

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成17年(2005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.	研究総括と NALT・GALT に代表される呼吸器・粘膜免疫機構のアレルギーへの関与の基礎研究と粘膜-全身免疫クロストークについての検討	
	清野 宏	5
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難治化に関する研究	
	黒野 祐一	21
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV.	研究成果の刊行物・別刷り	31

総括研究報告

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）
総括研究報告書

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

主任研究者 清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：粘膜免疫を基点としたクロストークを解明する目的で基礎系（3名）と臨床系（1名）の各研究者の個別研究を推進し、随時有機的・横断的協同研究体制を使ってその目的達成に向けて研究を推進した。その結果、IL-12p70DNA、CpG、Peptide 25、MICAなどの遺伝子、分子を粘膜免疫調整因子としてアレルギー発症の制御に応用できる可能性を示唆することが出来た。特に、粘膜面からの投与により、他の粘膜関連臓器、末梢組織など遠隔でのアレルギー症状抑制効果などが期待できる結果も得ており、粘膜免疫基点免疫療法の可能性についても提示出来た。

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
黒野 祐一 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

A. 研究目的

アレルゲンの最初の取り組み部位である呼吸器・消化器粘膜面には巧妙かつダイナミック粘膜免疫システムが存在している。粘膜免疫システムは外部環境と体内環境の接点としてアレルゲンに代表される色々な異種抗原を識別し、必要性に応じてその積極的排除や無視・無応答を行っている。その誘導・制御は当然アレルギーの発症に深く関与する。そこで、本研究計画では粘膜免疫系を基点とした全身系と皮膚系免疫統御系の解明を進め、アレルギーにおける呼吸器・消化器など粘膜で被われた臓器特異性免疫応答の異常のみならず、それによる全身免疫と皮膚免疫システム破綻の過程について実証的な理論構築を行う。これを基盤としてアレルギーの予防・治療につながる粘膜免疫機構から全身免疫と皮膚免疫を制御する「粘膜免疫基点免疫療法」開発に向けて基礎的情報を提供する。

B. 方法

粘膜免疫システムを基点としたアレルギーの誘導・制御機構の解明を進め、その予防・治療に結びつく「粘膜免疫基点免疫療法」開発に向けて基礎系3名と臨床系1名による共同研究体制のもとで研究を開発している。

- 1) 本研究計画では、粘膜免疫学領域で先導的研究を展開している東大・清野は主任研究者として研究全般の総括と呼吸器粘膜免疫(NALT)を基点としたアレルギー制御についての解明に従事している。特にアレルギー性下痢モデルを駆使してNALTを介したクロスネットワークシステムによるアレルギー予防・治療法確立へ向けての研究を展開している。
- 2) 広島大・高橋は環境ストレス応答分子であるMICA/NKG2Dや粘膜系サイトカインとして注目されるIL-15での腸管免疫への影響を検討しているが、アレルゲンを環境ストレスとして考え臓器特異性を代表する腸管T細胞のアレルギー制御への関与の観点から研究を進めてい

- る。
- 3) 東大・高津は IL-5 シグナル伝達による好酸球制御と IgA⁺B 細胞誘導機構についての世界的第一人者であり、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に代表される分子細胞ネットワークの解明を進めている。
 - 4) 鹿児島大・黒野は臨床的観点からヒト NALT が存在する上気道粘膜における吸入アレルゲン抗原、自然免疫分子の上皮細胞、好酸球などへの影響を検討している。

C. 結果

- 1) 清野班: アレルギー性下痢誘導マウスの病態形成に大腸上皮細胞ならびにその周囲に存在する抗原提示細胞群が IL-12p40 を発現・産出し、局所における異常な Th2 型誘導環境形成に関わっている事が提示された。そこで IL-12p70 のプラスミド経鼻投与を行うと下痢の発症が強く抑えられ、またその症状の有意な軽減も見られた。予防効果だけではなくアレルギー性下痢発症が起きているマウスにおいても IL-12p70 DNA 経鼻投与の治療効果が認められた。同時に施術した空のインサートの DNA プラスミド投与では下痢は遺伝子治療なしと同等に発症することから、この予防・治療効果は IL-12p70 の遺伝子発現によるものである。また、この遺伝子治療による蛋白の発現を共焦点顕微鏡等で観察したところ確かに DNA プラスミドの経鼻投与により大腸にその遺伝子の蛋白発現が認められその産生細胞は樹状細胞であった。
- 2) 高橋班: 当研究班が開発してきた腸炎発症 T 細胞レセプター α 鎖欠損マウス、腸管局所発現 IL-15 トランスジェニック・マウス、腸管局所発現 MICA トランスジェニックマウスの三つのユニークなモデルを駆使して、腸管上皮細胞に生体のレベルで強発現させた 2 重変異の遺伝子改変動物などを作製し、腸管環境因子変化に対する病態形成 T 細胞、IL-15 そして MICA 三者間相互作用について検討を進めてきた。その結果、粘膜系サイトカインとして注目されている IL-15 は病態形成 T 細胞誘導に関与する事が示唆された。一方 MICA には炎症制御効果がある事を初めて提示する事が出来た。
- 2) 高津班: 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、1) 新規 Th1-Th2 細胞バランス調節因子開発、2) マスト細胞を標的とした Link ファミリーアダプター分子制御、3) 粘膜系サイトカインによるアレルギー制御、という 3 つの異なる方向から多面的なアプローチを試みた。そこで Peptide-25 と I-A^b 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 (P25 TCR-TG) を用いて、未熟 T 細胞から Th1 への分化に TCR シグナルが極めて重要であることを示した。さらに CpG が Th2 誘導に抑制的に作用するのみならず B 細胞への直接作用による IgE 産生の抑制に起因することを示した。Lnk ファミリーアダプター分子である APS 遺伝子導入マウスを用いて、マスト細胞の接着や遊走に APS が重要な役割も果たすことを明らかにした。IgE 刺激に対応しマスト細胞は Th2 サイトカインを産生すること、その中で GM-CSF と IL-5 は好酸球の生存を延長し MIP-1 \cdot や MIP-1 \cdot は好酸球の炎症局所への遊走を促進することを初めて示した。
- 4) 黒野班: 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。その結果 IL-8 の上昇が認められた。また、VEGF はアレルギー性鼻炎、アレルギー性鼻炎を合併する副鼻腔炎、化膿性副鼻腔炎の順で高値を示した。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、エンドトキシンや IL-1 \cdot 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 を用いて測定したところ、

