

平成15年度  
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

研 究 報 告 書

第1分冊

厚 生 労 働 省

## 序

平成9年度から発足した厚生科学研究「感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業」は、平成14年度より厚生労働科学研究「免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業」となり、本年度はその2年目として各研究課題が実施された。これまでに本事業に関わってこられた多くの研究者の努力により、我が国の当該分野において数々の成果があげられ、国民に還元されてきたことはまことに喜ばしいことである。本年度実施された研究課題は、平成13年度からの継続課題10課題（アレルギー部門7課題、リウマチ部門3課題）、平成14年度からの継続課題19課題（アレルギー部門9課題、リウマチ部門10課題）、及び平成15年度からの新規課題7課題の合計36課題である。

本年度の研究成果の評価については、平成16年2月16,17日の2日間に亘り全ての課題についての研究報告会を実施した。2日間とも評価委員をはじめ、各主任研究者、分担研究者及び研究協力者のみならず多数の関係者の参加により活発な意見交換が行われた。さらに研究報告会に引き続いて中間・事後評価委員会が開催され、厳正な評価がなされた。

厚生労働科学研究事業は、文部科学省関連研究事業とは異なり国民の健康と保健衛生を預かる厚生労働省としての役割から、国民の保健と医療にフィードバックされることを常に念頭においた研究を中心として実施されなければならない。行政的視点からもできるだけ一般国民の目に見える形での成果が望まれている。本研究事業も発足後7年を経過し着実に成果が挙がっていることは大変喜ばしい。この分野での研究の困難さは勿論承知の上であるが、今後とも本研究事業の特性を考慮しつつ各研究班のさらなる奮起、発展を祈るものである。

最後に平成15年度の研究報告書が事務局を担当している国立相模原病院臨床研究センターの関係者の皆様のご努力によって刊行となったことに対して、ここに厚くお礼を申し上げる。本研究事業に参加された各主任研究者、分担研究者及び研究協力者の方々の高い水準を保った研究に敬意を表するとともに、今後とも益々活発な研究を推進し、多くの成果をあげるようお願いしたい。特に厚生労働省疾病対策課長をはじめとする厚生労働省の関係者の皆様には多くの貴重なご指導を賜った。また本研究を推進するにあたり貴重なご意見、ご指導をいただいた評価委員各位に心からお礼を申し上げる。

(なお、本年度の報告書は、課題数の増加により、終了予定年度順に掲載する形式として、4分冊とせざるを得なかった。)

平成16年3月

厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業  
評価委員長

国立相模原病院 名誉院長

宮本 昭正

# 目次

## 平成15年度終了研究課題（分冊1）

### 関節リウマチの難治性病態に対する新規治療法の開発研究

メトトレキサート治療が困難な関節リウマチ患者に対する白血球除去療法の治療効果

難治性関節リウマチに対する造血幹細胞移植に関する研究

多剤耐性遺伝子を標的とする難治性関節リウマチの新規治療に関する研究

関節炎病変集積T細胞の抗原特異性の再構築による抗原解析・治療応用の検討

タクロリムスの抗リウマチ作用に関する研究

関節リウマチにおけるマクロファージ系滑膜細胞-T細胞間相互作用とその新規治療への応用に関する研究一

関節リウマチの滑膜細胞におけるアダプター蛋白の発現とチロシンキナーゼ阻害薬による増殖制御に関する研究

関節リウマチの遺伝子治療にむけたアデノウイルスベクター改変に関する研究

サイクリン依存性キナーゼインヒビターp21<sup>Cip1</sup>遺伝子によるp16<sup>Ink4a</sup>発現誘導機構の研究

関節リウマチ治療に用いられる生物製剤の医薬経済学的評価に関する研究

### 関節リウマチの発症及び重篤な合併症の早期診断に関する研究

関節リウマチの自己抗体による早期診断に関する研究  
-診断未確定関節炎における抗CCP抗体の意義-

関節リウマチのMRIによる早期診断、活動性および予後判定に関する研究

RAの早期診断と臨床経過、特に関節破壊の進行予測

NKT細胞による関節リウマチの早期診断・制御に関する研究

RA患者滑膜細胞の遺伝子発現プロファイル解析  
: Notchの活性化とその意義に関する研究

ゲノム解析に基づく、関節リウマチ病因・病態解析

疾患遺伝子DR3からみた早期診断と臨床経過の予知

RAに続発するアミロイドーシスの遺伝要因の解析

### 関節リウマチの治療反応性規定因子の同定と、それを用いた新治療方針確立に関する総合的研究

カスタムDNAマイクロアレイを用いたインフリキシマブの有効性予測因子同定に関する研究

遺伝子発現プロファイルによる疾患診断システムの開発に関する研究

抗リウマチ薬投与に関するテーラーメイド医療

関節リウマチ患者骨髄幹細胞における遺伝子発現の異常に関する研究

東京医科歯科大学歯学部総合研究科生体応答調節学分野 教授

宮坂 信之 (1)

順天堂大学医学部膠原病・リウマチ内科 教授

橋本 博史 (5)

北海道大学大学院医学研究科分子病態制御学講座免疫病態分野 講師

渥美 達也 (10)

産業医科大学医学部第一内科学講座 教授

田中 良哉 (14)

東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学 教授

山本 一彦 (18)

国立病院長崎医療センター臨床研究センター 免疫研究部長

右田 清志 (20)

東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター 教授

原 まさ子 (23)

埼玉医科大学総合医療センター 第二内科 助手

亀田 秀人 (26)

東京医科歯科大学歯学部総合研究科生体応答調節学分野 教授

宮坂 信之 (29)

東京医科歯科大学大学院歯学部総合研究科生体応答調節学分野 助教授

上阪 等 (32)

東京大学大学院薬学系研究科・医薬経済学 客員教授

津谷 喜一郎 (36)

長崎大学大学院歯学部総合研究科病態解析・制御学講座(第一内科) 教授

江口 勝美 (39)

京都大学大学院医学研究科臨床免疫学 教授

三森 経世 (51)

長崎大学大学院歯学部総合研究科放射線生命科学講座 助教授

上谷 雅孝 (55)

長崎大学大学院歯学部総合研究科病態解析・制御学講座(第一内科) 教授

江口 勝美 (59)

筑波大学臨床医学系内科 教授

住田 孝之 (69)

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学 教授

岡本 尚 (74)

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野 助教授

土屋 尚之 (78)

神戸大学医学部保健学科膠原病学講座・大学院医学系研究科病態解析学・附属病院免疫内科 教授

塩澤 俊一 (83)

新潟大学医学部保健学科 教授

中野 正明 (87)

埼玉医科大学総合医療センター第二内科 教授

竹内 勤 (91)

埼玉医科大学総合医療センター第二内科 教授

竹内 勤 (95)

東京大学国際・産学共同研究センター 教授

油谷 浩幸 (100)

東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター 教授

山中 寿 (105)

順天堂大学医学部膠原病内科 助教授

小林 茂人 (108)

