

的に Th1 細胞に分化を誘導した。

#### D. 考察

小腸の粘膜固有層には2種類の樹状細胞とマクロファージ、好酸球が存在している。TLR5 は CD11c+CD11b+樹状細胞に特異的に発現していた。腸管では免疫を抑制する細胞は多数いられている。しかし、この細胞はフラジェリンに反応して自然免疫応答と獲得免疫を活性化を誘導することが明らかになった。腸管の感染防御において重要な働きをする細胞だと考えられる。今後、免疫を活性化するという観点から、今後粘膜ワクチンのよい標的細胞となることが考えられるであろう。

#### E. 結論

小腸粘膜固有層の CD11c+CD11b+細胞は TLR5 を特異的に発現しており、自然免疫応答を獲得免疫の活性化を誘導した。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

(論文発表)

Andersen-Nissen E, Hawn TR, Smith KD, Nachman A, Lampano AE, Uematsu S, Akira S, and Aderem A. Tlr5<sup>-/-</sup> Mice Are More Susceptible to Escherichia coli Urinary Tract Infection. *J. Immunol.* 178 : 4717-4722. 2007.

Shim DH, Chang SY, Park SM, Jang H, Carbis R, Czerkinsky C, Uematsu S, Akira S, and Kweon MN. Immunogenicity and protective efficacy offered by a ribosomal-based vaccine from *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine.* 25 : 4828-4836. 2007.

Saha S, Takeshita F, Matsuda T, Jounai N, Kobiyama K, Matsumoto T, Sasaki S, Yoshida A, Xin KQ, Klinman DM, Uematsu S, Ishii KJ, Akira S, and Okuda K. Blocking of the TLR5 activation domain hampers protective potential of flagellin DNA vaccine. *J. Immunol.* 179 : 1147-1154. 2007.

Hawn TR, Berrington WR, Smith IA, Uematsu S, Akira S, Aderem A, Smith KD, and Skerrett SJ. Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with *Legionella pneumophila*. *J. Immunol.* 179 : 6981-6987. 2007.

Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, Kumar A, Aitken JD, Sitaraman SV, Neish AS, Uematsu S, Akira S, Williams IR, and Gewirtz AT. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* 117 : 3909-3921. 2007.

Vijay-Kumar M, Aitken JD, Kumar A, Neish AS, Uematsu S, Akira S, and Gewirtz AT. TLR5KO mice have dysregulated intestinal gene expression and non-specific resistance to

Salmonella-induced typhoid-like disease.  
Infect Immun. 2008. (in press)

(学会発表)

**Akira S.** The role of TLRs and RIG-I-like helicases in anti-viral responses. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, November 20<sup>th</sup>-22<sup>th</sup>, 2007.

**Akira S.** 自然免疫による病原体認識機構. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, November 20<sup>th</sup>-22<sup>th</sup>, 2007.

**Akira S.** Dunham Lecturer, U.S.A. April 24<sup>th</sup>-26<sup>th</sup>, 2007.

Ishii K, and **Akira S.** Innate Recognition Receptors and Signalling Pathways. the first congress of the Society of Innate Immunity, U.S.A. May 13<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>, 2007.

**Akira S.** Pathogen Recognition by Mammalian Innate System. 19<sup>th</sup> FAOBMB Seoul Conference, Korea, May 27<sup>th</sup>-30<sup>th</sup>, 2007.

**Akira S.** TLR-dependent and independent anti-viral responses. International Conference on Immunology 2007, China, Jul 12<sup>th</sup>-15<sup>th</sup>, 2007.

**Akira S.** Toll-like receptors in microbial and viral defence. Innate Immunity and Its Interface with Adaptive Immunity 2007, France,

September 2<sup>th</sup>-5<sup>th</sup>, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

出願中

特願 2006-146012 「粘膜ワクチンアジュバントのスクリーニング方法」出願人: JST・大阪大学、発明者: 審良静男・植松智 (出願日 2006年5月25日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー等・疾患予防研究事業）

総合研究報告書（分担）

粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

分担研究項目：花粉症における粘膜免疫と腸内フローラとの関りについての研究：  
アレルギー性鼻炎モデルマウスの作製と、自然免疫系を介した気道アレルギー治療戦略の  
構築

分担研究者：川内 秀之 島根大学医学部耳鼻咽喉科 教授

研究要旨：上気道におけるアレルギーについて、全身免疫および粘膜免疫の両面から解明していくにあたり、分子、細胞、個体レベルで詳細に検討するため、その病態を誘導相と炎症局所での反応相とに分けて、アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて解析を行った。アレルギー性鼻炎における外的環境因子の関与について、自然免疫系において重要な役割を担う Toll-like receptor を介した免疫応答を中心に検討した。

#### A. 研究目的

花粉症をはじめとするアレルギー性鼻炎の病態の成立までには、遺伝的な素因を背景としながら、生後の種々の外的環境因子への曝露により感作され、発症に至る過程がある。アレルギー性鼻炎の感作・発症機序の解明や予防・治療戦略の究明には、全身における免疫機構のみならず、気道局所の粘膜免疫機構を明らかにしていくことが必要不可欠である。個体においてアレルギーの病態成立には、アレルゲン特異的な I 型アレルギー反応が惹起されるための誘導相（すなわち感作、induction phase）と、気道粘膜局所においてアレルゲンへの曝露により I 型アレルギーが起こる反応相（すなわち発症、effector/eliciting phase）の二つの相がある。我々はアレルギー性鼻炎の病態

を誘導相と炎症局所での反応相とに分け、外的環境因子の関与について、自然免疫系において重要な役割を担う Toll-like receptor を介した免疫応答を中心に、アレルギー性鼻炎モデルマウスを用いて検討した。

#### B. 研究方法

1. 抗腫瘍性溶連菌製剤として知られる OK-432 はヒト由来 A 群溶血性連鎖球菌 *Streptococcus pyogenes* 弱毒 Su 株由来の菌体成分であり、Toll-like receptor (TLR) 2 のリガンドであるペプチドグリカンや、TLR4 のリガンドであるリポタイコ酸を含んでいる。OK-432 のアトピー性皮膚炎に対する抑制効果については近年報告されているが (Horiuchi Y. Arch. Dermatol. Res. 2006; 298:163)、気道や腸管でのアレルギーにお

ける関与についての報告はほとんど皆無である。今回われわれはマウスの Ovalbumin (OVA)に対する Th2 反応誘導モデルを作製し、OK-432 の及ぼす影響について検討を行った。

