

まで移動していた。IL-7R^{-/-} マウス、*aly/aly* マウスの IEC ターンオーバーも WT より有意に速いことが分かった。この μ m^{-/-} マウスの著しく速い IEC ターンオーバーは抗生物質経口投与によって減速し、WT のそれと同等となった。これらの結果や δ -^{-/-} マウスの IEC ターンオーバーが逆に抑制される事実によって、種々の異なった免疫機能が IEC の恒常性を正又は負の方向に統御することが示された (J. Immunol. 168 : 2626-2633, 2002)。

- d) 骨髄移植療法の障壁である急性の移植片対宿主反応に起因する病変 (acute graft-versus-host disease ; a-GVHD) の発症にパイエル板が関与する知見を得た。マウス a-GVHD モデルにおいて、パイエル板のみを欠如する宿主マウスは a-GVHD の incidence が著しく低下することを明らかにした (Nat. Immunol. 4 : 154-160, 2003)。この新知見の反響は大きく、ヒト骨髄移植療法の成功に向けての全く新しい戦略を提示することとなった。この論文の図版は Nature Immunology の表紙に採用されるとともに、同号の News & Views に “location, location, location” という表題で紹介された。さらにこの新知見は平成 15 年 1 月 13 日から 27 日にかけて、毎日新聞、日刊工業新聞、読売新聞及び日本経済新聞の医療/科学欄に掲載された。
- e) DDS による IBD モデルを追究した結果、 $\alpha\beta$ -IEL と $\gamma\delta$ -IEL の病態形成への関与が異なることを明らかにした。すなわち $\alpha\beta$ -IEL 欠損マウスの病変部には granulocyte を主とした細胞集積がみられるのに対し、 $\gamma\delta$ -IEL 欠損マウスでは主として monocyte の集積がみられた。又、 $\alpha\beta$ -IEL に加え $\gamma\delta$ -IEL をも欠損するマウスの DDS による IBD は極めて重症であり、IEL が IBD 発症・進行を統御する事実を明らかにした (J. Immunol. 171 : 5507-5513, 2003)。

D. 考察

- a) 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。腸管粘膜 B 細胞は腸内フローラによる IEC ターンオーバーを統御することが確かめられた。
- b) パイエル板が a-GVHD の発生源であることは、ヒト骨髄移植療法の障害である a-GVHD を回避する手段開発に重要である。 $\gamma\delta$ -T 細胞は未だその生理的機能が解明されていない T 細胞であり、NK 細胞と同様に自然免疫と獲得免疫の中間に位置す

ると考えられている。腸管粘膜最前線に位置する $\gamma\delta$ -IEL が DSS 腸炎に何らかの役割を担うことが明らかにされたことによって、 $\gamma\delta$ -T 細胞機能解明に寄与する進展が期待される。

E. 結論

- a) 腸内フローラ/B 細胞/IEC 発達分化の機能的連結の一端が明らかとなった。
- b) 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。
- c) パイエル板の特殊な生理的機能 (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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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

2. 学会発表

- 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.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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 25th Annual Meeting 2003.9.19~23.
- 6) 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⁺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, 斎藤厚: 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.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
特になし

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

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

研究要旨

本研究では、我々が独自に開発した超微小ビーズ担体「ミラクルビーズ」を用い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単離のための基礎知見を得ることを目的とした。低分子化合物への結合分子単離が可能であったことから、本方法による生体受容体単離技術が有効であることを示したとともに、続いて腸管病原大腸菌 (EPEC) の病原因子 EspB に結合する生体側受容体の同定に成功した。本研究成果は、低分子化合物を用いて生体反応の制御機構を解析するケミカルバイオロジーに大いに貢献することが期待されるとともに、大腸菌毒素など高分子タンパク質に対する受容体同定のための基礎知見が得られたことで、アレルギー抗原となる高分子物質に対する生体受容体単離の技術基盤としてもきわめて重要である。今後の食物アレルギー発症機構に関わる生体受容体の同定、機能解明を通じて、治療に直結する新規知見の探索に有力な技術基盤を提供する研究成果であると考えている。