滑膜細胞のTRAIL誘導性アポトーシスの検討に関する研究	長崎大学医学部第一内科 講師	川上 純 (111)
<i>In vitro</i> でのヒト末梢血B細胞の抗シトルリン化ペプチド抗体産生に関する検討	東京大学医学部 アレルギー・リウマチ科 助手	沢田 哲治 (114)
抗fractalkine抗体による関節炎抑制機序の検討	東京医科歯科大学学生体応答調節学 助手	南木 敏宏 (117)
<b>重症喘息の決定因子の同定とそれに基づく新規治療法の開発</b>	千葉大学大学院医学研究院細胞治療学 助教授	岩本 逸夫 (121)
アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明	千葉大学大学院医学研究院細胞治療学 助教授	岩本 逸夫 (126)
慢性喘息における気道過敏性亢進機序およびCD4+T細胞およびサブセットのMDC/TARC産生能に関する研究	獨協医科大学呼吸器科・アレルギー内科 教授	福田 健 (129)
CpGモチーフによるTh2反応の制御に関する研究	東北大学病院感染症・呼吸器内科講師	田村 弦 (132)
アレルギー性気道炎症の新たな制御機構の解明	国立相模原病院 臨床研究センター長	秋山 一男 (135)
<b>アレルギー疾患を抑制する新規天然薬物の開発に関する研究</b>	東邦大学第二小児科助教授	鈴木 五男 (139)
抗炎症・抗アレルギー作用を有する民間薬の疫学的データの調査と植物成分のデータベース化に関する研究	東京理科大学薬学部製薬学科 講師	鈴木 政雄 (148)
アレルギーを抑制する新規天然薬物の開発に関する研究	日本大学薬学部教授	北中 進 (153)
アレルギー疾患を抑制する新規天然薬物に関する研究	日本大学大学院医学研究科分子細胞免疫・アレルギー学講座教授	羅 智靖 (164)
鼻アレルギーに対するシジュウム点鼻液の臨床効果の検討	東邦大学第二小児科助教授	鈴木 五男 (172)
<b>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</b>	東京医科歯科大学大学院消化・代謝内科学分野 教授	渡辺 守 (177)
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	東京医科歯科大学大学院消化・代謝内科学分野 教授	渡辺 守 (185)
腸管粘膜免疫の新しい機構とアレルギーに関する研究	慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学 教授	石川 博通 (190)
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	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	半田 宏 (193)
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	慶應義塾大学医学部内科教授	日比 紀文 (195)
<b>遺伝子情報に基づいた抗脂質メディエーター薬適正投与の検討</b>	慶應義塾大学医学部 呼吸循環器内科 講師	浅野 浩一郎 (199)
プロスタグランジンD <sub>2</sub> 受容体DP遺伝子多型とその機能解析	慶應義塾大学医学部 呼吸循環器内科 講師	浅野 浩一郎 (205)
脂質メディエーター合成酵素の遺伝的多様性に基づいたアレルギー性鼻炎の治療についての研究	薬学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学 教授	岡本 美孝 (209)
日本人喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬の薬物動態と臨床効果	慶應義塾大学医学部 呼吸循環器内科 助教授	山口 佳寿博 (211)
日本人軽症喘息患者におけるロイコトリエン受容体拮抗薬反応性規定因子の解析	東京電力病院 検査科 科長	石坂 彰敏 (214)
気管支喘息治療におけるブランルカスト反応性とγグルタミルロイコトリエンナーゼ遺伝子多型の関連	慶應義塾大学医学部小児科 助教授	小崎 健次郎 (217)
CysLT <sub>2</sub> 受容体が炎症性シグナルを惹起する可能性についての検討	東京大学大学院 医学系研究科生化学分子生物学講座 細胞情報部門 助手	石井 聡 (219)
遺伝子情報に基づいた抗脂質メディエーター薬適正投与の検討	岐阜大学医学部小児病態学 助手	松井 永子 (224)

気管支喘息の発症や喘息症状の増悪に及ぼすウイルス感染の影響と治療の効果に関する研究

成人喘息の発症および増悪に及ぼすウイルス感染の影響に関する研究

気管支喘息の発症や喘息症状の増悪におよぼすウイルス感染の影響と治療の効果に関する研究

小児の喘息（発作）におけるrhinovirus (RV)感染の関与

ウイルス感染と気道過敏性に関する研究

気管支喘息の発症や喘息症状の増悪に及ぼすウイルス感染の影響と治療の効果に関する研究

ウイルス感染等による喘息を含めた呼吸器疾患の増悪に関する研究 -第3報-

ウイルス感染による気管支喘息発症に及ぼす影響—マウスモデルの確立と解析—

成人喘息におけるウイルス感染の呼吸機能に及ぼす影響

成人喘息におけるウイルス感染の日常生活障害（経済的負担も含めて）及び、予後に及ぼす影響に関する研究

RSウイルス感染で喘鳴をきたした乳幼児の鼻咽頭吸入液中リンパ球亜分類に関する研究

ヒトメタニューモウイルスの感染と気管支喘息の発症や喘息症状の増悪に及ぼす影響

小児における気管支喘息急性増悪時の気道ウイルス感染頻度の検討

夏期における喘鳴児のRSウイルス感染に関する研究

リウマチアレルギー疾患の早期診断に関する研究

アレルギー疾患予防効果試験研究のためのフィールド作成

アレルギーにおける粘膜免疫形成とサイトカイン関与検討マウスモデル開発

消化器上皮細胞に対するIL-4, IL-13の機能的影響に関する検討

腸内フローラをEPEC（腸管病原性大腸菌）で再建したマウスを用いた経口免疫寛容の検討

乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー発症の相関関係の解析

沖縄県石垣市小児におけるアトピー性皮膚炎(Atopic dermatitis:AD)と家族歴・血清IgE値・RASTの関係に関する研究

アレルギー疾患関連遺伝子解析研究

リウマチ・アレルギー疾患の研究・診療に関する的確かつ迅速な情報収集・提供体制の確立に関する研究—患者、医療関係者、研究者、一般国民を対象とした包括的情報網確立を目指して—

「リウマチ・アレルギー情報センター」からの情報発信内容に関する研究 -アレルギー部門-

「リウマチ・アレルギー情報センター」からの情報発信内容に関する研究 -関節リウマチ-

患者、患者家族及び一般市民を対象とした的確な情報収集、情報提供方法の確立の研究—学校での健康教育としての思春期喘息教育の必要性と有効性の研究—

インターネットを用いたリウマチ・アレルギー疾患患者に対する情報発信・保健指導の研究

昭和大学医学部小児科 助教授

小田島 安平 (229)

国立相模原病院 臨床研究センター長

秋山 一男 (234)

昭和大学第一内科 教授

足立 満 (237)

東京慈恵会医科大学小児科 講師

勝沼 俊雄 (239)

国立相模原病院臨床研究センター アレルギー性疾患研究部長

海老澤 元宏 (241)

国立感染症研究所 感染症情報センター長

岡部 信彦 (244)

博慈会記念総合病院 副院長

田島 剛 (248)

岐阜薬科大学薬理学教室 教授

永井 博式 (251)

国立国際医療センター 副院長

工藤 宏一郎 (253)

同愛記念病院 アレルギー・呼吸器科 部長

佐野 靖之 (255)

千葉県衛生研究所 疫学調査研究室長

一戸 貞人 (257)

国立感染症研究所 感染症情報センター 第三室長

多屋 馨子 (260)

千葉県こども病院アレルギー科 医長

椿 俊和 (262)

昭和大学医学部小児科 助教授

小田島 安平 (264)

京都大学大学院医学研究科社会健康医学専攻健康要因学講座健康増進・行動学 教授

白川 太郎 (267)

京都大学大学院医学研究科社会健康医学専攻健康要因学講座健康増進・行動学 教授

白川 太郎 (271)

東京大学医科学研究所 教授

清野 宏 (274)

佐賀医科大学医学部分子生命科学講座 教授

出原 賢治 (276)

東海大学医学部感染症学 教授

古賀 泰裕 (280)

九州大学大学院農学研究院 教授

園元 謙二 (282)

九州大学大学院農学研究院 助教授

中山 二郎

九州大学大学院医学研究院皮膚科学分野 教授

古江 増隆 (285)

京都大学大学院医学研究科環境衛生学 教授

小泉 昭夫 (288)

国立相模原病院 診療部長

長谷川 真紀 (291)

国立相模原病院 臨床研究センター長

秋山 一男 (296)

国立相模原病院臨床研究センター リウマチ性疾患研究部長

當間 重人 (298)

国立成育医療センター 総合診療部小児期診療科医長

赤澤 晃 (300)

国立療養所南岡山病院アレルギー科 医長

岡田 千春 (304)



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

## 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で成人のアレルギー疾患の病態解明と新規治療法開発を目指す新しい視点にもとづく研究であった。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を、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圧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

### 1. 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) 腸管組織特有の免疫機構の解析および自然免疫応答との機能関連解析、2) 腸管粘膜における新規免疫装置の同定および腸内フローラによる局所免疫調節の解析、3) T細胞共刺激分子機能調節による Th1/Th2 応答の人為的制御とその応用技術開発、4) 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についての基礎技術開発からなっている。