濃度依存性に遺伝子レベルそして蛋白レベルで IL-8 を産生した。さらにゲルシフトアッセイにより、転写活性因子である NF- κ B の活性化関与を観察した。VEGF に関しては、低酸素下の培養で有意に上昇した。エンドトキシンと低酸素の両方で刺激すると、VEGF 産生において相乗効果が認められた。

D. 考察

本研究計画をとおしてアレルギーの予防・治療へ向けての粘膜免疫システムの応用性を強く示唆する結果を得ることが出来た。例えば、食物アレルギーの予防・治療に関しては粘膜免疫クロスネットワークシステムを使った呼吸器 NALT を介した大腸でのアレルギー応答制御の可能性を提示する新知見を得た。大腸における過度な Th2 型応答に対して IL-12p70 DNA, CpG または Peptide-25 を経粘膜投与という手段で予防・治療効果を期待出来る可能性が示唆された。さらにストレス誘導性恒常性逸脱化シグナル MICA が粘膜での炎症制御効果がある事も示唆され今後の展開が期待される。一方で粘膜でのアレルギー反応・炎症に関して、粘膜系サイトカインである IL-15 による病態形成性 T 細胞誘導や自然免疫シグナルを介した粘膜における IL-8 や VEGF の異常産生の関与が提示され、今後の予防・治療ターゲットとしての研究の展開を進める事が大切であろう。

E. 結論

基礎系・臨床系各々の研究分担者からの研究効果が、有機的に結びつき、粘膜免疫クロスネットワークシステムを応用したアレルギー予防・治療に向けた新しい「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事が出来た。具体的には、IL-12p70 DNA, CpG, Peptide 25, MICA などの遺伝子・分子が粘膜免疫調節因子としてアレルギーの発症制御に応用出来る可能性が示唆された。その一

連の成果を反映する様に、既に本研究計画に関連する 21 編の論文が国際学術誌 (PNAS, J. Exp. Med., J. Immunol.) に発表された。

F. 健康危険情報 なし

G. 文献

1. Hino, A., Kweon, M-N., Fujihashi, K., McGhee, J.R., and Kiyono, H. 2004. Pathological role of large intestinal IL-12p40 for the induction of Th2-type allergic diarrhea. *Am. J. Pathol.* 164: 1 3 2 7 - 1 3 3 3
2. Jang, M-H., Kweon, M-N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, G., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, K., and Kiyono, H. 2004. Intestinal villous M cells: a new antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Asso. Sci.* 101:6110-6115
3. Shikina, T., Hiroi, T., Iwatani, K., Jan, M-H., Fukuyama, S., Tamura, M., Kubo, T., Ishikawa, H. and Kiyono, H. 2004. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J. Immunol.* 172:6259-6264
4. Yamamoto, M., Kweon, M-N., P-D, Rennert, Hiroi, T., Fujihashi, K., McGhee, R-J., and Kiyono, H. 2004. Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antigen-specific intestinal IgA immunity. *J. Immunol.* 173:762-769
5. Ohmura-Hoshino, M., Yamamoto, M., Yuki, Y., Takeda, Y., and Kiyono, H. 2004. Non-toxic Stx derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for mucosal immunity.

