

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 contribute 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 α や MIP-1 β 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 TCRV γ 5V δ 11 cDNA を用いて、TCRV γ 5V δ 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。その骨髄細胞を 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 α や MIP-1 β 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 γ 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, RM. 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, W. Xu, A. Kariyone, T. Saito, T. Kitamura, G. 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、クロノタイプについては 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, MIP-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 ? 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 ? 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⁺ T 細胞の発達が亢進していた。この CD4⁺CD8⁺ T 細胞は CD44, CD45RB, CD69 などの活性化マーカーが陽性であった。また TCR 発現様式とクロノ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, MIP-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 β 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 β 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

結果、得られた2重変異 IL-15 Tg/T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスは、T 細胞レセプター α 鎖を単独で欠損したマウスに比べて、腸炎の発症が早期より観察され、さらに重症遷延化することが明らかになった。重症腸炎発症2重変異マウスの病変部大腸粘膜より分離した $\beta\beta$ T 細胞は IL-4 を主体とした Th2 型のサイトカインを発現し、また Bcl-2 の発現亢進を介して、病変部大腸粘膜に長期間にわたって生存・維持されることが明らかになった。また重症化腸炎発症 T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスの病変部大腸 $\beta\beta$ T 細胞は高いレベルの活性化 NK レセプター、NKG2D を発現していることが明らかになった。(8) Th2 型サイトカイン産生性 NKG2D⁺ $\beta\beta$ T 細胞を腸管局所発現 MICA Tg/RAG2 欠損マウスに養子移入し、移入後の腸炎の重症度を RAG2 遺伝子単独欠損マウスと比較検討した。その結果、MICA 遺伝子を有する2重変異マウスにおいて腸炎の程度が軽減することが明らかになった。

D. 考察

近年、微生物感染、発がん物質などのストレス侵襲をうけて恒常性を逸脱した粘膜上皮において組織適合抗原に近縁の MICA の発現が亢進すること、また特定の抗原受容体を発現した?? T 細胞がその機能発現に MICA を要求することが示されたことから、MICA が粘膜におけるホメオスタシスの逸脱マーカーとして粘膜免疫の機能発現に寄与していることが予想されていた。そこで分担研究者は、粘膜上皮限局 MICA トランスジェニックマウス、つまりストレスをたえずうけた腸内環境を再現したモデルを作成し、その粘膜免疫の動態を解析した。その結果、MICA が粘膜内リンパ球の発達を正に統御すること、またこの MICA の統御をうけた粘膜内リンパ球が難治性粘膜疾患（ハプテン誘導性大腸炎モデル）の発症を制御しうることを見出した。以上の成果より、MICA は粘

膜におけるホメオスタシス逸脱マーカーとして、単に粘膜内リンパ球の機能を制御するのみならず、粘膜内リンパ球の発達をも統御する分子として粘膜における免疫学的恒常性の維持に包括的に寄与していることが明らかになった。

またヒトの潰瘍性大腸炎に酷似した自然発症慢性腸炎モデル T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスを用いて、慢性腸炎の重症遷延化に粘膜上皮より産生される IL-15 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。IL-15 は組織常在リンパ球における活性化 NK レセプター NKG2D の発現を正に統御することが報告されており、T 細胞レセプター α 鎖欠損マウスで観察される慢性腸炎の後期病変の形成および重症遷延化には、大腸粘膜浸潤 $\beta\beta$ T 細胞における IL-15/NKG2D を介したシグナル伝達系が重要な役割を果たすことが窺えた。また MICA Tg/RAG2 欠損マウスを用いた T 細胞移入腸炎誘発モデルの解析結果より、ストレス誘導性恒常性逸脱化シグナル MICA は、粘膜炎症の制御に寄与することが明確に示された。

E. 評価

- 1) 達成度について 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はたらきを明らかにすることができたことに加えて、MICA を利用し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でき、たいへん満足している。
- 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について 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寄与しているのみならず、粘膜免疫機構の発生・分化を正に統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ことは、極めて国際的に科学的社会的価値が高いといえる。

