

## 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14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 清野 宏

平成17年(2005年)4月

## 目 次

I.	総合研究報告書	
	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	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	
	清野 宏	13
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	19
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	23
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	29
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV.	研究成果の刊行物・別刷り	39

# 総合研究報告

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）  
総合研究報告書

「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」に関する研究

主任研究者：清野 宏 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：本研究計画ではアレルギー発症における粘膜免疫を起点とした皮膚免疫と全身免疫クロスネットワークシステムを分子・細胞・個体レベルで解明し、その新しい免疫統御機構を応用した「粘膜免疫起点免疫療法」とも言える新しいアレルギー予防・治療法の開発へ向けての理論形成とその応用性を旨とした基礎的研究を展開してきた。その目的達成に向けて基礎系3名と臨床系1名による共同研究体制のもとで研究推進してきた。粘膜免疫において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)を中心としたアレルギーとの関連の解明に従事した。さらに、アレルギー性下痢モデルを駆使して大腸粘膜免疫と全身免疫とのクロスネットワークシステムの存在を示し、そのメカニズムの解明を進めた。東大・高津はIL-5シグナル伝達による好酸球制御とIgA<sup>+</sup>B細胞誘導機構についての世界的第一人者であり、トライアングル免疫クロスネットワークシステムに関連するサイトカイン制御機構の解明に代表される分子細胞ネットワークの解明を進めた。さらに、ペプチド25と命名された結核菌由来ペプチドによるアレルギー制御効果を示した。腸管免疫とストレスという観点から興味ある研究を展開している。広島大・高橋は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た。MICAによる粘膜炎症の治療と制御への応用可能性を提示した。臨床的観点から粘膜免疫の重要性をとらえて研究を推進してきた鹿児島大・黒野は臨床的観点からヒトNALTを中心とする上気道粘膜における吸入アレルギー抗原の好酸球遊送への影響を検討し、自然免疫分子の関与を示唆した。

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薬学総合研究科 教授

A. 研究目的

アレルギー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な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ギー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進めた。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」開発へ向けて基礎的情報を提供することを目的として共同研究を展開してきた。

## B. 研究方法

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」開発に向けた基礎的な解析と新情報収集の為に基礎系 3 名と臨床系 1 名による共同研究体制のもとで研究を推進した。

- 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た。さらに当研究班が開発した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た。
- 2) 東大・高津は IL-5 シグナル伝達による好酸球制御と IgA<sup>+</sup>B 細胞誘導機構についての世界的第一人者であり、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た。さらに自然免疫関連分子・物質 (例: 結核菌由来ペプチド) によるアレルギー誘導型免疫応答の制御についても検討を進めた。
- 3) 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 の腸管免疫への影響を検討した。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について MICA/NK2GD と IL-15 を中心とした観点から研究を進めた。特に、MICA、IL-15 単独または両者上皮細胞特異的発現 Tg マウスの作成と病態形成モデル確立を進めた。

- 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と行った。また、東京大学と広島大学各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。本研究に関連するヒト検体を使った実験実施に際しては鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の臨床倫理委員会に承認を得た。そして、研究対象者に本研究内容ならびに不利益や危険性の無いことを説明し文書にて同意を得た。

## C. 結果

- 1) 清野班:アレルギー性下痢誘導マウスの大腸での病態形成に脾臓由来の病態形成性 Th2 型細胞が関与する事を発見した。さらに、その誘導にあたり大腸上皮

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を提示した。さらに 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、下痢が無遺伝子治療群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事が強く示唆された。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<sup>b</sup> 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 $\alpha$  や MIP-1 $\beta$  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。

- 3) 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  $\alpha$  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、腸管腸管局所発現 MICA トランスジェニックマウス、マウス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 TCR  $\beta\beta'$  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  $\beta\beta'$  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。
- 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

胞、線維芽細胞を分離培養し、エンドトキシンや IL-1 $\alpha$  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- $\kappa$ 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. 評価