- Vaccine 2: 3751-3761
6. Nochi, T., Yuki, Y., Terahara, K., Hino, A., Kunisawa, J., Kweon, M-N., Yamaguchi, T. and Kiyono, H. 2004. Biological role of Ep-CAM in the physical interaction between epithelial cells and lymphocytes in intestinal epithelium. *Clin. Immunol.* 113:326-339
 7. Mizushima, T., Ito, T., Kishi, D., Kai, Y., Tamagawa, H., Nezu, R., Kiyono, H. and Matsuda, H. 2004. Therapeutic effects of a new lymphocyte homing reagent FTY720 in interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 10:182-192
 8. Ueta, M., Nochi, T., Jang, M-H., Park, E-J., Igarashi, O., Hino, A., Kawasaki, S., Shikina, T., Hiroi, T., Kinoshita, S. and Kiyono, H. 2004. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J. Immunol.* 173:3337-3347
 9. Yoshino, N., Lu, X-S., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Kataoka, K., Lu, D., Hirst, L., Honda, M., F.W. van Ginkel., Takeda, Y., Miller, C. J., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2004. A novel adjuvant for mucosal immunity to HIV-1 gp120 in nonhuman primates. *J. Immunol.* 173:6850-6857
 10. Kubo-Akashi, C., Iseki, M., Kweon, S-M., Takizawa, H., Takatsu, K., and S. Takaki, S. Roles of conserved family of adaptor proteins, Lank, SH2-B and APS for mast cell development growth and functions: APS-deficiency causes impaired degranulation. 2004. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:356-362
 11. 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
 12. Tamura, T., Ariga, H., Kinashi, T., Uehara, S., Kikuchi, T., Nakada, M., Tokunaga, T., Xu, W., Kariyone, A., Saito, T., Kitamura, T., Maxwell, G., Takaki, S. and Takatsu, K. 2004. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell recetpro transgenic model. *Int. Model. Int. Immunol.* 6: 1691-1699
 13. Moon, B-Y., Takaki, S., Miyake, K. and Takatsu, K. 2004. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J. Immunol.* 172:6020-6029
 14. Kobayashi, R., Kohda, T., Kataoka, K., Ihara, H., Kozaki, S., Pascual, DW., Staats, HF., Kiyono, H., McGhee, JR. and Fujihashi, K. 2004. A novel botulinum neurotoxoid vaccine prevents mucosal botulism. *J. Immunol.* (in press)
 15. Kai, Y., Takahashi, I., Ishikawa, H., Hiroi, T., Mizushima, T., Kishi, D., Hamada, H., Tamagawa, H., Ito, T., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Matsuda, H. and Kiyono, H. 2004. Colitis in mice lacking common cytokine receiptpr chain is mediated by IL-6-producing CD4+ T cells. *Gastroenterology.* (in press)
 16. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Rennert, P. D., Park, E-J., Lee A-Y., Chang, S-N., Hiroi, T., Nanno, M. and Kiyono, H.

分担研究報告書

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

NALT・GALTに代表される消化器・呼吸器粘膜免疫機構のアレルギーへの関与についての基礎研究

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 日野 綾子 東京大学医科学研究所

研究要旨：本研究計画の目的である粘膜免疫系を基点とした全身系に代表される他の免疫システムクロストークを解明し、アレルギー発症とその予防・治療に向けた新規基礎情報を提供することを目指して研究を推進してきた。特に、当研究班が開発したアレルギー性下痢モデルマウスを駆使して病態形成における全身系と粘膜系クロストークシステムの存在を明らかにする事が出来た。さらに、その発症に大腸局所における IL-12p40 の異常発現が極度のアレルギー誘導型 Th2 環境形成に関わっている事を証明した。さらに NALT を介した大腸粘膜免疫制御という新しい概念とそれを応用したアレルギー予防・治療法開発への可能性を提示した。

A. 研究目的

当研究班が開発したアレルギー性下痢モデルを駆使した全身系免疫と粘膜免疫間におけるクロストークの存在とその制御機構を明らかにする。さらに、粘膜免疫間クロストーク（例：NALTからの腸管免疫制御）の存在とそれを応用した新規アレルギー予防・治療法開発へ向けた基礎的情報を提供する。

B. 方法

アレルギー性下痢発症マウスモデルを駆使して、全身系免疫（例：脾臓）由来病態形成性 Th2 型細胞の大腸への選択的移動とその結果としてのアレルギー性下痢誘導のメカニズムを解明する為に、Th1 型・Th2 型誘導バランスに関与する IL-12 に標的を絞り検討を進めた。Th2 型誘導に関与する IL12p40 の異常発現が関与するがアレルギー症状がアレルギー症状が顕著な大腸を中心として解析した。次に IL-12p40 に拮抗する IL-12p70 のプラスミドを経鼻投与を施し、そのときの下痢の発症率また下痢の症状に伴ってみられる大腸での異常反応を測定しその治療効果を検討した。また下痢をすでに発症してしまったマウスに同様に IL-12p70 のプラスミド経鼻投与し、その治癒が見られるかを観察した。

（倫理面への配慮）

本研究計画では、主に実験用マウスならびに同動物から分離した細胞を使用してアレルギー

ーにおける粘膜免疫の関わりを検討した。実験用マウス使用にあたっては独立法人・国立大学実験動物施設協議会指針に基づいた実験を行った。また、東京大学動物実験施設の定める指針に準じて動物愛護上の配慮なども含めて適正に実施された。

