

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

アレルギーにおける粘膜免疫を基点とした全身・皮膚
免疫クロスネットワークシステムの解明と予防への
応用に向けた基礎研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成15年(2003年) 4月

目 次

I.	研究総括報告書	
	アレルギーにおける粘膜免疫を基点とした全身・皮膚免疫クロスネットワークシステムの解明と予防への応用に向けた基礎研究	1
II.	分担研究報告書	
1.	NALTに代表される呼吸器粘膜免疫機構のアレルギーへの関与の基礎研究 清野 宏	9
2.	アレルギー疾患の分子細胞ネットワークとその制御に関する研究 高津 聖志	13
3.	環境ストレス応答分子反応型腸管T細胞のアレルギーへの関与解明に向けての基礎研究 高橋 一郎	17
4.	上気道粘膜における好酸球浸潤と難治化に関する研究 黒野 祐一	21
5.	カンジダが関与するアトピー性皮膚炎病態調節の可能性に関する研究 権 美那	25
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV.	研究成果の刊行物・別刷	33

研究総括報告書

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

主任研究報告書

アレルギーにおける粘膜免疫を基点とした全身・皮膚免疫クロスネットワークシステムの
解明と予防へ向けた基礎研究

主任研究者： 清野 宏 東京大学医科学研究所免疫・感染研究部門炎症免疫学分野 教授

分担研究者： 高津 聖志（東京大学医科学研究所 教授）

高橋 一郎（広島大学大学院 教授）

黒野 祐一（鹿児島大学医学部 教授）

権 美那（大阪大学微生物病研究所 助手）

研究要旨： 粘膜免疫系を基点とした全身系・皮膚免疫三者間クロスネットワークという新しいパラダイムの確立とその誘導・制御機構を解明し、新しい視点でのアレルギー予防・治療開発に向けての基礎医学的情報を提供する。その目的達成に向けて初年度は関連する領域で活発な研究を展開している基礎系4名と臨床系1名の研究体制を立ち上げ多面的な研究活動を開始した。呼吸器系と消化器系における粘膜免疫の特異性とそれに関連する免疫調節機能について個体、細胞、分子レベルでの解明を進めている。それを反映する様に初年度にも拘わらず29編の論文を国際誌に報告している。

A. 研究目的：本研究計画では粘膜免疫系を基点とした全身免疫と皮膚免疫トライアングル免疫統御系の解明を進め、アレルギーにおける呼吸器・消化器など粘膜で被われた臓器特異性免疫応答の異常のみならず、それによる全身免疫と皮膚免疫システム破綻の過程について実証的な理論構築をおこなう。これを基盤としてアレルギーの予防・治療につながる粘膜免疫機構から全身免疫と皮膚免疫を制御する「粘膜免疫基点免疫療法」開発へ向けての基礎的情報を提供する。

B. 研究方法：粘膜免疫システムを基点とした全身免疫と皮膚免疫間トライアングル免疫クロストークシステムの誘導・制御機構の解明を進め、アレルギー

発症における関与を追及していく目的で基礎系4名と臨床系1名による共同研究体制のもとで多面的研究を展開している。本研究計画では、粘膜免疫学領域で先導的研究を展開している東大・清野は主任研究者として研究全般の総括と呼吸器粘膜免疫(NALT)を中心としたアレルギーとの関連の解明に従事している。東大・高津はIL-5シグナル伝達による好酸球制御とIgA⁺B細胞誘導機構についての世界的第一人者であり、トライアングル免疫クロストークシステムに関連するサイトカイン制御機構の解明を細胞・分子レベルから多面的に研究を進めている。広島大・高橋は環境ストレス応答性分子であるMICA/NG2Dの腸管T細胞発達への関与を中心として研究を展開し、アレルゲンを環境ストレスと考え、

臓器特異性を代表する腸管 T 細胞のアレルギー制御への関与という新しい観点から研究を展開している。阪大・権はカンジダアレルギーモデルの開発とそれを駆使した粘膜・皮膚・全身免疫間クロストークシステムの存在についての解析を担当している。鹿児島大・黒野は臨床的観点からヒト NALT の発達過程に及ぼす吸入アレルギー抗原の影響を検討し、特にホーミングレプターの観点からヒト検体を駆使して研究を展開している。

C. 研究結果：清野班は NALT やパイエル板組織形成が遺伝的に欠損している新生児 $Id2^{-/-}$ マウスをレシピエントとして正常マウスから分離した胎生肝細胞や $CD3^{+}CD4^{+}CD45^{+}$ 細胞を FACS で精製分離し $Id2^{-/-}$ マウスへの移入実験をおこない、移入してから約 1 週間後には NALT 組織形成が将来起きる鼻腔底の両角に $CD3^{+}CD4^{+}CD45^{+}$ 細胞集団の存在を認めた。さらに、数週間後にはベル状の形態を有した NALT 組織形成を認め、胎生肝細胞集団の中の $CD3^{+}CD4^{+}CD45^{+}$ 細胞によって NALT 組織形成が開始されることを個体レベルで直接的に初めて見出した。

