

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成 16 年（2004 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 食物アレルギーにおける腸管粘膜免疫機構の関与に関する研究

清野 宏 7

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 11

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 15

4 上気道粘膜における好酸球浸潤とサイトカイン産生に関する研究

黒野 祐一 19

III 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV 研究成果の刊行物・別刷 27

# 総括研究報告書

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）

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  
の解明と予防への応用に向けた基礎研究」に関する研究

主任研究者氏名 清野 宏  
東京大学医科学研究所 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 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授  
異野 祐一 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究協力者 権 美那 東京大学医科学研究所 客員研究員  
(国際ワクチン研究所 部長)

研究要旨 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ネットワ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究していく目的で基礎系3名と臨床系1名による共同研究体制のもとで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・消化器粘膜免疫(NALT・GALT)を中心としたアレルギーとの関連の解明と、粘膜・皮膚・全身免疫間クロスネットワークシステムの存在についての解析を担当している。東大 高津は IL-5 ンクナル伝達による好酸球制御と IgA<sup>+</sup>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ネットワ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/NKG2D の腸管 T 細胞発達への関与を中心として研究を展開し、アレルギーを環境ストレスと考え、臓器特異性を代表とする腸管 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。鹿児島大・異野は臨床的観点からヒト NALT 免疫システムに代表される上気道粘膜免疫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、特にホーミングレセ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。

A 研究目的 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査証的な理

論構築を行う。

B 研究方法 (1) 清野班は同班が開発したアレルキー性下痢マウスモデルを駆使してその病態形成過程の解明を試みた。特に大腸に限局する異常Th2型免疫応答誘導機構について、小腸と大腸間における上皮細胞と抗原提示細胞由来 IL-12 p 40 の関与について検討を細胞 タンパク・遺伝子レベルで進めた。

(2) 高津班はアレルキーの病態を改善する新規 Th1 誘導分子としての結核菌由来 Ag85B ペプチド (または Peptide-25) の開発と粘膜系マスト細胞と好酸球の解析を進めて新しいアレルキー阻害剤開発へ向けての研究を展開した。

(3) 高橋班は環境ストレス応答性分子である非古典的 MHC 分子 MICA 遺伝子腸管特異的発現マウスの開発を進めた。さらに同モデルを駆使して MICA による腸管粘膜炎症の発症制御に関する役割についての検討を行った。

(4) 早野班は呼吸器粘膜免疫の要である NALT 免疫機構に関連する上気道粘膜における好酸球浸潤に関与するサイトカインシグナルの解析をヒト検体を駆使して検討を進めた。

C 研究結果 (1) 清野班 大腸に限局した異常 Th2 型応答の誘導メカニズムとして、上皮細胞由来 IL-12p40 の関与を強く示唆する結果を得た。つまり、大腸上皮細胞が IL-12p40 を産出し、その拮抗作用により Th1 型応答抑制状況が惹起され、その結果として強い Th2 型応答によるアレルキー性下痢が引き起こされる。

(2) 高津班 Th1 型誘導分子としての Peptide-25 を特異的に認識する TCR 発現遺伝子導入マウスの作出に成功し、個体レベル

その Th1 誘導効果を実証した。さらに、Lnk ファミリーアダプター分子の APS 遺伝子欠損や遺伝子導入マウスも作出し、IgE 依存性脱顆粒異常の検討が個体レベルで可能となった。

(3) 高橋班 環境ストレス応答分子 MICA の腸管特異的発現マウスの作出に成功した。そのモデルを使い、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与により誘導される大腸に限局した炎症が MICA 遺伝子腸管特異的発現マウスではその病態形成が抑制または軽症化傾向にある事が明らかになった。

(4) 早野班 上気道粘膜におけるアレルキー性炎症反応では、VCAM-1、VEGF、IL-8、の産生亢進が進み、好酸球浸潤が亢進する事が明らかになった。その引き金として自然免疫系の関与が示唆される結果が得られた。

D 考察 腸管粘膜免疫システムを基点としたアレルギーや炎症の発症に関して、そのシステムの一つの特徴でもある上皮細胞の関与について新しい知見が得られた。つまり、IL-12p40 の産生亢進や MICA 分子の発現がその誘導制御に深く関わっている。さらにその下部に存在するマスト細胞の脱顆粒における Lnk ファミリーアダプター分子の役割も明らかになってきた。また、アレルギーという異常な Th2 型応答の状況を改善する分子としての結核菌由来 Peptide-25 の有用性を示唆する結果も得ることが出来た。さらに呼吸器アレルギーの際に上気道粘膜における好酸球浸潤に関与する VCAM-1、VEGF、IL-8 産生亢進のメカニズムに細菌由来内毒素が関与している事が示唆された。