C. 結果

我々は食物抗原によって引き起こされる BALB/c マウスのアレルギー性下痢のモデルの確立に成功し、その下痢誘導には大腸における IL-12p40 の高発現が重要な役割をしていることを示した。さらにその治療方法として IL-12p40 と拮抗して働く IL-12p70 の遺伝子治療法を開発し、その効果について確認出来た。IL-12p70 のプラスミド経鼻投与を行うと下痢の発症が強く抑えられ、またその症状の有意な軽減も見られた。予防効果だけではなくアレルギー性下痢発症が起きているマウスにおいても IL-12p70 DNA 経鼻投与の治療効果が認められた。同時に施術した空のインサートの DNA プラスミド投与では下痢は遺伝子治療なしと同等に発症することから、この予防・治療効果は IL-12p70 の遺伝子発現によるものである。また、この遺伝子治療による蛋白の発現を共焦点顕微鏡等で観察したところ確かに DNA プラスミドの経鼻投与により大腸にその遺伝子の蛋白発現が認められその産生細胞は樹状細胞であった。

D. 考察

ウイルスのような侵入性の媒体に入れない DNA 遺伝子の状態でも経粘膜投与することによって遠隔の粘膜面でもその遺伝子の蛋白質が有意に発現していることが明らかになった。またこの遺伝子治療によって粘膜面でみられるアレルギー病状の強い軽減が認められた。このアレルギー疾患が大腸における抗原提示細胞等による IL-12p40 の高発現によって引き起こされているため、遺伝子治療によって樹状細胞が発現する IL-12p70 によってすみやかに病状が押さえられていると考えられる。

E. 評価

- 1) 達成度：粘膜系の食物アレルギー誘導への関与については、アレルギー性下痢モデルと評価される新規実験動物モデルを開発する事が出来た。それを駆使して全身系と粘膜免疫系クロストークの存在と病態形成への関与を明らかにする事が出来た。さらに、IL-12p40 が Th2 型アレルギー性下痢誘導に強く関与する事がわかり、それを標的とした経粘膜 DNA 療法の可能性を提示出来た。
- 2) 学術的・国際的・社会的意義：食物アレルギー発症における全身系と粘膜系両免疫システムが関与している事が明らかになり、さらに腸管由来 IL-12p40 が病態形成に深く関わっている事が明らかになり、新規視点からのアレルギー発症メカニズムとして評価され、キーストンカンファレンスなどに招待講演の機会を得た。また、新しい治療戦略とも言える NALT を標的とした経鼻 DNA 投与によるアレルギー予防・治療の可能性を提示する事が出来た。
- 3) 今後の展望：粘膜免疫クロストーク（例：NALT からの腸管免疫制御）を応用した。経鼻免疫による食物アレルギーの予防・治療へ結びつく結果を得る事が出来た。今後はその安全性について検討し、ヒトに近い霊長類を使ってその効果を検証する必要がある。
- 4) 研究の効率性について：順調に目的達成に向けて研究を推進する事が出来た。強いて言えば、皮膚免疫系とのクロストークについて、もう少し進展が必要であっ

た。しかし、総合的には論文発表そしてその成果の臨床への応用性などについて結果を出す事が出来た。

F. 結論

本研究において、粘膜免疫クロストークシステムを応用したアレルギー疾患に対する予防ならびに治療効果も期待できる遺伝子治療法開発への可能性がある新しい知見を得ることができた。本経鼻投与はウイルス等の媒体も使用しないことから患者の負担もかけずに副作用も少ないサイトカイン治療法として期待できる。

F. 健康危惧情報 なし

G. 研究発表

1. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F.W. van Ginkel., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., J.R. McGhee. and Kiyono, H. 2002. A non-toxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE Ab. *J. Infect. Dis.* 186: 1261-1269.
2. Fukuyama, S., Hiroi, T., Yokota, Y., Rennert, P.D., Yanagita, M., Kinoshita, N., Terawaki, S., Shikina, T., Yamamoto, M., Kurono, Y. and Kiyono, H. 2002. NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT \cdot 1 \cdot 2/LT \cdot R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3 $^{-}$ CD4 $^{+}$ CD45 $^{+}$ cells. *Immunity* 17:31-40.
3. Sakaue, G., Hiroi, T., Nakagawa, Y., Someya, K., Iwatani, K., Sawa, Y., Takahashi, H., Honda, M., Kunisawa, J. and Kiyono, H. 2002. HIV mucosal vaccine: nasal immunization with gp160 encapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J. Immunol.* 170:495-502.
4. Watanabe, I., Hagiwara, Y., Kadowaki, S., Yoshikawa, T., Komase, K., Aizawa, C., Kiyono,