高津班は結核菌 Ag85B 蛋白質の C-末端側の 15 アミノ酸残基ペプチド (Peptide-25) が選択的に Th1 応答を惹起するアジュバント活性を示し Th1 応答や細胞傷害性 T 細胞の生成を促進することを初めて見出した。また、Lnk ファミリーアダプター分子である Lnk の過剰発現がマスト細胞の増殖を抑制することや APS が増すと細胞の脱顆粒の制御に関与することを初めて発見した。そして、IgA 産生や好酸球の増殖・分化を制御する IL-5 が実験アレルギー性鼻炎の病態に関与することを初めて示した。

高橋班は環境ストレス応答分子である NKG2D や Rae-1 β の局在についてマウス小腸遠位部および大腸近位部粘膜の陰窩部上皮に発現が高いことを同定した。さらに環境ストレス応答分子である MICA-Tg マウスを作成し、小腸 IELs において CD44,

CD45RB, CD69 などの活性化マーカーが陽性な $CD4^{+}CD8^{+}$ T 細胞の発達が亢進していることを見出した。この MICA 誘導型 T 細胞の TCR 発現様式とクロノタイプを解析により、クローナルな増殖分化をうかがわせる TCR レパトア V β 8.2-J β 2.7 を示すことを明らかにした。

権班はカンジダとアレルギーの関連を探求する動物モデルの開発を試み成功している。カンジダ抗原を Alum と共に腹腔内投与することにより、血清中総 IgE 抗体と抗原特異的 IgE 抗体の産生が認められ、全身感作が成立した。次にこのマウスにカンジダアレルギーと共に CT を経鼻投与したところ既存 IgE 抗体に影響することなく血清中、分泌液中にカンジダ特異的 IgA 抗体誘導が確認された。

黒野班は臨床的観点から血管内皮細胞と線維芽細胞による可溶性と膜型 VCAM-1 上昇と転写活性因子である NF- κ B 発現相関性を証明し、これらの反応は抗アレルギー薬であるセチリジンそしてステロイドによって有意に抑制された。次に臨床検体中の VEGF の濃度を ELISA によって測定したところ、アレルギー性鼻炎鼻汁、慢性副鼻腔炎鼻汁中の濃度が血清中と比較して有意に高値であった。そこで、線維芽細胞を低酸素下に培養すると、VEGF 産生が上昇した。また、NF- κ B に加えて、低酸素関連因子のひとつである HIF の発現も認められた。これら因子の産生、発現はステロイドそして 14 員環系マクロライド薬によって有意に抑制された。

D. 考察：清野班の研究結果は胎生肝細胞と $CD3^{+}CD4^{+}CD45^{+}$ 細胞によって NALT 組織形成が開始されることを個体レベルで直接的に初めて証明した。両細胞群移入マウスにおける NALT 組織形成の成熟度を比較した場合、胎生肝細胞移入群のほうが高いことから $CD3^{+}CD4^{+}CD45^{+}$ 細胞以外にもその過程に関与する細胞集団が存在している可能性が示唆され、現在その検討を進めている。

高津班では本年度の結果をもとに Peptide-25 がどのようなメカニズムで Th1 の生成を促進するのか、さらに Th1 アジュバントによるアレルギー制御の方法を探索していく。Lnk によるマスト細胞増殖抑制のメカニズムについては c-Kit との相互作用の観点とシグナル伝達系の解析により今後明らかにしていく。IL-5 の粘膜内 B 細胞活性化の機構の解明、ヒト好酸球株化細胞を用いて IL-5 レセプターの細胞内ドメインに会合する分子を同定し、その拮抗剤を検索していく予定である。

高橋班の結果は NKG2D テトラマーと Rae-1 β anti-sense RNA を用いて In situ hybridization 法を駆使した実験の所見より IEL の発達を促すリガンドのひとつとして Rae-1 β などの NKG2D リガンドの関与が示唆された。また、MICA-Tg マウスの解析から IELs の一部は MICA 特異的に誘導される環境ストレス適応性の胸腺外分化 T 細胞である可能性が示唆された。今後は環境ストレス反応性腸管 T 細胞の食物アレルギー発症への関与を検討する。

権班の結果により、経鼻カンジダ粘膜ワクチンは、カンジダ抗原に全身感作されている宿主に対しても血清中総 IgE 抗体や抗原特異的 IgE 抗体の増加やアレルギー症状を増悪することなく、腸管内粘膜免疫機構を活性化し、腸管内常在性 *C. albicans* 生体内バランスを調節し、安全かつ有効にアトピー重症化改善効果に寄与する可能性が示唆された。