##### 1) 達成度について

A. 粘膜免疫を基点とした他の免疫系とのクロストーク機構の解明という観点については、粘膜免疫系と全身免疫系間におけるその存在を強く示唆する結果を得る事が出来た。つまり、全身免疫系由来病態形成性食物抗原特異的 Th 細胞が大腸において、粘膜系上皮細胞、樹状細胞の影響化において強度の Th2 型免疫応答を惹起してアレルギー性下痢を誘導する事が明らかになってきた。一方、皮膚免疫系でのクロストークについては、それを示唆する現象論的結果は得ているが、それを基礎とした、メカニズムに迫る解析が必要であり、現在その点に関して研究が展開されている。

B. 粘膜系・全身免疫系間クロスネットワークの異常を介したアレルギー応答(例:アレルギー性下痢モデル)などを駆使して、その異常な免疫応答を改善もしくは阻止する方法として IL-12p70 DNA, CpG そして Peptide-25 などが程度の差はあろうが効果のある事を示唆する事が明らかになってきた。

C. 当初の目標としていた粘膜恒常性逸脱化分子 MICA のトランスジェニックマウスの作成を終え、MICA の粘膜免疫システムの構築と作動メカニズムにおける多彩な働きを明らかにすることができたことに加えて、MICA を利用を使い、全身免疫系由来病態形成性 Th2 型細胞が大腸においてアレルギー症状を誘導し、そのメカニズムとして上皮細胞、粘膜系樹状細胞由来 IL-12p40 が深く関与している事を突き止める事が出来た。この成果について「粘膜免疫とアレルギー」をメインテーマとしたキーストンスンポジウムにおいて、招待講演として報告する機会を得た。

次に、拮抗分子として IL-12p70DNA を経粘膜投与する事で、アレルギー性下痢を予防・改

善出来る事が動物実験モデルで証明され、今後の研究の発展によりヒトでの新しいアレルギー予防・治療法としての可能性が期待される。また、CpG や本研究班で開発された Peptide-25 によるアレルギー応答の改善が望める結果も得る事が出来、次世代のアレルギー療法に結びつけたあらたな粘膜炎症アレルギー疾患の治療戦略の萌芽を得ることが出来た。

D. 本研究の目的とする呼吸粘膜における好酸球浸潤に関わる因子の役割を *in vitro* で実証することは概ね達成しえた。今後は *in vivo* での好酸球浸潤への直接的な関与を証明する研究を展開する。

## 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究計画をとおして、世界に先駆て、食物アレルギーモデルを使い、全身免疫系由来病態形成性 Th2 型細胞が大腸においてアレルギー症状を誘導し、そのメカニズムとして上皮細胞、粘膜免疫系樹状細胞由来 IL-12p40 が深く関与している事を突き止める事が出来た。この成果について「粘膜免疫とアレルギー」をメインテーマとしたキーストンシンポジウムにおいて、招待講演として報告する機会を得た。

次に、拮抗分子として IL-12p70DNA を経粘膜投与する事で、アレルギー性下痢を予防・改善出来る事が動物実験モデルで証明され、今後の研究の発展によりヒトでの新しいアレルギー予防・治療法としての可能性が期待される。また、CpG や本研究班で開発された Peptide-25 によるアレルギー応答の改善が望める結果も得る事が出来、次世代のアレルギー療法に結びつく可能性のある結果を得た。

非古典的 MHC 分子の関与についても、MICA Tg マウスを用いて、MICA が単にストレス逸脱化シグナルとして粘膜ホメオスタシスの維持に関与しているのみならず、粘膜免疫機構の発生・分化を正に制御しうることを世界に先駆けて示したこと、さらに MICA を利用した新規のアレルギー免疫疾患制御法を示し得た事は、極めて国際的に科学的社会的価値が高いといえる。

好酸球浸潤の機序を明らかにすることは、アレルギー性鼻炎のみならず、好酸球性中耳炎や好酸球性副鼻腔炎などにより重篤な難治性疾患の病態解明においても急務とされる。また、これらの好酸球増多性疾患は国際的にも問題視されており、本研究の学術的・国際的・社会的意義は大きい。