- H., Takeda, Y., McGhee, J. R., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T. and Tammura, S. 2002. Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine*. 20: 3443-3455
5. Kawahara, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Hiroi, T., Kiyono, H., Matsumoto, S., Yamada, T., Yamamoto, N. and Honda, M. 2002. Combined intrarectal/intradermal inoculation of recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66.
6. Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., Yamamoto, H. and Ishikawa, H. 2002. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.* 168 : 57-64.
7. Kunisawa, J., Takahashi, I., Okudaira, A., Tsutsumi, Y., Katayama, K., Hiroi, T., Nakagawa, S., Kiyono, H. and Mayumi, T. 2002. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen. *Eur. J. Immunol.* 32 :2347-2355.
8. Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and Kiyono, H. 2002. IL-15 induced CD8⁺ NK1.1⁺T cells in the development of small intestinal inflammation in T3b-IL-15 Tg mice. *J. Immunol.* 169 : 460-468.
9. Kinoshita, N., Hiroi, T., Ohta, N., Fukuyama, S., E. J. Park. and Kiyono, H. 2002. Autocrine IL-15 mediates intestinal epithelial cell death via the activation of neighboring intraepithelial NK cells. *J. Immunol.* 169:6187-6192.
10. Kweon, M-N., Takahashi, I., Yamamoto, M., Jang, M-H., Suenobu, N. and Kiyono, H. 2002. Development of antigen-induced enterocolitis in SCID mice reconstituted with spleen-derived memory type CD4⁺ CD45RB⁺ T cells. *Gut* 50:299-306.
11. Yanagita, M., Shimabukuro, Y., Nozaki, T., Yoshimura, N., Watanabe, J., Koide, H., Terakura, M., Saho, T., Takedachi, M., Jang, M-H., Kiyono, H. and Murakami, S. 2002. IL-15 up-regulates iNOS expression and NO production by gingival epithelial cells. *Biochem. Biophysical. Res. Commun* 297 : 329-334.
12. Takahashi, I., Matsuda, J., Gapin, L., DeWinter, H., Kai, Y., Tamagawa, H., Kronenberg, M. and Kiyono, H. 2002. Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10 deficient mice. *Clin. Immunol.* 102 (3): 237-248.
13. Ueta, M., Kweon, M-N., Sano, Y., Sotozono, C., Yamada, J., Koizumi, N., Kiyono, H. and Kinoshita, S. 2002. Immunosuppressive properties of human amniotic membrane for mixed lymphocyte reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 129 : 464-470.
14. Suenobu, N., Kweon, M-N. and Kiyono, H. 2002. Nasal vaccination induces the ability to eliminate Candida colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of Candida-related atopic dermatitis. *Vaccine*. 20: 2972-2980.
15. Kweon, M-N. and Kiyono, H. 2002. CD40L in auto immunity and mucosally induced tolerance. *J. Clin. Invest.* 109 : 171-173.
16. Boyaka, P. N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R. J., Kiyono, H., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2003. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal

- adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J. Immunol.* 170: 454-462.
17. 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.
18. Yuki, Y. and Kiyono, H. 2003. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* 13: 293-310
19. Okuda, Y., Takahashi, I., Kim, J-K., Ohta, N., Iwatani, K., Kai, Y., Tamagawa, H., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kawano, S., Sasaki, Y., Hori, M., Takeda, K., Akira, S. and Kiyono, H. 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. Pathol.* 162: 263-271
20. 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
21. 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
22. Jang, M-H., 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
23. Kweon, M-N. and Kiyono, H. 2003. Eosinophilic gastroenteritis: a problem of the mucosal immune system? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 79-85
24. Park, E-J., 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
25. Hino, A., Kweon, M-N., Fujihashi, K., McGhee, J.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
26. Jang, M-H., Kweon, M-N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y., and Kiyono, H. 2004. Intestinal villous M cells: A new antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Associ. Sci. USA* 101: 6110-6115
27. Nochi, T., Yuki, Y., Terahara, K., Hino, A., Kunisawa, J., Kweon, M-N., Yamaguchi, T., Kiyono, H. 2004. Biological role of Ep-CAM in the physical interaction between epithelial cells and lymphocytes in intestinal epithelium. *Clin. Immunol.* 113: 326-339
28. Shikina, T., Hiroi, T., Iwatani, K., Jan, M-H., Fukuyama, S., Tamura, M., Kubo, T., Ishikawa, H. and Kiyono, H. 2004. IgA class switch occurs in the organized nasopharynx and gut-associated lymphoid tissue, but not in the diffuse lamina propria of airways and gut. *J. Immunol.* 172: 6259-6264