E 結論 腸管呼吸器での粘膜免疫を基点としたアレルギー 炎症の解明に向けて横断的研究が進み、新しい知見とその情報を基盤とし

た新しい予防法 治療法開発へ向けての基礎研究が着実に展開されている。例えば、アレルギー性炎症と制御する新しいターゲットとしての IL-12p40, MICA そして結核菌由来 Peptide 25 の可能性が提示された。これらの結果は、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。

#### F 健康危険情報

特になし。

#### G 研究発表

(発表論文リスト)

英文

- 1 Tamagawa, H , Takahashi, I , Furuse, M , Yoshitake-Kitano, Y , Tsukita, S , Itoh, T , Matsuda, H and Kiyono, H 2003 Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer' s patches Preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region Lab Invest 83 1045-1053
- 2 Park, EJ , Takahashi, I , Ikeda, J , Kawahara, K , Okamoto, T , Kweon, M-N , Fukuyama, S , Groh, V , Spies, T , Obata, Y , Miyazaki, J and Kiyono, H 2003 Clonal expansion of double-positive (DP) IELs by MICA expressed in mouse small intestinal epithelium J Immunol 171 4131-4139
- 3 Kweon, M-N and Kiyono, H 2003 Eosinophilic gastroenteritis a problem of the mucosal immune system? Curr Allergy Asthma Rep 3 79-85
- 4 Okuda, Y , Takahashi, I , Kim, J-K , Ohta, N , Iwatani, J , Kai, Y , Tamagawa, H , Hiroshi, T , Kweon, M-N , Kawano, S , Sasaki, Y , Hori, M , Takeda, K , Akira, and Kiyono, H 2003 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 $^{+}$  $\beta\beta$  T cells Am J Pathool 162 263-271
- 5 Kobayashi, M , Kweon, M-N , Kuwata, H , Schreiber, R D , Kiyono, H , Takeda, K , and Shizuo, A 2003 Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes Chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice J Clin Invest 111 1297-1308
- 6 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 2003 Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4 $^{+}$ T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue J Immunol

- 15 1754-1762
- 7 Boyaka, P N , Ohmura, M , Fujihashi, K , Koga, T , Yamamoto, M , Kweon, M-N , Takeda, Y , Jackson, R J , Kiyono, H , Yuki, Y and McGhee, J R 2003 Chimeral of labile toxin one toxin one and cholera Toxin retain mucosal adjuvanticity and Direct Th cell subsets via their B subunit *J Immunol* 170 454-462
- 8 Yuki, Y and Kiyono, H , 2003 New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity *Rev Med Virol* 13 293-310
- 9 Jang, MH , Kweon, M-N , Hiroi T , Yamamoto, M , Takahashi, I and Kiyono, H 2003 Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells *Vaccine* 21 1613-1619
- 10 Hino, A , Kweon, M-N , Fujihashi, K , McGhee, Jerry R , and Kiyono, H 2004 Pathological role of large intestinal IL-12p40 for the induction of Th2-type allergic diarrhea *Am J Pathol* 164 1327-1333
- 11 Takaki, S , Y Tezuka, K Sauer, C Kubo, S-M kwon, E Armstead, RM Perlmutter, and K Takatsu 2003 Impaired expansion of lymphoid precursors and altered distribution of peripheral B cell subpopulations *J Immunol* 170 703-710
- 12 Suzuki, H , S Matsuda, Y Terauchi, M Fujiwara, T Ohteki, T Asano, W T Behrens, T Kouro, K , Takatsu, K , T Kadowaki, T and Koyasu, S 2003 PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction *Nat Immunol* 4 280-286
- 13 Takatsu, K , and Kariyone, A 2003 Immunogenic peptide for the Th1 development *Int Immunopharmacol* 3 783-800
- 14 Kariyone, A , H Kano, T Tamura, Y Iwakura, and Takatsu, K Immuno-genicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development role of IFN- $\gamma$  2003 *Int Immunol* 15 1183-1194
- 15 Nobuhisa, I , Takizawa, M , Takaki, S , Inoue, H , Okita, K , Ueno, M , Takatsu, K , and Taga, T 2003 Regulation of hemato-poietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein *Mol Cell Biol* 23 8486-8494
- 16 Minami, A , Iseki, M , Kishi, K , Wang, M , Furukawa, N , Ogura, M , Hayashi, S , Yamada, M , Obata, T , Takeshita, Y , Nakaya, Y , Bando, Y , Izumi, K , Moodie, S A , Takatsu, K , Takaki, S , and Ebina, Y , 2003 Increased insulin sensitivity and hypoinsulinemia in APS knockout mice

