

20020815

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

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渡 辺 守

平成15 (2003) 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に関する研究 ...	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- に関する研究	11
渡辺 守	
2. 腸管粘膜免疫の新しい機構とアレルギーに関する研究	15
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に関する研究	18
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 に関する研究	21
日比紀文	
III. 研究成果の刊行および学会発表に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

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
新しい抑制戦略に関する研究」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に関する研究

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。本研究の結果、腸内細菌・ペプチドによる腸管粘膜免疫応答機構、特殊な腸管粘膜免疫組織の存在とこれらによる粘膜免疫制御機構を明らかにし、これらが各々さまざまな腸疾患の病態形成に直結するものであることを明確にした。また、粘膜免疫応答における Th1/Th2 バランスの人為的制御が可能であること、および個々の食物/腸内細菌抗原・ペプチドに対応する生体側受容体の単離が可能であることを明らかにし、腸管粘膜免疫組織の特殊性理解に立脚した上で食餌性および腸内細菌性抗原に対する生体受容体を単離し、これらを人為的免疫反応誘導に応用するための技術基盤を確立した。これら成果は、多面的に展開されるアレルギー疾患制御戦略のなかにおいて、腸管免疫機構の特殊性を最大限に利用したきわめて独創的なアプローチを創出するものと考えられた。

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

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変え、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「ミラクルピース」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することを試みた。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、その中心的役割を担う MyD88 分子と粘膜免疫制御の関連につき解析した。また、IL-7/IL-7 レセプターを介した免疫調節機構と TLR シグナルとの関連性を解析し、さらにこれらが腸管免疫異常に及ぼす影響を解析した。

2) 分担研究者石川は GALT、すなわちクリプトパッチ、パイエル板、腸管上皮内リンパ球 (IEL) 等の機能と腸管機能の相互作用を明らかにするた

めに、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。また、パイエル板が移植片対宿主病に関わる可能性につき解析を行った。

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」を用いて食餌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) 主任研究者渡辺はまず、腸内細菌・ペプチドによる腸管粘膜免疫応答を解析する目的で innate immunity の制御を担う Toll-like レセプターに着目し、Toll シグナルに中心的機能を果たすアダプター分子 MyD88 と腸管粘膜制御の関連を解析した。その結果、MyD88 ノックアウトマウスにおいては、クリプトパッチ、パイエル板、腸管上皮内リンパ球 (IEL) 等粘膜関連リンパ装置の発達不全およびパイエル板、粘膜内リンパ球の機能不全が存在することを見いだした。MyD88 ノックアウトマウスはまた、DSS などある種の腸炎惹起薬剤に対しより高い感受性を示すことから、これら TLR によるシグナルが実際に腸炎発症に関わることを示した。また、MyD88 ノックアウトマウスにおける表現型が、腸内細菌による粘膜関連リンパ装置のすべての機能欠損を誘導しないことは、腸内細菌による粘膜免疫応答誘導には TLR を介さないシグナル伝達経路が存在する可能性を示唆するものでもあった。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では、腸炎発症前のクリプトパッチおよび粘膜リンパ球の過形成が明らかとなり、さらにマクロファージ・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。さらに抗 TLR4 抗体投与により IL-7 トランスジェニックマウスでの腸炎発症が

部分的に抑制されることから、IL-7 シグナルの異常を介する腸炎発症機序に、innate immunity の制御をになう TLR 分子が関わることを示された。

2) 分担研究者石川は 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のみならず、マウス小腸粘膜の腸管膜反対側に B 細胞の小集積を新たに見出し、これらが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、粘膜リンパ球が腸管上皮細胞 (IEC) に及ぼす影響を各種遺伝子操作マウスの IEC を用いて解析することにより、B 細胞を欠損する $\mu\text{m}^{-/-}$ マウスでは、正常マウスや T 細胞を欠損する $\delta\times\beta^{-/-}$ マウスと比較し有意に IEC ターンオーバーが亢進していることを見いだした。また、この $\mu\text{m}^{-/-}$ マウスにおける IEC ターンオーバーの亢進は抗生物質経口投与によって消失すること、IL-7R ノックアウトマウス、*aly/aly* マウスの IEC ターンオーバーも正常マウスより有意に速いこと、逆に TCR- $\delta^{-/-}$ マウスの IEC ターンオーバーが抑制されることを示し、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を明らかにした。さらに、移植片対宿主病 (GVHD) のモデルマウスを詳細に解析することにより、パイエル板が GVHD の発症に中心的役割を担うことを明らかにした。

3) 分担研究者半田は、食物アレルギー発症の誘因となる食餌性・腸内細菌性抗原・peptide に対する生体レセプターの単離・同定を最終目標とし、分担研究者らが開発した「ミラクルビーズ」によるアプローチを試みた。まず、本法を用いた生体受容体精製の条件設定のために、低分子化合物 FK506 を固定化したビーズを用い、実際にヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞の粗細胞質抽出液からその受容体である FKBP を選択的に、しかも効率よく精製しうることを示した。次に、NF κ B 阻害剤として知られる低分子化合物 E3330 を固定化したビーズをもちいて、Jurkat 細胞の粗核抽出液から、1回の affinity 精製により受容体を単離した。これにより受容体 Ref-1 蛋白を明らかにしたことは、この薬剤作用機構を分子レベルで明らかにしたと同時に、本法が、夾雑物の混入する細胞粗抽出液から極微量の標的受容体分子を活性を維持したまま検出しうることを示すものであった。さらに最終年度においては、大腸菌毒素に対する生体受容体の単離を行い、低分子化合物に比較し、より stringent な固定化条件、結合反応、および洗浄条件が必要とされるなどの知見を得ると同時に、実際に複数の生体受容体を単離した。

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 OVA を頻回に経口投与することにより、強い Th2 型免疫反応の誘導とともにアレルギー性大腸炎の発症が誘導されることを明らかにした。本モデルを、Th1 型免疫反応が深く関わる CD4+CD45RBhigh リンパ球移入慢性大腸炎発症モデルに適用したところ、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が示された。また、腸炎における Th1/Th2 バランスの解析の過程で、Th2 型免疫反応制御分子として知られる ICOS 分子が、Th1 型免疫反応が主体をなすクローン病の炎症粘膜において強く発現し疾患活動度と相関することを見いだした。さらに、抗 ICOS 抗体投与により CD4+CD45RBhigh リンパ球移入による慢性大腸炎発症を有意に抑制することから、ICOS 分子が実際に腸炎に関わる可能性を提示した。