- 3) 今後の展望について MICA 分子を介した粘膜制御の機構を分子のレベルでさらに詳細に解明する必要がある。また腸管以外の粘膜や皮膚に好発するアレルギー免疫疾患への応用の可能性を仔細に評価する必要がある。
- 4) 研究内容の効率性について ほぼ順調に研究成果が得られており、問題ないと考えている。

F. 結論

ストレス誘導性恒常性逸脱化シグナル MICA は、IL-15/NKG2D シグナルを介した粘膜炎症アレルギー疾患の、治療と制御に有用なことが明らかになった。

G. 研究発表

1) 国内

口頭発表 14件

原著論文による発表 なし

それ以外 (レビューなど) の発表 12件

論文発表

1. 高橋一郎、朴恩正、清野宏。(2002) 粘膜免疫担当組織細胞の特殊性と炎症性腸疾患。Molecular Medicine. 39:1000-1007.
2. 島津篤、高橋一郎。(2002) 粘膜ワクチン、経皮ワクチン研究の現状。最新医学、57:1953-1960.
3. 国澤純、高橋一郎、清野宏、真弓忠範。(2002) 抗原の性状と抗体産生におけるパイエル板の役割。臨床免疫、37:387-391.
4. 高橋一郎。(2002) 粘膜免疫システム：その特徴と重要性。広島大学歯学雑誌 34:170-171.
5. 高橋一郎。粘膜ワクチン。小児科 44巻

4号 160-161, 2003.

6. 高橋一郎。粘膜免疫応答の制御機構。化学療法の世界 19巻 11号 18?24, 2003.
7. 清野宏、幸義和、高橋一郎。粘膜免疫による感染症制御：次世代型ワクチン開発に向けての展開。日本医学会雑誌 130巻 11号 KM41-44, 2003.
8. 高橋一郎。ワクチン研究の新しい展開？粘膜ワクチンによる感染症の克服？。アレルギー・免疫 10巻 4号 83?85, 2003.
9. 高橋一郎。(2004) 経粘膜ワクチン。Biotherapy 18巻 43-49.
10. 高橋一郎。(2004) 予防接種の免疫学。総合臨床 53巻 1830-1833.
11. 高橋一郎。(2002) 粘膜ワクチン。粘膜免疫の最前線。(吉開泰信編) 医薬ジャーナル社、東京、102-115頁。
12. 高橋一郎、清野宏。(2003) 粘膜ワクチン。分子予防環境医学 (松島綱治 編) 本の泉社、東京、741?753頁。

学会発表

1. 50th Annual Meeting Japanese Association for Dental Research, 古賀敏比古メモリアルシンポジウム、粘膜免疫システムの特徴と重要性、高橋一郎、November 30, 2002, Sendai, Japan.
2. 第32回日本免疫学会総会、Clonal expansion of extrathymic double-positive IELs by the expression of MICA in mouse small intestine. E. J. Park, I. Takahashi, et al. December 4, 2002, Tokyo, Japan.
3. 第32回日本免疫学会総会、Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches; preferential localization of claudin-4 at the apex of the dome region. H. Tamagawa, I. Takahashi, et al. December 4, 2002, Tokyo, Japan.
4. 第32回日本免疫学会総会、Elucidation of immune enhancing mechanisms for the induction of antigen specific immune response by fusogenic

liposome as a new mucosal vaccine vector. T. Ariyama, I. Takahashi, et al. December 4, 2002, Tokyo, Japan.