黒野班の結果から I 型アレルギーそして炎症に関わるサイトカインや因子は VCAM-1、VEGF の産生を促進し、粘膜組織内への好酸球浸潤そして浮腫に関わっていると推測される。さらにそのシグナル伝達には転写活性因子である NF- κ B が重要な役割を演じていることが示唆された。また、アレルギー性炎症の遷延化や難治化には起炎物質の存在のみでなく、病変臓器の環境たとえば低酸素状態などが関与し、複雑な病態を呈すると考えられる。

E. 結論: 粘膜免疫システムを基点とした全身免疫と皮膚免疫間トライアングル免疫クロストークシステムの誘導・制御機構の解明を進め、アレルギー発症における関与を追及していく目的で基礎系 4 名と臨床系 1 名による共同研究体制を推進して、呼吸器粘膜免疫の観点からはその誘導に関して中心的役割を果たしている NALT 組織形成細胞集団の同定とその直接的関与の個体レベルでの証明から始まり IL-5 の実験アレルギー性鼻炎の病態形成関与が明らかになった。さらに臨床検体等を駆使して呼吸器粘膜炎症における転写活性因子 NF- κ B を介した VCAM-1、VEGF の産生促進機構とその抑制効果薬剤についての知見を提供した。腸管免疫においては環境ストレス応答分子である NKG2D、Rae-1 の腸管組織発現パターンから MICA 反応性 CD4⁺CD8⁺T 細胞の発達亢進メカニズムについて新知見を提供した。アレルギーとの関連ではアトピー性皮膚炎との関連が疑われている腸管内常在性 *C. albicans* を制御できる抗原特異的粘膜免疫誘導法を検討できるマウルモデルを確立した。基礎・治療的観点からは結核菌 Ag85B 蛋白質由来 Peptide-25 が選択的に Th1 応答を惹起するアジュバント活性を示しアレルギー治療への可能性が示唆された。また、Lnk ファミリーアダプター分子である Lnk の過剰発現がマスト細胞の増殖を抑制することや APS が増すと細胞の脱顆粒の制御に関与することが分かり、それをターゲットにした薬剤の開発研究へ向けての応用研究が期待される。

F. 健康危惧情報: 当研究計画は医学的情報発信へ向けた基礎的理論形成研究の為、現時点では該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表:

1. Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S.,

- Shikina, T., Yamamoto, M., Kurono, Y. and **Kiyono, H.** NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT $\alpha 1\beta 2$ /LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3⁻ CD4⁺CD45⁺ cells. *Immunity* 17: 31-40, 2002.
2. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and **Kiyono, H.** IL-15 induced CD8 $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺T cells in the development of small intestinal inflammation in T3b-IL-15 Tg mice. *J Immunol* 169: 460-468 2002.
 3. Suenobu, N., Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** Nasal vaccination induces the ability to eliminate *Candida* colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of *Candida*-related atopic dermatitis. *Vaccine* 20: 2972-2980, 2002.
 4. Kweon, M-N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M-H., Suenobu, N. and **Kiyono, H.** Development of antigen-induced enterocolitis in SCID mice reconstituted with spleen-derived memory type CD4⁺ CD45RB⁺ T cells. *Gut* 50: 299-306, 2002.
 5. 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. *J Immunol* 168: 57-64, 2002.
 6. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and **Kiyono, H.** Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. *Clin Immunol* 102: 237-248, 2002.
 7. Kunisawa, J., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Hiroi, T., Nakagawa, S., **Kiyono, H.** and Mayumi, T. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 α antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen. *Eur J Immunol* 32: 2347-2355, 2002.
 8. Ueta, M., Kweon, M-N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J., Koizumi, N., **Kiyono, H.** and Kinoshita, S. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol* 129: 464-470, 2002.
 9. Watanabe, I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., **Kiyono, H.**, Takeda, Y., McGhee, J.R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T. and Tammura, S. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* 20: 3443-3455, 2002.