### 2. 研究方法

- 1) 主任研究者渡辺はこれまで独自に報告してきた粘膜 IL-7 機構を中心とし、これに対する自然免疫応答シグナルすなわち Toll like receptor (TLR) を介したシグナルとの機能的関連、腸管上皮細胞から産生される IL-7 および TSLP による粘膜免疫制御につき解析した。また、これら粘膜 IL-7 機構と TLR シグナルとの機能関連の異常が腸管免疫異常に及ぼす影響を解析した。
- 2) 分担研究者石川は粘膜リンパ装置 (GALT) と腸管上皮の機能的相互作用を明らかにするため、腸管粘膜内 T/B 細胞による上皮細胞ターンオーバーの統御を解析した。最終年度においては新規粘膜リンパ装置の同定、および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) 分担研究者半田は高効率に結合蛋白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、大腸菌や食品中に含まれる物質に対する生体側レセプターを単離同定する技術を確認することを目的とした。

4) 分担研究者日比はマウス慢性腸炎モデルを用い、主として T 細胞共刺激分子の機能解析により、Th1/Th2 型免疫反応の人為的制御の可能性を検討した。

(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。

### 3. 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 TLR シグナルに着目し、ひろく TLR レセプター下流でアダプター分子として機能する 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、粘膜関連リンパ装置の発達不全およびパイエル板や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。また、MyD88 ノックアウトマウスでは腸管上皮細胞からの IL-7 産生が少ないことを明らかとし、TLR を介した自然免疫応答と粘膜 IL-7 機構に機能的連関があることを示した。MyD88 ノックアウトマウスはまた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 が関与することが示された。また、腸炎発症モデルマウスにおける上皮細胞による IL-7 と TSLP 産生の解析から、IL-7、TSLP 産生が局所における Th1 および Th2 応答にそれぞれ重要であることが示唆された。

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、各種遺伝子操作マウスの腸管上皮細胞 (IEC) を用いた解析により、B 細胞を欠損する  $\mu\text{m}^{-/-}$  マウスや IL-7R ノックアウトマウス、*aly/aly* マウスでは、有意に IEC ターンオーバーが亢進していること、逆に TCR- $\delta^{-/-}$  マウスでは 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、急性移植片対宿主病 (a-GVHD) のモデルマウスの解析により、パイエル板が GVHD 発症に中心的役割を担うことを明らかにした。さらに DDS による IBD モデルの解析から、IEL がその発症機構に重要であることを示した。

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、NF $\kappa$ B 阻害剤である低分子化合物 E3330 を固定化したビーズにより、Jurkat 細胞粗核抽出液から結合蛋白 Ref-1 を単離した。その後 Ref-1 が転写因子 NF- $\kappa$ B の特定のシステイン残基を還元し DNA 結合を制御すること、および E3330 は Ref-1 による還元活性抑制効果を有することを明らかにし、E3330 作用機構を分子レベルで明らかにしたと同時に、本法が細胞粗抽出液から極微量の標的受容体分子単離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、腸管病原大腸菌 (EPEC) の病原因子 EspB に対する生体受容体の単離を試み、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 OVA Tg マウスへの OVA 少数回投与で Tr1 型経口免疫寛容の成立を確認すること、さらに、この条件では Th1 型 TNBS



大腸炎の発症を抑制することを明らかとした。さらに OVA を継続投与することにより、Th2 型免疫反応が優位なアレルギー性大腸炎の発症を誘導することを明らかにした。さらにこの時 OVA Tg x ICOS 欠損マウスにおいては Th2 型免疫反応、Tr1 反応誘導のいずれもが著しく障害を受け、免疫寛容は成立せずアレルギー性腸炎は発症しないことから、ICOS 分子を介するシグナルの関与が示された。Th2 型免疫反応制御分子として知られる ICOS 分子が、Th1 型免疫応答に関わる可能性をさらに検討した結果、CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T 細胞 SCID マウス移入モデルによる腸炎発症が抗 ICOS 抗体投与により改善することを示した。これに対し、抗 B7RP-1 抗体投与では体重減少は抑制されず、組織学的にも改善を認めなかった。ICOS<sup>-/-</sup>マウス由来 CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>細胞移入においては、ICOS<sup>+/-</sup>マウス由来細胞移入群と同程度の慢性大腸炎を発症した。一方、別の共刺激シグナル PD-1/PD-ligand システムについても同様に検討したところ、抗 B7-H1 抗体および抗 B7-H1 抗体+抗 B7-DC 抗体投与が腸炎発症抑制機能を有することから、B7-H1 分子に対する新規の受容体分子が存在する可能性を指摘した。また、CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>細胞をあらたな制御性 T 細胞として同定したのみならず、これら細胞が OVA TCR Tg Th2 型アレルギー腸炎モデルを強く押さえることを明らかにした。

#### 4. 考察

1) 主任研究者渡辺は、TLR を介した自然免疫応答が腸管粘膜 IL-7 ネットワークと機能的に関わることを検討し、MyD88 KO マウスにおいて上皮細胞からの IL-7 産生低下がみられたこと、IL-7 Tg マウスでクリプトバッチの発達亢進および TLR 分子の発現増強を認めたことなどから、自然免疫応答における IL-7 機構の関与を示した。また、TLR シグナルがリンパ球機能に影響し、これが上皮細胞の IL-7 産生調節を介してさらに局所リンパ球機能を調節するという、innate immunity から始まる腸管局所 IL-7 ネットワークにつながる経路が一部明らかとなった。さらに、各種モデル腸炎の経過中にみられる腸管上皮による IL-7 と TSLP 発現パターンの検討から、腸管においては IL-7 と TSLP がそれぞれ Th1、Th2 応答に強く関わり、そのバランス変動により慢性大腸炎やアレルギー

ーが引き起こされる機構が存在すると考えられた。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。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、CP の組織発生及びその生理的機能やマウス小腸における ILF の存在が明らかとなった。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、パイエル板が  $\alpha$ -GVHD の発信源であるとの解析結果は、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。さらに、 $\gamma\delta$ -T 細胞は未だその生理的機能が解明されていないが、本研究により腸管粘膜最前線に位置する  $\gamma\delta$ -IEL が DSS 腸炎に関わることが明らかにされ、 $\gamma\delta$ -T 細胞機能解明に寄与することが期待される。

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。まずはじめに低分子化合物を用いた詳細な検討の結果、低分子化合物を固定化した SG ビーズが生体レセプター研究に汎用性を有し、生体反応の制御機構を研究するケミカルバイオロジーの分野に貢献することが期待された。さらにこれらを利用し、次に大腸菌毒素を標的とした生体受容体単離を

試み、分子固定化のスぺーサー構造、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。その結果、タンパク質など高分子を固定化した SG ビーズは低分子化合物固定化ビーズよりも非特異的吸着による夾雑物が精製画分に混入することがわかったが、洗浄方法やビーズ固定化の際のリンカー分子の連結など高分子タンパク質固定化のための条件に関わる基礎知見が数多く得られた。さらにこれら条件の改善により実際に腸管病原大腸菌 (EPEC) の病原因子 EspB の結合蛋白を同定することが可能であったことより、アレルギー抗原となりうる腸内細菌由来蛋白あるいは食餌性蛋白抗原に対する生体受容体単離の網羅的解析にむけた技術基盤がほぼ確立されたと同時に、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。また、近年注目を集めている抑制性 T 細胞に関し、われわれは CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>T 細胞サブセットも抑制性 T 細胞として機能するという成績を報告したが、我々が見いだした新規の CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>制御性 T 細胞は主として Th2 型免疫反応をコントロールするという重要な知見が得られた。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、これらを人為的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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(渡辺)

- 1) 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 co-stimulator monoclonal antibody in a murine model of chronic colitis. **Gastroenterology**. 124 : 410-421, 2003.
- 2) Watanabe M, Yamazaki M, Kanai T: Mucosal T Cells as a target for treatment of IBD. **J Gastroenterol**. 38 : 48-50, 2003.
- 3) Tsuchiya K, Kawano Y, Kojima T, Nagata K, Takao T, Okada M, Shinohara H, Maki K, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka N, Watanabe M, Karasuyama H: Molecular cloning and characterization of TPP36 and its isoform TPP32, novel substrates of Abl tyrosine kinase. **FEBS Lett**. 537 : 203-209, 2003.
- 4) Totsuka T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Yamazaki M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF- $\alpha$  MAb in a murine model of chronic colitis. **Am J Physiol**. 284: G595-G603, 2003.
- 5) Iiyama R, Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Nakamura T, Miyata T, Yagita H, Tezuka K, Watanabe M: The role of Inducible Co-stimulator (ICOS)/B7 related protein-1 (B7RP-1) interaction in the germinal center formation in Peyer's patch. **Immunol Lett**. 88: 63-70, 2003.