5. 第21回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、粘膜免疫の特殊性と重要性、高橋一郎、平成15年2月15日、鹿児島。

6. 第26回日本医学会総会、粘膜免疫のユニーク性とその異常、高橋一郎、平成15年4月6日、福岡。

7. 第4回大阪クローン病治療研究会、粘膜免疫機構とその破綻による炎症性腸疾患、高橋一郎、平成15年11月21日、大阪。

8. 第33回日本免疫学会総会、MICA トランスジェニックマウスにおけるデキストラン硫酸ナトリウム誘発性腸炎の腸管粘膜免疫応答の解析。池田淳子、河原和子、谷亮治、岡本哲治、朴恩正、清野宏、高橋一郎、平成15年12月10日、福岡。

9. 第33回日本免疫学会総会、In situ expression of Rae-1 by intestinal epithelial goblet cells, 朴恩正、高橋一郎、福山聡、清野宏、平成15年12月10日、福岡。

10. 高橋一郎、平成16年度日本細菌学会中国四国支部会総会、粘膜免疫システムの作動原理とその異常、平成16年10月14日、広島。

11. 高橋一郎、第54回日本アレルギー学会総会、シンポジウム、粘膜免疫機構を駆使したアレルギー予防・治療戦略へ向けての最近の展開、上皮由来MICA・IL-15による粘膜免疫制御、平成16年11月5日、横浜。

12. 第34回日本免疫学会総会、Dysfunctional mucosal intranet between Th2 type, bb T lymphocytes and epithelial cells for the development of colitis, 高橋一郎、太田典之、飯島英樹、廣井隆親、清野宏、鶴田圭伊子、桐戸真美、松元歌奈子、佐々木一喜、平成16年12月1日、札幌。

13. 第34回日本免疫学会総会、Dynamics of colonic patch in MICA-Tg mice altered intestinal flora by antibiotics, 河原和子、池田淳子、島津篤、鶴田圭伊子、岡本哲治、清野宏、高橋一郎、平成16年12月1日、札幌。

14. 第34回日本免疫学会総会、MICA 強性発現による腸管液性免疫応答機構への影響、島津篤、高明善、柳原琢磨、桐戸真美、清野宏、高橋一郎、平成16年12月1日、札幌

2) 海外

口頭発表 2件

原著論文による発表 9件

それ以外(レビューなど)の発表 なし

論文発表

1. Kai, Y., I. Takahashi, H. Ishikawa, T. Hiroi, T. Mizushima, D. Kishi, H. Hamada, H. Tamagawa, T. Ito, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, H. Matsuda, and H. Kiyono. 2004. Colitis in mice lacking common cytokine receptor?? chain is mediated by IL-6-producing CD4⁺ T cells. *Gastroenterology*. in press.

2. Park, E. J., I. Takahashi, J. Ikeda, K. Kawahara, T. Okamoto, M. Kweon, S. Fukuyama, V. Groh, T. Spies, Y. Obata, J. Miyazaki, and H. Kiyono. Clonal expansion of double positive IELs by MICA expressed in mouse small intestinal epithelium. *J. Immunol.* 171:4131-4139, 2003.

3. Tamagawa, H., I. Takahashi, M. Furuse, Y. Yoshitake-Kitano, S. Tsukita, T. Itoh, H. Matsuda, and H. Kiyono. Characteristics of claudin expression in follicle-associated epithelium of Peyer's patches: Preferential localization of claudin 4 at the apex of the dome region. *Laboratory Investigation.* 83:1045-1053, 2003.

4. Okuda, Y., I. Takahashi, J. Kim, N. Ohta, K. Iwatani, H. Iijima, Y. Kai, H. Tamagawa, T. Hiroi, S. Kawano, Y. Sasaki, M. Hori, K. Takeda, S. Akira, and H. Kiyono.

Development of colitis in STAT6-deficient TCR alpha chain deficient mice: A potential role of STAT6-independent IL-4 signaling for the generation of Th2-biased pathologic CD4⁺ T cells. *Am. J. Pathol.* 162:263-271, 2003.

5. Jang, M-H., M. Kweon, T. Hiroi, M. Yamamoto, I. Takahashi, and H. Kiyono. Induction of cytotoxic T lymphocyte responses by cholera toxin-treated bone marrow-derived dendritic cells. *Vaccine* 21:1613-1619, 2003.