## 3) 今後の展望について

本研究成果で得られた新知見をベースにして、粘膜免疫系を駆使した新しいアレルギー予防法・治療法開発への基礎的研究を推進・発展させ、そのシーズの中からトランスレーショナルリサーチ的研究を進め、臨床応用できる実験に発展させていく。例えば、本研究計画から得られた IL-12p70 DNA、Peptide-25、CpG そして非古典的 MHC 分子 MICA などが、新しいアレルギー免疫応答調節分子・物質として応用できる可能性について成果を得たので、それをさらに裏付けそしてトランスレーショナル研究へ発展させていく事が必要であろう。

## 4) 研究内容の効率性について

当初の研究計画については、基礎系 (3 名) と臨床系 (1 名) が情報交換を取りながら、各々の目標に向かって全般的に順調に研究を推進し、その成果を免疫・アレルギー分野において評価されている国際学術誌に 56 編報告することができた。



## F. 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、粘膜免疫クロスト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 56 編の論文が国際学術誌 (PNAS, J. Exp. Med., J. Immunol. など) に発表された。

## G. 研究発表

- 1) 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  $\alpha$  1?  $\beta$  2/LT  $\beta$  R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> cells. *Immunity* 17:31-40.
- 2) Ohta, N., Hiroi, T., Kweon, M-N., Kinoshita, N., Jang, M-H., Miyazaki, J. and Kiyono, H. 2002. IL-15 induced CD8<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> T cells in the development of small intestinal inflammation in T3b-IL-15 Tg mice. *J. Immunol.* 169 : 460-468.
- 3) 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.
- 4) 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<sup>+</sup> CD45RB<sup>+</sup> T cells. *Gut* 50:299-306.
- 5) 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
- 6) 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 enapsulated HVJ-liposome induces antigen-specific CTL and neutralizing antibody responses. *J. Immunol.* 170: 495-502.
- 7) 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
- 8) Kweon, M-N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., F. W. vanGinkel., 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.
- 9) 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 almette-Guerin (BCG) induces enhanced immune responses against the inserted HIV-1 V3 antigen. *Vaccine* 21: 158-66.
- 10) 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
- 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 efficient mice. *Clin. Immunol.* 102: 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) De Winter, H., Elewaut, D., Turovskaya, O., Huflejt, M., Shimeld, C., A. Hagenbaugh, A., Binder, S., Takahashi, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. 2002. Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 122:1829-1841