- 6) Ishikura T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Makita S, Totsuka T, Yamazaki M, Sawada T, Nakamura T, Miyata T, Kitahora T, Hibi T, Hoshino T, Watanabe M: IL-18 overproduction exacerbates the development of colitis with markedly infiltrated macrophages in IL-18 transgenic mice. **J Gastroenterol Hepatol.** 18 : 960-969, 2003.
- 7) Watanabe M, Yamazaki M, Okamoto R, Ohoka S, Araki A, Nakamura T, Kanai K: Therapeutic approaches to chronic intestinal inflammation by specific targeting of mucosal IL-7/IL-7R signal pathway. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.** 2: 119-123, 2003.
- 8) Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Okazawa A, Hibi T, Oshima S, Miyata T, Nakamura T, Watanabe M: Macrophage-derived IL-18 targeting for the treatment of Crohn's disease. **Cur Drug Targets Inflamm Allergy.** 2: 131-136, 2003.
- 9) Okamoto R, Watanabe M: Prospects for regeneration of gastrointestinal epithelia using bone-marrow cells. **Trends Mol Med.** 9: 286-290, 2003.
- 10) Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T, Watanabe M: Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25-CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. **J Immunol.** 171: 708-716, 2003.
- 11) Ezaki T, Watanabe M, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Ishii H, Hibi T: A specific genetic alteration on chromosome 6 in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. **Cancer Res.** 63: 3747-3749, 2003.
- 12) Iiyama R, Kanai T, Uraushihara K, Ishikura T, Makita S, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Miyata T, Yoshida H, Takeuchi O, Hoshino K, Takeda K, Ishikawa H, Akira S, Watanabe M: Normal development of the gut-associated lymphoid tissue except Peyer's patch in MyD88-deficient mice. **Scand J Immunol.** 58: 620-627, 2003.
- 13) Yamazaki M, Yajima T, Tanabe M, Fukui K, Okada E, Okamoto R, Oshima S, Nakamura T, Kanai T, Uehira M, Takeuchi T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M: Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis. **J Immunol.** 171: 1556-1563, 2003.
- 14) Dan N, Kanai T, Totsuka T, Iiyama R, Yamazaki M, Sawada T, Miyata T, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Ameliorating effect of anti-Fas ligand Mab on wasting disease in a murine model of chronic colitis. **Am J Physiol.** 285: G754-G760, 2003.
- 15) Makita S, Kanai T, Matsumoto S, Iiyama R, Uraushihara K, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Ishikawa H, Watanabe M: The role of cryptopatch-derived intraepithelial lymphocytes in the development of chronic ileocolitis. **Scand J Immunol.** 58: 428-435, 2003.
- 16) Takagi H, Kanai T, Okazawa A, Kishi Y, Sato T, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Hoshino K, Takeda K, Akira S, Watanabe M, Ishii H, Hibi T: Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. **Scand J Gastroenterol.** 38: 837-844, 2003.
- 17) Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Machida U, Iwai H, Azuma M, Chen L, Watanabe M: Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. **J Immunol.** 171: 4156-4163, 2003.
- 18) Sato T, Kanai T, Watanabe M, Sakuraba A, Okamoto S, Nakai T, Okazawa A, Inoue N, Totsuka T, Yamazaki M, Kroczeck RA, Fukushima T, Ishii H, Hibi T: Hyperexpression of inducible costimulator and Its contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology.** 126: 829-839, 2004.
- 19) Ishii K, Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Ishikura T, Yamazaki M, Okamoto R, Araki A, Miyata T, Tezuka K, Nakamura T, Watanabe M: Hyperexpression of inducible costimulator (ICOS) on lamina propria mononuclear cells in rat dextran sulfate sodium (DSS) colitis. **J Gastroenterol Hepatol.** (in press)
- 20) Kanai T, Kawamura T, Uraushihara K, Dohi T, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Higuchi T, Aiba Y, Okumura K, Tsubata T, Watanabe M: Ectopic CD40 ligand expression on B cell triggers intestinal inflammation. **J Immunol.** (in press)
- 21) Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Okada E, Tsuchiya K, Okamoto R, Yamazaki M, Yokota T, Kanai T, Watanabe M: IRF-1 and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of IL-7 in human intestinal epithelial cells. **Mol Cell Biol.** (in press)  
(石川)
- 1) Tsuchiya T, Fukuda S, Hamada H, Nakamura A, Kohama Y, Ishikawa H, Tsujikawa K, Yamamoto H : Role of  $\gamma\delta$ Tcells in the inflammatory response of experimental colitis mice. **J Immunol** 171 : 5507-5513, 2003
- 2) Ishikawa H, Camerini V: Extrathymic T cell development in mucosal tissue. **Mucosal Immunology Update** 11 : 5-7, 2003
- 3) Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, 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
- 4) 石川博通 : 腸管防御におけるフローラの役割【特集編輯 腸管免疫とフローラ】 **Medical Science Digest** 29 : 11-12, 2003年12月
- 5) 南野昌信, 石川博通 : 腸管リンパ球の新たな発達分化経路 **現代医療** 35 : 35-39, 2003年12月
- 6) 南野昌信, 石川博通 : 腸管粘膜免疫の重要性 **Biotherapy** 18 : 9-15, 2004年1月  
(半田)
- 1) Imaki H, Nakayama K, Delehouzee S, Handa H,

- Kitagawa M, Kamura T, Nakayama KI: Cell Cycle-dependent regulation of the Skp2 promoter by GA-binding protein. **Cancer Res.** 63: 4607-4613, 2003.
- 2) Narita T, Yamaguchi Y, Yano K, Sugimoto S, Chanarat S, Wada T, Kim DK, Hasegawa J, Omori M, Inukai N, Endoh M, Yamada T, Handa H: Human transcription elongation factor NELF: Identification of novel subunits and reconstitution of the functionally active complex. **Mol Cell Biol.** 23: 1863-1873, 2003.
- 3) Kuraoka I, Endou M, Yamaguchi Y, Wada T, Handa H, Tanaka K: Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II: implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. **J Biol Chem.** 278: 7294-7299, 2003.
- 4) Bando M, Hasegawa M, Tsuboi Y, Miyake Y, Shiina M, Ito M, Handa H, Nagai K, Kataoka T: The mycotoxin penicillic acid inhibits Fas-ligand-induced apoptosis by blocking self-processing of caspase-8 in death-inducing signaling complex. **J Biol Chem.** 278: 5786-5793, 2003.
- 〈日比〉
- 1) 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 of effect of anti-inducible costimulator Monoclonal Antibody in A murine model of chronic colitis. **Gastroenterology.** 124 (2): 410-421, 2003.
- 2) Ezaki T, Watanabe M, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Ishii H, Hibi T: A specific genetic alteration on chromosome 6 in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. **Cancer Res.** 63 (13): 3747-9, 2003.
- 3) Yamazaki M, Yajima T, Tanabe M, Fukui K, Okada E, Okamoto R, Oshima S, Nakamura T, Kanai T, Uehira M, Takeuchi T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M: Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis. **J Immunol.** 171 (3): 1556-63, 2003.
- 4) Hibi T, Naganuma M, Kitahora T, Kinjyo F, Shimoyama T: Low-dose azathioprine is effective and safe for maintenance of remission in patients with ulcerative colitis. **J Gastroenterol.** 38 (8): 740-6, 2003.
- 5) Nohara H, Inoue N, Hibi T, Okita K, Hinoda Y: Association between the interleukin-1 receptor antagonist polymorphism and ulcerative colitis with younger age at diagnosis. **Immunol Lett.** 90 (1): 53-7, 2003.
- 6) Naganuma M, Funakoshi S, Sakuraba A, Takagi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Ishii H, Hibi T: Granulocytapheresis is useful as an alternative therapy in patients with steroid-refractory or -dependent ulcerative colitis. **Inflamm Bowel Dis.** (in press)
- 7) Sato T, Kanai T, Watanabe M, Sakuraba A, Okamoto S, Nakai T, Okazawa A, Inoue N, Totsuka T, Yamazaki M, Kroczek RA, Fukushima T, Ishii H, Hibi T: Hyperexpression of Inducible Costimulator and Its Contribution on Lamina Propria T cells in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology.** (in press)
2. 学会発表  
〈渡辺〉
- 1) Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M : Interferon Regulatory Factor-2 (IRF-2) Positively Regulates The Gene Expression of IL-7 in Intestinal Epithelial Cells. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.18
- 2) Nakamura T, Oshima S, Namiki S, Tsuchiya K, Okamoto R, Hibi T, Kanai T, Watanabe M : Interferon (IFN) - $\gamma$  Induces IL-7 Gene Expression in Intestinal Epithelial Cells Via Upregulation of Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1). DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.19
- 3) Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Nakamura T, Hibi T, Tezuka K, Yagita H, Watanabe M : Inducible Co-stimulator Targeting Can Ameliorate A Murine Model of Chronic Colitis. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.19
- 4) Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Nakamura T, Hibi T, Tezuka K, Yagita H, Watanabe M : Successful prevention and treatment of chronic colitis by elimination of highly interleukin-7 receptor expressing mucosal T cells. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.19
- 5) Uraushihara K, Kanai T, Dohi T, Kawamura T, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Nakamura T, Hibi T, Aiba Y, Tsubata T, Watanabe M : Ectopic CD40 Ligand Expression on B Cells Trigger Intestinal Inflammation. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.19
- 6) Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Iiyama R, Tamura M, Nakamura T, Hibi T, Fukushima T, Yagita H, Azuma M, Chen L, Watanabe M : Blockade of PD-L1, But Not PD-L2 Suppresses the Development of Chronic Intestinal Inflammation. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.20
- 7) Okamoto R, Yajima T, Matsumoto T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M : Bone Marrow-Derived Cells Regenerate Damaged Epithelia in the Human Gastrointestinal Tract. DDW 2003, Orlando, Florida,