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 TLR-MyD88 依存性および非依存性両者の経路の存在が必要であることが示唆された。TLR、MyD88 以外の経路の関与については、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。また本研究では、われわれがこれまで示してきた腸管粘膜免疫制御の中心的役割をなす IL-7 分子が、TLR を介する生体応答に関わることを明らかにした。本研究で、腸管粘膜における腸内細菌による生体免疫応答制御機構、およびその異常による慢性腸管炎症の発症機構が一部明らかとなったことは、腸管組織に特殊な免疫統御分子機構解明に重要な知見を与えるものであり、今後これら特殊性を利用した新規アレルギー抑制戦略の開発にきわめて有用であると考えられる。

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 であることが確認された。また、腸管粘膜 B 細胞を中心とした免疫担当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明らかとなった。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、腸管粘膜内 T/B 細胞の機能を介して腸管上皮細胞ターンオーバーの統御を担うという、食物質/腸内フローラ/免疫システムによる腸管上皮機能制御という新たな視点を創出した。また、GVHD モデル解析の結果は、食物質/腸内フローラの抗原刺激を絶えず受けるパイエル板機能が、実際のヒト疾患発症機構と関

わる可能性を強く提示するものであると考えられた。

3) 分担研究者半田は、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ことを目的とし、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」を用いた検討を行った。低分子化合物を用いた詳細な検討の結果、ビーズへの標的分子固定化に関する重要な基礎的知見を得た。これらを利用し、次に大腸菌毒素を標的とした生体受容体単離を試み、さらに分子固定化のスペーサー構造、標的分子の固定化量や固定化反応条件、および粗抽出液とビーズとの結合反応条件、洗浄条件などにつき詳細に解析をおこなった。これら解析から得られた知見は、本法が、食餌性・腸内細菌性抗原受容体の今後の実際の探索にも十分応用可能な、きわめて強力かつ有効な手法であることを示すものと考えられた。

4) 分担研究者日比は、食物アレルギーにより Th2 型免疫反応を誘導することにより Th1/Th2 型免疫反応のバランスを人為的に制御し、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。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 型免疫反応を強く誘導することが有効であるとの本研究結果は、きわめて独創的な成果である。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り構成され、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で成人のアレルギー疾患に対する新規治療法開発を目指すという研究であった。本研究期間において、腸内細

菌・ペプチドによる腸管粘膜免疫応答機構、特殊な腸管粘膜免疫組織の存在とこれらによる粘膜免疫制御機構、粘膜免疫応答における人為的 Th1/Th2 バランス制御の実用性を示すことが可能であったと同時に、これら解析結果が各々種々の腸疾患の病態形成に直結する機構であることを明確にした。また本研究で個々の食物/腸内細菌抗原・ペプチドに対応する生体側受容体単離のための基礎知見が集積されたことは、腸管粘膜免疫組織の特殊性理解に立脚した上での食餌性および腸内細菌性抗原に対する受容体単離と、これらを用いた免疫反応誘導に応用するための技術基盤が確立したことを意味する。本研究結果は、したがって、多面的に展開されるアレルギー疾患制圧戦略のなかにおいても、腸管免疫機構の特殊性を最大限に利用した、きわめて独創的なアプローチを創出するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(渡辺)

- 1) Kobayashi K, Ogata H, Morikawa M, Iijima S, Harada N, Yoshida T, Brown WR, Inoue N, Hamada Y, Ishii H, Watanabe M, Hibi T : Distribution and partial characterisation of IgG Fc binding protein in various mucin producing cells and body fluids. *Gut* 51 : 169-176, 2002
 - 2) Sasazuki T, Sawada T, Sakon S, Kitamura T, Kishi T, Okazaki T, Katano M, Tanaka M, Watanabe M, Yagita H, Okamura K, Nakano H : Identification of a Novel Transcriptional activator, BSAC, by a Functional Cloning to Inhibit Tumor Necrosis Factor-induced Cell Death. *J Biol Chem* 277 : 28853-28860, 2002
 - 3) Kanai T, Iiyama R, Ishikura T, Uraushihara K, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Watanabe M : Role of the innate immune system in the development of chronic colitis. *J Gastroenterol* 37 : 38-42, 2002
 - 4) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M : Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nature Med* 8 : 1011-1017, 2002
 - 5) Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Okamoto R, Hibi T, Tezuka K, Azuma M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M : Ameliorating Effect of Anti-Inducible Costimulator Monoclonal Antibody in a Murine Model of Chronic Colitis. *Gastroenterology* 124 : 410-421, 2002
- (石川)
- 1) Onai N, Kitabatake M, Zang Y-U, Ishikawa H, Ishikawa S, Matsushima K : Pivotal role of CCL25 (TECK)/CCR9 in the formation of gut crypto-patches and consequent appearance of intestinal intraepithelial T lymphocytes. *Int Immunol* 14 : 687-694, 2002
 - 2) Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, Hamada H, Asakura H, Ishikawa H, Matsushima K : Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nature Immunol* 4 : 154-160, 2003
 - 3) 南野昌信, 石川博通 : 腸管上皮細胞間T細胞の発達分化. *アレルギー・免疫* 9 (7) : 74 (810)-76 (812), 2002
 - 4) 南野昌信, 小内伸幸, 石川博通 : 腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) の腸管粘膜における生理的機能と発達分化. *蛋白質 核酸 酵素* (12月号増刊 免疫研究の最前線) 47 (16) : 2318-2324, 2002
 - 5) 南野昌信, 石川博通 : 胸腺外T細胞の発達・分化. *標準免疫学* 第2版, 172-180, 医学書院, 2002
- (半田)
- 1) Yamaguchi Y, Inukai N, Narita T, Wada T, Handa H : Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA. *Mol Cell Biol* 22 : 2918-2927, 2002
 - 2) Hiramoto M, Shimizu N, Nishi T, Shima D, Aizawa S, Tanaka H, Hatakeyama M, Kawaguchi H, Handa H : High-performance affinity beads for identifying anti-NF- κ B drug receptors. *Methods Enzymol* 353 : 81-88, 2002
 - 3) Nishimura K, Hasegawa M, Ogura Y, Nishi T, Kataoka K, Handa H, Abe M : 4°C preparation of ferrite nanoparticles having protein molecules immobilized on their surfaces. *J Appl Phys* 91 : 8555-8556, 2002
 - 4) Tomohiro T, Sawada J, Sawa C, Nakura H, Yoshida S, Kodaka M, Hatakeyama M,