10. Yanagita, M., Shimabukuro, Y., Nozaki, T., Yoshimura, N., Watanabe, J., Koide, H., Terakura, M., Saho, T., Takedachi, M., Jang, M-H., **Kiyono, H.** and Murakami, S. IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells. *Biochem Biophysical Res Commun* 297: 329-334, 2002.
11. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W. van Ginkel., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., J.R. McGhee. and **Kiyono, H.** A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab. *J Infect Dis* 186:1261-1269, 2002.
12. Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., E. J. Park. and **Kiyono, H.** Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J Immunol* 169: 6187-6192, 2002.
13. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and **Kiyono, H.** HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 enapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J Immunol* 170: 495-502, 2002.
14. Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** CD40L in autoimmunity and mucosally induced tolerance. *J Clin Invest* 109: 171-173, 2002.
15. Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y. and **Takatsu, K.** Enhanced hematopoiesis by hematopoietic stem cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J Exp Med* 195: 151-60, 2002.
16. Saito, H., Matsumoto, K., Denburg, A. E., Crawford, L., Ellis, R., Inman, M.D., Sehmi, R., **Takatsu, K.**, Matthaei, K. I., Band, B. and Denburg, J.A. Pathogenesis of murine experimental allergic rhinitis: A study of local and systemic consequences of IL-5 deficiency. *J Immunol* 168: 3017-23, 2002.
17. Takaki, S., Tezuka, Y., Sauer, K., Kubo, C., Kwon, S-M., Armstead, E., Perlmutter, R.M. and **Takatsu, K.** Impaired expansion of lymphoid precursors and altered distribution of peripheral B cell subpopulations in transgenic mice overexpressing intracellular adaptor protein, Lnk. *J Immunol* (in press) , 2003.
18. Ohtsuka, S., S. Takaki, M. Iseki, N. Nakagata, Y. Kataoka, N. Yoshida, **K. Takatsu,** and A. Yoshimura. SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol Cell Biol* 22: 3066-77, 2002.
19. Kaku, H., K. Horikawa, Y. Obata, I. Kato, H. Okamoto, N. Sakaguchi, S. Gerondakis, and **K Takatsu.** Nuclear factor κ B is required for

- CD38-mediated induction of the germline transcripts of C γ 1 in murine B lymphocyte. *Int Immunol* 14: 1055-1064, 2002.
20. Mtsune, S., Kono, M., Ushikai, M., Deguchi, K. and **Kurono, Y.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and chemokines from fibroblast of human nasal polyp under hypoxic condition. *Proc of Airway Secretion Res* 10: 67-69, 2002.
 21. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and **Kiyono, H.** Development of colitis in STAT6-deficient TCR $\alpha^{-/-}$ mice : A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4 $^{+}$ β β T cells. *Am J Pathol* 162: 263-271, 2003.
 22. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., **Kiyono, H.**, Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66, 2002.
 23. Boyaka, P.N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R.J., **Kiyono, H.**, Yuki, Y. and Kiyono, H. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvant activity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J Immunol* 170: 454-462, 2003.
 24. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4 $^{+}$ T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 15: 1754-1762, 2003.
 25. De Winter, H., Elewaut, D., Turovskaya, O., Huflejt, M., Shimeld, C., Hagenbaugh, A., Binder, S., **Takahashi, I.**, Kronenberg, M. and Cheroutre, H. Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 122: 1829-1841, 2003.
 26. Takaki, S., Y. Tezuka, K. Sauer, C. Kubo, S-M. kwon, E. Armstead, RM. Perlmutter, and **K. Takatsu.** Impaired expansion of lymphoid precursors and altered distribution of peripheral B cell subpopulations. *J Immunol* 170: 703-710, 2003.
 27. **Kweon M.-N.**, and Kiyono H. Eosinophilic Gastroenteritis: A Problem of the Mucosal Immune System? *Current Allergy and Asthma Reports* 3: 79-85, 2003.
 28. Suzuki, H., S. Matsuda, Y. Terauchi, M. Fujiwara, T. Ohteki, T. Asano, T. W. Behrens, T. Kouro, **K. Takatsu,** T. Kadowaki, and S.

Koyasu. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat Immunol* (in press), 2003.

29. **Takatsu, K.**, and A. Kariyone. Immunogenic peptide for the Th1 development. *Int Immunopharmacol* (in press), 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし。

分担研究報告書

分担課題名:NALTに代表される呼吸器粘膜免疫機構のアレルギーへの関与の基礎研究

分担研究者： 清野 宏 東京大学医科学研究所免疫・感染研究部門炎症免疫学分野 教授

研究要旨： 呼吸器系粘膜免疫機構の中核組織である NALT の組織形成のユニーク性について検討を進めた。NALT 組織形成にあおって胎生肝細胞集団に存在する CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞が直接的に関与していることを移入実験により個体レベルで初めて明らかにする事が出来た。

A. 研究目的：呼吸器は腸管とならんで粘膜免疫機構の大輪の一つを司っているが、その免疫学的実像に関する詳細な解明は進んでいない。特にその誘導組織と考えられている鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）については各種粘膜免疫担当細胞が集積しており、経鼻免疫のターゲットになることは知られているが、その組織構築メカニズムや花粉症に代表されるアレルギー発症との関連については未解明の部分が非常に多い。そこで本分担研究では NALT の組織発達機構特異性の解明と呼吸器粘膜関連アレルギー免疫応答誘導メカニズムを解明していく。