- USA, 2003.5.20
- 8) 渡辺 守 : 炎症性腸疾患の病因・病態と治療 2. 潰瘍性大腸炎の病因と病態. 第 26 回 日本医学会総会, 福岡, 2003.4.5
- 9) 岡本隆一、矢島知治、渡辺 守 : 骨髄由来腸管上皮細胞による腸管上皮の維持・再生機構. 第 89 回日本消化器病学会, 大宮, 2003.4.24
- 10) 浦牛原幸治、金井隆典、渡辺 守 : 粘膜免疫における自然免疫系の関与. 第 89 回日本消化器病学会, 大宮, 2003.4.24
- 11) 河村貴広、金井隆典、土肥多恵子、種田 力、戸塚輝治、浦牛原幸治、飯山稜一、山崎元美、饗場裕一、鏑田武志、渡辺 守 : B 細胞 CD リガンド過剰発現によるマウス慢性腸炎の発症と病因. 第 89 回日本消化器病学会, 大宮, 2003.4.24
- 12) 石倉隆宏、金井隆典、浦牛原幸治、飯山稜一、蒔田 新、田村美保、山崎元美、日比紀文、星野友昭、渡辺 守 : IL-18 トランスジェニックマウスにおける急性 DDS 腸炎の増悪. 第 89 回日本消化器病学会, 大宮, 2003.4.24
- 13) 飯山稜一、金井隆典、石倉隆宏、蒔田 新、戸塚輝治、浦牛原幸治、中村哲也、渡辺 守 : マウスパイエル板の胚中心形成における ICOS 分子の役割. 第 89 回日本消化器病学会, 大宮, 2003.4.24
- 14) 戸塚輝治、金井隆典、浦牛原幸治、飯山稜一、東 みゆき、八木田秀雄、渡辺 守 : 炎症性腸疾患および慢性腸炎モデルにおける PD-1/PD-L1,2 分子の関与. 第 89 回日本消化器病学会, 大宮, 2003.4.26
- 15) 浦牛原幸治、金井隆典、高 貴範、戸塚輝治、蒔田 新、飯山稜一、石倉隆宏、山崎元美、中村哲也、渡辺 守 : 慢性大腸炎を制御する CD4+CD25<sup>-</sup> 制御性 T 細胞. 第 40 回日本消化器免疫学会, 東京, 2003.8.7
- 16) 金井隆典、戸塚輝治、日比紀文、渡辺 守 : 炎症性腸疾患における新規 Costimulatory 分子の多様性. 第 40 回日本消化器免疫学会, 東京, 2003.8.8
- 17) 蒔田 新、金井隆典、浦牛原幸治、戸塚輝治、谷本佳奈美、中村哲也、小金井一隆、福島恒男、渡辺 守 : 制御性 T 細胞としてのヒト腸粘膜内 CD4 陽性 CD25 陽性細胞の機能. 第 45 回日本消化器病学会, 大阪, 2003.10.16
- 18) 戸塚輝治、金井隆典、飯山稜一、浦牛原幸治、山崎元美、手塚克成、八木田秀雄、渡辺 守 : ICOS 分子を標的とした慢性大腸炎治療. 第 45 回日本消化器病学会, 大阪, 2003.10.16
- 19) 浦牛原幸治、金井隆典、高 貴範、戸塚輝治、蒔田 新、飯山稜一、石倉隆宏、山崎元美、中村哲也、渡辺 守 : 慢性大腸炎を制御する CD4+CD25<sup>-</sup> 制御性 T 細胞. 第 45 回日本消化器病学会, 大阪, 2003.10.16
- 20) 蒔田 新、金井隆典、戸塚輝治、浦牛原幸治、澤田泰輔、中村哲也、河村貴広、谷本佳奈美、福島恒男、渡辺 守 : ヒト腸粘膜内 CD4+CD25<sup>bright</sup> 制御性 T 細胞の存在と機能. 第 33 回日本免疫学会, 福岡, 2003.12.8
- 21) 大島 茂、中村哲也、並木 伸、金井隆典、渡辺 守 : 腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1・IRF-2 機能とサイトカイン IL-7 産生調節機構. 第 33 回日本免疫学会, 福岡, 2003.12.10
- 22) 山崎元美、岡田英理子、矢島知治、田邊将信、中村哲也、金井隆典、日比紀文、竹内 勤、石川博通、渡辺 守 : 腸管粘膜内浸潤 IL-7 レセプター高発現細胞の選択的除去による慢性大腸炎治療. 第 33 回日本免疫学会, 福岡, 2003.12.10 (石川)
- 1) Murai M, Yoneyama H, Hamada H, Ishikawa H, Matsushima K: Peyer's patches is the essential site in initiating murine acute and lethal graft -versus -host reaction. 2003 KEYSTONE SYMPOSIA on The regulation of mucosal inflammation 2003.4.1~6.
- 1) Ishikawa H, Nanno M, Kanamori Y: <Symposium; The organization and development of the mucosal immune system> Identification of cryptopatches and isolated lymphoid follicles in the mouse small intestine. (Plenary Lecture) 2003 KEYSTONE SYMPOSIA on The regulation of mucosal inflammation 2003.4.1~6.
- 1) 一松 収, 浜田裕公, 野中聡史, 日比紀文, 石井裕正, 石川博通 : ラット腸管粘膜におけるリンパ球集積の組織学的検討 第 40 回日本消化器免疫学会 2003.8.7~8.
- 1) 石川博通 : <シンポジウム; 腸管免疫とその周辺>腸管生体防御の特殊性 第 15 回日本比較免疫学会 2003.8.29~30.
- 1) Galson DL, Zhao C, Peng L, Laplace C, Bachler MA, Amano H, Aburatani H, Ishikawa H, Wagner EF, Matsuo K : A Major c-Fos target gene during osteoclast formation ASBMR 25<sup>th</sup> Annual Meeting 2003.9.19~23.
- 2) 石川博通 : <特別講演>腸管生体防御の特殊性 :