Kawaguchi H, Handa H, Okuno H: Total analysis and purification of cellular proteins binding to cisplatin-damaged DNA using submicron beads. *Bioconjug Chem* 13 : 163-166, 2002

- 5) Kataoka K, Han S-I, Shioda S, Hirai M, Nishizawa M, Handa H : MafA is a glucose- regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* 277 : 49903-49910, 2002

〈日比〉

- 1) Naganuma M, Hibi T : Do immuno-suppressants really work as maintenance of therapy after the achievement of remission of severe ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 37 : 315-317, 2002
- 2) Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Nunez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T and Hibi T : Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 123 : 86-91, 2002
- 3) Naganuma M, Watanabe M, Kanai T, Iwao Y, Mukai M, Ishii H, Hibi T : Characterization of structures with T-Lymphocyte aggregates in ileal villi of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 97 : 1741-1747, 2002
- 4) Hibi T, Ogata H, Sakuraba A : Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 37 : 409-417, 2002
- 5) Okazawa A, Kanai T, Watanabe M, Yamazaki M, Inoue N, Ikeda M, Kurimoto M, Ishii H, Hibi T : Th1-mediated intestinal inflammation in Crohn's disease may be induced by activation of lamina propria lymphocytes through synergistic stimulation of interleukin-12 and interleukin-18 without T cell receptor engagement. *Am J Gastroenterol* 97:3108-3117, 2002

2. 学会発表

〈渡辺〉

- 1) Kanai T, Totsuka T, Iiyama R, Yamazaki M, Uraushihara K, Nomura T, Tezuka K, Yagita H, Watanabe M : Ameliorating Effect of Anti-ICOS Monoclonal Antibody in a Murine Model of Chronic Colitis. *DDW 2002*, San Francisco, California, USA, 2002.5.19
- 2) Ogata H, Kishi Y, Watanabe M, Kanai T, Ishii H, Iwao Y, Inoue N, Hitotsumatsu O, Hibi T : The Role of Epithelial Cells in Inflammatory

Process of Ulcerative Colitis : Ubiquitin-Proteasome System and IκB Degeneration. *DDW 2002*, San Francisco, California, USA, 2002.5.19

- 3) Matsuoka M, Inoue N, Sato T, Sakuraba A, Naganuma M, Ogata H, Iwao Y, Koganei K, Fukushima T, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T : T-bet Is Indispensable for Intestinal Inflammation Crohn's Disease. *DDW 2002*, San Francisco, California, USA, 2002.5.20
- 4) Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Yagita H, Watanabe M : Chronic Murine Colitis is Dependent on the OX40/OX40L Pathway and Can Be Attenuated by Anti-OX40L. *DDW 2002*, San Francisco, California, USA, 2002.5.20
- 5) Iiyama R, Kanai T, Totsuka T, Yamazaki M, Uraushihara K, Makita S, Ishikura T, Takeda K, Shizuo A, Watanabe M : Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Development of Mouse Gut-Associated Lymphoid Tissue. *DDW 2002*, San Francisco, California, USA, 2002.5.21
- 6) Yamazaki M, Okada E, Matsumoto T, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Tanabe M, Takeuchi T, Watanabe M : Transfer of Highly Interleukin-7 Receptor Expressing Mucosal T Cells into Immunodeficient Mice Induced Chronic Severe Colitis. *DDW 2002*, San Francisco, California, USA, 2002.5.22
- 7) Yamazaki M, Okada E, Matsumoto T, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Tanabe M, Takeuchi T, Ishikawa H, Watanabe M : Transfer of highly interleukin-7 receptor expressing mucosal T cells into immunodeficient mice induced chronic severe colitis. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.17
- 8) Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Yamazaki M, Iiyama R, Tezuka K, Hibi T, Yagita H, Watanabe M : Ameliorating effect of anti-ICOS MAb in a murine model of chronic colitis. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.18
- 9) Watanabe M, Yamazaki M, Ohshima S, Namiki S, Nakamura T, Kanai T, Ishikawa H, Yajima T, Hibi T : Mucosal IL-1/IL-7 receptor dependent signals in the development of chronic intestinal