実験プロトコールとして、第 0 日と第 7 日に OVA と Alum をマウスの腹腔内に投与して全身感作を成立させ、第 21 日から 28 日まで OVA の点鼻を行って OVA に対するアレルギー性鼻炎モデルを作製した。誘導相における OK-432 の作用についての検討では、OK-432 またはコントロールとして PBS を第 0 日と第 7 日に OVA とともに腹腔内投与し、第 14 日に血清、脾臓を採取して解析を行った。また、反応相での OK-432 の作用についての検討では、OVA で全身感作を行った後、第 21 日から 28 日に OVA とともに OK-432 を 点鼻投与して解析を行った。マウスは野生型マウスに加え、TLR4 遺伝子変異マウスである C3H/HeJ マウスおよび TLR2 ノックアウトマウスを用いた。

2. Lipopolysaccharide (LPS)は TLR4 のリガンドであり、*in vitro* の実験により、アレルギー性鼻炎の反応相において中心的な役割を担う肥満細胞からの Th2 型サイトカイン産生を誘導することが報告されている。今回我々はマウスアレルギー性鼻炎モデルを用い、*in vivo* で LPS がアレルギー性鼻炎に及ぼす影響について検討した。

実験プロトコールとして、第 0 日と第 7 日に OVA と Alum をマウスの腹腔内に投与して全身感作を成立させ、第 21 日から 28 日まで OVA 単独で点鼻、もしくは LPS を

OVA と共に点鼻して検討した。最終点鼻後に鼻症状としてくしゃみの回数を測定するとともに鼻粘膜組織、脾臓を採取して解析を行った。マウスは野生型マウス、C3N/HeJ マウスおよび肥満細胞欠損マウスである WBB6F-W/W<sup>v</sup> マウスを用いた。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、主に実験用動物ならびに分離した細胞、細胞株を使用して実験を行った。実験動物使用にあたっては、独立行政法人国立大学実験動物施設協議会指針に基づき、島根大学医学部動物実験施設の管理下で実験を行った。

#### C. 研究結果

1. はじめに、単球系細胞における OK-432 の認識について *in vitro* の実験で検討した。野生型マウスから腹腔マクロファージを採取し、OK-432 により刺激すると濃度依存的に IL-12 産生が増強された。C3H/HeJ マウス由来のマクロファージでも、OK-432 刺激により濃度依存的に IL-12 産生が増強されたのに対し、TLR2 ノックアウトマウス由来のマクロファージでは OK-432 刺激を行っても IL-12 産生が増強されなかった。また、*in vivo* の実験系を用い、OK-432 をナイーブマウスに腹腔内投与し、12 時間後に腹腔マクロファージを採取して 48 時間培養した後、培養上清中の IL-12 濃度を測定した。OK-432 投与により野生型マウスおよび C3H/HeJ マウスでは腹腔マクロファージの培養上清中の IL-12 濃度が増加していたが、

TLR2 ノックアウトマウスでは IL-12 濃度の増加を認めなかった。これらの結果から、マクロファージにおける OK-432 の認識については、主に TLR2 が関与していることが示唆された。

次に、マウスアレルギー性鼻炎モデルを用いて誘導相における OK-432 の作用について検討した。抗原での全身感作成立後に血清中の抗体価を測定したところ、野生型マウスと C3H/HeJ マウスでは、OK-432 投与群で非投与群と比較して血清 OVA 特異的 IgE、IgG1 が有意に低値を示し、IgG2a は有意に高値を示した。一方、TLR2 ノックアウトマウスでは OK-432 投与群と OK-432 非投与群との間で血清中の抗体価に有意差は認められなかった。脾臓 T 細胞におけるサイトカイン産生能について検討を行ったところ、野生型マウス、C3H/HeJ マウスともに OK-432 投与群で IL-4 が有意に低値を示し、IFN- $\gamma$  が有意に高値を示した。一方、TLR2 ノックアウトマウスでは OK-432 投与群と非投与群との間でサイトカイン産生に有意差は認められなかった。

つづいて、反応相における OK-432 の作用について検討した。OVA 単独点鼻群と OVA/OK-432 共点鼻群とでは、アレルギー症状であるくしゃみの回数や鼻粘膜中の好酸球浸潤に有意差は認められなかった。OVA/OK-432 点鼻群において、OVA 単独点鼻群と比較して鼻粘膜組織における IL-5 発現の増強を認めた。

以上の結果より、OK-432 が誘導相において TLR2 を介して単球系細胞からの IL-12

産生を誘導することにより、抗原特異的 Th2 反応を制御していることが示唆された。

2. 野生型マウスを用いた OVA に対するアレルギー性鼻炎モデルの反応相において、LPS を OVA と共に点鼻投与したところ、くしゃみの回数が OVA 単独点鼻群と比較して増加した。OVA/LPS 共点鼻群において、鼻粘膜組織における好酸球浸潤が OVA 単独群と比較して増加する傾向を示した。鼻粘膜における Th2 型サイトカイン発現は、OVA 単独点鼻群において IL-5、IL-10、IL-13 の発現を認め、OVA/LPS 点鼻群では OVA 単独群と比較して IL-5 の発現の増強を認めた。

次に C3H/HeJ マウスを用いて検討したところ、くしゃみの回数、鼻粘膜中の好酸球浸潤、Th2 サイトカイン発現については、OVA 単独点鼻群と OVA/LPS 点鼻群とで有意な差は認められなかった。

また、肥満細胞欠損マウスを用いた検討においても、くしゃみの回数、鼻粘膜中の好酸球浸潤、Th2 サイトカイン発現に、OVA 単独点鼻群と OVA/LPS 点鼻群とで有意な差は認められなかった。

以上の結果から、反応相において LPS が肥満細胞の TLR4 を介し、IL-5 発現を誘導することによりアレルギー性炎症の増悪因子として作用することが示唆された。

#### D. 考察

マウスアレルギー性鼻炎モデルを用いた検討により、OK-432 が誘導相において TLR2 を介して単球系細胞からの IL-12 産生

を誘導することにより、抗原特異的 Th2 反応を制御していることが示唆された。一方で、反応相においては抑制的に作用する結果は認められなかった。興味深いことに、OVA/OK-432 共点鼻群では OVA 単独点鼻群と比較して鼻粘膜組織での IL-5 発現が増強されており、その詳細については今後追究していく必要があると思われる。臨床的には、生後早期からアレルゲンへの曝露により感作が成立するまでの過程において、OK-432 を投与することにより Th2 反応を抑制することが期待され、ヒトでのアレルギー性疾患に対する予防的治療としての可能性が示された。