- 上皮細胞間 T 細胞を中心として 第 6 回皮膚のアレルギー・免疫疾患研究会 2003.10.4
- 7) 松尾光一, 後藤真一, 石川博通, 松井秀則: Salmonella typhimurium のマクロファージ内増殖に関する形態学的検索 第 86 回日本細菌学会関東支部会 2003.10.30~31.
- 8) 石川博通: <記念講演>腸管の驚異的な生理機能を考える 第 3 回ヤクルト代田カンファレンス 2003.11.5~6.
- 9) 石川博通: Distinctive features of intestinal immune surveillance 第 10 回移植免疫制御 21 2003.11.15.
- 10) 石川博通: <特別講演>腸管粘膜生体防御の特殊性 第 17 回 Tokyo Gut Club 2003.11.20.
- 11) Ishikawa H: Intestinal function and immune surveillance of gut mucosa. Understanding and Control of Life's Function via Systems Biology, Yokohama, 2003.11.20~21.
- 12) 一松 収, 浜田裕公, 高石官均, 石井裕正, 日比紀文, 石川博通: ラット及びヒト腸管粘膜に分布する c-kit<sup>+</sup>未分化リンパ球集積の検索 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12.8~10.
- 13) 山崎健一, 志田寛, 石川博通, 南野昌信: 腸内細菌及び食餌量が宿主免疫機能の発達に及ぼす影響 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12.8~10.
- 14) 茂呂和世, 野中聡史, 陳昊, 保坂奈美, 浜田裕公, 村井政子, 石川博通: 胸腺外発達分化腸管上皮細胞間 T 細胞 (IEL) における TCR 遺伝子再構成 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12.8~10.
- 15) 野中聡史, 内藤智昭, 保坂奈美, 森美穂, 浜田裕公, 南野昌信, 石川博通:  $\gamma\delta$ 型上皮細胞間 T 細胞 ( $\gamma\delta$ -IEL) の腸管粘膜最前線での生理的機能 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12.8~10.
- 16) 浜田裕公, 野中聡史, 白木文子, 陳昊, 保坂奈美, 南野昌信, 石川博通: TLR 欠損マウスの腸管粘膜組織の解析 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12.8~10.
- 17) 金城武士, 川上和義, 上江洲香織, 宮城一也, 仲松正司, 山城信, 岸原健二, 石川博通, 齋藤厚: クリプトコッカス感染防御における  $\gamma\delta$ T 細胞の役割: NKT 細胞との比較検討 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12.8~10.
- 18) 石川博通: <レビュートーク>粘膜免疫: 腸管粘膜生体防御機構を中心として 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12.8~10.
- 19) Murai M, Ishikawa H, Matsushima K: <Symposium; Leukocyte trafficking from signal transduction to immunobiology> Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction 第 33 回日本免疫学会総会 2003.12.8~10.  
<日比>
- 1) Sakuraba A, Naganuma M, Hibi T, Ishii H: Intensive therapy of granulocyte and monocyte adsorption apheresis induces rapid remission in patients with ulcerative colitis Digestive Disease Week (Orlando) 2003.5.17~22
- 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



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

本研究はアレルギー疾患に、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、アレルギー担当免疫組織、免疫統御分子機構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。本分担研究では innate immunity を司る TLR シグナルの異常により IL-7/IL-7R ネットワークの異常を来し、局所における獲得免疫システム応答のための生体装置形成および機能異常が惹起されることを示した。TLR シグナルの異常が薬剤誘発性腸炎に対する感受性を高めることから、上記機構が腸管炎症の病体にも関わる可能性を示した。以上、innate immunity に関わる分子および IL-7/IL-7R ネットワークとその制御分子がアレルギー抑制戦略における新規標的として重要であることを提示した。

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、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。具体的には、生体のホメオスタシス維持に必須である腸内細菌と腸管免疫機構の相互応答、およびその異常と腸管炎症発症の関連を解析した。また、細菌に対する生体側反応システムに重要な Toll-like Receptor (TLR) を介したシグナルに着目し、IL-7/IL-7 レセプターを介した免疫調節機構との機能的関連を追究した。さらに、自然免疫、すなわち TLRシグナルの欠損がTh1免疫反応のみを障害し、Th2免疫反応は正常に誘導される事実より、最終年度においては、IL-7 レセプターを介して二つのリガンドである IL-7 と thymic stromal lymphopoietin (TSLP) がそれぞれ Th1、Th2 応答に強く関わる事を見出し、そのバランスにより、慢性大腸炎、アレルギーが引き起こされる機構を追究した。すなわち、①腸内細菌刺激→TLR→IFN- $\gamma$ →IL-7→自己免疫 vs. ②食物アレルギー→?→TSLP→アレルギー性腸炎という仮説を設定し、腸管上皮細胞より産生される IL-7/TSLP のコントロ

ールを応用したアレルギー性疾患の治療戦略の基礎検討を行った。特に、腸管粘膜免疫制御の腸管上皮細胞側における制御機構を明らかにするため、自然免疫がいかに上皮細胞より IL-7 産生を誘導するのか、細胞内分子機構の解明を目指した。

B. 研究方法

- 1) 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 (MyD88KO) マウスを用いて、腸内細菌フローラからのシグナルが IL-7 ネットワークの機能や薬剤誘発性腸炎に対する感受性と関わる可能性につき検討した。
- 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<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T 細胞移入モデルを用いて検討した。
- 3) IL-7 Tg 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) 腸炎を発症した TCR ノックアウトマウス、CD45RB<sup>high</sup> transfer モデルにおいて、上皮における IL-7 および TSLP 発現を検討した。また粘膜内リンパ球(LPL)を単離し、IL-7 レセプター発現を検討した。外来性 IL-7 および TSLP 単独刺激による LPL の増殖を検討した。
- 5) 腸炎発症前および発症後の TCR ノックアウトマウスに外来性 IL-7、抗 IL-7R 抗体を投与し、大腸炎発症増悪、抑制を検討した。

6) ヒト腸管上皮細胞における IL-7、TSLP 産生機構の解析をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト細胞としては古くから樹立された腸管上皮由来細胞株のみの解析に限っており、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たが、3 週令のマウスではこれらリンパ装置の著しい発達不全を認めた。また、3, 10 週令いずれにおいてもパイエル板、粘膜内リンパ球の LPS や ConA に対する反応性の減少など機能的異常が明らかとなった。
- 2) MyD88 KO マウスにおける粘膜リンパ装置形成不全に IL-7 産生低下が関わる可能性を検討したところ、MyD88 KO マウスにおいて上皮細胞からの IL-7 産生低下がみられることが明らかとなった。
- 3) MyD88 KO マウス、コントロールマウスに比し DSS 誘発性腸炎における上皮細胞傷害が著しかった。さらに、MyD88 KO DSS 腸炎群では大腸組織において、IL-7 産生低下のみならず MIP-2, KC, MCP-1 などケモカイン産生の減少を認めた。
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 腸炎を発症した TCR ノックアウトマウス、CD45RB<sup>high</sup> transfer モデルにおいて、経過中に上皮における IL-7 発現は低下し、回復期における TSLP 発現の増加が認められた。IL-7 レセプター高発現 LPL は IL-7 単独刺激で強い増殖を示したが、TSLP 単独刺激に対しては無反応であった。
- 7) 腸炎発症前および発症後の TCR ノックアウトマウスに外来性 IL-7、抗 IL-7R 抗体を投与し、大腸炎発症増悪、抑制を検討した。
- 8) 腸管上皮細胞における IL-7 産生は IFN- $\gamma$ によ