- Diabetes*, 52 2657-2665
- 17 Hirai, H , Abe, H , Tanaka, K , Nakno, Y , Takashi, T , Takatsu, K , Sugamura, K , Takano, S , Nakamura, M , and Nagata, K 2003 Gene structure and pharmacological properties of the mouse CRTH2, a prostaglandin D2 receptor *Biochem Biophys Res Commun* *Biochem Biophys Res Commun* 307 797-802
- 18 Nobuhisa I, M Takizawa, S Takaki, H Inoue, K Okita, M Ueno, K Takatsu, and T Taga Regulation of hematopoietic development in the Aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein 2003 *Mol Cell Biol* 23 8486-8494
- 19 Kubo-Akashi, C , M Iseki, S-M Kweon H Takizawa, K Takatsu, and S Takaki 2004 Roles of conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B and APS for mast cell development, growth and functions. APS-deficiency causes impaired degranulation *Biochem Biophys Res Commun* 315 356-362
- 20 Iseki, M , Kubo, C , Kwon S-M , Yamaguchi, A , Kataoka, Y , Yoshida, M , Takatsu, K , and Takaki, S 2004 Negative regulatory role of APS, adaptor molecule containing PH and SH2 domains in B-1 cells and B cell receptor-mediated proliferation *Mol Cell Biol* 24 2243-2250
- 21 Matsune, S , Kono, M , Sun, D , Ushikai, M , and Kurono Y 2003 Hypoxia in paranasal sinuses of patients with chronic sinusitis with or without the complication of nasal allergy *Acta Otolaryngol* 123(4) 519-23
- 22 Takaki, M , Ushikai, M , Deguchi, K , Nishimoto, K , Matsune, S , and Kurono, Y 2003 The role of nuclear factor-kappa B in interleukin-8 expression by human adenoidal fibroblasts 2003 *Laryngoscope* 113(8) 1378-85
- H 知的財産権の出願登録状況  
なし



# 分担研究報告書

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

研究課題名 「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」に関する研究

分担研究課題 「食物アレルギーにおける腸管粘膜免疫機構の関与する研究」

主任研究者 清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

研究協力者 権 美那 東京大学医科学研究所 客員研究員（国際ワクチン研究所 部長）  
日野 綾子 東京大学医科学研究所 文部科学技官

#### 研究要旨

食物アレルギーにおける粘膜免疫と全身免疫間クロストークの関与を検討する目的として我々が開発したアレルギー性下痢マウスモデルが有用である。そこで、同モデルにおける腸管での異常な Th2 型免疫応答環境誘導メカニズムを解明する為に IL-12p40 の免疫系と全身系での関与の検討を進めた。そして IL-12p40 が病態形成に不可欠な Th2 型誘導に関与することを同定した。

A 研究目的 食物アレルギーにおける粘膜免疫機構の関与を検討する為に、我々はアレルギー性下痢マウスモデルの開発をし、脾臓由来抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞が大腸に選択的にホーミングし、局所において強い Th2 型免疫応答環境が誘導されることか病態形成に重要なことを報告した。本年度は局所におけるこの異常な Th2 型免疫応答誘導メカニズムの解明を目指した。仮説として、大腸局所において Th1 型誘導を抑制する IL-12p40 の産生向上が関与するという斬新な考えを打ち立て検討した。

B 研究方法 アレルギー性下痢が誘導されているマウスの小腸 大腸における IL-12p40, p35, p70 の産生を蛋白、mRNA レベルで検討した。さらに、組織切片をもちいて、各種 IL-12 蛋白発現の有無を確認した。IL-12 特異的抗体

投与実験も行い、それを標的とした予防・治療効果も検討した。

C 結果 アレルギー性下痢が誘導されているマウス大腸に IL-12p40 単量体・二量体の発現上昇が蛋白・mRNA 両レベル認められた。大腸上皮細胞での IL-12p40 の強発現が組織切片においても確認された。さらに、IL-12p40 抗体を投与するとアレルギー性下痢症状の発症低下ならびに軽減化が認められた。