- inflammation; therapeutic approaches by specific targeting of highly IL-7 receptor expressing mucosal lymphocytes. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.20
- 10) Watanabe M : Mucosal IL-7/IL-7 receptor dependent signals in the development of chronic intestinal inflammation. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, 2002.8.25
 - 11) Watanabe M : Epithelial regeneration by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. Colloquium for the Study of Gastrointestinal Defense System, Osaka, 2003.1.11
 - 12) 飯山稜一, 金井隆典, 石倉隆宏, 蒔田 新, 戸塚輝治, 山崎元美, 竹田 潔, 審良静男, 渡辺 守 : パイエル板の形成に対する MyD88 分子を介する TLR シグナルの役割. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.25
 - 13) 蒔田 新, 金井隆典, 松本 敏, 飯山稜一, 石倉隆宏, 野村哲也, 山崎元美, 石川博通, 渡辺 守 : SAMPI/Yit マウスにおける小腸炎と Cryptopatch との関連性. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.25
 - 14) 岡本隆一, 矢島知治, 渡辺 守 : ヒト骨髄由来細胞による腸管上皮の再生. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
 - 15) 石倉隆宏, 金井隆典, 浦牛原幸治, 戸塚輝治, 蒔田 新, 山崎元美, 竹田 潔, 審良静男, 渡辺 守 : マウス DSS 腸炎における自然免疫系の関与—MyD88 欠損マウスを用いて—. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
 - 16) 浦牛原幸治, 金井隆典, 戸塚輝治, 山崎元美, 竹田 潔, 審良静男, 日比紀文, 渡辺 守 : マウスクローン病モデルにおける T 細胞内 IL-18・MyD88 シグナルの関与. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
 - 17) 戸塚輝治, 金井隆典, 飯山稜一, 山崎元美, 手塚克也, 八木田秀雄, 佐藤俊朗, 日比紀文, 渡辺 守 : ICOS 分子を標的とした慢性大腸炎治療. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
 - 18) 檀 直彰, 金井隆典, 戸塚輝治, 浦牛原幸治, 山崎元美, 飯山稜一, 八木田秀雄, 渡辺 守 : マウス慢性大腸炎モデルにおける Fas/FasL 分子の関与と治療戦略. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
 - 19) 松本智子, 山崎元美, 岡田英理子, 岡本隆一, 戸塚輝治, 浦牛原幸治, 中村哲也, 金井隆典, 矢島知治, 日比紀文, 田邊将信, 竹内 勤, 渡辺 守 : 慢性大腸炎発症における腸管粘膜浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞の役割. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
 - 20) 澤田泰輔, 渡辺 守 : E-セ렉チンの大腸癌細胞接着による血管内皮細胞の剥離現象抑制—E-セ렉チンシグナル伝達抑制による血行性転移予防の可能性—. 第 44 回日本消化器病学会, 横浜, 2002.10.24
 - 21) 岡本隆一, 矢島知治, 渡辺 守 : 骨髄由来細胞による腸管上皮の再生機構. 第 44 回日本消化器病学会, 横浜, 2002.10.25
 - 22) 戸塚輝治, 金井隆典, 飯山稜一, 浦牛原幸治, 八木田秀雄, 渡辺 守 : マウス慢性大腸炎モデルにおける、抗 TNF 抗体と抗 OX40L 抗体によるコンビネーション治療の可能性. 第 44 回日本消化器病学会, 横浜, 2002.10.25
 - 23) 大島 茂, 中村哲也, 金井隆典, 渡辺 守 : 腸管上皮細胞における IL-7 産生機構の解析. 第 32 回日本免疫学会, 東京, 2002.12.4
 - 24) 中村哲也, 渡辺 守, 渡辺すみ子, 北村俊雄, 森本幾夫, 田中廣壽 : common β subunit による転写因子 NF- κ B 活性化機構. 第 32 回日本免疫学会, 東京, 2002.12.5
- (石川)
- 1) 石川博通 : <特別講演>腸管免疫防御の特殊性. 第 75 回日本細菌学会総会, 横浜, 2002.4.4-6.
 - 2) 石川博通 : <特別講演>腸管粘膜生体防御の特殊性. 第 6 回腸内細菌学会, 東京, 2002.5.30-31.
 - 3) 石川博通 : <ランチョンセミナー>腸管粘膜防御の特殊性 (上皮内 T 細胞を中心として). 第 23 回癌免疫外科研究会, 東京, 2002.6.7-8.
 - 4) Ishikawa H, Nishiyama Y, Nonaka S, Hamada H : <Symposium: Extrathymic T cell development in mucosal tissue> Extra-thymic development of precursor intra-epithelial T cells in the mouse gut cryptopatches. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.16-20.
 - 5) Hamada H, Nishiyama Y, Nonaka S, Ishikawa H : <Symposium: Mucosal B cell development and function> Multiple isolated lymphofollicles are aligned at roughly regular intervals along the antimesenteric wall of the mouse small intestine. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.16-20.

- logy, Orlando, Florida, USA, 2002.6.16-20.
- 6) Murai M, Matsushima K, Ishikawa H : The subepithelial dome of gut mucosa as an initial site for the generation of donor-derived allo-specific cytotoxic T cells in graft-versus-host disease. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.16-20.
 - 7) Nishiyama Y, Hamada H, Katayama Y, Takahashi H, Ishikawa H : B cell-mediated downregulation of intestinal epithelial cell turnover by controlling the activity of enteric microorganisms. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.16-20.
 - 8) Nishiyama Y, Hamada H, Nonaka S, Ishikawa H : Homeostatic regulation of intestinal villous epithelia by B lymphocytes: The obvious implication of enteric micro-organisms in the regulation. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Hyogo, Japan, 2002.8.24-27.
 - 9) 石川博通 : <シンポジウム> 粘膜免疫防御システムの特殊性 : 腸管粘膜を中心として. 第 44 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 東京, 2002.10.3-5.
 - 10) 石川博通 : <特別講演> 粘膜免疫防御の特殊性について—腸管粘膜を中心として. 第 133 回薬学月例セミナー, 静岡, 2002.10.21.
 - 11) 野中聡史, 白木文子, 栗原さやか, 保坂奈美, 浜田裕公, 南野昌信, 石川博通 : 免疫担当細胞 / 腸内フローラによる上皮細胞の恒常性統御. 第 85 回日本細菌学会関東支部総会, 東京, 2002.11.21-22.
 - 12) Ishikawa H : <Symposium : Mucosal immunity > Identification and characterization of gut cryptopatches and isolated lymphoid follicles in the lamina propria of mouse small intestine. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2002.12.4-6.
 - 13) 白木文子, 野中聡史, 栗原さやか, 保坂奈美, 浜田裕公, 南野昌信, 石川博通 : MyD88 KO マウスの腸管粘膜免疫組織の解析. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2002.12.4-6.
 - 14) 浜田裕公, 白木文子, 栗原さやか, 保坂奈美, 野中聡史, 西山康裕, 石川博通 : B 細胞による腸管上皮細胞の再生・発達分化の統御 : 腸内フローラの関与. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2002.12.4-6.
 - 15) 野中聡史, 白木文子, 栗原さやか, 保坂奈美, 西山康裕, 浜田裕公, 石川博通 : $\gamma\delta$ 型上皮細胞間 T 細胞 ($\gamma\delta$ -IEL) による腸管上皮細胞の機能統御. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2002.12.4-6.
 - 16) Shikina T, Horoi T, Iwatani K, Hamada H, Ishikawa H, Kiyono H : Comparison of IgA isotype class switching between the respiratory and intestinal tracts. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2002.12.4-6.
 - 17) Murai M, Yoneyama H, Ishikawa H, Matsushima K : The subepithelial dome of gut mucosa as an initial site for the generation of donor-derived allo-specific cytotoxic T cells in graft-versus-host disease. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2002.12.4-6.
- (半田)
- 1) 山口雄輝, 成田 央, 和田忠士, 半田 宏 : RNA ポリメラーゼ II の転写伸長反応を制御する細胞性因子とウイルス性因子. 第 75 回日本生化学会, 京都, 2002.10.15
 - 2) 片岡浩介, 韓松伊, 西澤 誠, 半田 宏 : bZip 転写因子 MafA はグルコース濃度依存的/ β 細胞特異的なインスリン発現制御因子である. 第 75 回日本生化学会, 京都, 2002.10.16
 - 3) 和田忠士, 長谷川純, 遠藤正紀, 岡部幸子, 山口雄輝, Reinberg Danny, 半田 宏 : クロマチン環境下での転写伸長反応. 第 75 回日本生化学会, 京都, 2002.10.16
 - 4) 長谷川純, 犬飼直人, 遠藤正紀, 山口雄輝, 和田忠士, 半田 宏 : 転写伸長段階の分子制御メカニズム. 第 75 回日本生化学会, 京都, 2002.10.17
 - 5) 和田忠士, 長谷川純, 遠藤正紀, 岡部幸子, 山口雄輝, Danny Reinberg, 半田 宏 : クロマチンと転写伸長反応. 日本分子生物学会・25 回年会, 横浜, 2002.12.11
 - 6) 中太智義, 嶋田美穂, 田中祐司, 嶋 大輔, 半田 宏, 田村隆明 : TLP-TFIIA 結合の反応速度論的解析と TFIIA 結合による TLP の生化学的性質・局在への影響. 日本分子生物学会・25 回年会, 横浜, 2002.12.11
 - 7) 阿川泰夫, 広瀬 進, 半田 宏, 和田忠士, 篠原あづさ, 岩松明彦, 上田 均 : ショウジョウバエ FTZ-F1 の転写調節領域に作用する因子 Factor I-4 の解析. 日本分子生物学会・25 回年会, 横浜, 2002.12.11

