学分野 教授

研究要旨

本研究は腸管粘膜免疫における新しい免疫抑制機構の考え方を導入して、アレルギー 担当免疫組織、免疫統御分子機構の存在等その特殊性を明らかとし、その特殊性を利用した新しいアレルギーに対する抑制戦略を実用化しようとする試みである。本年度 は腸内細菌と生体側免疫機構の相互応答、およびその異常による慢性腸管炎症の発症 に関して、細菌に対する生体側の反応系である Toll-like レセプター（TLR）を介した Toll シグナルに着目し、IL-7/IL-7 レセプターを介した免疫調節機構との関連性を追 究した。まず、腸内細菌に対する生体応答に IL-7 分子の関与が示唆された。また、腸 内細菌に対する応答には既存の TLR、MyD88 以外の生体側細胞受容体が関与して いる可 能性が明らかとなり、新しい受容体の単離を目指す研究が必要であると考えられた。

A. 研究目的

本研究はこれまでのアレルギー疾患側からみた病因・病態の解明とは全く出発点を変え、生体内最大の免疫組織である腸管粘膜免疫において主任研究者らの研究組織が独自に見いだしてきた IL-7/IL-7 レセプターを介した新しい免疫抑制機構の考え方を導入して、アレルギー担当免疫組織、免疫統御分子機構の存在等その特殊性を明らかとし、その特殊性を利用した新しいアレルギーに対する抑制戦略を実用化しようとする試みである。今回はそのプロトタイプとして、腸管粘膜機構における生体のホメオシタシス維持に必須である腸内細菌と生体側免疫機構の相互応答、およびその異常による慢性腸管炎症の発症の解析を行った。本年度は細菌に対する生体側の反応系である Toll-like レセプター（TLR）を介した Toll シグナルに着目し、IL-7/IL-7 レセプターを介した免疫調節機構との関連性を追究することにより、生体応答の異常を解析した。

B. 研究方法

腸管免疫にて重要な役割を果たす粘膜内リンパ球、IL-7 と腸内細菌フローラとの関連を腸炎モデルである IL-7 トランスジェニックマウス(IL-7Tg)および TLR 関連の遺伝子ノックアウトマウスを用いて検討した。特に、TLR を介したシグナルの中核的アダプター分子である MyD88 ノックアウトマウスの経時的

粘膜免疫の発達、endotoxin 活性抑制を有する抗

TLR4 抗体の腸炎発症抑制効果、IL-7Tg の慢性腸炎発症前と発症後の上皮細胞、免疫担当細胞の性状を検討した。

C. 研究結果

- 1) MyD88 ノックアウトマウスのクリプトパッチ、パリエル板、粘膜内リンパ球の検討で 10 週令では正常な形成を認めたが、離乳直後 3 週令のマウスにおいて、これらのリンパ装置の著しい発達不全を認めた。
- 2) 抗 TLR4 抗体投与により、腸炎発症の部分的な抑制効果を 0-3 週の初期に認めたが、経過とともにその抑制効果は減弱した。
- 3) IL-7Tg の慢性腸炎発症前のクリプトパッチおよび粘膜リンパ球はコントロールマウスに比し過形成であり、マクロファージ・樹状細胞における TLR2 および TLR4 受容体の発現の亢進を認めた。

D. 考察

TLR を介したシグナルの中核的アダプター分子である MyD88 分子を介した腸内細菌刺激は粘膜免疫の発達・分化には必須なものではなく、他の生体内受容体による代償機構の存在が示唆された。しかしながら、構造的には正常と変わらず発達した粘膜免疫系における腸炎発症や endotoxin shock などの誘導系での TLR 関連分子の役割については今後検討を要する。