29. Yamamoto, M., Kweon, M-N., P-D, Rennert, Hiroi, T., Fujihashi, K., McGhee, J.R., and Kiyono, H. 2004. Role of gut-associated lymphoreticular tissues in antigen-specific intestinal IgA immunity. *J. Immunol.* 173: 762-769
30. Ohmura-Hoshino, M., Yamamoto, M., Yuki, Y., Takeda, Y., and Kiyono, H. 2004. Non-toxic Stx derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for mucosal immunity. *Vaccine* 22: 3751-3761
31. Ueta, M., Nochi, T., Jang, M-H., Park, E-J., Igarashi, O., Hino, A., Kawasaki, S., Shikina, T., Hiroi, T., Kinoshita S., and Kiyono, H. 2004. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J. Immunol.* 173: 3337-3347
32. Kiyono, H., and Fukuyama, S. 2004. Nalt-versus peyer's-patch-mediated mucosal immunity. 2004. *Nature Reviews Immunol*4: 699-710
33. Mizushima, T., Ito, T., Kishi, D., Kai, Y., Tamagawa, H., Nezu, R., Kiyono, H. and Matsuda, H. 2004. Therapeutic effects of a new lymphocyte homing reagent FTY720 in interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 10: 182-192
34. Yoshino, N., Lu, F.X., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Kataoka, K., Lu, D., Hirst, L., Honda, M., van Ginke, F.W., Takeda, Y., Miller, C.J., Kiyono, H. and McGhee, J.R. 2004. A novel adjuvant for mucosal immunity to HIV-1 gp120 in nonhuman primates. *J. Immunol.* 173: 6850-6857
35. Kai, Y., Takahashi, I., Ishikawa, Hiroi, T., Mizushima, T., Kishi, D., Hamada, H., Tamagawa, H., Ito, T., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Matsuda, H. and Kiyono, H. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor γ -chain is mediated by IL-6-producing CD4⁺ T cells. *Gastroenterology* (in press)
36. Kobayashi, R., Kohda, T., Kataoka, K., Ihara, H., Kozaki, S., Pascual, D.W., Staats, H.F., Kiyono, H., McGhee, J.R. and Fujihashi, K. A novel botulinum neurotoxin vaccine prevents mucosal botulism. *J. Immunol.* (in press)
37. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Rennert, P.D., Park, E-J., Lee A-Y., Chang, S-N., Hiroi, T., Nanno, M. and Kiyono, H. Prenatal blockage of LT-R and TNFRp55 signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine. *J. Immunol.* (in press)
38. Nonaka, S., Naito, T., Chen, H., Yamamoto, M., Moro, K., Kiyono, H., Hamada, H. and Ishikawa, H. Intestinal γ -T cells develop in mice lacking thymus, all lymph nodes, Peyer's patches and isolated lymphoid follicles. *J. Immunol.* (in press)
39. Kunisawa, J., and Kiyono, H. A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation of first lines of defense. *Cell. Mol. Life. Sci.* (in press)
40. Kunisawa, J., Fukuyama, S., and Kiyono, H. Resemblance and discrepancy of mucosa-associated lymphoid tissues in aerodigestive tract for the orchestration of mucosal immune system. *Curr. Mol. Med.* (in press)
41. Ohmura, M., Yamamoto, M., Tomiyama-Miyaji, C., Yuki, Y., Takeda, Y. and Kiyono, H. 2005. Nontoxic Stx derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via DC activation. *Infect. Immunol.* (in press)
42. Ueta, M., Hamuro, J., Kiyono, H. and Kinoshita, S. 2005. Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to

induc inflammatory cytokines.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press)

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

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た。研究期間の3年間に（1）結核菌の分泌する Ag85B の C-末端側ペプチド（Peptide-25）と I-A^b 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（P25 TCR-Tg）を作出し、そのリンパ球を Peptide-25 刺激すると選択的に Th1 に分化すること、そのシグナルは TCR 刺激に依存することを初めて見出した。（2）Lnk ファミリーアダプター分子である APS の遺伝子欠損マウスやトランスジェニックマウスのマスト細胞を用いて、APS がマスト細胞の脱顆粒、接着や遊走に重要な役割を果たすことを明らかにした。（3）卵白アルブミンに対するアナフィラキシー誘発マウスモデルを樹立し、CpG ODN が抑制的に作用すること、その作用が Th2 生成のみならず B 細胞への直接作用による IgE 産生の抑制に起因することを示した。（4）IgE/アレルゲン 刺激によりマスト細胞はサイトカインやケモカインを産生するが、GM-CSF と IL-5 は好酸球の生存を延長し MIP-1 β や MIP-1 α はその炎症局所への遊走を促進することを初めて示した。

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 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 TCR α 5V β 11 cDNA を用いて、TCR α 5V β 11 発現するトランスジェニック（P25 TCR-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。その骨髓細胞を IL-3 存在下に長期培養し株化マスト細胞（BMMC）を樹立し、マスト細胞の実験に供した。BMMC を IgE/アレルゲン複合体で刺激

した上清を用い、精製好酸球に及ぼす作用を調べた。

C. 研究成果

(1) 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) と I-A^b 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 (P25 TCR-Tg) を作出し、そのリンパ球が Peptide-25 に応答し選択的に Th1 に分化すること、その際 TCR シグナルが主たる役割を果たし、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) APS 遺伝子欠損マウスやトランスジェニックマウスを作出した。APS-Tg マウス由来 BMMC を抗 DNP IgE 抗体と DNP-BSA 刺激しその脱顆粒を野生マウスのそれと比較した。APS 欠損 BMMC は IgE 依存性の脱顆粒に異常を示すことを見出した。この異常は Lnk や SH2-B 欠損マウスでは見られなかった。また、APS-Tg マウスの BMMC を用いて、APS がマスト細胞の脱顆粒、接着や遊走に重要な役割を果たすことを明らかにした。(3) 卵白アルブミンに対するアナフィラキシー誘発マウスモデルを樹立し、CpG ODN が抑制的に作用すること、その作用が Th2 生成のみならず B 細胞への直接作用による IgE 産生の抑制に起因することを示した。(4) IgE 刺激に対応しマスト細胞はサイトカインやケモカインを産生すること、その中で GM-CSF と IL-5 は好酸球の生存を延長し MIP-1 β や MIP-1 α は好酸球の炎症局所への遊走を促進することを示した。