D 考察 IL-12p40 によるアレルギー性下痢誘導への関与を直接的に証明する為に同遺伝子欠損マウスでの検討が必要であり、最近の結果では IL-12p40 欠損マウスではその病態形成か起きないことか分かってきた。さらに、大腸上皮細胞だけでなく、その下層に存在する抗原提示細胞群（樹状細胞 大食細胞）の関与に

についても確認する必要がある。

**E 結論** アレルギー性下痢誘導において、大腸に限局して異常な Th2 型環境が形成される、一つの因子として、局所において IL-12p70 に拮抗する IL-12p40 の発現のみが上昇するという興味ある結果が得られた。さらに、上皮細胞が IL-12p40 を産生出来るという新しい知見を提供した。

**F 健康危険情報** なし

**G 発表論文**

- 1 Kweon, M-N and Kiyono, H 2003 Eosinophilic gastroenteritis a problem of the mucosal immune system? *Curr Allergy Asthma Rep* 3 79-85
- 2 Park, EJ, Takahashi, I, Ikeda J, Kawahara, K, Okamoto, T, Kweon, M-N, Fukuyama, S, Groh, V, Spies, T, Obata, Y, Miyazaki, J and Kiyono, H 2003 Clonal expansion of double-positive (DP) IELs by MICA expressed in mouse small intestinal epithelium *J Immunol* 171 4131-4139
- 3 Okuda, Y, Takahashi, I, Kim, J-K, Ohta, N, Iwatani, K, Kai, Y, Tamagawa, H, Hiroi, T, Kweon, M-N, Kawano, S, Sasaki, Y, Horii, M, Takeda, K, Akira, S and Kiyono, H 2003 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<sup>+</sup>  $\beta\beta$  T cells *Am J Pathol* 162 263-271
- 4 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 2003 Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4<sup>+</sup>T cells in nasopharyngeal-associated-lymphoreticular tissue *J Immunol* 15 1754-1762
- 5 Kobayashi, M, Kweon, M-N, Kuwata, H, Schreiber, R D, Kiyono, H, Takeda, K, and Shizuo, A 2003 Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes Chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice *J Clin Invest* 11 1297-1308
- 6 Tamagawa, H, Takahashi, I, Furuse, M, Yoshitake-Kitano, Y, Tsukita, S, Itoh, T, Matsuda, H and Kiyono, H 2003 Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region *Lab Invest* 83 1045-1053
- 7 Boyaka, P N, Ohmura, M, Fujihashi, K, Koga, T, Yamamoto, M, Kweon, M-N, Takeda, Y, Jackson, R J, Yuki, Y and

- Kiyono, H 2003 Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal djuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit J Immunol 170 454-462
- 8 Yuki, Y and Kiyono, H 2003 New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity Rev Med Virol 13 293-310
- 9 Jang, MH , Kweon, M-N , Hiroi T, Yamamoto, M , Takahashi, I and Kiyono, 2003 Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells Vaccine 21 1613-1619
- 10 Hino, A , Kweon, M-N , Fujihashi, K , McGhee, Jerry R , and Kiyono, H 2003 Pathological role of intestinal IL-12p40 for the induction of Th2-type allergic diarrhea Am J Pathol 164 1327-1333
- 11 Jang MH , Kweon, MN , Iwatani, K , Yamamoto, M , Terahara, K , Sasakawa, G , Suzuki, T , Nochi, T , Yokota, Y , Hiroi, T , Tamagawa, H , Iijima, H Kunisawa, J , Yuki, Y , and Kiyono, H Intestinal Villous M Cells A new antigen entry site in the mucosal epithelium Proc Natl Associ Sci 16 6110-5

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15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) と MHC クラス II 分子を認識する T 細胞抗原受容体 (TCR) を発現する遺伝子導入マウスを作出し、そのリンパ球が Peptide-25 に応答し選択的に Th1 応答を惹起することを初めて見出した。Lnk ファミリーアダプター分子である APS 遺伝子欠損マウスや遺伝子導入マウスを作出した。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。

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、マスト細胞と好酸球のアレルギー性炎症における役割を検索する。

B 研究方法

結核菌の分泌する蛋白質 Ag85B の C-末端ペプチドである Peptide-25 を認識する T 細胞

株より単離した TCRV 5V 11 cDNA を用いて、TCRV 5V 11 発現するトランスジェニック (P25 Tg) マウスを樹立した。そのリンパ球を試験管内培養し、サイトカインやケモカインの産生を検討した。APS 遺伝子欠損マウスや Aps-Tg マウスを作出した。その骨髄細胞を IL-3 存在下に長期培養し株化マスト細胞を樹立し、マスト細胞の実験に供した。