今回のデータは腸炎発症と腸内細菌との相関関係を初めて分子レベルで示唆したものであるが、TLR4 以外の TLR 関連分子、新規受容体の追究が必要であると考えられる。また、IL-7 と腸内細菌との接点は粘膜免疫を正確に理解する上で極めて重要な点であり、今回、IL-7 分子を異常発現したマウスにおいて、クリプトパッチの発達亢進および TLR 分子の発現増強を認め、innate immunity における IL-7 分子の関与が示唆された。既に主任研究者らは慢性大腸炎炎症局所における IL-7 受容体陽性 T 細胞の著明な浸潤、免疫不全マウスにおける IL-7 受容体陽性 T 細胞による腸炎の惹起、この細胞を標的とした新規大腸炎治療法の開発に成功している。今回の研究により、腸内細菌-innate immunity と IL-7 および慢性大腸炎が関連づけられ、今後の IL-7/IL-7 レセプターを介した腸管粘膜免疫抑制機構による新しいアレルギー抑制戦略に重要な成績と考えている。

## E. 結論

腸内細菌と生体側免疫機構の相互応答、およびその異常による慢性腸管炎症の発症 に関して、細菌に対する生体側の反応系である Toll-like レセプター (TLR) を介した Toll シグナルに着目し、IL-7/IL-7 レセプターを介した免疫調節機構との関連性を追 究し、腸内細菌に対する生体応答に IL-7 分子の関与が示唆された。また、腸 内細菌に対する応答には既存の TLR、MyD88 以外の生体側細胞受容体が関与している可 能性が明らかとなり、新しい受容体の単離を目指す研究が必要であると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kanai T, Watanabe M, et al.: IL-18 and Crohn's disease. *Digestion*. 63: 37-42, 2001.
- 2) Ohkusa T, Watanabe M, et al.: Improvement in atrophic gastritis and intestinal metaplasia in patients from whom *Helicobacter pylori* was eradicated. *Ann Int Med*. 134: 380-386, 2001.
- 2) Inoue N, Watanabe M, et al.: Restricted VH gene usage in lamina propria B cells that produced anticolon antibody from patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 121:15-23, 2001.
- 4) Sawada T, Watanabe M, et al.: Colon cancer cell adhesion to endothelial E-selectin inhibits

detachment of endothelial cells through activation of beta(1)-integrin. *Biochem Biophys Res Commun*. 286: 20-27, 2001.

- 5) Kanai T, Watanabe M, et al.: Macrophage-derived IL-18 mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 121: 875-888, 2001.

### 1. 学会発表

#### 〈国内〉

- 1) 渡辺 守、山崎元美、矢島知治：腸管粘膜内浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞の選択的除去による慢性大腸炎治療の可能性. 第 87 回日本消化器病学会 (シンポジウム). 2001 年 4 月 18 日
- 1) 永山和宜、渡辺 守、日比紀文：IL7-/IL-7 レセプターを介した腸管粘膜内リンパ球増殖調節機構の異常による潰瘍性大腸炎の発症. 第 87 回日本消化器病学会 (ワークショップ). 2001 年 4 月 19 日
- 1) 金井隆典、戸塚輝治、渡辺 守：Toll-like Receptor シグナルを介在する MyD88 分子の腸管粘膜免疫における役割. 第 87 回日本消化器病学会 (シンポジウム). 2001 年 4 月 19 日
- 1) 渡辺 守、山崎元美、矢島知治：内視鏡下生検組織を用いた潰瘍性大腸炎における IL-7/IL-7 レセプター発現の計時的解析. 第 61 回日本消化器内視鏡学会 (ワークショップ). 2001 年 5 月 11 日
- 1) 渡辺 守：腸管粘膜内浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞を標的とした慢性大腸炎に対する細胞療法を試み. 第 45 回日本リウマチ学会 (シンポジウム). 2001 年 5 月 16 日
- 1) 渡辺 守、山崎元美、岡田英里子、松本智子、大島 茂、岡本隆一、戸塚輝治、金井隆典、矢島知治、日比紀文：腸管粘膜浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞移入による慢性大腸炎の惹起. 厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性炎症性腸管障害に関する調査研究 H13 年第 1 回. 2001 年 7 月 11 日
- 1) 岡本隆一、山崎元美、渡辺 守：小腸における上皮細胞由来 IL-7 による粘膜免疫応答の維持. 第 43 回日本消化器病学会 (シンポジウム). 2001 年 10 月 17 日
- 1) 金井隆典、山崎元美、渡辺 守：Toll-like Receptor (TLR) を介した腸管粘膜修復機. 第 43 回日本消化器病学会 (ワークショップ). 2001 年 10 月 19 日
- 2) 渡辺 守、岡本隆一、金井隆典：腸管上皮の再