LPS を用いた検討により、反応相において LPS が肥満細胞の TLR4 を介して、IL-5 発現を誘導することによりアレルギー性炎症の増悪因子として作用することが示唆された。今後、TLR4 ノックアウトマウスを用いて実験をすすめるとともに、TLR4 を介したシグナル伝達につき詳細を検討していく予定である。現在 *in vitro* での検討により、p38 および GATA3 が関与する結果を得ており、今後検討をすすめる。また、LPS 点鼻によりくしゃみが増加することから、*in vivo* において LPS がヒスタミンの遊離にどのような影響を及ぼすのかも今後の検討課題である。

#### E. 結論

溶連菌製剤 OK-432 がアレルギー性鼻炎の誘導相において、TLR2 を介して単核球を活性化し、IL-12 産生を通して Th2 反応を抑

制することが示唆された。

LPS がアレルギー性鼻炎の反応相において、肥満細胞の TLR4 を介して IL-5 発現を誘導することにより、アレルギーの増悪因子として作用することが示唆された。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

(論文発表)

**Kawauchi H.** アレルギー性鼻炎の制御に向けた治療戦略の確立. 臨床免疫・アレルギー科. 47:444-451. 2007.

**Kawauchi H.** スギ花粉症緩和剤による経口免疫寛容の誘導とスギ花粉症抑制の試み. Japan Allergy Foundation Kyusyu Branch. 11:5. 2007.

Takamura K, Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Kawamura A, **Kawauchi H**, and Kiyono H. Regulatory role of lymphoid chemokine CCL19 and CCL21 in the control of allergic rhinitis. J. Immunol. 179 : 5897-5906. 2007.

Takamura K, and **Kawauchi H.**, et al. アレルギー性鼻炎における T 細胞応答の制御に関する CCR7 リガンドの機能. 耳鼻咽喉科免疫アレルギー. 25 : 152-153. 2007.

**Kawauchi H.** 花粉症の予防と治療戦略. 日

本医師会雑誌. 136 : 1975-1979. 2008.

Aoi N and **Kawauchi H.**, et al. サイトカインによるアレルギー治療・耳鼻咽喉科展望. in press

**Kawauchi H.**, et al. アレルギー性鼻炎・花粉症の病態解明と治療戦略の確立ー環境衛生仮説から遺伝子治療までー. 耳鼻咽喉科展望. in press

(学会発表)

**Kawauchi H.** スギ花粉症の治療戦略ーガイドラインを中心にー. 倉敷医師会学術講演会, Kurashiki, January 16<sup>th</sup>, 2007.

Takamura K, and **Kawauchi H.**, et al. アレルギー性鼻炎における T 細胞応答の制御に関する CCR7 リガンドの機能. 第 25 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, Kouhu, March 30<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.** Treatment: animal models. World Immune Regulation Meeting, Davos, Switzerland, April 13<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.** 鼻アレルギー・花粉症の病態と治療. 第 108 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, Kanazawa, May 17<sup>th</sup>, 2007.

Yamada T, and **Kawauchi H.**, et al. Cytokine Profile of Nasopharyngeal T Cells in Ag-specific Mucosal Immune Response. 9<sup>th</sup>

International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, Florida, U.S.A. June 5<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.** Role of Toll-Like Receptors in Persistent Inflammation of Upper Respiratory Tract and its Clinical Implication. 9<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, Florida, U.S.A. June 7<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.** 上気道炎症性疾患の病態における Toll 様受容体の役割. 第 5 回京阪神耳鼻咽喉科臨床懇話会, Oosaka, June 23<sup>th</sup>, 2007.

Aoi N, and **Kawauchi H.**, et al. アレルギー性鼻炎の病態における肥満細胞の役割と細菌感染による修飾 (肥満細胞の機能発現における Toll-like receptor の関与). 第 8 回中四国耳鼻咽喉科アレルギー疾患研究会, Takamatsu, July 21<sup>th</sup>, 2007.

Aoi N, and **Kawauchi H.**, et al. アレルギー性鼻炎の病態における肥満細胞の役割と細菌感染による修飾 (肥満細胞の機能発現における Toll-like receptor の関与). 第 18 回日本生体防御学会学術集会, Hukuoka, July 26<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.** アレルギー性鼻炎・花粉症. 第 32 回日本アレルギー学会専門医教育セミナー, Tokyo, August 26<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.** スギ花粉症の病態と治療戦略—アレルギー性炎症の制御に向けた最新の話題. 第9回宮崎県耳鼻咽喉科懇話会, Miyazaki, September 13<sup>th</sup>, 2007.

Aoi N, and **Kawauchi H.**, et al. サイトカインによるアレルギー制御. 第31回日本医用エアロゾル研究会, Asahikawa, September 22<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.** 鼻アレルギー制御のための粘膜免疫の臨床応用. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, Yokohama, December 1<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.** スギ花粉症の病態と治療戦略. 第5回熊本耳鼻咽喉科アレルギー研究会, December 28<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.** Allergic Rhinitis: Pathogenesis, diagnosis, treatment. What's the current thinking. 12<sup>th</sup> Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, December 7<sup>th</sup>, 2007.

Gohda K, and **Kawauchi H.**, et al. Regulatory role of lymphoid chemokine CCL19 and CCL21 in the control of allergic rhinitis. 12<sup>th</sup> Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, December 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>, 2007

Tongu M, and **Kawauchi H.**, et al. Mucosal

immunity of nasopharynx: study of long term T cell memory. 12<sup>th</sup> Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, December 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>, 2007.

Yamada T, and **Kawauchi H.**, et al. Mucosal immunity of nasopharynx: cytokine profile of nasopharyngeal T cells in Ag-specific mucosal immune response. 12<sup>th</sup> Congress of the International Rhinologic Society, Venezia, Italy, December 5<sup>th</sup>-8<sup>th</sup>, 2007.

**Kawauchi H.**, et al. スギアレルギー治療薬の免疫修飾作用に関する基礎的検討—肥満細胞からのサイトカイン産生抑制. 第26回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, Osaka, February 22<sup>th</sup>, 2008.

Tongu M, and **Kawauchi H.**, et al. 鼻粘膜における局所免疫応答機構の解析—サイトカイン産生とT細胞のメモリーに関する検討. 第26回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, Osaka, February 22<sup>th</sup>, 2008.