C 研究成果

平成15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 MHC クラス II 分子を認識する T 細胞抗原受容体 (TCR) を発現する遺伝子導入マウスを作出し、そのリンパ球が Peptide-25 に応答し選択的に Th1 応答を惹起することを初めて見出した。その応答に抗原提示細胞からのサイトカインや副刺激は必ずしも必要でなかった。(2)に関し、Lnk ファ

ミリーアダプター分子である APS 遺伝子欠損マウスや遺伝子導入マウスを作出した。APS トランスジェニックマウス由来の株化マスト細胞を抗 DNP IgE 抗体と DNP-BSA 刺激しその脱顆粒を野生マウスのマスト細胞のそれと比較した。APS 欠損マスト細胞は IgE 依存性の脱顆粒に異常を示すことを初めて見出した。この異常は Lnk や SH2-B 欠損マウスではみられなかった。

#### D 考察

本年度の研究により、結核菌の分泌する Ag85B の C-末端ペプチド、Peptide-25 に応答する株化 T 細胞の TCR の遺伝子構造が明らかになり、それが機能的な TCR を再構成し Peptide-25 に応答して 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手段が確立されたので、次年度以降に詳細な解析を予定している。APS によるマスト細胞増殖抑制や脱顆粒の抑制機構を 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 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活性を示す。Lnk アダプターファミリー分子である APS はマスト細胞の脱顆粒の制御を制御する。

#### 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., Y. Tezuka, K. Sauer, C. Kubo, S.-M. Kwon, E. Armstead, R.M. Perlmutter, and K. Takatsu. Impaired expansion of lymphoid precursors and altered distribution of peripheral B cell subpopulations. *J Immunol* 170: 703-710, 2003.

2 Suzuki, H., S. Matsuda, Y. Terauchi, M. Fujiwara, T. Ohteki, T. Asano, W. T. Behrens, T. Kouro, K. Takatsu, T. Kadowaki, and S. Koyasu. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat Immunol* 4: 280-286, 2003.

3 Takatsu, K. and A. Kariyone. Immunogenic peptide for the Th1 development. *Int Immunopharmacol* 3: 783-800, 2003.

4 Kariyone, A., H. Kano, T. Tamura, Y. Iwakura, and K. Takatsu. Immuno-genicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN-. *Int Immunol* 15: 1183-1194, 2003.

5 Nobuhisa, I., M. Takizawa, S. Takaki, H. Inoue, K. Okita, M. Ueno, K. Takatsu and T. Taga. Regulation of hemato-poietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein. *Mol Cell Biol* 23: 8486-8494, 2003.

6 Minami, A., M. Iseki, K. Kishi, M. Wang, N. Furukawa, M. Ogura, S. Hayashi, M. Yamada, T. Obata, Y. Takeshita, Y. Nakaya, Y. Bando, K. Izumi, S. A. Moodie, K. Takatsu, S. Takaki, and Y.

Ebina Increased insulin sensitivity and hypoinsulinemia in APS knockout mice *Diabetes* 52 2657-2665, 2003

7 Hiraï H Abe, K Tanaka, Y Nakno, T Takashi, K Takatsu, K Sugamura S Takano, M Nakamura and K Nagata Gene structure and pharmacological properties of the mouse CRTH2, a prostaglandin D2 receptor *Biolchem Biophys Res Commun Biochem Biophys Res Commun* 307 797-802 2003

8 Nobuhisa I M Takizawa, S Takaki, H Inoue, K Okita, M Ueno K Takatsu, and T Taga Regulation of hematopoietic development in the Aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein *Mol Cell Biol* 23 8486-8494, 2003

9 Kubo-Akashi, C, M Iseki S-M Kwon H Takizawa, K Takatsu, and S Takaki Roles of conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B and APS for mast cell development growth and functions APS-deficiency causes impaired degranulation *Biochem Biophys Res Commun* 315 356-362 2004

10 Iseki M, C Kubo, S-M Kwon A Yamaguchi Y Kataoka M Yoshida, K Takatsu and S Takaki Negative regulatory role of APS, adaptor molecule containing PH and SH2 domains in B-1 cells and B cell receptor-mediated proliferation *Mol Cell Biol* 24 2243-2250 2004