A. 研究目的

食物アレルギーの発症機構は不明である。腸管腔内抗原の一部は、腸管上皮の特異的な受容体に結合することにより intact macromolecule として細胞内を輸送され血中に至り、アレルギー性疾患の誘因となると考えられる。このようなアレルギー反応の最前線である食餌性および腸内細菌性抗原に対する受容体の単離は、現在ブラックボックスとなっている食餌性/腸内細菌性抗原に対する腸管粘膜および全身性免疫の免疫統御機構を解明する端緒を開くと考えられる。しかしながら、個々の食餌性/腸内細菌性抗原に対応する生体受容体の単離はほとんどなされていないのが現状である。これは、生体受容体の単離が従来の方法では極めて困難であったことに起因する。我々が開発した超微小ビーズ担体「ミラクルビーズ」は、従来のアフィニティビーズ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。今回の研究では、この「ミラクルビーズ」により腸管上皮細胞に発現する食餌性/腸内細菌性抗原の生体受容体を単離するための基礎的知見を蓄積することを目的とした。

B. 研究方法

スチレンを芯に持ち表面をグリシジルメタクリレートで覆われた SG ビーズ「ミラクルビーズ」をアフィニティクロマトグラフィの担体として構

築した。食餌性/腸内細菌性抗原・peptide の「ミラクルビーズ」への固定化、およびそれを用いた生体受容体精製の条件設定のためのモデル実験系として、1) 夾雑物の混入する粗抽出液から極微量の標的分子の生成が可能か否かを検討するため、NFκB 阻害剤である E3330 を固定化した beads を用いて受容体単離を試みた。2) SG ビーズに、腸管病原大腸菌 (EPEC) の病原因子の一つである分泌蛋白 EspB の組換え蛋白を固定化し、細胞粗抽出液からじかに毒素の標的となる生体分子をアフィニティ精製することを試みた。

(倫理面への配慮)

本研究においては、ヒト T 細胞から株化された Jurkat 細胞およびヒト大腸癌由来 HT29 細胞をもちいており、ヒトから採取した臨床材料はもちいておらず、また遺伝子情報の解析も行っていないために、倫理面での問題はないと思われる。

C. 研究結果

1) 低分子化合物 E3330 が標的とする生体分子の一つとして核内レドックス因子 Ref-1 を同定した。また Ref-1 が転写因子 NF-κB の 62 番目のシステイン残基を還元しその DNA 結合能を活性化すること、および E3330 が Ref-1 に結合してその還元活性を抑制することにより NF-κB の活性化を阻害することを明らかにし、実際に「ミラクルビーズ」による生体受容体単

離が微量蛋白の検出・同定に有効であることを示した。

- 2) 腸管病原大腸菌 (EPEC) の病原因子 EspB に対するアフィニティ精製画分には多くの夾雑物が含まれ、EspB と選択的に結合する生体分子の検出は低分子化合物の受容体単離に比較し困難が伴った。そこで、EspB の蛋白の SG ビーズへの固定化方法すなわちリンカー分子の連結によるビーズ固定の導入や、EspB 蛋白固定化量の最適化など詳細な条件検討を重ねることにより、EspB に結合する生体側受容体 (特許申請中であり EspB 結合蛋白とのみ表記) を同定することが可能であった。
- 3) EspB 結合蛋白と tag 配列との融合蛋白発現系および recombinant EspB 結合蛋白の精製をおこなった。また、これを用いた GST pull down 法による検討の結果、EspB と EspB 結合蛋白が特異的に結合することが明確になった。