生、分化機序の解明と粘膜修復への応用. 厚生  
科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 平成  
13年度第1回研究会. 2001年12月26日

- 3) 山崎元美、松本智子、岡田英里子、岡本隆一、  
中村哲也、金井隆典、矢島知治、日比紀文、田  
邊将信、竹内 勤、石川博通、渡辺 守：腸管  
粘膜浸潤 IL-7 レセプター高発現細胞による慢性  
大腸炎発症. 第 39 回日本消化器免疫学会総会.  
2002年3月7日

〈国外〉

- 1) Yamazaki M, Watanabe M, et al. : Decrease of  
interleukin-7-induced apoptosis of IL-7  
receptor intestinal mucosal lymphocytes in  
chronic inflamed colonic mucosa of  
ulcerative colitis. DDW 2001. 20001.5.22  
2) Watanabe M, et al. : Selective elimination of

IL-7 receptor mucosal lymphocytes  
ameliorated established chronic colitis. DDW  
2001. 2001.5.23

- 3) M Watanabe : Mucosal IL-7/IL-7 receptor  
dependent signals in the development of  
chronic intestinal inflammation. The 7th  
International Workshop on Autoantibodies  
and Autoimmunity (シンポジウム) 2001.9.28

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし

腸管局所免疫機構の特殊性を利用した治療法の開発

分担研究者 石川 博通 慶應義塾大学 医学部 微生物学・免疫学 教授

研究要旨

食物質/腸内フローラ/腸管上皮細胞/腸管免疫システムの間で見られる相互的な機能的連結（cross-talk）を解明するために、本年度は腸管粘膜 T/B 細胞による腸管上皮細胞の恒常性維持機構を腸内フローラとの関連で追及する研究手段の開発を目指した。

A. 研究目的

食物質由来の雑多な外来抗原やアレルギー起因物質、トキシン、病原微生物などの侵入に曝される腸管粘膜は最も危険な生体局所である。さらに食物質由来の餌が潤沢に存在する暖かい腸管腔は天文学的な数の腸内フローラを生育している。食物質/腸内フローラが腸管機能や免疫システムを特異的・非特異的に普段から賦活している事実は、無菌マウスや無菌且つ無抗原飼料での生育マウスが腸管免疫組織（GALT）の低形成に加えて免疫グロブリン（抗体）の激減や全身性免疫応答の著しい遅延を伴うこと、動物を非経口的栄養（高カロリー輸液）で維持すると体重は減少しないものの、たちどころに腸管組織が脆弱化し腸管壁は薄紙状になることや、感染に対する抵抗力が著しく減弱することなどから明らかである。すなわち食物質/腸内フローラ/免疫システムには密接な機能的連結（相互作用）がみられる。さらに、腸管上皮細胞（IEC）は生体内で最も寿命の短い細胞の一つであり、この著しく速いターンオーバーが腸管粘膜防御の役割を担うと考えられている。本研究の目的達成のために、本年度は主として腸内フローラと腸管粘膜内 T/B 細胞による IEC ターンオーバーの統御を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

腸管上皮内 T 細胞（IEL）の起源であるクリプトパッチ（CP）をマウス腸管粘膜内に同定したが、引き続き B 細胞の小集積を各種マウス腸管粘膜を精査し、同定を目指した。次に、T 細胞や B 細胞を欠損するマウスに加えて、各種ミュータントマウスの IEC 発達分化を解析し、手始めとして抗生物質経口投与による腸内フローラの質的・量的改