## 2 学会発表

1 Takatsu K Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development role of IFN- $\gamma$ 、東京大学医科学研究所/九州大学生体防御医学研究所シンポジウム、ケノムから個体へ、3 2003、福岡

2 井関将典、久保千代美、権 相模、吉田進昭、高津聖志、高木 智 抑制性蛋白質 APS による B 細胞受容体シグナルの負の制御機構、第 33 回日本免疫学会学術集会、12, 2003、福岡

3 Tamura T Kariyone A, and Takatsu K The Immunogenic peptide derived from the secreted *Mycobacterium tuberculosis* Antigen for Th1 development, US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM, Thirty-eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference Newark NY 7, 2003

4 有賀晴之、田村敏生、徳永岳志、刈米アイ、菊池剛史、Xu Wen、高津聖志 初期 TCR 活性化シグナルによる Th1 分化の誘導、第 33 回日本免疫学会学術集会、12 2003、福岡

5 久保千代美、井関将典、権 相模、高津聖志、高木 智 肥満細胞の脱顆粒における Lnk ファミリーアダプター蛋白質 APS の制御作用、第 33 回日本免疫学会学術集会、12, 2003、福岡

6 田村敏生、徳永岳志、有賀晴之、刈米アイ、菊池剛史、高津聖志 Th1 を誘導するペプチドである Peptide-25 の抗原提示細胞へ及ぼす効果、第 33 回日本免疫学会学術集会、12, 2003、福岡

7 刈米アイ、田村敏生、高津聖志 Th1 ペプチドである Peptide-25 による免疫制

御、第33回日本免疫学会学術集会、12  
2003、福岡

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

なし



環境ストレス応答分子反応型腸管T細胞のアレルキ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 MICA 分子の腸管局所発現は腸管粘膜防御に有利な免疫応答を誘導し、消化管の免疫学的な恒常性の維持に寄与している可能性が明らかになった

A 研究目的

粘膜免疫のユニークな特徴は、粘膜を介して絶えずなく侵襲する各種抗原の善玉性と悪玉性を巧みに識別し、食物に代表される善玉性の抗原に対しては免疫応答を極力差し控え、いっぽう病原微生物に代表される悪玉抗原に対してはこれを積極的に排除する、相反した2通りの免疫応答を共進的に発達させたことにある。しかしながらこれら善玉ないし悪玉抗原の認識ないしは識別、あるいはこれらに対する応答ないしは適応反応を担う粘膜系免疫担当細胞の本体とその分子レベルでの作用機構に関しては、粘膜系樹状細胞、あるいは胸腺非依存性粘膜系T細胞の関与を示唆する実験結果が得られつつあるか、その多くはいまなお不明のままである。このような状況のもと、米国のグループにより、微生物の感染、発がん物質の摂取、放射線の照射、温熱刺激の負荷などのストレスの侵襲により組織適合性抗原 MHC class Ib に近縁の MICA が粘膜上皮細胞、あるいは樹状細胞で発現が亢進すること、また V1V2V9 などの特定の TCR を発現した T細胞が機能発現(細胞障害活性 腸管粘膜上皮細胞の品質管理に必須の機能)に MICA を要求することが明らかになった。このような背景から我々は MICA 遺伝子を粘膜上皮特異的に組み込んだトランスジェニックマウス、換言すると、絶えずストレス侵襲のおよぶ腸内環境を再現した遺伝子改変マウスを作成し、その粘膜免疫システムの動態を解析した。その結果、MICA が胸腺非依存性に 粘膜に固有の腸管上皮内 CD8<sup>+</sup> T細胞の発達・分化を制御することを見出した。本年度は我々の開発した絶えずストレス侵襲のおよぶ腸内環境を再現した MICA トランスジェニックマウスを用いて、粘膜(体表面)における免疫学的恒常性の誘導 維持機構を、粘膜に好発する難治性粘膜疾患の発症モデルを用いて細胞と分子のレベルで解明する。

B 研究方法

(1) 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(8週齢, ♀)および対照として C57BL/6 マウス(8週齢, ♀)に、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を経口的に投与し大腸炎を誘導した。

(2) 大腸炎の活動性は、体重の増減、便の性状、腸管組織の肉眼的ないしは病理組織学的な検索により評価した。

(3) DSS を投与した MICA Tg マウスないしは C57BL/6 マウスの大腸粘膜固有層より単核球画分を分離し、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6, MCF-1, IFN- $\gamma$ , IL-12)の産生を Flow cytometric cytokine bead array 法で検討した。また同細胞よりの単個レベルでの抗体産生細胞数は ELISPOT 法で算定した。