D. 考察

低分子化合物を固定化した SG ビーズは、レセプター研究に汎用的に威力を発揮するので、今後低分子化合物を用いて生体反応の制御機構を研究する学問分野であるケミカルバイオロジーに大いに貢献することが期待される。また、大腸菌毒素などの高分子タンパク質を固定化した 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ものと考えた。

E. 結論

大腸菌毒素や食品に含まれる物質に対する生体側の受け手であるレセプターを単離同定する技術を確認した。今後は感染疾患や食物アレルギー疾患などの発症機構に関わるこれら生体受容体の同定、およびその機能解明を通じて、治療に直結する新規知見の探索に有力な技術基盤を提供する研究成果であると考えられた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

- 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.

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

研究要旨

本研究では食物アレルギーにより誘導される Th2 型免疫反応が Th1 型免疫反応を主体とする慢性腸炎治療への可能性を特に新規共刺激分子系(Costimulatory Molecules)の関与を中心に追究した。Th1 型免疫反応を主体とする病態にも、Th2、Tr1 型免疫反応の誘導可能な ICOS 陽性細胞集団が存在することが明らかとした。すなわち、食物アレルゲンなど有望な Th2 インデューサーを同定し、応用することはアレルギー疾患の治療のみならず、Th1 型優位な慢性大腸炎の新規治療法の開発の可能性が示唆された。さらに、PD-1 システムは、炎症性腸疾患モデル Th1 型 CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞 SCID マウス移入腸炎およびヒト炎症性腸疾患に関与し、抑制性の機能ばかりではなく、刺激系システムが未知の PD-1 類似分子と B7-H1 間で成立することを証明した。さらに、Th1 型 CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞 SCID マウス移入腸炎およびアレルギーモデル Th2 型 OVA TCR Tg マウスへの OVA 経口投与モデルでは PD-1 と CD25 は明瞭に区別され、アレルギー型免疫反応は我々が見いだした新規の CD4⁺PD-1⁺CD25⁻制御性 T 細胞によりコントロールされる可能性が示唆された。以上、食物アレルゲンより誘導される Th2 型免疫反応として、ICOS/PD-1 といった共刺激系分子の関与し、これらの免疫機構を応用した新たな治療戦略が期待された。

A. 研究目的

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っている可能性が考えられている。食物アレルギーにより誘導される Th2 型免疫反応が健常状態に引き起こされるとアレルギーという病態に直結すると考え、本研究では、経口抗原により誘導した Th2 型免疫反応が Th1 型免疫反応を主体とする慢性腸炎治療に可能性かどうかを追究する目的で基礎検討を行った。特殊な環境・刺激下において、Th2 型のみならず、Tr1 型制御性 T 細胞の誘導機構に関する検討を行った。本分担者はアレルギーという免疫反応の導入に関連した活性化システムとして、共刺激分子系(Costimulatory Molecules)の関与をフォーカスに検討を行った。すなわち、Th1<Th2 反応に主に関与する Inducible costimulator (ICOS)分子、さらには免疫抑制系に主に関与する Programmed death-1 (PD-1)分子の経口免疫寛容、食物アレルギー反応の関与を追求し、慢性大腸炎治療を応用することを試みた。さらに、従来より、主に Th1 型自己免疫反応を抑制する制御性 T 細胞 CD4⁺CD25⁺細胞に代わる Th2 型アレルギー反応を制御する新たな細胞集団の同定に挑戦した。

B. 研究方法

1) OVA TCR トランスジェニックマウス(OVA Tg)

へ単回の OVA 懸濁液経口投与を行い、経口免疫寛容誘導を行い、Th1/Th2/Tr1 型サイトカインの変動を検討した。さらに、Tr1 型経口免疫寛容が成立したマウスに対し、Th1 型慢性大腸炎モデル (TNBS 大腸炎) の誘導を試みた。10 回の OVA 懸濁液経口投与を行い、Th2 型アレルギーモデルの作製を行い、Th1/Th2/Tr1 型サイトカインの変動を脾細胞、小腸パイエル板細胞にて検討した。さらに、Th2 型アレルギー状態にあるマウスに対し、Th1 型慢性大腸炎モデルを誘導した。体重、組織学的、サイトカイン産生を用いて検定した。