- 8) 倉岡 功, 遠藤正紀, 山口雄輝, 和田忠士, 半田 宏, 田中亀代次: ヒト RNA ポリメラーゼ II の転写伸長における内在性 DNA 損傷の影響. 日本分子生物学会・25 回年会, 横浜, 2002.12.13
- 9) 田所恵子, 東 範行, 山口雄輝, 半田 宏, 山田正夫: PAX family 遺伝子の転写調節相互作用. 日本分子生物学会・25 回年会, 横浜, 2002.12.13
- 10) 坂東優篤, 長谷川慎, 坪井靖典, 三宅靖延, 椎名雅史, 伊東美佳, 半田 宏, 永井和夫, 片岡孝夫: ペニシリン酸は Fas リガンドによるカスパーゼ8の自己限定分解を阻害する. 日本分子生物学会・25回年会, 横浜, 2002.12.13
- 11) 大羽玲子, 大津嘉弘, 小林幹央, 羽鳥英孝, 半田 宏: ラテックス微粒子を用いた結合タンパク探索系: レセプター固定化担体を用いたレセプター/リガンド複合体結合タンパクの特異的検出. 日本分子生物学会・25 回年会, 横浜, 2002.12.13
- (日比)
- 1) 井上 詠, 小池祐司, 日比紀文: 日本人 Crohn 病患者における NOD2 遺伝子多型の解析. 第88 回日本消化器病学会総会, 旭川, 2002.4.24
- 2) 一松 収, 井上 詠, 小池祐司, 新井 潤, 船越信介, 岸 祐介, 西谷大輔, 緒方晴彦, 岩男 泰, 石井裕正, 日比紀文: Crohn病における樹状細胞の性状および機能検討. 第88回日本消化器病学会総会, 旭川, 2002.4.24
- 3) 松岡克善, 井上 詠, 佐藤俊朗, 桜庭 篤, 芳沢茂雄, 高木英恵, 江崎俊彦, 長沼 誠, 緒方晴彦, 岩男 泰, 小金井隆一, 福島恒男, 金井隆典, 渡辺 守, 石井裕正, 日比紀文: Th1特異的転写因子T-betの小ローン病の病態への関与.第88回日本消化器病学会総会, 旭川, 2002.4.24
- 4) 戸塚輝治, 金井隆典, 飯山稜一, 山崎元美, 手塚克成, 八木田秀雄, 佐藤俊朗, 日比紀文, 渡辺 守: ICOS分子を標的とした慢性大腸炎治療.第88回日本消化器病学会総会, 旭川, 2002.4.24
- 5) 新井 潤, 緒方晴彦, 原 歩, 吉岡政洋, 井上 詠, 小池祐司, 一松 収, 松岡克善, 佐藤俊朗, 岩男 泰, 石井裕正, 日比紀文: 再発性アフタ性口内炎におけるマレイン酸イルソグラジンの有効性と治癒機転の内視鏡的観察. 第88回日本消化器病学会総会, 旭川, 2002.4.24
- 6) 緒方晴彦, 井上 詠, 岸 祐介, 岩男 泰, 一松 収, 石井裕正, 金井隆典, 渡辺 守, 日比紀文: 潰瘍性大腸炎の炎症粘膜におけるubiquitin-proteasome系と I k Bの病態への関与.第88回日本消化器病学会総会, 旭川, 2002.4.24
- 7) Hibi T: Genetic alterations in ulcerative colitis-associated colorectal. 26th International Congress of Internal Medicine, 京都, 2002.5.29
- 8) 長沼 誠, 船越信介, 緒方晴彦, 岩男 泰, 石井裕正, 日比紀文: ステロイド抵抗・依存性潰瘍性大腸炎に対する顆粒球除去療法 (GCAP) の有用性. 第74回日本消化器内視鏡学会関東地方会, 宇都宮, 2002.6.7
- 9) 緒方晴彦, 井上 詠, 岸 祐介, 一松 収, 新井 潤, 小池祐司, 岩男 泰, 石井裕正, 金井隆典, 渡辺 守, 日比紀文: 潰瘍性大腸炎の炎症粘膜上皮におけるNF- κ B活性化機構の解析. 第44回日本消化器病学会, 横浜, 2002.10.25
- 10) 桜庭 篤, 佐藤俊朗, 岸 祐介, 一松 収, 芳沢茂雄, 井上 詠, 小金井一隆, 福島恒男, 石井裕正, 日比紀文: 炎症性腸疾患における腸間膜リンパ節樹状細胞の解析. 第44回日本消化器病学会, 横浜, 2002.10.25
- 11) 今枝博之, 熊井浩一郎, 緒方晴彦, 相浦浩一, 長沼 誠, 鈴木秀和, 岩男 泰, 日比紀文, 石井裕正: 早期胃癌EMRの工夫. 第75回日本消化器内視鏡学会関東地方会, 横浜, 2002.12.6
- 12) 岩瀬恭子, 早川恵子, 矢島知治, 常松 令, 芹澤 宏, 渡辺憲明, 熊谷直樹, 土本寛二, 日比紀文, 石井裕正: エタノール散布療法にて軽快した術後再発ステロイド. 第75 回日本消化器内視鏡学会関東地方会, 横浜, 2002.12.6
- 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