D. 考察

(1) 3年間の研究により、結核菌の分泌する Ag85B の C-末端ペプチド、Peptide-25 に応答する T 細胞の TCR の遺伝子構造が明らかになり、それが Peptide-25 と I-A^b 分子のみを認識して Th1 にのみ分化しうることを見出した。今後、Th1 分化の分子機構

を転写因子レベルで解析したい。(3) APS によるマスト細胞増殖抑制、脱顆粒の抑制、接着亢進の機構を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。

(4) CpG ODN によるアナフィラキシー抑制の機序とその有用性を明らかにしたい。

E. 結論

(1) Ag85B 由来の 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。(2) 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や接着、遊走を制御する。(3) マスト細胞は Fc ϵ レセプターの架橋によりサイトカインやケモカインを放出し好酸球の生存や遊走を制御する。(4) CpG ODN はアレルギー誘発アナフィラキシーを抑制する。

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- γ . *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.
7. Nobuhisa I, M. Takizawa, S. Takaki, H. Inoue, K. Okita, M. Ueno, K. Takatsu, and T. Taga. Regulation of hemat-opoietic development in the Aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein. *Mol. Cell. Biol.* 23: 8486-8494, 2003.
8. 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.
9. 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.
10. Tamura, T., Ariga, H., Kinashi, T., Uehara, S., Kikuchi, T., Nakada, M., Tokunaga, T., Xu, W., Kariyone, A., Saito, T., Kitamura, T., Maxwell, G., Takaki, S., and Takatsu, K. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int. Immunol.* 16: 1691-1699, 2004.
11. Moon, B-Y., Takaki, S., Miyake, K., and Takatsu, K. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *J. Immunol.* 172: 6020-6029, 2004.
12. Hirano, M., Y. Kikuchi, A. S. Nisitani, A. Yamaguchi, A. Sato, T. Ito, H. Iba, and K. Takatsu. Btk enhances transcriptional co-activation activity of BAM11, a Btk associated molecule of a SWI/SNF complexes. *Int. Immunol.* 16: 747-57, 2004.
13. Tanaka, H., M. Komai, K. Nagao, M. Ishizaki, D. Kajiwara, K. Takatsu, G. Delespesse, and H. Nagai. Role of IL-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 31: 62-8, 2004.
14. Moon, B-M., S. Takaki, H. Nishizumi, T. Yamamoto, and K. Takatsu. Abrogation of autoimmune disease in Lyn-deficient mice by the deletion of IL-5 receptor α chain gene. *Cell. Immune.* 228:110-118, 2004.
15. Wen, X., D. Zhang, Y. Kikuchi, Y. Jiang, K. Nakamura, H. Tsurui, K. Takahashi, M. Abe, M. Ohtsuji, H. Nishimura, K. Takatsu, T. Shire, and S. Hirose. Transgene-mediated over-

expression of IL-5 inhibits autoimmune disease, but increases the risk of B-cell chronic lymphocytic leukemia in a model of murine lupus. *Eur. J. Immunol.* 34:2740-2749, 2004.

16. Tamura, T., H. Ariga, T. Kinashi, S Uehara, T Kikuchi, M. Nakada T Tokunaga, Wen Xu, A. Kariyone, T. Saito, T. Kitamura, Gavin Maxwell, S. Takaki, and K. Takatsu. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int. Immunol.* 15: 1691-1699, 2004. (Featured article)

17. Inoue, H., R. Kato, S. Fukuyama, A. Nonami, K. Taniguchi, K. Matsumoto, T. Nakano, M. Tsuda M. Matsumura, M. Kubo, F. Ishikawa, K. Takatsu, Y. Nakanishi, and A. Yoshimura. Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness. *J. Exp Med.* 201: 73-82, 2005.

18. Iseki, M., C. Kubo, S-M. Kwon, A. Yamaguchi, K. Takatsu, and S. Takaki. APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains has a negative regulatory role in B cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* In press, 2005.

19. Ema, H., K. Sudo, J. Seita, A. Maeda, Y. Morita, M. Osawa, K. Takatsu, S. Takaki, and H. Nakauchi. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cell from normal and Lnk-deficient mice. *Dev. Cell* in press, 2005.

2. 学会発表

1. Takatsu K. Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- γ , 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, "ゲノムから個体へ", 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. 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

4. 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

5. 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 細胞のアレルギーへの関与解明に向けての基礎研究

分担研究者： 高橋 一郎 広島大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨：環境ストレス応答分子である MICA/NKG2D の腸管免疫機構への影響を検討した。つまり、アレルギーを環境ストレスとして捉えたユニークな研究計画であり、その目的達成に向けて解明する研究を推進してきた。そして MICA による粘膜炎症制御系が存在し、それを応用してきた。新規予防・治療法の可能性を提示した。我々が独自に開発した腸管局所 MICA 強制発現マウスや腸管局所 IL-15 強制発現マウスなどの遺伝子改変動物を駆使して、アレルギー微生物感染、発がん物質、環境ホルモンなどのストレスの侵襲を絶えず受ける過酷な生体組織、すなわち腸管粘膜における粘膜常在性自己反応性 T 細胞の発達・機能分化のメカニズムとその病因論的な役割を細胞と分子のレベルで解明する。