り強く誘導されること、そしてこの機構には転写因子 IRF-1 が重要な役割を担うことがわかった。

### 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・分化には必須ではないものの、一時的に粘膜関連リンパ装置の発達不全を認め、これに IL-7 の低産生が関わることを示されたことから、innate immunity が腸管粘膜 IL-7 ネットワークと機能的に関わることを示唆された。また、MyD88 KO マウスにおいては DSS 誘発大腸炎の増悪を認めたのに対し、抗 TLR4 抗体による CD4+CD45RB<sup>high</sup> T 細胞移入大腸炎の部分的抑制を認めたことより、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。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、1) MyD88 KO マウスにおいて上皮細胞からの IL-7 産生低下がみられたこと、2) IL-7 Tg マウスで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たことなどから、innate immunity における IL-7 分子の関与が示唆された。MyD88 KO マウスにおいては Th1 型リンパ球の機能障害が生じることが知られるが、IFN- $\gamma$ が腸管上皮細胞における IL-7 産生誘導因子であることは、TLR シグナルがリンパ球機能に影響し、これが上皮細胞の IL-7 産生調節を介してさらに局所リンパ球機能を調節するという、innate immunity から始まる腸管局所 IL-7 ネットワークにつながる経路が一部明らかとなった。さらに、3) 腸管上皮が IL-7 と TSLP を共に発現し、腸炎の経過中に発現の逆相関変動が認められた。また、腸炎発症粘膜に IL-7 レセプター高発現 LPL が IL-7/TSLP において逆の反応性を示した。我々のグループが明らかにしてきた IL-7 トランスジェニックマウスが Th1 優位の腸炎を自然発症すること、他のグループから報告されたアトピー性皮膚炎においてケラチン細胞由来 TSLP による Th2 細胞の増殖が認められることを考え合わせ、腸管においては IL-7 と TSLP がそれぞれ Th1、Th2 応答に強く関わり、そのバランス変動により、慢性大腸炎、アレルギーが引き起こされる機構が存在すると考えられる。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

ギー抑制戦略に重要な成績と考えている。

#### E. 結論

- 1) innate immunity を司る TLR シグナルの異常により IL-7/IL-7R ネットワークの異常を来し、局所における獲得免疫システム応答のための生体装置形成および機能異常が惹起されることを示した。TLR シグナルの異常が薬剤誘発性腸炎に対する感受性を高めることから、上記機構が腸管炎症の病体にも関わる可能性を示した。
- 2) innate immunity に関わる分子および IL-7/IL-7R ネットワークとその制御分子がアレルギー抑制戦略における新規標的として重要であることを提示した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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 co-stimulator monoclonal antibody in a murine model of chronic colitis. **Gastroenterology**. 124 : 410-421, 2003.
- 2) Watanabe M, Yamazaki M, Kanai T: Mucosal T Cells as a target for treatment of IBD. **J Gastroenterol**. 38 : 48-50, 2003.
- 3) Tsuchiya K, Kawano Y, Kojima T, Nagata K, Takao T, Okada M, Shinohara H, Maki K, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka N, Watanabe M, Karasuyama H: Molecular cloning and characterization of TPP36 and its isoform TPP32, novel substrates of Abl tyrosine kinase. **FEBS Lett**. 537 : 203-209, 2003.
- 4) Totsuka T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Yamazaki M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF- $\alpha$  MAbs in a murine model of chronic colitis. **Am J Physiol**. 284: G595-G603, 2003.
- 5) Iiyama R, Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Nakamura T, Miyata T, Yagita H, Tezuka K, Watanabe M: The role of Inducible Co-stimulator (ICOS)/B7 related protein-1 (B7RP-1) interaction in the germinal center formation in Peyer's patch. **Immunol Lett**. 88: 63-70, 2003.
- 6) Ishikura T, Kanai T, Uraushihara K, Iiyama R, Makita S, Totsuka T, Yamazaki M, Sawada T, Nakamura T, Miyata T, Kitahara T, Hibi T, Hoshino T, Watanabe M: IL-18 overproduction exacerbates the development of colitis with markedly infiltrated macrophages in IL-18 transgenic mice. **J Gastroenterol Hepatol**. 18 : 960-969, 2003.
- 7) Watanabe M, Yamazaki M, Okamoto R, Ohoka S, Araki A, Nakamura T, Kanai K: Therapeutic approaches to chronic intestinal inflammation by specific targeting of mucosal IL-7/IL-7R signal pathway. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**. 2: 119-123, 2003.
- 8) Kanai T, Uraushihara K, Totsuka T, Okazawa A, Hibi T, Oshima S, Miyata T, Nakamura T, Watanabe M: Macrophage-derived IL-18 targeting for the treatment of Crohn's disease. **Cur Drug Targets Inflamm Allergy**. 2: 131-136, 2003.
- 9) Okamoto R, Watanabe M: Prospects for regeneration of gastrointestinal epithelia using bone-marrow cells. **Trends Mol Med**. 9: 286-290, 2003.
- 10) Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T, Watanabe M: Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25-CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. **J Immunol**. 171: 708-716, 2003.
- 11) Ezaki T, Watanabe M, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Ishii H, Hibi T: A specific genetic alteration on chromosome 6 in ulcerative colitis-associated colorectal cancers. **Cancer Res**. 63: 3747-3749, 2003.
- 12) Iiyama R, Kanai T, Uraushihara K, Ishikura T, Makita S, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Miyata T, Yoshida H, Takeuchi O, Hoshino K, Takeda K, Ishikawa H, Akira S, Watanabe M: Normal development of the gut-associated lymphoid tissue except Peyer's patch in MyD88-deficient mice. **Scand J Immunol**. 58: 620-627, 2003.
- 13) Yamazaki M, Yajima T, Tanabe M, Fukui K, Okada E, Okamoto R, Oshima S, Nakamura T, Kanai T, Uehira M, Takeuchi T, Ishikawa H, Hibi T, Watanabe M: Mucosal T cells expressing high levels of IL-7 receptor are potential targets for treatment of chronic colitis. **J Immunol**. 171: 1556-1563, 2003.
- 14) Dan N, Kanai T, Totsuka T, Iiyama R, Yamazaki M, Sawada T, Miyata T, Yagita H, Okumura K, Watanabe M: Ameliorating effect of anti-Fas ligand Mab on

- wasting disease in a murine model of chronic colitis. **Am J Physiol.** 285: G754-G760, 2003.
- 15) Makita S, Kanai T, Matsumoto S, Iiyama R, Uraushihara K, Totsuka T, Yamazaki M, Nakamura T, Ishikawa H, Watanabe M: The role of cryptopatch-derived intraepithelial lymphocytes in the development of chronic ileocaetitis. **Scand J Immunol.** 58: 428-435, 2003.
  - 16) Takagi H, Kanai T, Okazawa A, Kishi Y, Sato T, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Hoshino K, Takeda K, Akira S, Watanabe M, Ishii H, Hibi T: Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. **Scand J Gastroenterol.** 38: 837-844, 2003.
  - 17) Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Nakamura T, Koganei K, Fukushima T, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Machida U, Iwai H, Azuma M, Chen L, Watanabe M: Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. **J Immunol.** 171: 4156-4163, 2003.
  - 18) Sato T, Kanai T, Watanabe M, Sakuraba A, Okamoto S, Nakai T, Okazawa A, Inoue N, Totsuka T, Yamazaki M, Kroczeck RA, Fukushima T, Ishii H, Hibi T: Hyperexpression of inducible costimulator and its contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology.** 126: 829-839, 2004.
  - 19) Ishii K, Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Ishikura T, Yamazaki M, Okamoto R, Araki A, Miyata T, Tezuka K, Nakamura T, Watanabe M: Hyperexpression of inducible costimulator (ICOS) on lamina propria mononuclear cells in rat dextran sulfate sodium (DSS) colitis. **J Gastroenterol Hepatol.** (in press)
  - 20) Kanai T, Kawamura T, Uraushihara K, Dohi T, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Higuchi T, Aiba Y, Okumura K, Tsubata T, Watanabe M: Ectopic CD40 ligand expression on B cell triggers intestinal inflammation. **J Immunol.** (in press)
  - 21) Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Okada E, Tsuchiya K, Okamoto R, Yamazaki M, Yokota T, Kanai T, Watanabe M: IRF-1 and IRF-2 distinctively up-regulate gene expression and production of IL-7 in human intestinal epithelial cells. **Mol Cell Biol.** (in press)
2. 学会発表
- 1) Oshima S, Nakamura T, Namiki S, Tsuchiya K, Okamoto R, Kanai T, Watanabe M : Interferon Regulatory Factor-2 (IRF-2) Positively Regulates The Gene Expression of IL-7 in Intestinal Epithelial Cells. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.18
  - 2) Nakamura T, Oshima S, Namiki S, Tsuchiya K, Okamoto R, Hibi T, Kanai T, Watanabe M : Interferon (IFN)  $\gamma$  Induces IL-7 Gene Expression in Intestinal Epithelial Cells Via Upregulation of Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1). DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.19
  - 3) Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Nakamura T, Hibi T, Tezuka K, Yagita H, Watanabe M : Inducible Co-stimulator Targeting Can Ameliorate A Murine Model of Chronic Colitis. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.19
  - 4) Totsuka T, Kanai T, Iiyama R, Uraushihara K, Yamazaki M, Nakamura T, Hibi T, Tezuka K, Yagita H, Watanabe M : Successful prevention and treatment of chronic colitis by elimination of highly interleukin-7 receptor expressing mucosal T cells. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.19
  - 5) Uraushihara K, Kanai T, Dohi T, Kawamura T, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Nakamura T, Hibi T, Aiba Y, Tsubata T, Watanabe M : Ectopic CD40 Ligand Expression on B Cells Trigger Intestinal Inflammation. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.19
  - 6) Kanai T, Totsuka T, Uraushihara K, Makita S, Iiyama R, Tamura M, Nakamura T, Hibi T, Fukushima T, Yagita H, Azuma M, Chen L, Watanabe M : Blockade of PD-L1, But Not PD-L2 Suppresses the Development of Chronic Intestinal Inflammation. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.20
  - 7) Okamoto R, Yajima T, Matsumoto T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M : Bone Marrow-Derived Cells Regenerate Damaged Epithelia in the Human Gastrointestinal Tract. DDW 2003, Orlando, Florida, USA, 2003.5.20
  - 8) 渡辺 守 : 炎症性腸疾患の病因・病態と治療 2. 潰瘍性大腸炎の病因と病態. 第 26 回 日本医学会総会, 福岡, 2003.4.5
  - 9) 岡本隆一、矢島知治、渡辺 守 : 骨髄由来腸管上皮細胞による腸管上皮の維持・再生機構. 第 89 回日本消化器病学会, 大宮, 2003.4.24
  - 10) 浦牛原幸治、金井隆典、渡辺 守 : 粘膜免疫における自然免疫系の関与. 第 89 回日本消化器病学会, 大宮, 2003.4.24