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



厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー等・疾患予防研究事業）

総合研究報告書（分担）

粘膜系自然・獲得免疫によるアレルギー制御

分担研究項目：分泌型 IgA の欠損による小腸上皮細胞間 T 細胞の増加機構に関する研究

分担研究者：南野 昌信

（株）ヤクルト本社中央研究所 応用研究Ⅱ部 免疫研究室 副主席研究員

研究要旨：腸管液や母乳などの外分泌液中に存在する分泌型 IgA の生理的役割を追究するために、IgA の上皮細胞間輸送に関わる多量体抗体受容体 (pIgR) を欠損するミュータントマウスの腸管を解析した。その結果、pIgR 欠損マウスでは小腸上皮細胞間に  $\text{Thy-1}^+\text{CD8}\alpha\beta^+\text{TCR}\alpha\beta^+$  細胞が増加しており、これらのサブセットは腸管外から移行する可能性が示された。

#### A. 研究目的

粘膜は宿主が外来の異種抗原と接触する最前線であり、粘膜免疫機構はこれらの異種抗原に対する適切な応答（積極的排除、免疫寛容など）の開始を制御する重要な防御機構である。一方、腸管には 400~500 種の常在性細菌が存在し、長い進化の過程で宿主と共利共生の関係を構築してきたものと推測される。腸管粘膜には多数の IgA 産生細胞や  $\gamma\delta$ -T 細胞が存在し粘膜固有の免疫防御機構の一端を担っている。また、腸管粘膜防御機構の発達に腸内細菌が密接に関与することが明らかになりつつある。本研究では、腸管外分泌液中に多量に含まれる IgA に着目し、IgA 分泌阻止に伴う免疫防御機構の変化を解析することにより、分泌型 IgA の生理的役割を追究した。

#### B. 研究方法

IgA の分泌に必須の分子である多量体抗体受容体 (pIgR) の遺伝子を欠損するマウス ( $\text{pIgR}^{-/-}$ )、TCR $\beta$ 鎖遺伝子を欠損するマウス ( $\beta^{-/-}$ ) (利根川進博士より分与された)、および両者を欠損するマウス ( $\text{pIgR}^{-/-}\beta^{-/-}$ ) を作製した。各マウスの小腸から常法に従って腸管上皮細胞間リンパ球 (IEL) を調製し、フローサイトメトリーで細胞構成を解析した。磁気ビーズ法で野生型マウス (WT) の脾臓から T 細胞を調製し、 $\text{pIgR}^{-/-}\beta^{-/-}$  マウスの静脈内に移入した ( $1 \times 10^7$  cells/head)。移入後 2 週間および 4 週間の時点で小腸 IEL を調製し、フローサイトメトリーで細胞構成を解析した。 $\text{pIgR}$  遺伝子欠損の影響を確認するために、ELISA 法で血清の IgA レベルを測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、株式会社ヤクルト本社中央研究所の動物実験倫理委員会の承認を得て行われた。

### C. 研究結果

pIgR<sup>-/-</sup>マウスは IgA の分泌が阻止されており、血中 IgA レベルが著しく高まっていた。また、pIgR<sup>-/-</sup>マウスは WT マウスに比べて小腸 IEL が多く、サブセット構成を調べた結果 Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-IEL の著しい増加が認められた。一方、無菌 pIgR<sup>-/-</sup>マウスは通常の pIgR<sup>-/-</sup>マウスに比べて血中 IgA レベルが 10 分の 1 程度に低下し、小腸における Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-IEL の増加は見られないことを既に明らかにしている。

次に、pIgR 欠損が Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-IEL を選択的に増加させるか否かを検討するために、pIgR<sup>-/-</sup>β<sup>-/-</sup>マウスの IEL を解析した。その結果、pIgR<sup>-/-</sup>β<sup>-/-</sup>マウスの IEL 数は WT マウスやβ<sup>-/-</sup>マウスと差がなく、pIgR<sup>-/-</sup>β<sup>-/-</sup>マウスとβ<sup>-/-</sup>マウスの IEL 構成 (~85%がγδ-T 細胞) には差がみられなかった。

Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-IEL は胸腺由来と考えられている。そこで、pIgR 欠損により増加する Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-IEL が腸管外から移行した可能性を検討するために、WT マウスの脾臓から調製した T 細胞 (>95%はαβ-T 細胞) を pIgR<sup>-/-</sup>β<sup>-/-</sup>マウスに移入したところ、2 週間後、4 週間後には IEL 数が増加し、小腸上皮細胞間に αβ-T 細胞 (~70%が Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-T 細胞) が検出された。また、移入細胞由来のαβ-IEL は脾臓 T 細胞に

比べて CD69 や CD103 の発現が高まっていた。

### D. 考察

pIgR<sup>-/-</sup>マウスでは、IgA の分泌が阻止され、IEL の特定のサブセット (Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-T 細胞) が著しく増加することが明らかになった。一方、無菌 pIgR<sup>-/-</sup>マウスの小腸では Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-IEL の増加が見られないことから、腸内細菌の刺激が Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-IEL の増加を誘導すると考えられた。さらに、脾臓 T 細胞の移入実験の結果は、pIgR<sup>-/-</sup>マウスでは Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-T 細胞が腸管外から小腸上皮細胞間に移行して増加する可能性を支持している。

これまでに、腸管上皮細胞 (IEC) はさまざまな細胞を遊走させる因子 (ケモカイン) を産生することが知られている。また、IEC と IEL は密接に位置しており、細胞間接着を介した相互作用も予想される。今後は WT マウスと pIgR<sup>-/-</sup>マウスの小腸粘膜の機能を詳細に比較することが重要である。

IgA の欠損と炎症性腸疾患やセリアック病との関連が提示されており、pIgR<sup>-/-</sup>マウスに見られる Thy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-IEL の選択的増加が腸管粘膜の炎症と関連するかどうかを検討することは興味深い。これらの知見は、腸管粘膜防御機構の破綻に起因すると推測される食物アレルギーの発症機序解明とその予防法開発につながることを期待される。

## E. 結論

pIgR<sup>+</sup>マウスではThy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-IELが選択的に増加することから、分泌型 IgA は小腸上皮細胞間への過剰なThy-1<sup>+</sup>CD8αβ<sup>+</sup>αβ-T 細胞の集積を抑え、腸管粘膜における炎症抑制や恒常性維持に関与すると考えられる。また、本研究の結果は、腸管粘膜において IgA 分泌とαβ-IEL が相互に補い合っ腸管の防御を担う可能性を示している。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

(論文発表)

Yamazaki K, Shimada S, Kato-Nagaoka N, Soga H, Itoh T, and Nanno M. Accumulation of intestinal intraepithelial lymphocytes in association with lack of polymeric immunoglobulin receptor. *Eur.J.Immunol.* 35:1211-1219. 2005.

Tamura M, Shikina T, Morihana T, Hayama M, Kajimoto O, Sakamoto A, Kajimoto Y, Watanabe O, Nonaka C, Shida K, and Nanno M. Effects of probiotics on allergic rhinitis induced by Japanese cedar pollen: Randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 143:75-82. 2007.

(学会発表)

Nanno M. 腸内細菌による腸管免疫機能

の修飾. 日本動物細胞工学会 2005 年度大会, Tokyo, July 6<sup>th</sup>, 2005.