6. De Winter, H., D. Elewaut, O. Turovskaya, M. Huflejt, C. Shimeld, A. Hagenbaugh, S. Binder, I. Takahashi, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 122:1829-1841, 2002.

7. Kunisawa, J., I. Takahashi, A. Okudaira, T. Hiroi, K. Katayama, T. Ariyama, Y. Tsutsumi, S. Nakagawa, H. Kiyono, and T. Mayumi. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 receptor alpha chain antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen. *Eur. J. Immunol.* 32:2347-2355, 2002.

8. Takahashi, I., J. Matsuda, L. Gapin, H. De Winter, Y. Kai, H. Tamagawa, M.

Kronenberg, and H. Kiyono. Colitis-related public T cells are selected in the colonic lamina propria of IL-10-deficient mice. *Clinical Immunology* 102:237-248, 2002.

9. Mina, K., I. Takahashi, M. Yamamoto, M. Jang, N. and H. Kiyono. Development of antigen induced colitis in SCID mice reconstituted with spleen derived memory type CD4⁺ CD45RB⁺ T cells. *Gut* 50:299-306, 2002.

学会発表

11th International Congress of Mucosal Immunology. June 16-20, 2002, Orland, USA: Park EJ, Takahashi I. and Kiyono H. Intestinal Rael and MICA as molecular machinery for the development of extrathymic IELs.

Takahashi, I., E.J. Park, H. Kiyono, V. Groh, and T. Spies. 2002. Clonal expansion of CD4CD8 alpha+ intraepithelial lymphocytes by MICA ectopically expressed in mouse small intestine. 第2回淡路島感染症・免疫国際フォーラム August 24.

H. 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

上気道粘膜における好酸球浸潤と難治化に関する研究

分担研究者 黒野 祐一 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 聴覚頭頸部疾患学

研究要旨：本研究では、好酸球浸潤の機序およびその修飾因子を明らかにすることを目的として、好酸球の接着因子である VCAM-1 および強力な血管透過性因子である VEGF の上気道培養細胞からの産生、さらに各種炎症性サイトカインの上気道粘膜からの産生について検討した。上気道粘膜への好酸球浸潤には、アレルギーのみならず感染や慢性炎症、低酸素状態など様々な要因が関与し、高度の粘膜浮腫や腫脹そして難治化をもたらすと考えられる。

A. 研究目的

アレルギー性鼻炎を中心とする上気道アレルギー疾患においては、局所粘膜への好酸球浸潤が特徴的であり、その程度が病態の重症そして難治化に関与することが知られている。そこで、本研究では、好酸球浸潤の機序およびその修飾因子を明らかにすることを目的として、好酸球の接着因子である VCAM-1 および強力な血管透過性因子である VEGF の上気道培養細胞からの産生、さらに各種炎症性サイトカインの上気道粘膜からの産生について検討した。

B. 研究方法

鼻粘膜そして鼻茸から血管内皮細胞および線維芽細胞を分離培養し、これを継代培養したものを実験に供した。これら培養細胞を TNF α 、IL-4、LPS で一定時間刺激し、VCAM-1、Eotaxin、VEGF の産生を観察した。さらに、アレルギー性鼻炎患者から、中耳貯留液、鼻咽腔液、鼻分泌液を採取し、IL-8、VEGF 濃度を測定した。また、ゲルシフトアッセイにより、転写活性因子である NF- κ B の活性化を観察した。

（倫理面への配慮）

本研究の実施に際しては当施設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. 研究結果

1) 鼻培養細胞における VCAM-1、Eotaxin の発現：TNF α 、IL-4 刺激によって鼻粘膜血管内皮細胞および鼻線維芽細胞から可溶性 VCAM-1 そして Eotaxin が産生され、その濃度は TNF α と IL-4 を同時に加えることによってさらに高値を示した。TNF α 刺激による VCAM-1 の発現は NF- κ B の活性化と相関したが、IL-4 刺激では NF- κ B そして AP-1 の活性化は認められなかった。