変が IEC 発達分化に及ぼす効果を追究した。

（倫理面への配慮）

本研究はヒトの題材を扱っていないので、倫理面では問題がないと思われる。マウスの使用に当たっては、本学動物実験委員会の倫理規定に従った。

C. 研究結果

- 1.) マウス小腸粘膜の腸間膜反対側に B 細胞の小集積を 100~200 ケ所見出し、これらが未だ報告されていないマウス小腸の孤立リンパ小節（isolated lymphoid follicles : ILF）であることを明らかにした（*J. Immunol.* 168 : 57-64, 2002 ; *Highlight in Nature Rev. Immunol.* 2 : 70, 2002）。
- 2.) 正常（WT）マウスや T 細胞を欠損する  $\delta \times \beta^{-}$  マウスと比較して、B 細胞を欠損する  $\mu m^{-}$  マウスの IEC ターンオーバーは著しく亢進していた。WT マウスで BrdU 陽性 IEC が絨毛の中央部に達する時点で、 $\mu m^{-}$  マウスではすでに絨毛先端まで移動していた。IL-7R<sup>+</sup>、*aly/aly* マウスの IEC ターンオーバーも WT より有意に速いことが分かった。この  $\mu m^{-}$  マウスの著しく速い IEC ターンオーバーは抗生物質経口投与によって減速し、WT のそれと同等となった。これらの結果や TCR- $\delta^{-}$  マウスの IEC ターンオーバーが逆に抑制される事実によって、種々の異なった免疫機能が IEC の恒常性を正又は負の方向に統御することが示された（*J. Immunol.* 168 : 2626-2633, 2002）。

D. 考察

マウス小腸にも ILF が存在し、これらはパイエル板と同等の機能を担う GALT であることが判明した。腸管粘膜 B 細胞は腸内フローラによる IEC



ターンオーバー促進を統御することが確かめられた。

#### E. 結論

腸内フローラ/B細胞/IEC 発達分化の機能的連結の一端が明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### “国際誌”

- 1) Kawaguchi-Miyashita M, Shimada S, Kurusu H, Kato-Nagaoka N, Matsuoka Y, Ohwaki M, Ishikawa H and Nanno M: An accessory role of TCR $\gamma\delta^+$  cells in the exacerbation of inflammatory bowel disease in TCR $\alpha$  mutant mice. *European Journal of Immunology* 31 : 980-988, 2001.
- 2) Bannai M, Kawamura T, Naito T, Kameyama H, Abe T, Kawamura H, Tsukada C, Watanabe H, Hatakeyama K, Hamada H, Nishiyama Y, Ishikawa H, Takeda K, Okumura K, Taniguchi M and Abo T: Abundance of unconventional CD8 $^+$  natural killer T cells in the large intestine. *European Journal of Immunology* 31: 3361-3369, 2001.
- 3) Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Kiyono H, Yamamoto H and Ishikawa H :Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *The Journal of Immunology* 168 : 57-64, 2002.
- 4) Nishiyama Y, Hamada H, Nonaka S, Yamamoto H, Nanno M, Katayama Y, Takahashi H, and Ishikawa H :Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes. *The Journal of Immunology* 168 : 2626-2633, 2002.

###### “国内誌”

- 1) 清野宏, 石川博通, 名倉宏. 中山書店 2001年3月  
序論: 清野宏, 石川博通, 名倉宏 編  
粘膜免疫 腸は免疫の司令塔
- 2) 石川博通. 中山書店 2001年3月  
腸管粘膜の生体防御を考える  
粘膜免疫 腸は免疫の司令塔: 31-48.
- 3) 石川博通. 昭和堂 2001年10月

腸管上皮内リンパ球と腸管免疫

シリーズ21世紀の健康と医生物学 からだを守る: 1-20.