Nanno M. 腸内細菌概説. 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会, Tokyo, May 31<sup>th</sup>, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

1) 分泌型 IgA の分泌因子を認識する単クローン抗体及び該抗体を産生するハイブリドーマ (特願 2001-387362、平成 13 年 12 月 20 日出願)

2) アレルギー性疾患予防・治療剤のスクリーニング方法 (特願 2005-167810、平成 17 年 6 月 8 日出願)

3) アレルギー性疾患予防・治療剤 (特願 2005-167811、平成 17 年 6 月 8 日出願)

### 2. 実用新案登録

特記事項なし。

### 3. その他

特記事項なし。

#### IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表 平成19年度(2007)

〈雑誌〉

主任研究者:清野 宏

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
Nochi T, Yuki Y, Matsumura A, Mejima M, Terahara K, Kim DY, Fukuyama S, Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y, Kohda T, Kozaki S, Igarashi O, Kiyono H.	A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses.	The Journal of Experimental Medicine.	204	2789-2796	2007
Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, Nakanishi U, Matsumura A, Uozumi A, Hiroi T, Morita S, Tanaka K, Takaiwa F, Kiyono H.	Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination.	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.	104	10986 - 10991	2007
Nagai S, Mimuro H, Yamamda T, Baba Y, Moro K, Nochi T, Kiyono H, Suzuki T, Sasakawa C, Koyasu S.	Role of Peyer's patches in the induction of Helicobacter pylori-induced gastritis.	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.	104	8971-8976	2007
Fukuyama S, Kiyono H.	Neuroregulator RET initiates Peyer's-patch tissue genesis.	Immunity	26	393-395	2007
McGhee JR, Kunisawa J, Kiyono H.	Gut lymphocyte migration: we are halfway 'home'.	Trends in immunology.	28	150-153	2007
Kunisawa J, Takahashi I, Kiyono H.	Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine.	Immunologic al reviews.	215	136-153	2007

分担研究者: 審良 静男

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
Andersen-Nissen E, Hawn TR, Smith KD, Nachman A, Lampano AE, Uematsu S, Akira S, Aderem A.	Cutting Edge: Tlr5-/- Mice Are More Susceptible to Escherichia coli Urinary Tract Infection.	J Immunol.	178	4717-2.	2007
Shim DH, Chang SY, Park SM, Jang H, Carbis R, Czerkinsky C, Uematsu S, Akira S, Kweon MN.	Immunogenicity and protective efficacy offered by a ribosomal-based vaccine from Shigella flexneri 2a.	Vaccine.	25	4828-36.	2007
Saha S, Takeshita F, Matsuda T, Jounai N, Kobiyama K, Matsumoto T, Sasaki S, Yoshida A, Xin KQ, Klinman DM, Uematsu S, Ishii KJ, Akira S, Okuda K.	Blocking of the TLR5 activation domain hampers protective potential of flagellin DNA vaccine.	J Immunol.	179	1147-54	2007
Hawn TR, Berrington WR, Smith IA, Uematsu S, Akira S, Aderem A, Smith KD, Skerrett SJ.	Altered inflammatory responses in TLR5-deficient mice infected with Legionella pneumophila.	J Immunol.	179	Jul-81	2007
Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, Kumar A, Aitken JD, Sitaraman SV, Neish AS, Uematsu S, Akira S, Williams IR, Gewirtz AT.	Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice.	J Clin Invest.	117	3909-21.	2007

Vijay-Kumar M, Aitken JD, Kumar A, Neish AS, Uematsu S, Akira S, Gewirtz AT.	TLR5KO mice have dysregulated intestinal gene expression and non-specific resistance to Salmonella-induced typhoid-like disease.	Infect Immun.	in press	in press	2008
--	--	---------------	----------	----------	------

分担研究者:川内 秀之

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
川内 秀之	アレルギー性鼻炎の制御に向けた治療戦略の確立	臨床免疫・アレルギー科編集委員会	臨床免疫・アレルギー科	444-451	2007
川内 秀之	スギ花粉症緩和剤による経口免疫寛容の誘導とスギ花粉症抑制の試み	Japan Allergy Foundation Kyusyu Branch		vol.11 p.5	2007
Takamura K., et al.	Regulatory role of lymphoid chemokine CCL19 and CCL21 in the control of allergic rhinitis	The Journal of Immunology	179	5897-5906	2007
高村 薫 他	アレルギー性鼻炎におけるT細胞応答の制御に関するCCR7リガンドの機能	山中 昇	耳鼻咽喉科アレルギー	152-153	2007
川内 秀之	花粉症の予防と治療戦略	日本医師会	日本医師会雑誌	1975-1979	2008
青井 典明 他	サイトカインによるアレルギー治療	森山 寛	耳鼻咽喉科展望	in press	
川内 秀之 他	アレルギー性鼻炎・花粉症の病態解明と治療戦略の確立ー環境衛生仮説から遺伝子治療までー	森山 寛	耳鼻咽喉科展望	in press	

分担研究者:南野 昌信

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	頁	出版年
Yamazaki K, Shimada S, Kato-Nagaoka N, Soga H, Itoh T, Nanno M.	Accumulation of intestinal intraepithelial lymphocytes in association with lack of polymeric immunoglobulin receptor.	Eur J Immunol	35 (4)	1211-1219	2007

Tamura M, Shikina T, Morihana T, Hayama M, Kajimoto O, Sakamoto A, Kajimoto Y, Watanabe O, Nonaka C, Shida K Nanno M	Effects of probiotics on allergic rhinitis induced by Japanese cedar pollen: Randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial.	Int Arch Allergy Immunol	143 (1)	75-82	2007
---	--	--------------------------	---------	-------	------

<書籍>

分担研究者: 審良 静男

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名/書籍名	出版社名・出版地	頁	出版年
植松 智、審良静男	Toll-like receptorと自然免疫	生化学会 生化学	生化学会 東京	769-776	2007



V. 研究成果の刊行物・別冊  
(主なもの)

# Sphingosine 1-Phosphate-Mediated Trafficking of Pathogenic Th2 and Mast Cells for the Control of Food Allergy<sup>1</sup>

Yosuke Kurashima, Jun Kunisawa, Morio Higuchi, Masashi Gohda, Izumi Ishikawa, Naoko Takayama, Miki Shimizu, and Hiroshi Kiyono<sup>2</sup>

Sphingosine 1-phosphate (S1P) has been proposed as a regulator of lymphocyte trafficking, but its role in mucosa-associated diseases, such as in food allergies, remains to be elucidated. To examine the role of S1P in allergic diseases in the intestine, we used a Th2 cell-mediated Ag-specific allergic diarrhea model and demonstrated that type 1 S1P receptor (S1P<sub>1</sub>) expression was preferentially associated with pathogenic CD4<sup>+</sup> T cells for the development of allergic reactions. Consistent with this demonstration, treatment with FTY720, a modulator of the S1P<sub>1</sub>, prevented allergic diarrhea by inhibiting the migration of systemically primed pathogenic CD4<sup>+</sup> T cells induced by oral challenge with allergen into the large intestine. In addition, FTY720 hampered mast cell infiltration into the large intestine, whereas eosinophil infiltration into the large intestine and total and allergen-specific serum IgE production were comparable between mock- and FTY720-treated groups. These results suggest that modulation of the S1P-mediated pathway to inhibit the migration of pathogenic CD4<sup>+</sup> T cells and mast cells into the large intestine could be a novel strategy for preventing allergic diarrhea. *The Journal of Immunology*, 2007, 179: 1577–1585.