2) 鼻培養細胞における VEGF の発現：鼻線維芽細胞をエンドトキシンで刺激するとその培養上清中の IL-8、RANTES の産生が有意に上昇し、低酸素下の培養では VEGF 産生のみ有意に上昇した。一方エンドトキシンと低酸素の両方で刺激すると、VEGF 産生においては相乗効果が認められた。さらにこの VEGF 産生はステロイドそして抗

アレルギー薬によって有意に抑制された。

3) 外分泌液中サイトカイン：鼻咽腔液中からはすべての症例で IL-8 が検出され、その濃度を鼻咽腔からのインフルエンザ菌検出の有無と比較すると、インフルエンザ菌検出例は非検出例と比較して有意に高値であった。VEGF は鼻分泌液ならびに中耳貯留液からも検出され、鼻分泌液で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。中耳貯留液中の VEGF は粘液性貯留液のほうが漿液性貯留液よりも高値であり、乳突蜂巣の発育が不良なものでより高値を示した。

C. 考察

上気道感染症の重要な起炎菌のひとつであるインフルエンザ菌に含まれるエンドトキシンは鼻咽腔や鼻腔における好酸球走化因子である Eotaxin や RANTES の産生を促し、また TNF- α 産生を誘導することによって VCAM-1 の発現を亢進し、上気道粘膜のアレルギー性炎症や好酸球性炎症を修飾していることが示唆される。さらに閉鎖腔である中耳腔や副鼻腔においてはアレルギー性炎症によってもたらされる換気不全によっても VEGF が産生される。最近、好酸球が VEGF を産生し、その受容体も存在することが証明されており、上気道粘膜での好酸球浸潤の悪循環が示唆される。

D. 評価

1) 達成度について

本研究の目的とす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。また、いずれも間接的な成績

であり、好酸球浸潤への直接的な関与を証明するには至らなかった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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

今回の研究でその重要性が確認された種々の因子が実際の好酸球浸潤にどれくらいの比重をもって作用するのか、そして *in vivo* においてこれらの因子がどのような関連性をもって好酸球浸潤を促進あるいは抑制するかを明らかにしたい。

4) 研究内容の効率性について

鼻線維芽細胞の培養や上気道粘液の採取は極めて容易であり、研究は効率的に実施された。一方、血管内皮細胞の培養は難しく決して効率性は高くなかった。今後は培養株を用いての比較研究が必要と思われる。

E. 結論

上気道粘膜への好酸球浸潤には、アレルギーのみならず感染や慢性炎症、低酸素状態など様々な要因が関与し、高度の粘膜浮腫や腫脹そして難治化をもたらすと考えられる。

F. 健康危惧情報（総括研究報告書を参照）

G. 研究発表 論文発表

1.孫 東、松根彰志、大堀純一郎、牛飼雅人、黒野祐一：低酸素刺激下における培養鼻茸維芽細胞からの VEGF 産生と制御. 耳鼻免疫アレルギー 2003; 21 (1): 19-22.

2.Matsune S, Kono M, Sun D, Ushikai M, Kurono Y. Hypoxia in paranasal sinuses of patients with chronic sinusitis with or without the complication of nasal allergy. Acta Otolaryngol. 2003; 123(4):519-23.

学会発表

黒野祐一：シンポジウム「粘膜免疫機構を駆使したアレルギー予防・治療戦略へ向けての最近の展開－上気道粘膜免疫機構と治療戦略－」（第 54 回日本アレルギー学会）

Yuichi Kurono. Expression of VCAM-1 in Nasal Mucosa and the Role in Eosinophilic Accumulation. (10th International Rhinologic Society Congress)

H. 知的所有権の出願・取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧

発表論文

- 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 α 1 β 2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3⁻CD4⁺CD45⁺ 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⁺ NK1.1⁺ 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⁺ CD45RB⁺ 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 α 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 encapsulated HIV-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 Tamura, 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-kappaB 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⁺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⁺ $\beta\beta$ 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- γ . *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 proposal 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.