##### 4) 浜田裕公, 西山康裕, 石川博通.

クリプトパッチ-腸管上皮細胞間T細胞 (IEL) の腸管粘膜での発達分化—

医学のあゆみ 199 ( 1 ): 49-52, 2001年10月.

##### 5) 石川博通, 西山康裕, 浜田裕公.

腸管上皮内T細胞の発達分化とクリプトパッチ

免疫2002 (臨時増刊号 *Molecular Medicine*) 38 : 136-141, 2001年11月.

##### 6) 南野昌信, 石川博通.

粘膜免疫とケモカイン

分子細胞治療 (*CELLULAR MOLECULAR MEDICINE*) 2 ( 6 ): 28 (584) -33 (589), 2001年12月.

##### 7) 南野昌信, 石川博通.

分子メカニズムからみた腸管免疫機構

*BIO Clinica* 17 ( 1 ): 18-22, 2002年1月.

##### 2. 学会発表

###### 1) Hiromichi Ishikawa.

<Symposium ; Chemokines on the Dynamics of Leukocyte Trafficking > Gut Cryptopatches: intestinal development and function of intraepithelial T cells.

10th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2001, Tokyo, 2001年6月21日~22日

###### 2) 西山康裕, 浜田裕公, 高橋秀実, 石川博通.

$\gamma\delta$ 型上皮細胞間T細胞サブセットによる腸管上皮細胞の再生統御.

第38回日本消化器免疫学会総会, 札幌, 2001年8月9日~10日

###### 3) 山崎元美, 岡田英里子, 岡本隆一, 金井隆典, 矢島知治, 日比紀文, 田邊将信, 竹内勤, 石川博通, 渡辺守.

腸管粘膜浸潤IL-7レセプター陽性細胞移入による慢性大腸炎の惹起.

第38回日本消化器免疫学会総会, 札幌, 2001年8月9日~10日

###### 4) 浜田裕公, 西山康裕, 高橋秀実, 石川博通.

B及びT細胞による腸管上皮細胞新生と発達分化の統御.

第84回日本細菌学会関東支部総会, 横浜2001年11月26日~27日

- 5) 西山康裕, 金成安慶, 浜田裕公, 坂上静香, 栗原さやか, 野中聡史, 高橋秀美, 山岸秀夫, 石川博通.  
 $\gamma\delta$ 型上皮細胞間T細胞サブセットによる腸管上皮細胞の再生統御.  
 第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2001年12月11日~13日
- 6) 坂上静香, 栗原さやか, 野中聡史, 浜田裕公, 西山康裕, 高橋秀美, 石川博通.  
 免疫機能関連遺伝子ミュータントマウスにおける腸管上皮細胞の増殖.  
 第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2001年12月11日~13日
- 7) 浜田裕公, 廣井隆親, 西山康裕, 高橋秀美, 八村敏志, 上野川修一, 清野宏, 山元弘, 石川博通.  
 マウス腸管粘膜に分布する孤立リンパ小節 (第2報).  
 第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2001年12月11日~13日
- 8) 山崎元美, 岡田英理子, 松本智子, 岡本隆一, 大島茂, 戸塚輝治, 金井隆典, 矢島知治, 日比紀文, 田邊将信, 竹内勤, 石川博通, 渡辺守.  
 腸管粘膜潤滑IL-7レセプター陽性細胞による慢性大腸炎の惹起.  
 第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2001年12月11日~13日
- 9) 伊藤聡美, 八村敏志, 増永陽平, 浜田裕公, 石川博通, 上野川修一.  
 経口免疫寛容における小腸パイエル板 (PP) および孤立リンパ小節 (ILF) の役割.  
 第31回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 2001年12月11日~13日
- 10) 石川博通.  
 <シンポジウム ; 消化器疾患制御に必要な臓器再生研究の現況> 消化管生体防御機構の特殊性と発達分化.  
 第20回Cytoprotection研究会, 京都, 2002年2月1日
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
特になし