B. 研究方法：NALT 発達における原基細胞集団と考えられている CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞による NALT 組織形成能を個体レベルで証明する。そこで、NALT やパイエル板組織形成が遺伝的に欠損している新生児 Id2^{-/-}マウスをレシピエントとして正常マウスから分離した胎生肝細胞や CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞を FACS で精製分離し Id2^{-/-}マウスに移入してその組織形成への関わりを検討した。

C. 研究結果：胎生肝細胞を移入してから約 1 週間後には NALT 組織形成が将来起きる鼻腔底の両角に CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞集団の存在が認められた。さらに、数週間後にはベル状の形態を有した NALT 組織形成が認められた。また、CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞を移入した場合においてもベル状の形態にちかい NALT 組織形成が鼻腔底の両角に確認された。

D. 考察：当研究グループは他の 2 次リンパ組織に比較して NALT 組織形成が生後に開始されることを見出してきた。それを基盤として Id2^{-/-}マウスを駆使して胎生肝細胞内に NALT 組織形成を開始する原基細胞集団が存在することを証明することが出来た。さらに、二次リンパ組織形成原基細胞集団と考えられている CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞によって NALT 組織形成が開始されることを個体レベルで直接的に初めて証明した。両群における NALT 組織形成の成熟度を比較した場合、胎生肝細胞移入群のほうが高いことから CD3⁺CD4⁺CD45⁺細胞以外にもその過程に関与する細胞集団が存在している可能性が示唆され現在検討を進

めている。

E. 結論：胎生肝細胞集団の中の CD3⁺CD4⁺CD45⁺ 細胞によって NALT 組織形成が開始されることを 個体レベルで直接的に初めて見出した。

F. 健康危惧情報：当研究計画は医学的情報発信へ 向けた基礎的理論形成研究の為、現時点では該当 しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S., Shikina, T., Yamamoto, M., Kurono, Y. and **Kiyono, H.** NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT α 1 2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3⁺ CD4⁺CD45⁺ cells. *Immunity* 17: 31-40, 2002.
2. Kunisawa, J., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Hiroi, T., Nakagawa, S., **Kiyono, H.** and Mayumi, T. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 α antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen. *Eur J Immunol* 32: 2347-2355, 2002.
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. *J Immunol* 168: 57-64, 2002.
4. Kweon, M-N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M-H., Suenobu, N. and **Kiyono, H.** Development of antigen-induced enterocolitis in SCID mice reconstituted with spleen-derived memory type CD4⁺CD45RB⁺ T cells. *Gut* 50: 299-306, 2002.
5. Ueta, M., Kweon, M-N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J., Koizumi, N., **Kiyono, H.** and Kinoshita, S. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin Exp Immunol* 129: 464-470, 2002.
6. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and **Kiyono, H.** IL-15 induced CD8 $\alpha\beta$ ⁺ NK1.1⁺T cells in the development of small intestinal inflammation in T3b-IL-15 Tg mice. *J Immunol* 169: 460-468, 2002.
7. Suenobu, N., Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** Nasal vaccination induces the ability to eliminate *Candida* colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of *Candida*-related atopic dermatitis. *Vaccine* 20: 2972-2980, 2002.
8. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M.

- and **Kiyono, H.** Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. *Clin Immunol* 102: 237-248, 2002.
9. Watanabe, I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., **Kiyono, H.**, Takeda, Y., McGhee, J.R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T. and Tammura, S. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* 20: 3443-3455, 2002.
 10. Yanagita, M., Shimabukuro, Y., Nozaki, T., Yoshimura, N., Watanabe, J., Koide, H., Terakura, M., Saho, T., Takedachi, M., Jang, M-H., **Kiyono, H.** and Murakami, S. IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells. *Biochem. Biophysical. Res Commun* 297: 329-334, 2002.
 11. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W, van Ginkel., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., J.R. McGhee. and **Kiyono, H.** A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab. *J Infect Dis* 186: 1261-1269, 2002.
 12. Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., E. J. Park. and **Kiyono, H.** Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J Immunol* 169: 6187-6192, 2002.
 13. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and **Kiyono, H.** HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J Immunol* 170: 495-502, 2002.
 14. Kweon, M-N. and **Kiyono, H.** CD40L in autoimmunity and mucosally induced tolerance. *J Clin Invest* 109: 171-173, 2002.
 15. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and **Kiyono, H.** Development of colitis in STAT6-deficient TCR $\alpha^{-/-}$ mice: A potential of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4 $^{+}$ β β T cells. *Am J Pathol* 162: 263-271, 2003.
 16. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., **Kiyono, H.**, Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66, 2002.

17. Boyaka, P.N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R.J., **Kiyono, H.**, Yuki, Y. and Kiyono, H. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J Immunol* 170: 454-462, 2003.

18. Hagiwara, Y., McGhee, J.R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., **Kiyono, H.** and Fujihashi, K. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4⁺T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J Immunol* 170: 1754-1762, 2003.