2) 上記 2 モデルにおいて、ICOS 分子発現を検討した。ICOS 欠損マウスでの経口免疫寛容、アレルギー性腸炎の誘導を試みた。体重、組織学的、サイトカイン産生を用いて検定した。

3) 慢性大腸炎モデル、CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞 SCIN マウス移入モデルを BALB/c マウスをドナー、C.B-17 SCID マウスをレシピエントとして作成した。ICOS/B7-RP-1 システム、PD-1/PD-1 ligand (B7-H1, B7-DC) システムの関与を追求する目的に、腸炎発症マウス、正常マウス大腸における ICOS、B7-RP1、PD-1、B7-H1、B7-DC の発現をモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー、免疫組織化学染色にて検討した。

4) さらに、同腸炎誘導時より抗 ICOS 抗体、抗 B7-RP1 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 B7-H1 抗体、抗 B7-DC 抗体を投与し、腸炎進展の変化を臨床症状、病理組織、浸潤リンパ球数、Th1/Th2/Tr1 サイトカイン産生能を比較検討した。さらに、ICOS に関して、ICOS^{-/-}、ICOS^{+/-} マウス由来 CD4⁺CD45RB^{high} 細胞を移入、腸炎発症を比較検討した。

5) 視点をまったく変え、正常マウス脾臓 CD4⁺細胞における恒常状態での PD-1 分子の発現をフローサイトメトリーにて検討し、同細胞の制御性 T 細胞としての機能を、制御性 T 細胞マーカー；CD25、GITR、CTLA-4、FoxP3 の発現、細胞増殖活性、細胞増殖抑制活性を *in vitro* にて検討した。

6) OVA T 細胞受容体トランスジェニック(Tg)マウスに 10 回の OVA 懸濁液経口投与を週 1 回のペースで行い、Th2 型アレルギー性腸炎下痢モデルを昨年度同様に作製し、同時に、3)で得られた CD4⁺PD-1⁺ CD25⁻制御性 T 細胞(従来の制御性細胞)または CD4⁺ PD-1⁻CD25⁺T 細胞を投与することによりアレルギー性腸炎の発症進展への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

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) OVA 少数回、経口投与により、OVA ペプチドに対する増殖反応性およびサイトカイン産生能の低下を認め、Tr1 型経口免疫寛容の成立を確認した。さらに、このような生体側のコンデションでは 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 型免疫反応が優位となり、アレルギー性大腸炎の発症を誘導した。このような生体側のコンデションでは Th1 型 TNBS 大腸炎の発症を抑制するのみならず、Th2 型アレルギー性腸炎の病態を改善することを明らかとした。

2) ICOS 分子は上記 2 モデルにおいて、小腸パイエル板、粘膜内リンパ球 CD4 陽性 T 細胞に強い発現を認めた。さらに B7RP-1 は CD4 陽性 T 細胞を取り囲むように抗原提示細胞に発現を認めた。OVA Tg x ICOS 欠損マウスにおいて上記、Th2 型反応、Tr1 反応いずれも誘導が著しく障害を受け、免疫寛容は成立せず、アレルギー

性腸炎は発症しなかった。

3) CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞 SCID マウス移入腸炎発症マウスでは ICOS は CD4⁺細胞に、B7-RP1 分子はマクロファージ、樹状細胞に、PD-1 は CD4⁺細胞に、B7-H1 分子は CD4⁺細胞、マクロファージ、樹状細胞に、B7-DC 分子は樹状細胞に高発現を認めた。正常マウスでは ICOS、PD-1 いずれも発現を認めなかった。