- 17) Kaku, H., Horikawa, K., Obata, Y., Kato, I., Okamoto, H., Sakaguchi, N., Gerondakis, S. and Takatsu, K. 2002. NF- $\kappa$ B is required for CD38-mediated induction of C (gamma)1 germline transcripts in murine B lymphocytes. *Int. Immunol.* 14: 1055-1064.
- 18) Otsuka, S., Takaki, S., Iseki, M., Miyoshi, K., Nakagata, N., Kataoka, Y., Yoshida, N., Takatsu, K. and Yoshimura, A. 2002. SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol. Cell. Biol.* 22:3066-3077
- 19) Saito, H., Matsumoto, K., Denburg, A. E., Crawford, L., Ellis, R., Inman, M. D., Sehmi, R., Takatsu, K., Matthaei, K. I. and Denburg, J. A. 2002. Pathogenesis of murine experimental allergic rhinitis: a study of a local and systemic consequences of IL-5 deficiency. *J. Immunol.* 168:3017-3023
- 20) Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y. and Takatsu, K. 2002. Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J. Exp. Med.* 195:151-160
- 21) Boyaka, P. N., Ohmura, M., Fujihashi, K., Koga, T., Yamamoto, M., Kweon, M-N., Takeda, Y., Jackson, R. J., Yuki, Y. and Kiyono, H. 2003. Chimeras of labile toxin one and cholera toxin retain mucosal adjuvanticity and direct Th cell subsets via their B subunit. *J. Immunol.* 170: 454-462.
- 22) Hagiwara, Y., McGhee, J. R., Fujihashi, K., Kobayashi, R., Yoshino, N., Kataoka, K., Etani, Y., Kweon, M-N., Tamura, S., Kurata, T., Takeda, Y., Kiyono, H. and Fujihashi, K. 2003. Protective mucosal immunity in aging is associated with functional CD4<sup>+</sup>T cells in nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue. *J. Immunol.* 15: 1754-1762.
- 23) Yuki, Y. and Kiyono, H. 2003. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* 13:293-310
- 24) 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<sup>+</sup> $\beta\beta$  T cells. *Am. J. Pathol.* 162: 263-271
- 25) 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
- 26) 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
- 27) Jang, M-H., Kweon, M-N., Hiroi, T., Yamamoto, M., Takahashi, I. and Kiyono, H. Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells. *Vaccine* 21:1613-1619
- 28) Kweon, M-N. and Kiyono, H. 2003. Eosinophilic gastroenteritis: a problem of the mucosal immune system? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3: 79-85
- 29) 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
- 30) Takaki, S., Tezuka, Y., Sauer, K., Kubo, C., Kwon, S-M., Armstead, E., Perlmutter RM., and Takatsu, K. 2003. Impaired expansion of lymphoid precursors and altered distribution of peripheral B cell subpopulations. *J. Immunol.* 170: 703-710
- 31) Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens W. T., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T., and Koyasu, S. 2003. PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat. Immunol.* 4: 280-286
- 32) Takatsu, K., and Kariyone, A. 2003. Immunogenic peptide for the Th1 development. *Int. Immunopharmacol.* 3: 783-800
- 33) Kariyone, A., Kano, H., Tamura, T., Iwakura, Y., and Takatsu, K. 2003. Immuno-genicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- $\gamma$ . *Int. Immunol.* 15:1183-1194
- 34) Nobuhisa, I., Takizawa, M., Takaki, S., Inoue, H., Okita, K., Ueno, M., Takatsu, K., and Taga, T. 2003. Regulation of hemato-poietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein. *Mol. Cell. Biol.* 23: 8486-8494
- 35) Matsune, S., Kono, M., Sun, D., Ushikai, M., and Kurono, Y. 2003. Hypoxia in paranasal sinuses of patients with chronic sinusitis with or without the complication of nasal allergy. *Acta Otolaryngol.* 123 (4):519-23.
- 36) 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
- 37) 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, Y., and Kiyono, H. 2004. Intestinal Villous M Cells: A new antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Asso. Sci.* 101:6110-5
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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.
- 43) 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
- 44) Kiyono, H., and Fukuyama, S. 2004. NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. 2004. *Nature Rev. Immunol.* 4: 699-710
- 45) Yoshino, N., Lu, X-S. F., 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
- 46) 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

- 47) 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
- 48) 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 receptor transgenic model. *Int. model. Int. Immunol.* 6:1691-1699
- 49) 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
- 50) Hirano, M., Y. Kikuchi, A. S. Nisitani, A. Yamaguchi, A. Sato, T. Ito, H. Iba, and K. Takatsu. 2004. Btk enhances transcriptional co-activation activity of BAM11, a Btk associated molecule of a SWI/SNF complexes. *Int. Immunol.* 16: 747-57
- 51) Tanaka, H., M. Komai, K. Nagao, M. Ishizaki, D. Kajiwarag, and Takatsu, K. 2004. 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.
- 52) Moon, B-M., S. Takaki, H. Nishizumi, T. Yamamoto, and Takatsu, K. 2004. Abrogation of autoimmune disease in Lyn-deficient mice by the deletion of ILL-5 receptor a chain gene. *Cell. Immune.* 228:110-118
- 53) 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. 2004. 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
- 54) 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 Takatsu, K. . 2004. The role of antigenic peptide in CD4+ T helper phenotype development in a T cell receptor transgenic model. *Int. Immunol.* 15: 1691-1699, (Featured article)
- 55) 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. 2005. Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness. *J. Exp Med.* 201: 73-82, 2005.
- 56) Kweon, M. N., Yamamoto, M., Rennert, P. D., Park, E. J., Lee, A. Y., Chang, S. N., Hiroi, T., Nanno, M. and Kiyono, H. 2005. Prenatal blockage of lymphotoxin beta receptor and TNF receptor p55

signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in large intestine. ( in press)

8. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

# 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 IL-12p40 の異常発現が関与する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<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>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<sup>+</sup> CD45RB<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>  $\beta\beta$  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, MH., Kweon, M-N., Hiroi T, Yamamoto, M., Takahashi, I. and Kiyono, H. 2003. Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells. *Vaccine* 21: 1613-1619
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