19. **Kweon M.-N.**, and Kiyono H. Eosinophilic Gastroenteritis: A Problem of the Mucosal Immune System? *Current Allergy and Asthma Reports* 3: 79-85, 2003.

厚生労働省科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

アレルギー疾患の分子細胞ネットワークとその制御に関する研究

分担研究者 高津 聖志 東京大学医科学研究所教授

研究要旨 本研究は粘膜免疫と全身免疫間のクロストークシステムを分子・細胞レベルで解明することを目的とし、研究実施期間内に多面的なアプローチを試みる。平成14年度は結核菌の分泌する主要蛋白質である Ag85B の C-末端側ペプチド (Peptide-25) がマウスに強い免疫原性を示し選択的に Th1 応答を惹起すること、共免疫により他の抗原による Th1 応答を選択的に促進することを初めて見出した。アダプター分子である Lnk を株化マスト細胞に過剰発現させ幹細胞因子 (SCF)依存性の応答を解析し、Lnk の過剰発現はマスト細胞の SCF 依存性の増殖を抑制することを初めて明らかにした。

A. 研究目的 粘膜免疫と全身免疫間のクロストークシステムを分子・細胞レベルで解明するために、研究実施期間内に我々は3つの異なる方向から多面的なアプローチを試みる。(1) 細胞性免疫に関与する Th1 を活性化できる結核菌由来ペプチドや CpG DNA、経口ワクチン を利用して、免疫応答をアレルギー発症を促進するもの (Th2 優性) から抑制する方向 (Th1 優性) に変換せしめる方法を開発する。(2) マスト細胞の増殖や脱顆粒を制御するアダプター分子や接着分子のシグナル伝達系を明らかにし、その阻害剤の有用性を探索する。(3) アレルギー性炎症制御につながる「粘膜免疫基点免疫療法」の開発に向けて、粘膜免疫機構から全身免疫と皮膚免疫を制御する。

B. 研究方法

結核菌の α 抗原由来ペプチドである Peptide-25 を C57BL/6 マウスに免疫しそのリンパ節を試験管内培養し、サイトカインやケモカインの産生を検討した。Lnk アダプター分子遺伝子欠損マウスを作出した。骨髄細胞を IL-3 存在下

に長期培養し株化マスト細胞を樹立し、必要に応じて Lnk を過剰発現させ実験に供した。

C. 研究成果

平成14年度は(1)に関して、結核菌の分泌する主要蛋白質である Ag85B の C-末端側の 15 アミノ酸残基ペプチド (Peptide-25) が強い免疫原性を示し選択的に Th1 応答を惹起すること、共免疫することにより他の抗原に対するアジュバント活性を示し Th1 応答や細胞傷害性 T 細胞の生成を著明に促進することを初めて見出した。

(2) に関し、Lnk ファミリーアダプター分子である Lnk, SH2-B, APS の遺伝子欠損マウスを作出した。野生マウスの骨髄細胞を IL-3 と共に長期培養して株化マスト細胞を樹立し、Lnk 遺伝子を導入し SCF に対する応答性の変化を野生型マスト細胞株と比較した。Lnk の過剰発現はマスト細胞の SCF 依存性の増殖を抑制すること、それは c-Kit による Gab2 や MAP キナーゼの活性化を阻害する結果であることを明らかにした。また、APS トランスジェニックマウスのマスト細胞は IgE 依存性の脱顆粒に異常を示すことを初めて見出した。

(3) に関し、IgA 産生や好酸球の増殖や分化を制御する IL-5 が実験アレルギー性鼻炎の病態に 関与することを初めて示した。

D. 考察

本年度の研究により、結核菌の分泌する主たる蛋白質として知られている、 α 抗原 (Ag85B ないし MPT59 と呼ばれる) の C-末端ペプチドである Peptide-25 はマウスに免疫原性を示し Th1 生成を 選択的に誘導することを見出した。何故 Peptide-25 による免疫が Th1 のみを惹起しうる のか、サイトカインの影響、副刺激分子の関与、 抗原提示をする樹状細胞 (DC) の関与等、そのメ カニズムを多面的に解析する必要があると考 える。現在 Peptide-25 を MHC クラス II 抗原ととも に認識する TCR を発現しているトランスジェニ ックマウスを作出できたので、次年度以降に解析 を予定している。Peptide-25 の示す選択的な Th1 誘導活性が IgE 産生やアレルギー性炎症を制御で きるか生体内で解析し、有用な方法を開発したい。 Lnk や APS によるマスト細胞増殖抑制や脱顆粒の 抑制メカニズムを c-Kit との相互作用の観点、シ グナル伝達分子との会合の解析により明らかに する必要がある。