**S**ituated in the gastrointestinal tract, one of the harshest environments in our body, both the small and large intestinal compartments are equipped with a highly orchestrated mucosal immune system to create and maintain an immunologically dynamic homeostasis between the host and the outside (1, 2). The gut mucosal immune system consists of numerous T cells, B cells, and APCs (e.g., dendritic cells and macrophages), which play important roles in the induction of protective immunity against pathogenic microorganisms invading the host via ingestion (3). Simultaneously, the intestinal mucosal immune system is capable of immunologic ignorance (i.e., oral tolerance) against nutritional Ags and commensal bacteria (4). These active and quiescent immune responses orchestrated by the intestinal immune system play a central role in the creation and maintenance of immunologic homeostasis in the intestine. Any disruption of that immunologic balance can lead to mucosa-associated immune diseases (e.g., inflammatory bowel diseases and food allergies) (5, 6).

Although an increasing number of patients suffer from food allergies, appropriate prevention and treatment methods for allergic diseases have not been fully developed because the underlying molecular and cellular pathological mechanisms are not well understood. To clarify the mechanisms whereby food allergies are induced, we previously established a murine food allergy model using OVA as a model allergen (7). In this model, mice were systemically primed with OVA and subsequently challenged with

OVA via the oral route on several occasions. After oral challenge, mice developed severe diarrhea in an allergen-specific manner. The allergic diarrhea required aberrant Th2-type responses, such as an elevated production of IL-4, IL-5, and IL-13 by the spleen and large intestine and high levels of OVA-specific serum IgE (7). In a separate study, we showed that a pathologic Th2-type environment was induced by the predominant expression of homodimer of IL-12 p40, which acted as an antagonist to heterodimeric IL-12 (p40 and p35) to trigger the shift from a Th1 to Th2 environment (8). Therefore, if the pathogenic Th2-dominant environment could be shifted to a Th1-dominant one by intranasal administration of plasmid DNA encoding the heterodimer of IL-12, allergic diarrhea could be prevented or effectively treated (9). Our previous studies also revealed that systemically primed CD4<sup>+</sup> T cells preferentially migrated from the spleen into the large intestine after repeated oral challenge, accounting for the development of an allergic reaction and clinical symptoms (7, 10). On the basis of these findings, we speculated that, in addition to the alteration of the Th1/Th2 balance, the migration of pathogenic CD4<sup>+</sup> T cells from the spleen into the large intestine might be a crucial step in the initiation of intestinal allergic responses that could be targeted to prevent disease development. In addition, several studies by other research groups using the murine allergic model revealed that infiltration of pathogenic cells such as mast cells, eosinophils, and CD4<sup>+</sup> T cells caused gastroenteropathy or gastrointestinal hypersensitivity (11, 12).

Sphingosine 1-phosphate (S1P),<sup>3</sup> a sphingolipid metabolite secreted mainly by platelets and mast cells, acts as a ligand for S1P receptors (13, 14). At present, five types of receptor have been identified (15), all of which share the same ligand (S1P) but each of which is associated with a different type of G protein, resulting in distinct signal transduction (15). Past research has shown that type 1 S1P receptor (S1P<sub>1</sub>) couples to G<sub>i</sub> protein; S1P<sub>2</sub> and S1P<sub>3</sub>

Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Received for publication April 27, 2007. Accepted for publication May 20, 2007.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported by grants from Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of the Japan Science and Technology Corporation (JST), the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, the Ministry of Health and Welfare in Japan, the Waksman Foundation, and Yakult Bio-Science Foundation.

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Hiroshi Kiyono, Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. E-mail address: kiyono@ims.u-tokyo.ac.jp

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: S1P, sphingosine 1-phosphate; S1P<sub>1</sub>, type 1 S1P receptor; HSA, human serum albumin; MLN, mesenteric lymph node; PP, Peyer's patch.

Copyright © 2007 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/07/\$2.00

receptors couple to  $G_i$ ,  $G_q$ , and  $G_{13}$  proteins; and  $S1P_5$  couples to  $G_{i/o}$  and  $G_{12}$  proteins (15). By activating small GTPases, such as Rho and Rac,  $S1P$  mediates cell migration via  $S1P_1$  (15). These observations suggest that  $S1P$  is multivalent, interacting with each receptor. Much is known about the role played by  $S1P$  in the regulation of lymphocyte trafficking, especially its roles in mediating lymphocyte emigration from the secondary lymphoid organs and thymus (13, 14). FTY720, a modulator for  $S1P$  receptors except the type 2 receptor, blocks  $S1P$ -mediated signaling by inducing internalization of the receptors from the cell surface (16–18). Thus, FTY720 prevents lymphocyte egress from the thymus and secondary lymphoid organs and thereby inhibits their infiltration into the inflammatory area (19). Because of these attractive immunologic features, FTY720 has been studied as potentially useful for the treatment of autoimmune diseases and the complications arising from transplantation (20–22). For instance, FTY720 treatment effectively inhibited aberrant T cell migration for the prevention of colitis, airway inflammation, and graft-versus-host disease (21–24).

In addition to the regulation of lymphocyte trafficking, the interaction of  $S1P$  with its receptors is involved in the regulation of the cellular functions causing the allergic reactions (e.g., mast cells, eosinophils, and macrophages) (14). For instance, cross-linking  $Fc\epsilon R1$  with IgE enhances  $S1P$  production by mast cells, and  $S1P$  reciprocally regulates the activation and trafficking of mast cells (25–28). In addition, i.p. administration of  $S1P$  induces the infiltration of eosinophils into the peritoneal cavity by enhancing CCR3-RANTES-dependent chemotaxis (29). Together with the result of an additional report indicating increased  $S1P$  secretion after allergen challenge in asthma (30), these findings have led us to propose the targeting of  $S1P$ -mediated trafficking of pathogenic cells (e.g., Th2 cells, mast cells, and eosinophils) as a potential strategy for preventing and treating food allergy.