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— に関する研究

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。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。第1に、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換え、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

1) 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(MyD88

KO) の経時的な粘膜免疫の発達を検討した。

2) endotoxin 活性抑制を有する抗 TLR4 抗体の腸炎発症抑制効果を慢性大腸炎モデル、CD4+CD45RBhigh T 細胞移入モデルを用いて検討した。

3) 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。

4) MyD88 KO での DSS 大腸炎モデル発症感受性を正常マウスと比較検討した。

(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) MyD88 KO 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認めた。3, 10 週令いずれにおいても機能的にはパイエル板、粘膜内リンパ球の LPS, ConA 反応性の減少を認めた。

2) 中和活性を有する抗 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。

3) MyD88 KO は予想に反し、コントロールマウス

に比し、DSS 腸炎の増悪を認めた。特に、免疫細胞浸潤に比し、著しい上皮細胞傷害を認めた。さらに、MyD88 KO DSS 腸炎群では大腸組織において、MIP-2, KC, MCP-1 などケモカイン産生の減少を認めた。

4) IL-7 Tg 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 MyD88 KO マウス腸炎発症での検討では、抗 TLR4 抗体による CD4+CD45RB^{high} T 細胞移入大腸炎の部分的抑制を認めたのに対し、DSS 急性大腸炎の増悪を MyD88 KO マウスが認めたことは、粘膜免疫での自然免疫系の関与が複雑に制御されていることが示唆された。すなわち、免疫細胞浸潤が主体である慢性大腸炎では MyD88 を中心とした自然免疫系は病態形成に重要な役割を担うのに対し、急性大腸炎では主に上皮再生に MyD88 は修復に必須な機構である可能性がある。最近、KC などケモカイン分子が TLR 分子を介し産生され、組織修復に関与するとの報告があり、自然免疫系は慢性炎症のみならず、大腸炎局所における創傷治癒過程にも重要な役割を担うことが示唆された。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) Kobayashi K, Ogata H, Morikawa M, Iijima S, Harada N, Yoshida T, Brown W R, Inoue N, Hamada Y, Ishii H, Watanabe M, Hibi T : Distribution and partial characterisation of IgG Fc binding protein in various mucin producing cells and body fluids. Gut 51 : 169-176, 2002
- 2) Sasazuki T, Sawada T, Sakon S, Kitamura T, Kishi T, Okazaki T, Katano M, Tanaka M, Watanabe M, Yagita H, Okamura K, Nakano H : Identification of a Novel Transcriptional activator, BSAC, by a Functional Cloning to Inhibit Tumor Necrosis Factor-induced Cell Death. J Biol Chem 277 : 28853-28860, 2002
- 3) Kanai T, Iiyama R, Ishikura T, Uraushihara K, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Watanabe M : Role of the innate immune system in the development of chronic colitis. J Gastroenterol 37 : 38-42, 2002
- 4) Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M : Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. Nature Med 8 : 1011-1017, 2002
- 5) Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Okamoto R, Hibi T, Tezuka K, Azuma M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M : Ameliorating Effect of Anti-Inducible Costimulator Monoclonal Antibody in a Murine Model of Chronic Colitis. Gastroenterology 124 : 410-421, 2002