E. 結論

結核菌の分泌する主要蛋白質である Ag85B の C-末端側の 15 アミノ酸残基ペプチド (Peptide-25) は、強い免疫原性を示し選択的に Th1 応答を惹起するのみならず、交叉性のない他 の抗原とともに共免疫すると、それに対する Th1 応答や細胞傷害性 T 細胞の生成を著明に亢進する ヘルパー活性を示す。Lnk アダプターファミリー 分子 (Lnk, APS) はマスト細胞の増殖や脱顆粒の

制御に 関与する。

F. 健康危険情報

特記事項はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takaki, S., H. Morita, Y. Tezuka, and K. **Takatsu**. Enhanced hematopoiesis by hematopoietic stem cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J Exp Med* 195: 151-60, 2002.
2. Ohtsuka, S., S. Takaki, M. Iseki, N. Nakagata, Y. Kataoka, N. Yoshida, K. **Takatsu**, and A. Yoshimura. SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol Cell Biol* 22: 3066-77, 2002.
3. Saito, H., K. Matsumoto, A. E Denburg, L. Crawford, R. Ellis, M. D. Inman, R. Sehmi, K. **Takatsu**, K. I Matthaei, B. Band, and J. A. Denburg. Pathogenesis of murine experimental allergic rhinitis: A study of local and systemic consequences of IL-5 deficiency. *J Immunol* 168: 3017-23, 2002.
4. Kaku, H., K. Horikawa, Y. Obata, I. Kato, H. Okamoto, N. Sakaguchi, S. Gerondakis, and K. **Takatsu**. Nuclear factor κ B is required for CD38-mediated induction of the germline transcripts of C γ 1 in murine B lymphocyte. *Int Immunol* 14:1055-1064, 2002.

5. Takaki, S., Y. Tezuka, K. Sauer, C. Kubo, S-M. kwon, E. Armstead, RM. Perlmutter, and **K. Takatsu**. Impaired expansion of lymphoid precursors and altered distribution of peripheral B cell subpopulations. *J Immunol* 170: 703-710, 2003.
6. Suzuki, H., S. Matsuda, Y. Terauchi, M. Fujiwara, T. Ohteki, T. Asano, T. W. Behrens, T. Kouro, **K. Takatsu**, T. Kadowaki, and S. Koyasu. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat Immunol* (in press), 2003.
7. **Takatsu, K.**, and A. Kariyone. Immunogenic peptide for the Th1 development. *Int Immunopharmacol* (in press), 2003.
2. 学会発表
 1. 高津聖志 : IL-5 による B 細胞分化制御、特定研究「免疫シグナル」公開シンポジウム、2002, 2, 東京
 2. 高津聖志、山本一彦 : 炎症・免疫とその制御、第 2 3 回日本炎症・再生医学会、2002, 7, 東京
 3. Tamura, T., A. Kariyone, and **K. Takatsu**.: The Immunogenic peptide derived from the secreted *Mycobacterium tuberculosis* γ Antigen for Th1 development, US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM, Thirty-seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2002, 8, Kyoto.
4. 田村敏生、高津聖志 : 結核菌由来ペプチドの選択的 Th1 活性化による抗腫瘍免疫増強、第 6 1 回日本癌学会総会、2002, 10, 東京
5. **Takatsu, K.**: Immunogenic peptide of *Mycobacterium tuberculosis* for the Th1 development, 第 7 回長崎-シンガポール大学シンポジウム "Medical Sciences - Infectious Diseases and Host Immune Responses", 2002, 10, 長崎
6. 高津聖志 : 免疫現象と創薬-ゲノム創薬に向けて、第 4 回富山県薬学会、2002, 11, 富山
7. 文 炳坤、高木 智、高津聖志 : B-1 細胞の活性化における IL-5/IL-5R 系の機能、第 3 2 回日本免疫学会学術集会、2002, 12, 横浜
8. 上原秀一郎、田村敏生、刈米アイ、高津聖志 : 結核菌由来 Th1 ペプチドによる抗原特異的細胞傷害性 T 細胞生成の増強、第 3 2 回日本免疫学会学術集会、2002, 12, 横浜
9. **Takatsu K**, Kariyone A, Uehara SI, Ariga H, and Tamura T.: Th1 peptide: its immunogenicity and adjuvant activity, The 42nd Mid-Winter Conference 2003, 1, Asilomar, CA.