C 研究結果

(1) DSS 投与開始直後より投与終了14日めまでの観察期間を通して、MICA Tg マウスの体重減少は対照 C57BL/6 マウスに比べて軽微であった。また MICA Tg マウスでは下痢、脱肛、hunched posture などの、臨床所見も対照 C57BL/6 マウスに比べて軽微であった。また DSS 投与 MICA Tg マウスでは、対照 C57BL/6 マウスに比べて大腸粘膜における炎症性所見および粘膜固有構造の消失が軽度であった。粘膜組織の再生も対照 C57BL/6 マウスに比べてすみやかであった。なお両マウスにおける病理組織学的変化の差は、大腸近位部に比べて遠位部で著明であった。

(2) 抗 MICA mAb (clone 6D4) を用いた免疫組織化学的な解析より、無処置 MICA Tg マウスでは大腸粘膜上皮の基底側に MICA が発現していることが確認された。DSS 処置 MICA Tg マウスでは炎症の進展とともに MICA の発現が消退するが、粘膜組織の再生とともに MICA の発現が回復することが明らかになった。

(3) DSS 投与後、対照 C57BL/6 マウスの大腸粘膜固有層リンパ球では TNF- $\alpha$ , IL-6, MCF-1 などの炎症性サイトカインの産生が著しく亢進した。いっぽう DSS 投与 MICA Tg マウスの大腸粘膜固有層リンパ球では同炎症性サイトカインの発現は対照マウスに比べて著しく減弱していることが観察された。(4) DSS 投与 MICA-Tg マウスでは対照 C57BL/6 マウスに比べて大腸粘膜固有層リンパ球画分よりの IgA 抗体産生が有意に亢進していた。

D 考察

デキストラン硫酸ナトリウムの経口投与により誘導される大腸炎誘発実験の解析より、腸管粘膜に固有のストレス応答性生体分子 MICA が粘膜炎症の増悪を抑制する免疫制御分子として機能している可能性が示唆された。MICA の作用機序として、まず MICA

を発現した粘膜上皮細胞のハリア機能そのものが亢進していることが予想される。あるいは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 細胞が粘膜固有層の炎症性 T 細胞ないしは炎症性マクロファージの機能を抑制している可能性が示唆される。さらに MICA 拘束性 T 細胞は、粘膜系 IgA の産生を高め、粘膜ハリア機能を亢進している可能性もうかがえた。

## E 結論

環境ストレス応答性 MICA 分子の腸管局所発現は腸管粘膜防御に有利でありまた多様な免疫応答を誘導し、消化管の免疫学的な恒常性の維持に多元的に寄与している可能性が明らかになった。

## F 健康危険情報

なし

## G 研究発表

### I 論文発表

- 1 Park E J, I Takahashi, J Ikeda, K Kawahara, T Okamoto, M Kweon S Fukuyama V Groh, T Spies, Y Obata, J Miyazaki, and H Kiyono Clonal expansion of double positive IELs by MICA expressed in mouse small intestinal epithelium. *J Immunol* 171 4131-4139, 2003
- 2 Tamagawa, H, I Takahashi M Furuse Y Yoshitake-Kitano, S Tsukita, T Itoh, H Matsuda, and H Kiyono Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches Preferential localization of claudin 4 at the apex of the dome region *Laboratory Investigation* 83 1045-1053, 2003
- 3 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<sup>+</sup> T cells *Am. J. Pathol* 162 263-271 2003