2. 学会発表

- 1) Kanai T, Totsuka T, Iiyama R, Yamazaki M, Uraushihara K, Nomura T, Tezuka K, Yagita H, Watanabe M : Ameliorating Effect of Anti-ICOS Monoclonal Antibody in a Murine Model of Chronic Colitis. DDW 2002, San Francisco, California, USA, 2002.5.19
- 2) Ogata H, Kishi Y, Watanabe M, Kanai T, Ishii H, Iwao Y, Inoue N, Hitotsumatsu O, Hibi T : The Role of Epithelial Cells in Inflammatory Process of Ulcerative Colitis : Ubiquitin-Proteasome System and I κ B Degeneration. DDW 2002, San Francisco, California, USA, 2002.5.19
- 3) Matsuoka M, Inoue N, Sato T, Sakuraba A, Naganuma M, Ogata H, Iwao Y, Koganei K, Fukushima T, Kanai T, Watanabe M, Ishii H, Hibi T : T-bet Is Indispensable for Intestinal Inflammation Crohn's Disease. DDW 2002, San Francisco, California, USA, 2002.5.20
- 4) Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Yagita H, Watanabe M : Chronic Murine Colitis is Dependent on the OX40/OX40L Pathway and Can Be Attenuated by Anti-OX40L. DDW 2002, San Francisco, California, USA, 2002.5.20
- 5) Iiyama R, Kanai T, Totsuka T, Yamazaki M, Uraushihara K, Makita S, Ishikura T, Takeda K, Shizuo A, Watanabe M : Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Development of Mouse Gut-Associated Lymphoid Tissue. DDW 2002, San Francisco, California, USA, 2002.5.21
- 6) Yamazaki M, Okada E, Matsumoto T, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Tanabe M, Takeuchi T, Watanabe M : Transfer of Highly Interleukin-7 Receptor Expressing Mucosal T Cells into Immunodeficient Mice Induced Chronic Severe Colitis. DDW 2002, San Francisco, California, USA, 2002.5.22
- 7) Yamazaki M, Okada E, Matsumoto T, Okamoto R, Nakamura T, Kanai T, Tanabe M, Takeuchi T, Ishikawa H, Watanabe M : Transfer of highly interleukin-7 receptor expressing mucosal T cells into immunodeficient mice induced chronic severe colitis. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.17
- 8) Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Yamazaki M, Iiyama R, Tezuka K, Hibi T, Yagita H, Watanabe M : Amelioratin effect of anti-ICOS MAb in a murine model of chronic colitis. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.18
- 9) Watanabe M, Yamazaki M, Ohshima S, Namiki S, Nakamura T, Kanai T, Ishikawa H, Yajima T, Hibi T : Mucosal IL-1/IL-7 receptor dependent signals in the development of chronic intestinal inflammation; therapeutic approaches by specific targeting of highly IL-7 receptor expressing mucosal lymphocytes. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002.6.20
- 10) Watanabe M : Mucosal IL-7/IL-7 receptor dependent signals in the development of chronic intestinal inflammation. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awajishima, 2002.8.25
- 11) Watanabe M : Epithelial regeneration by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. Colloquium for the Study of Gastrointestinal Defense System, Osaka, 2003.1.11
- 12) 飯山稜一, 金井隆典, 石倉隆宏, 蒔田 新, 戸塚輝治, 山崎元美, 竹田 潔, 審良静男, 渡辺 守 : パイエル板の形成に対する MyD88 分子を介する TLR シグナルの役割. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.25
- 13) 蒔田 新, 金井隆典, 松本 敏, 飯山稜一, 石倉隆宏, 野村哲也, 山崎元美, 石川博通, 渡辺 守 : SAMP1/Yit マウスにおける小腸炎と Cryptosporidium との関連性. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.25
- 14) 岡本隆一, 矢島知治, 渡辺 守 : ヒト骨髄由来細胞による腸管上皮の再生. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
- 15) 石倉隆宏, 金井隆典, 浦牛原幸治, 戸塚輝治, 蒔田 新, 山崎元美, 竹田 潔, 審良静男, 渡辺 守 : マウス DSS 腸炎における自然免疫系の関与 - MyD88 欠損マウスを用いて -. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
- 16) 浦牛原幸治, 金井隆典, 戸塚輝治, 山崎元美, 竹田 潔, 審良静男, 日比紀文, 渡辺 守 : マウスクローン病モデルにおける T 細胞内 IL-18・MyD88 シグナルの関与. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
- 17) 戸塚輝治, 金井隆典, 飯山稜一, 山崎元美, 手塚

- 克也, 八木田秀雄, 佐藤俊朗, 日比紀文, 渡辺 守: ICOS 分子を標的とした慢性大腸炎治療. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
- 18) 檀 直彰, 金井隆典, 戸塚輝治, 浦牛原幸治, 山崎元美, 飯山稜一, 八木田秀雄, 渡辺 守: マウス慢性大腸炎モデルにおける Fas/FasL 分子の関与と治療戦略. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
- 19) 松本智子, 山崎元美, 岡田英理子, 岡本隆一, 戸塚輝治, 浦牛原幸治, 中村哲也, 金井隆典, 矢島知治, 日比紀文, 田邊将信, 竹内 勤, 渡辺 守: 慢性大腸炎発症における腸管粘膜浸潤 IL-7 レセプター陽性細胞の役割. 第 88 回日本消化器病学会, 旭川, 2002.4.26
- 20) 澤田泰輔, 渡辺 守: E-セレクチンの大腸癌細胞接着による血管内皮細胞の剥離現象抑制 -E-セレクチンシグナル伝達抑制による血行性転移予防の可能性-. 第 44 回日本消化器病学会, 横浜, 2002.10.24
- 21) 岡本隆一, 矢島知治, 渡辺 守: 骨髄由来細胞による腸管上皮の再生機構. 第 44 回日本消化器病学会, 横浜, 2002.10.25
- 22) 戸塚輝治, 金井隆典, 飯山稜一, 浦牛原幸治, 八木田秀雄, 渡辺 守: マウス慢性大腸炎モデルにおける、抗 TNF 抗体と抗 OX40L 抗体によるコンビネーション治療の可能性. 第 44 回日本消化器病学会, 横浜, 2002.10.25
- 23) 大島 茂, 中村哲也, 金井隆典, 渡辺 守: 腸管上皮細胞における IL-7 産生機構の解析. 第 32 回日本免疫学会, 東京, 2002.12.4
- 24) 中村哲也, 渡辺 守, 渡辺すみ子, 北村俊雄, 森本幾夫, 田中廣壽: common β subunit による転写因子 NF- κ B 活性化機構. 第 32 回日本免疫学会, 東京, 2002.12.5

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

腸管粘膜免疫の新しい機構とアレルギーに関する研究

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

白血病や重度の免疫不全症などの根治療法として骨髄移植が実施されているが、非血縁者からの骨髄移植ではしばしば急性の移植片対宿主病（a-GVHD）を発症し、死を招く場合もある。この a-GVHD の発信源が生体内で最大の第二次リンパ組織である腸管粘膜のパイエル板であることを明らかにした。

A. 研究目的

a-GVHD は移植骨髄細胞中に少数存在するリンパ球が宿主の組織を攻撃する、われわれにとって不利益な免疫応答であり、広義のアレルギー反応である。腸管免疫防御機構にはその他の生体部位にみられない特殊性が備わっており、その大部分は未解明である。腸管粘膜固有層に分布する生体内で最大の第二次リンパ組織であるパイエル板は腸管腔へと流入する雑多な外来抗原に対する免疫応答が始動する解剖学的局所として良く知られている。パイエル板は特に分泌型 IgA 抗体応答の始動に重要と考えられているが、近年になって食物質由来の外来抗原に対する不必要な免疫応答を制御する場としてパイエル板が重要であることも明らかにされつつある。すなわち、常に活性化されたリンパ球が多数分布するパイエル板の生理的機能には未だ謎が数多く残されていると言えよう。a-GVHD の標的組織として粘膜、主として腸管粘膜の病変があげられる。われわれはマウス a-GVHD をモデルとして、パイエル板が a-GVHD の発症に関与する事実を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