環境ストレス応答分子反応型腸管T細胞のアレルギーへの関与解明に向けての基礎研究

分担研究者 高橋 一郎 広島大学大学院教授

研究要旨 環境ストレス応答性ないし適応性 IEL サブセットは腸内環境ストレスをすみやかに感知し、腸管粘膜バリアの免疫学的な恒常性の維持に寄与していること、たとえば食物アレルギーや炎症性腸疾患の発症制御に寄与している可能性が明らかになった。

A. 研究目的

腸管粘膜には上皮細胞間リンパ球 (IELs) とよばれる T 細胞が上皮細胞 6 個に 1 個の割合で存在するが、その多くは胸腺外分化の T 細胞である。これら IELs の発達分化を制御する生理的リガンドは不明のままである。最近ヒト $\gamma\delta$ IELs はストレスによって誘導される MICA を認識すること、また $\gamma\delta$ T 細胞に発現する NKG2D が MICA レセプターであることが明らかにされた。さらに Rae-1 と HSP60 が NKG2D リガンドとして機能している可能性が示された。こうした背景をふまえて分担研究者は IELs は、MICA のようなストレスによって誘導されるリガンドを発達分化に要求するものと考えた。本研究では IELs の発達機構を明らかにする目的で腸管上皮での NKG2D リガンドの同定を試みる。さらに MICA を腸管に局所発現させた遺伝子改変マウスを作製し、胸腺外分化 IEL の発達分化機構について解明する。

B. 研究方法

(1) マウス腸管上皮細胞での NKG2D リガンド

の同定を試みる目的で NKG2D テトラマーを作製し、免疫組織化学的にリガンドの解析を試みた。(2) thymic leukemia antigen に由来する T3b プロモーターを使った腸管局所発現性 MICA トランスジェニック (Tg) マウスを作製した。(3) 作製した MICA Tg マウスの IELs を FACS 法で、クロノタイプについては PCR-SSCP 法で検討した。

C. 研究結果

(1) マウス小腸遠位部および大腸近位部粘膜の陰窩部上皮に NKG2D テトラマーと反応するリガンドが存在することが明らかになった。また Rae-1 ・ anti-sense RNA を用いて In situ hybridization 法にてその局在を検討したところ、小腸遠位と大腸近位の陰窩部粘膜に Rae-1 ・ mRNA の発現がみられた。(2) 今回新規に作製した MICA-Tg マウスでは小腸 IELs において CD4⁺CD8⁺ $\alpha\alpha^+\alpha\beta$ T 細胞の発達が亢進していた。この CD4CD8 $\alpha\alpha^+\alpha\beta$ IELs は CD44, CD45RB, CD69 などの活性化マーカーが陽性であった。また TCR 発現様式とクロノタイプを解析すると、クローナル

な増殖分化をうかがわせる TCR レパトア (すなわち V β 8.2-J β 2.7) を示すことが明らかになった。

D. 考察

NKG2D テトラマーと Rae-1 · anti-sense RNA を用いて In situ hybridization 法を駆使した実験の所見より IEL の発達を促すリガンドのひとつとして Rae-1 β などの NKG2D リガンドの関与が示唆された。また、MICA-Tg マウスの解析から IELs は MICA 特異的に誘導される環境ストレス適応性の胸腺外分化 T 細胞である可能性が示唆された。

E. 結論

小腸 IELs の主要なサブセットである CD4⁺ CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ $\alpha\beta$ IELs は、MICA をはじめとするストレス誘導性リガンドの認識を介して発達分化することが明らかになった。このことから同 IEL サブセットは腸管粘膜バリアの免疫学的な恒常性の維持に寄与していること、たとえば食物アレルギーや炎症性腸疾患の発症制御に寄与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. De Winter, H., D. Elewaut, O. Turovskaya, M. Huflejt, C. Shimeld, A. Hagenbaugh, S. Binder, I. Takahashi, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 122: 1829-1841, 2002.

2. Okuda, Y., I. Takahashi, J. Kim, N. Ohta, K. Iwatani, H. Iijima, Y. Kai, H. Tamagawa, T. Hiroi, S. Kawano, Y. Sasaki, M. Hori, K. Takeda, S. Akira, and H. Kiyono. Development of colitis in STAT6-deficient TCR alpha chain deficient mice: A potential role of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4⁺ $\beta\beta$ ⁺ T cells. *Am J Pathol* 162: 263-271, 2003.

2. 学会発表

1. 11th International congress of mucosal immunology. June 16-20, 2002, Orland, USA: Intestinal Rae1 and MICA as molecular machinery for the development of extrathymic IELs.
2. 50th Annual Meeting Japanese Association for Dental Research, 古賀敏比古メモリアルシンポジウム、粘膜免疫システムの特徴と重要性、高橋一郎、November 30, 2002, Sendai, Japan.
3. 第32回日本免疫学会総会、Clonal expansion of extrathymic double-positive IELs by the expression of MICA in mouse small intestine. E.J. Park, I. Takahashi, et al. December 4, 2002, Tokyo, Japan.
4. 第32回日本免疫学会総会、Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches; preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. H. Tamagawa, I. Takahashi, et al. December 4, 2002, Tokyo, Japan.
5. 第32回日本免疫学会総会、Elucidation of