In the current study, we used FTY720 to disrupt the trafficking of pathogenic cells between the systemic and mucosal compartments and thereby prevent and treat allergic diarrhea. Among the candidate effector cells purported to be involved in the development of intestinal allergies, allergen-sensitized  $CD4^+$  T cells expressed high levels of  $S1P_1$ . We demonstrated that FTY720 critically inhibited the infiltration of systemically primed  $CD4^+$  T cells into the large intestine after repeated oral challenge with the same allergen. The inhibition of  $CD4^+$  T cell migration was associated with impaired mast cell but not eosinophil infiltration into the large intestine. This study therefore offers a novel approach to the control of intestinal allergic disease by targeting the  $S1P$ -mediated pathogenic trafficking pathway of effector cells between the systemic and mucosal compartments.

## Materials and Methods

### *Allergic diarrhea induction, FTY720 treatment, and splenectomy in a murine model*

Female BALB/c mice and BALB/c nude mice, age 6–8 wk, were purchased from Japan CLEA or Japan SLC. GFP transgenic mice were provided by Dr. M. Okabe (Osaka University, Osaka, Japan) (31). All mice were provided with sterile food and water ad libitum. OVA-specific allergic diarrhea was induced as previously described (7–9, 32). Briefly, mice were primed by s.c. injection of 1 mg of OVA (Sigma-Aldrich) in CFA (Difco). One week after systemic priming, the mice were challenged orally with 50 mg of OVA and continued to be challenged three times each week.

For the treatment with FTY720, we used a previously established protocol (17, 23, 33), injecting mice i.p. with FTY720 (1 mg/kg per injection; Novartis Pharma) daily starting 1 day before systemic priming and continuing through oral allergen inoculation until the tenth postinoculation. For the splenectomy experiment, spleens were removed before systemic priming or the first, third, or eighth oral challenge as previously described (34). All animals were maintained in the experimental animal facility at the

University of Tokyo (Tokyo, Japan) and experiments were conducted in accordance with the guidelines provided by the Animal Care and Use Committee of the University of Tokyo.

### *Lymphocyte isolation*

Lymphocytes were isolated from the spleen, mesenteric lymph nodes (MLNs), Peyer's patches (PPs), and large intestine as previously described (7–10, 33, 35, 36). Briefly, single-cell suspensions were prepared from the spleen and MLNs by passing them through a 70- $\mu$ m mesh filter. To isolate lymphocytes from PP, the tissues were stirred in 1 mg/ml collagenase S-1 (Nitta Gelatin). Similarly, after removing epithelium by stirring in RPMI 1640 containing 1 mM EDTA and 2% FCS, large intestinal lymphocytes were isolated by collagenase treatment. Lymphocytes were further purified by discontinuous Percoll gradient centrifugation (40% and 75% layers).

### *Mast cell culture, in vitro migration assay, and cytokine production assay*

To obtain bone marrow-derived mast cells, cells isolated from the femur are cultured for 5–8 wk in medium conditioned with WEHI-3 cells from American Type Culture Collection (ATCC) as previously described (37). The mast cells were purified by using CD117 magnetic beads (Miltenyi Biotec) and then used in an in vitro migration assay in accordance with a previously established method (26). Briefly, the upper chambers of the Transwell plate (5- $\mu$ m pore) were coated with 20  $\mu$ g/ml fibronectin (Invitrogen Life Technologies) for 12 h and blocked for 1 h with PBS containing 3% BSA at 37°C. Mast cells were pretreated with 2  $\mu$ g/ml anti-DNP IgE (clone SPE-7; Sigma-Aldrich) in the presence of 0, 20, or 200 nM FTY720 for 12 h. After washing, pretreated  $10^6$  mast cells were added to the upper chamber together with 0, 20, or 200 nM FTY720. The 20 ng/ml DNP-human serum albumin (HSA) was placed in the lower wells. After a 6-h incubation, the surviving mast cells in the lower wells were counted by using trypan blue staining in a hemocytometer. For the cytokine assay, MC/9 cells (ATCC) were stimulated for 4 h with 1  $\mu$ g/ml anti-DNP IgE and 30 ng/ml DNP-HSA and 0, 20, or 200 nM FTY720. The amount of TNF- $\alpha$  and IL-5 was measured by a cytometric bead array system in accordance with the manufacturer's instructions (BD Pharmingen).

### *Flow cytometric analysis and cell sorting*

A standard protocol was used for cell staining and subsequent flow cytometry (33, 35). Briefly, cells were incubated with 5  $\mu$ g/ml anti-CD16/32 Ab (Fc block; BD Pharmingen) for 5 min and stained with fluorescently labeled Abs specific for B220, c-kit, IgE, CD4, CD69,  $\alpha\beta_7$  integrin (BD Pharmingen), CCR3 (R&D Systems), and  $Fc\epsilon R1\alpha$  (eBioscience) for 30 min at 4°C. A Viaprobe (BD Pharmingen) was used to discriminate between dead and live cells. Flow cytometric analysis and cell sorting were performed using FACSCalibur and FACSaria (BD Biosciences), respectively.

### *Adoptive transfer experiment*

Splenic  $CD4^+$  T cells were isolated from systemically primed GFP transgenic BALB/c mice by cell sorting before being i.v. transferred to SCID mice according to a previously described protocol (7). The reconstituted SCID mice were orally administrated with 50 mg of OVA three times per week (7). One week after the adoptive transfer, lymphocytes were isolated from the large intestine and analyzed by flow cytometry as described in the preceding paragraph.

### *Quantitative RT-PCR*

To elucidate mRNA expression for  $S1P$  receptors, quantitative RT-PCR using a LightCycler (Roche Diagnostics) was performed as previously described (33). TRIzol (Invitrogen Life Technologies) and Powerscript Reverse Transcriptase (BD Biosciences) were used for total RNA isolation and complementary DNA synthesis, respectively. The oligonucleotide primers and probes for  $S1P_1$  (forward) TACTACTGACCAACAAGGA, (reverse) ATAATGGTCTCTGGGTTGTC, (FITC probe) TGCTGGCAA TTCAATTCAAGAGGCCATCATC, (LRed 640 probe) CAGGCATG GAATTTAGCCGAGCAAATC; and for GAPDH (forward) TGAACG GGAAGCTCACTGG, (reverse) TCCACCACCCTGTTGCTGTA, (FITC probe) CTGAGGACCAGGTTGTCTCTCCGCA, (LRed 640 probe) TT CAACAGCAACTCCCCTCTCCACC) were designed and produced by Nihon Gene Research Laboratory (Sendai, Japan) (33).