ミラクルビーズを用いた食物性/腸内細菌性抗原・ペプチドに対応する  
生体受容体の単離についての基礎的解析

分担研究者 半田 宏 東京工業大学大学院生命理工学フロンティア創造共同研究センター、  
分子生物学 教授

研究要旨

食物アレルギーの発症機構は不明であるが、食餌性抗原が腸管上皮の特異的な受容体に結合し、細胞内を輸送され血中に至り、アレルギー性反応を惹起する可能性が想定される。我々が開発した超微小 beads 担体「ミラクルビーズ」は、生体内の受容体を単離するうえでの強力なツールである。本年度の研究では、食餌性/腸内細菌性抗原受容体を探索するための基礎的検討をおこない、その結果、立体障害による受容体の結合阻害を回避するためには beads への target 分子固定化に際し適当な長さの spacer を挿入することが必須であることが明らかとなった。また、本法により夾雑物の多い細胞粗抽出液からでも、直接、回収効率よく、しかも活性を保持した状態で目的物を affinity 精製することが可能であることを確認した。この手法の応用による食物アレルギーの原因となる食餌性抗原の生体内受容体の同定は、副作用のない特異的受容体阻害剤の開発への応用や、他の疾患にも共通したアレルギー発症機構の解明への展開など、極めて重要な波及効果が得られるものと期待される。

A. 研究目的

食物アレルギーの発症機構は不明であり、また加齢に伴う軽快・消失の機序も腸管粘膜免疫系の成熟、経口免疫寛容等が想定されているが、その詳細は全く不明である。腸管管腔内抗原の一部は、腸管上皮の特異的な受容体に結合することにより intact macromolecule として細胞内を輸送され血中に至り、アレルギー性疾患の誘因となると考えられる。このようなアレルギー反応の最前線である食餌性および腸内細菌性抗原に対する受容体の単離は、現在ブラックボックスとなっている食餌性/腸内細菌性抗原に対する腸管粘膜および全身性免疫の免疫統御機構を解明する端緒を開くと考えられる。しかしながら、個々の食餌性/腸内細菌性抗原に対応する生体受容体の単離はほとんどなされていないのが現状である。これは、生体受容体の単離が従来の方法では極めて煩雑であり、また特異的精製が困難であったことに起因する。我々が開発した超微小 beads 担体「ミラクルビーズ」は、従来の affinity beads より単位容積あたり数千倍以上のリガンドを固定化でき、また物理的、化学的にも安定であり、かつ分散性、可動性であるために、極めて高効率に生体受容体を分離精製することが可能である。今回の研究で

は、この「ミラクルビーズ」により腸管上皮細胞に発現する食餌性/腸内細菌性抗原の生体受容体を単離するための基礎的知見を蓄積することを目的とした。

B. 研究方法

食餌性/腸内細菌性抗原・peptide の「ミラクルビーズ」への固定化、およびそれを用いた生体受容体精製の条件設定のためのモデル実験系として、低分子化合物である薬剤（FK506）を固定化した beads をもちいて、その既知の受容体である FKBP（FK506 binding protein）の精製を試みた。また、夾雑物の混入する粗抽出液から極微量の target を検出できるか否か、NFκB 阻害剤である E3330 を固定化した beads をもちいて、その受容体で核内微量蛋白質である Ref-1 の精製を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究においては、ヒト T 細胞から株化された Jurkat 細胞をもちいており、ヒトから採取した臨床材料はもちいておらず、また遺伝子情報の解析も行っていないために、倫理面での問題は無いと思われる。

## C. 研究結果

1) 低分子化合物 FK506 を直接 beads に固定化すると立体障害のために受容体が結合できないことが判明したが、適当な長さの spacer を挿入することによりこの問題を解決した。これにより、FK506 を固定化した beads をもちいて、ヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞の粗細胞質抽出液から、一回の結合反応で、目的の FKBP を効率よく回収することが可能であった。この回収物が FKBP であることは、western blotting、および遊離 FK506 による競合阻害により確認され、この beads には、非特異的結合が極めて少ないことを確認した。