A. 研究目的

粘膜に好発する慢性炎症・アレルギー疾患の新たな治療・予防戦略を開発する手掛かりとして、慢性腸炎を自然発症する T 細胞レセプター欠損マウス、および我々が独自に開発した腸管局所 MICA 強制発現マウスや腸管局所 IL-15 強制発現マウスなどの遺伝子改変動物を駆使して、微生物感染、発がん物質、環境ホルモンなどのストレスの侵襲を絶えず受ける過酷な生体組織、すなわち腸管粘膜における粘膜常在性自己反応性 T 細胞の発達・機能分化のメカニズムとその病因論的な役割を細胞と分子のレベルで解明する。また粘膜における慢性炎症・アレルギー疾患の劇症化・遷延化に関わる分子基盤を炎症性粘膜より産生される IL-15/MICA/NKG2D の病態生理学的連関を中心に解明する。

B. 研究方法

(1) マウス腸管上皮細胞でのストレス逸脱化シグナル、すなわち NKG2D リガンドの同定を試みる目的で NKG2D テトラマーを作製し、免疫組織化学的にリガンドの解析を試みた。(2)

thymic-leukemia-antigen に由来する T3b プロモーターを使った腸管局所発現性 MICA トランスジェニック (Tg) マウスを作製した。(3) 作製した MICA-Tg マウスの IELs を FACS 法で、クロナタイプについては PCR-SSCP 法で検討した。(4) 腸管局所発現性 MICA-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。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。さらに 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- α , IL-6, MCF-1, IFN- γ , IL-12) の産生を Flow cytometric cytokine bead array 法で検討した。(5) 腸炎発症 T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスの粘膜上皮より産生される腸炎の遷延増悪因子の探索を試みた。(6) 同定した腸炎の遷延増悪化因子を T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスの腸管上皮細胞に生体のレベルで強発現させた 2 重変異の遺伝子改変動物を作製し、その病態を解析した。(7) 消化管粘膜の恒常性逸脱化

シグナル MICA の粘膜炎症制御作用を生体のレベルで解明する目的で、慢性期腸炎発症 T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスから分離した病態形成 T 細胞を腸管局所発現 MICA Tg/RAG2 欠損マウスに養子移入し、移入後の消化管の病態を経時的に観察した。

(倫理面への配慮)

当該研究計画には P2 レベルの組換え DNA 実験を含むが、この点に関して分担研究者は平成 14 年に広島大学学長あてに機関届け出組換え DNA 実験「粘膜標的免疫病の分子医学的解析」の申請手続きを行い、同年 5 月 31 日付けで同実験の施行承認を得ており、問題はない。また当該研究計画に含まれる動物実験は、広島大学自然科学研究支援センター動物実験施設の定める指針に準じて適正に実施されており、動物愛護上の配慮などの問題はない。

C. 研究結果

(1) マウス小腸遠位部および大腸近位部粘膜の陰窩部上皮に NKG2D テトラマーと反応するリガンド、すなわちストレス逸脱化シグナル分子が恒常的に発現していることが明らかになった。また Rae-1 β anti-sense RNA を用いて In situ hybridization 法を用いてその局在を検討したところ、小腸遠位と大腸近位の陰窩部粘膜に Rae-1 β mRNA の発現がみられた。(2) 今回新規に作製した MICA-Tg マウスでは小腸 IELs において CD4CD8 $\alpha\alpha'$ $\alpha\beta$ T 細胞の発達が亢進していた。この CD4⁺CD8 $\alpha\alpha'$ $\alpha\beta$ IELs は CD44, CD45RB, CD69 などの活性化マーカーが陽性であった。また TCR 発現様式とクロータイプを解析すると、クローナルな増殖分化をうかがわせる自己抗原反応性 TCR レパトア (すなわち V β 8.2-J β 2.7) を発現することが明らかになった。(3) また MICA-Tg マウスの DSS 投与による腸炎誘発に対する感受性を検討した結果、DSS 投与開始直後より投与終了 14 日めまでの観察

期間を通じて、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。DSS 投与 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。また病理組織学的にも、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。(4) 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。(5) 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- α , 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が、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。(6) 腸炎発症 T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスの粘膜上皮よりの IL-15 の産生が著しく亢進していることを、定量 PCR を用いて明らかにした。また慢性期の重症度の高い腸炎を発症した T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスの病変部大腸粘膜より分離した $\beta\beta$ T 細胞では IL-15 レセプター複合体の発現が著しく亢進していること、また病変部大腸粘膜より分離した $\beta\beta$ T 細胞を試験管内でリコンビナント IL-15 とともに共培養すると、濃度依存的に著しい DNA 合成能を示すことが明らかになった。

(7) 以上の結果をふまえて T3b プロモーターを利用して IL-15 遺伝子を T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスの腸管粘膜上皮に強性発現させた 2 重変異マウス (IL-15 Tg/T 細胞レセプター α 鎖欠損マウス) を作製した。肉眼的、臨床的、病理組織学的な解析の