- 4 Jang, M-H M Kweon, T Hiroi, M Yamamoto I Takahashi and H Kiyono Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells *Vaccine* 21 1613-1619 2003
  - 5 高橋一郎 粘膜ワクチン 小児科 44 巻 4 号 160-161 2003
  - 6 高橋一郎 粘膜免疫応答の制御機構 化学療法の世界 19 巻 11 号 18 24, 2003
  - 7 清野宏、幸義和、高橋一郎 粘膜免疫による感染症制御 次世代型ワクチン開発に向けての展開 日本医学会雑誌 130 巻 11 号 KM41-44, 2003
  - 8 高橋一郎 ワクチン研究の新しい展開 粘膜ワクチンによる感染症の克服 アレルギー 免疫 10 巻 4 号 83 85, 2003
  - 9 高橋一郎、清野宏 粘膜ワクチン 分子予防環境医学 (松島綱治 編) 本の泉社, 東京, 741 753, 2003
  - 10 高橋一郎 経粘膜ワクチン *Biotherapy* 18 巻 43-49, 2004
- 2 学会発表
- 1 第 21 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、粘膜免疫の特殊性と重要性、高橋一郎 平成 15 年 2 月 15 日、鹿児島
  - 2 第 26 回日本医学会総会、粘膜免疫のユニーク性とその異常、高橋一郎 平成 15 年 4 月 6 日、福岡
  - 3 第 4 回大阪クローン病治療研究会、粘膜免疫機構とその破綻による炎症性腸疾患、高橋一郎 平成 15 年 11 月 21 日、大阪
  - 4 第 33 回日本免疫学会総会、MICA トランスジェニックマウスにおけるデキストラン硫酸ナトリウム誘発性腸炎の腸管粘膜免疫応答の解析 池田淳子、河原和子、谷亮治、岡本哲治、朴恩正、清野宏、高橋一郎 平成 15 年 12 月 10 日、福岡
  - 5 第 33 回日本免疫学会総会、In situ expression of Rae-1 by intestinal epithelial goblet

cells 朴恩正、高橋一郎、福山聡、清野宏 平  
成15年12月10日、福岡

## II. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）  
分担研究報告書

上気道粘膜における好酸球浸潤とサイトカイン産生に関する研究

分担研究者 黒野祐一 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科先進治療学専攻感覚器病学  
聴覚頭頸部疾患学 教授

研究要旨

好酸球の粘膜および分泌液中への浸潤は上気道 I 型アレルギー疾患の特徴であり、その難治化の要因ともなっている。そこで、中耳貯留液、鼻咽腔液、鼻分泌液などの上気道分泌液中の好酸球浸潤に関わる種々のサイトカイン濃度を測定し、さらに培養上気道線維芽細胞を用いてこれらサイトカインの産生機序を検討した。その結果、外分泌液中に高濃度の IL-8 ならびに VEGF を認め、アレルギー性鼻炎症例で特に高値であった。さらに培養線維芽細胞を TNF- $\alpha$  やエンドトキシンで刺激すると VCAM-1 の産生が誘導され、その産生に NF- $\kappa$ B が関与していることが証明された。これらの成績から、アレルギー性鼻炎の難治化を防ぐには、好酸球浸潤を制御することが必要であり、炎症性サイトカインやその転写活性化因子をターゲットにした戦略の可能性が示唆された。

A 研究目的

アレルギー性鼻炎患者の急増に伴い、本疾患を合併する副鼻腔炎や中耳炎が増加し、アレルギー性鼻炎そしてアレルギー性炎症がこれらの上気道感染症を遷延化さらには難治化させる大きな要因になっていると考えられる。とくに好酸球浸潤は重症度そして治療後の再発に関与する因子であり、好酸球性副鼻腔炎は鼻茸の再発を繰り返し、好酸球性中耳炎はいかなる治療にも抵抗し聾になることが稀ではない。そこで、本研究では、上気道粘膜における好酸球浸潤そして様々な炎症性サイトカインの発現とその産生機序を上気道分泌液および上気道培養細胞を用いて検討した。

B 研究方法

滲出性中耳炎そして慢性副鼻腔炎患者から中耳貯留液、鼻咽腔液、鼻分泌液を採取し、ELISA 法によりこれら分泌液中の IL-8、VEGF

濃度を測定した。また、鼻粘膜およびアデノイド組織から上皮細胞、線維芽細胞を分離培養し、これを継代培養したものを実験に供した。これら培養細胞をエンドトキシンや IL-1 $\beta$  で一定時間刺激し、IL-8、VCAM-1、RANTES、VEGF の発現およびその産生をそれぞれ RT-PCR、FACS、ELISA を用いて測定し、さらにゲルシフトアッセイにより、転写活性化因子である NF- $\kappa$ B の活性化を観察した。またアレルギー性炎症や慢性炎症に用いられる抗アレルギー薬、14 員環系マクロライド薬のこれらに及ぼす影響を観察した。なお、中耳貯留液や鼻分泌液などの外分泌液、そして鼻粘膜やアデノイドなどの組織を採取するにあたっては、研究対象者にその研究内容ならびに不利益や危険性の無いことを説明し、文書にて同意を得た。また、大学院生が関与する VCAM-1 発現に関する研究など一部のものは、当施設の臨床倫理委員会に承認を得た。