2) E3330 を固定化した beads をもちいて、Jurkat 細胞の粗核抽出液から、その受容体を回収した。当該受容体は、核内に極微量にしか存在しないため、通常の affinity 精製法では、前もって目的物を濃縮するか、あるいは精製結合反応を繰り返す必要があるが、本法を用いることにより、前もって目的物を濃縮することなく、また 1 回の affinity 精製により 3 種類の異なる受容体を効率よく単離することが可能であった。Ref-1 は、核内で NF $\kappa$ B を還元して、その DNA 結合能を更新させ活性化し、E3330 は Ref-1 に選択的に結合し、その還元活性を阻害する。本法で精製した Ref-1 は E3330 と特異的に結合するのみならず、NF $\kappa$ B に対する還元活性を保持することが確認された。

## D. 考察

受容体の単離において問題となるのは target 分子と受容体の結合の強度、安定性および特異性である。今回の検討により、beads への target 分子固定化に際しては、その立体構造による受容体の結合阻害の可能性を十分に考慮し、適当な長さの spacer を挿入する必要性が明らかとなった。これは、食餌性・腸内細菌性抗原・peptide の beads への固定化にも適用可能な重要な基礎的知見であった。

また、従来の affinity 精製では、非特異的吸着が極めて多かったために、煩雑な生成過程を反復し、前もって夾雑物を除去し、目的物を濃縮する必要があり、そのために膨大な時間、人的労力、経費が必要であり、これが生体受容体の単離をきわめて困難なものとしていた。しかしながら、我々の用いた「ミラクルビーズ」では、一回の反応できわめて効率よく受容体を回収することが可能であった。しかも、その結合はきわめて特異的であ

り、夾雑物の多い細胞粗抽出液からでも、直接精製することが可能であった。特筆すべきは、回収した微量核内蛋白が、その活性を保持した状態で affinity 精製することが可能であった点であり、これにより食餌性/腸内細菌性抗原受容体の探索にも十分応用可能な、極めて強力な手法であることが確認された。

## E. 結論

食物アレルギーの発症機構、加齢に伴う軽快・消失の機序の詳細は全く不明であるが、腸管内抗原の一部が腸管上皮の特異的な受容体に結合することにより血中に至り、アレルギー反応を惹起すると考えられる。すなわち、食餌性および腸内細菌性抗原に対する受容体はいわばアレルギー反応の最前線にあると考えられ、その解明は食餌性/腸内細菌性抗原に対する腸管粘膜および全身性免疫の免疫統御機構を解明する端緒を開くと考えられる。

我々が開発した超微小 beads 担体「ミラクルビーズ」は、従来の affinity beads と比較し、極めて高効率に生体受容体を分離精製することが可能である。今回の検討により、beads への target 分子固定化における問題点が明らかとなり、食餌性/腸内細菌性抗原に対応する生体受容体単離のための基礎的知見が得られた。また、腸管上皮細胞由来の細胞抽出液にはきわめて夾雑物が多いことが予想され、それが受容体単離を困難なものとする可能性が危惧されたが、今回の検討により、beads に固定された target 分子と受容体の結合はきわめて特異的であり、夾雑物の多寡を問わず直接、効率よく、活性を保持して精製することが可能であったことから、食餌性/腸内細菌性抗原・peptide の受容体の同定に十分に応用可能であることが確認された。今後この手法の応用により食餌性/腸内細菌性抗原・peptide に対応する受容体を明らかとし、食物アレルギー発症機構を解明することにより、食物アレルギーのみならず他のアレルギー疾患の治療に結びつく極めて重要な知見が得られるものと期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) K Kataoka, S Shioda, K Yoshitomo-Nakagawa, H Handa and M Nishizawa : Maf and Jun nuclear oformation. **J Boil Chem**