4) 抗 ICOS 抗体投与により、体重減少が有為に抑制され、組織学的にも著明に改善を認めた。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^{-/-}マウス由来 CD4⁺CD45RB^{high} 細胞移入においては、ICOS^{+/-}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。

5) 抗 PD-1 抗体、抗 B7-H1 抗体、抗 B7-DC 抗体投与の検討では、抗 B7-H1 抗体および抗 B7-H1 抗体+抗 B7-DC 抗体投与群に腸炎発症抑制機能を有するのに対し、抗 PD-1 抗体および抗 B7-DC 抗体単独投与群には認めなかった。さらに、抗 B7-H1 抗体および抗 B7-H1 抗体+抗 B7-DC 抗体投与群では粘膜内リンパ球からの Th1 サイトカイン、IL-2、IFN-g、TNF-a 産生の有意な減少を認めた

6) 正常マウス脾臓 CD4⁺細胞において PD-1 は恒常的に約 5% の集団に発現を認め、約半数は CD25 陽性、約半数が陰性であった。さらに、CD4⁺PD-1⁺CD25⁻、CD4⁺PD-1⁺CD25⁺いずれの集団も GITR、CTLA-4、FoxP3 の発現を認め、さらに自らアナジー状態で、他の CD4⁺細胞の増殖も有意に抑制し、特に CD4⁺PD-1⁺CD25⁻細胞は新たな制御性 T 細胞機能を有することを見いだした。

7) OVA TCR Tg Th2 型アレルギー腸炎モデルでの CD4⁺PD-1⁺制御性 T 細胞または CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞を投与実験より、CD4⁺PD-1⁺CD25⁻制御性 T 細胞に強い発症抑制効果を認めたのに対し、従来の CD4⁺PD-1⁻CD25⁺制御性 T 細胞には認めなかった。

D. 考察

Th1 型免疫反応を主体とする病態にも、Th2、Tr1 型免疫反応の誘導可能な ICOS 陽性の細胞集団が存在することが明らかとされた。特殊の刺激下においては Tr1 型免疫反応も選択的に誘導され、腸炎発症抑制効果を認めた。さらに、腸炎発症後での Th1 型反応を Th2 や Tr1 型免疫反応へのシフ

トを誘導可能であるかは今後の検討課題である。今後、ヒト炎症性腸疾患を含む慢性腸炎における特定の外来抗原（食物抗原、腸内細菌抗原）、自己抗原が明らかでない現状において、食物アレルギーなど有望な Th2 インデューサーを同定し、応用することはアレルギー疾患の治療のみならず、Th1 型優位な慢性大腸炎を含む自己免疫疾患の新規治療法の開発の可能性が示唆された。さらに、PD-1/PD-L システムは、炎症性腸疾患モデル Th1 型 CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞 SCID マウス移入腸炎およびヒト炎症性腸疾患に関与し、従来から言われてきた抑制性の機能ばかりではなく、刺激系システムが未知の PD-1 類似分子と B7-H1 間で成立することが推察された。このことは、CD80/CD86 分子対し、刺激系分子 CD28 と抑制系分子 PD-1 の相反する 2 分子が存在することに似て興味深い成績と言える。さらに、Th1 型 CD4⁺CD45RB^{high} T 細胞 SCIN マウス移入腸炎およびアレルギーモデル Th2 型 OVA TCR Tg マウスへの OVA 頻回経口投与モデルでは PD-1 と CD25 は明瞭に区別し、すなわち、Th1 型免疫反応は CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞に、Th2 型免疫反応は我々が見いだした新規の CD4⁺PD-1⁺CD25⁻制御性 T 細胞によりコントロールされる可能性が示唆された。

E. 結論

食物アレルギーより誘導される Th2 型免疫反応として、ICOS/PD-1 といった共刺激系分子の関与が示唆され、これらの免疫機構を応用した新たな治療戦略が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, 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**. (in press)

2. 学会発表

- 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。）

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

特になし