- 11) 河村貴広、金井隆典、土肥多恵子、種田 力、戸塚輝治、浦牛原幸治、飯山稜一、山崎元美、饗場裕一、鏑田武志、渡辺 守：B 細胞 CD リガンド過剰発現によるマウス慢性腸炎の発症と病因。第 89 回日本消化器病学会，大宮，2003.4.24
- 12) 石倉隆宏、金井隆典、浦牛原幸治、飯山稜一、蒔田 新、田村美保、山崎元美、日比紀文、星野友昭、渡辺 守：IL-18 トランスジェニックマウスにおける急性 DDS 腸炎の増悪。第 89 回日本消化器病学会，大宮，2003.4.24
- 13) 飯山稜一、金井隆典、石倉隆宏、蒔田 新、戸塚輝治、浦牛原幸治、中村哲也、渡辺 守：マウスパイエル板の胚中心形成における ICOS 分子の役割。第 89 回日本消化器病学会，大宮，2003.4.24
- 14) 戸塚輝治、金井隆典、浦牛原幸治、飯山稜一、東 みゆき、八木田秀雄、渡辺 守：炎症性腸疾患および慢性腸炎モデルにおける PD-1/PD-L1,2 分子の関与。第 89 回日本消化器病学会，大宮，2003.4.26
- 15) 浦牛原幸治、金井隆典、高 貴範、戸塚輝治、蒔田 新、飯山稜一、石倉隆宏、山崎元美、中村哲也、渡辺 守：慢性大腸炎を制御する CD4+CD25-制御性 T 細胞。第 40 回日本消化器免疫学会，東京，2003.8.7
- 16) 金井隆典、戸塚輝治、日比紀文、渡辺 守：炎症性腸疾患における新規 Costimulatory 分子の多様性。第 40 回日本消化器免疫学会，東京，2003.8.8
- 17) 蒔田 新、金井隆典、浦牛原幸治、戸塚輝治、谷本佳奈美、中村哲也、小金井一隆、福島恒男、渡辺 守：制御性 T 細胞としてのヒト腸粘膜内 CD4 陽性 CD25 陽性細胞の機能。第 45 回日本消化器病学会，大阪，2003.10.16
- 18) 戸塚輝治、金井隆典、飯山稜一、浦牛原幸治、山崎元美、手塚克成、八木田秀雄、渡辺 守：ICOS 分子を標的とした慢性大腸炎治療。第 45 回日本消化器病学会，大阪，2003.10.16
- 19) 浦牛原幸治、金井隆典、高 貴範、戸塚輝治、蒔田 新、飯山稜一、石倉隆宏、山崎元美、中村哲也、渡辺 守：慢性大腸炎を制御する CD4+CD25-制御性 T 細胞。第 45 回日本消化器病学会，大阪，2003.10.16
- 20) 蒔田 新、金井隆典、戸塚輝治、浦牛原幸治、澤田泰輔、中村哲也、河村貴広、谷本佳奈美、福島恒男、渡辺 守：ヒト腸粘膜内 CD4+CD25bright 制御性 T 細胞の存在と機能。第 33 回日本免疫学会，福岡，2003.12.8
- 21) 大島 茂、中村哲也、並木 伸、金井隆典、渡辺 守：腸管上皮細胞における転写因子 IRF-1・IRF-2 機能とサイトカイン IL-7 産生調節機構。第 33 回日本免疫学会，福岡，2003.12.10
- 22) 山崎元美、岡田英理子、矢島知治、田邊将信、中村哲也、金井隆典、日比紀文、竹内 勤、石川博通、渡辺 守：腸管粘膜内浸潤 IL-7 レセプター高発現細胞の選択的除去による慢性大腸炎治療。第 33 回日本免疫学会，福岡，2003.12.10
- 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

食物質／腸内フローラ／免疫システムの密接な機能的連結（相互作用）を追究し、1）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した、2）腸内フローラと腸管免疫防御の機能的連結を明らかにした、3）パイエル板の特殊な生理的機能、即ち食物質／腸内フローラによって常に活性化されている腸管粘膜中で最大のリンパ球集積の役割を解明した。今後、食物アレルギーのみならずアレルギー応答そのものの機序の解明に結びつく重要な成績である。また、経口免疫寛容など腸管免疫機構を応用したアレルギー戦略をたてる場合に重要な知見が得られたと考えている。

### 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。これらの機能的連結を追究するために a) 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、b) 腸管免疫防御の特殊性を司る腸管粘膜の新規リンパ組織の検索、c) 腸管粘膜最大のリンパ組織であるパイエル板の機能やフローラの関与が提示されている炎症性腸疾患マウスモデルにおける上皮細胞間 T 細胞（IEL）の役割などを明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

腸管上皮間 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、同定を目ざした。さらに、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、抗生物質経口投与による腸内フローラの質的・量的変化が IEC 発達分化に及ぼす効果を追究した。ひき続きマウス急性移植片宿主病（a-GVHD）モデルにおける腸管リンパ組織（主としてパイエル板）の役割を追究するとともにマウス炎症性腸疾患（IBD）のモデルとして dextran sulfate sodium (DSS) による IBD を上皮細胞間 T 細胞（IEL）との関連に主眼を置いて解析した。

（倫理面への配慮）

マウスの飼育や研究への使用は、慶應義塾大学医学部の倫理規定を順守して行った。

### C. 研究結果

- クリプトパッチ（CP）の組織発生や CP 中の T 前駆細胞から腸管局所で発達分化する腸管上皮細胞間 T 細胞（IFL）の成熟に CCL25 (TECK)-CCR9 ケモカイン シグナル伝達の関与が重要であることを明らかにした (Int. Immunol. 14 : 687-694, 2002)。
- 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 ヶ所見出し、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 : 70-70, 2002)。
- 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  $\mu\text{m}^{-/-}$  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、 $\mu\text{m}^{-/-}$  マウスではすでに絨毛先端