以下の確立されたマウス a-GVHD モデルを追究した。

- 1) B6 マウス spleen cells → (B6×DBA/2) F₁ マウス
- 2) B6 マウス spleen cells → 6Gy 放射線照射 BDF₁ マウス
- 3) bm1 マウス CD8⁺ T cells → 6Gy 放射線照射 B6 マウス

1) →3) の donor 細胞は eGFP⁺であり、その緑色蛍光によって宿主内での局在を追究可能である。これらの a-GVHD 誘導によって引き起こされる宿主の肝傷害、抗宿主キラーT 細胞（CTL）の出現、宿主の a-GVHD による死亡率などを検索した。一方、パイエル板のみを欠損し、それ以外はまったく正常な宿主マウスは妊娠後期の母親にインターロイキン 7（IL-7）受容体に対するモノクローナル抗体を投与し作製した（Hamada et al. J. Immunol. 168: 57-64, 2002）。マウス使用にあたっては、本学実験動物委員会の倫理規定に従った。

C. 研究結果

- 1) Donor T細胞中の CD8⁺ T細胞がパイエル板の subepithelial dome (SED)に多数集積し、CTL へと発達分化することを確認した。
- 2) CCR5 遺伝子欠損マウスから得た donor CD8⁺ T細胞の SED への集積は阻止され、a-GVHD 発症率が著しく低下した。
- 3) 抗 MAdCAM-1 抗体投与を受けた宿主マウスでは donor CD8⁺ T細胞の SED への集積は阻止され、a-GVHD 発症率が著しく低下した。
- 4) パイエル板欠損宿主マウスでは a-GVHD 発症率が著しく低下した。

D. 結論

パイエル板が a-GVHD の発信源であることが明らかとなった。パイエル板は食物質や腸内細菌などの外来抗原にさらされ続けるリンパ組織であり、常に免疫応答が活発に働いているために、a-GVHD などのアレルギー反応が起こり易いと考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Onai N, Kitabatake M, Zang Y-U, Ishikawa H, Ishikawa S, Matsushima K: Pivotal role of CCL25 (TECK)/CCR9 in the formation of gut crypto-patches and consequent appearance of intestinal intraepithelial T lymphocytes. *Int Immunol* 14: 687-694, 2002
 - 2) Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, Hamada H, Asakura H, Ishikawa H, Matsushima K: Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nature Immunol* 4: 154-160, 2003
 - 3) 石川博通: 腸管粘膜免疫防御と $\gamma\delta$ T 細胞. サイトプロテクション—生体防御機構の源流を探る—. サイトプロテクション研究会編, 192-196, 癌と化学療法社, 2002年3月
 - 4) 南野昌信, 石川博通: 粘膜免疫学の最前線. 粘膜リンパ球の発達分化, 28-39, 医薬ジャーナル社, 2002年5月
 - 5) 南野昌信, 石川博通: 腸管上皮細胞による腸管 T 細胞発達分化の調節. *最新医学* 57 (No5): 7 (971) -12 (976), 2002年5月
 - 6) 石川博通: 粘膜免疫. *感染と抗菌薬* 5 (No2): 160, 2002年6月
 - 7) 南野昌信, 石川博通: 腸管上皮細胞間 T 細胞の発達分化. *アレルギー・免疫* 9 (No7): 74 (810) -76 (812), 2002年6月
 - 8) 千葉勉, 石川博通, 日比紀文: 最近の消化管疾患【対談】. *ヒューマンサイエンス* 13 (No5): 4-12, 2002年9月
 - 9) 南野昌信, 小内伸幸, 石川博通: 腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) の腸管粘膜における生理的機能と発達分化. *蛋白質 核酸 酵素* (12月号増刊 免疫研究の最前線) 47 (No16): 2318-2324, 2002年11月
 - 10) 上野川修一, 石川博通: 腸管免疫研究の新しい動き【対談】. *FOOD Style* 217 (No1): 53-60, 2003年1月
 - 11) 南野昌信, 石川博通: 胸腺外 T 細胞の発達・分化. *標準免疫学* 第2版, 172-180, 医学書院, 2002年12月
 - 12) 石川博通: 腸管上皮内 T 前駆細胞のクリプトパッチでの発達分化. 食品とからだ 免疫・アレルギーのしくみ, 上野川修一 編, 71, 朝倉書店, 2003年1月
2. 学会発表
- 1) 石川博通: <特別講演>腸管免疫防御の特殊性. 第75回日本細菌学会総会, 横浜, 2002年4月4日~6日
 - 2) 石川博通: <特別講演>腸管粘膜生体防御の特殊性. 第6回腸内細菌学会, 東京, 2002年5月30日~31日
 - 3) 石川博通: <ランチョンセミナー>腸管粘膜防御の特殊性 (上皮内 T 細胞を中心として). 第23回癌免疫外科研究会, 東京, 2002年6月7日~8日
 - 4) Ishikawa H, Nishiyama Y, Nonaka S, Hamada H: <Symposium; Extrathymic T cell development in mucosal tissue > Extrathymic development of precursor intraepithelial T cells in the mouse gut cryptopatches. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002年6月16日~20日
 - 5) Hamada H, Nishiyama Y, Nonaka S, Ishikawa H: <Symposium; Mucosal B cell development and function > Multiple isolated lymphofollicles are aligned at roughly regular intervals along the antimesenteric wall of the mouse small intestine. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002年6月16日~20日
 - 6) Murai M, Matsushima K, Ishikawa H: The subepithelial dome of gut mucosa as an initial site for the generation of donor-derived allo-specific cytotoxic T cells in graft-versus-host disease. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando, Florida, USA, 2002年6月16日~20日
 - 7) Nishiyama Y, Hamada H, Katayama Y, Takahashi H, Ishikawa H: B cell-mediated downregulation of intestinal epithelial cell turnover by controlling the activity of enteric microorganisms. 11th International Congress of Mucosal Immunology, Orlando,