### *Analysis of total and OVA-specific Ab production by ELISA*

To measure OVA-specific IgE, microtiter plates were coated with purified anti-mouse IgE Ab (BD Pharmingen) and blocked with PBS containing 3%

BSA. Diluted serum samples were added to the plates, which were then incubated for 4 h at room temperature before being washed four times with PBS containing 0.05% Tween 20. Biotin-labeled OVA was added and the plates were then incubated with HRP-conjugated anti-biotin Ab (Vector Laboratories). The reaction was developed by 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Moss), and color development was terminated by the addition of 0.5 N HCl. Endpoint titers were expressed as the reciprocal  $\log_2$  of the last dilution, which gave an OD at 450 nm of 0.1 greater than in nonimmunized mice. The total IgE was measured with a mouse IgE ELISA kit in accordance with the manufacturer's instructions (Yamasa).

#### T cell proliferation assay and measurement of cytokine production

CD4<sup>+</sup> T cells purified from the spleen, MLNs, and PP using CD4-coupled magnetic beads (Miltenyi Biotec) and mononuclear cells from large intestinal lamina propria were used for the proliferation assay and for the measurement of cytokine production as previously reported (7, 35). Briefly, cells were incubated for 72 h with 1 mg/ml OVA in the presence of irradiated (3000 rad) splenocytes. To measure cell proliferation, 1  $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H]thymidine was added to each well 8 h before termination, and the uptake of [<sup>3</sup>H]thymidine was determined by scintillation counting. To measure cytokine production, the amounts of cytokines (e.g., IL-4, IL-5, and IFN- $\gamma$ ) in the culture supernatant were measured by the cytometric bead array system in accordance with the manufacturer's instructions (BD Pharmingen).

#### Histological analysis

Immunohistochemical analysis was performed as previously described (7). For immunohistochemical analysis, the large intestine was fixed in 4% paraformaldehyde (Wako) and incubated in 20% sucrose. The tissues were embedded in OCT compound (Sakura Fine Technical Company). H&E staining was used to detect eosinophils (7). Similarly, intestinal mast cells were subjected to naphthol AS-D chloroacetate esterase staining (Sigma-Aldrich) and counterstained with hematoxylin (38).

#### Statistical analysis

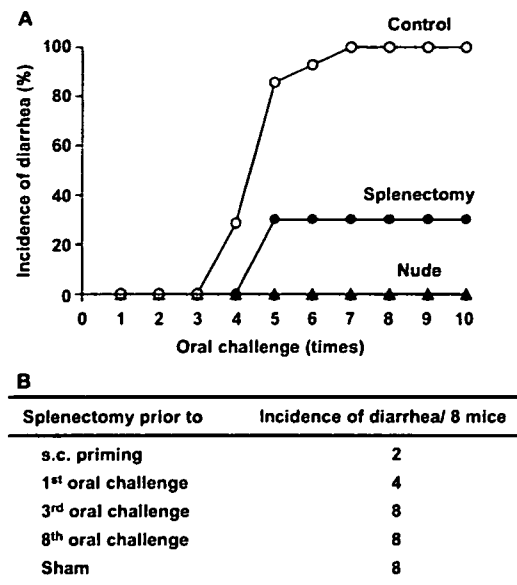
The results were compared using a Student's *t* test or Welch's *t* test. Statistical significance was established at a value for *p* < 0.05.

## Results

### Splenic T cells are essential for the induction of Ag-specific allergic diarrhea

We previously reported that systemically primed splenocytes preferentially migrated into the large intestine after repeated oral challenge with the same Ag; the splenocytes that migrated into the large intestine contributed to the development of severe allergic diarrhea (7). However, it remained unclear whether the spleen was directly involved in the intestinal allergy development, such as in the generation of pathogenic T cells. In the current study, our first experiment examined the induction of allergic diarrhea in splenectomized mice. Consistent with our previous results (7–9, 32), oral challenge (*n* = 4–10) with OVA resulted in severe diarrhea in spleen sham-treated (or intact) mice systemically primed with the same Ag (Fig. 1A). In contrast, the incidence of allergic diarrhea was reduced in splenectomized mice (Fig. 1A). To investigate the role of T cells in the induction of allergic diarrhea, we examined whether allergic responses were induced in nude mice lacking functional T cells due to their thymus deficiency. We found that systemically sensitized nude mice did not show any sign of allergic responses following exposure to oral allergen (Fig. 1A). These results further emphasize the importance of the spleen as an essential site for the induction and establishment of intestinal allergic responses.

We next investigated whether the spleen was required in the priming and/or oral challenge phase for the development of allergic diarrhea. To address this issue, we performed splenectomy at various time points and examined the influence of the timing of splenectomy on the development of allergic diarrhea. Allergic diarrhea was inhibited most effectively in mice that underwent sple-



**FIGURE 1.** The critical role of the spleen in the induction of allergic diarrhea. *A*, Three weeks after the splenectomy, splenectomized (●) mice and sham-operated (○) control mice were subjected to the allergic diarrhea inducing treatment. The incidence of allergic diarrhea was examined 1 h after each oral OVA challenge (*n* = 10). Nude mice were also examined for induction of allergic diarrhea (▲). *B*, Splenectomy was performed at various time points, including before systemic priming and before the first, third, or eighth oral OVA challenge, and the incidence of allergic diarrhea was examined 1 h after each OVA administration. The incidence of allergic diarrhea in splenectomized mice (*n* = 8 per group) after 10 challenges with oral OVA is depicted.

nectomy before systemic priming or initial oral challenge (Fig. 1B). In contrast, splenectomy just before the third or tenth oral challenge did not inhibit the development of allergic diarrhea (Fig. 1B). These results indicated that the spleen is involved during the early period of allergic diarrhea development, especially during the sensitization phase.

### Association of SIP<sub>1</sub> expression with the development of allergic diarrhea

SIP regulates the trafficking of lymphocytes, especially in their egress step from secondary lymphoid organs (13, 14). Because effector cell trafficking between the spleen and large intestine plays a crucial role in the induction of allergic diarrhea (7), we sought to investigate the possible contribution of the SIP<sub>1</sub> to trafficking by performing quantitative RT-PCR to measure the level of mRNA encoding SIP<sub>1</sub> in splenic CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 2). SIP<sub>1</sub> expression was low in systemically primed mice without oral challenge that did not develop intestinal allergic symptoms, compared with expression levels in naive CD4<sup>+</sup> T cells (Fig. 2). In contrast, SIP<sub>1</sub> expression was recovered and increased in diseased mice receiving both systemic priming and repeated oral challenge (Fig. 2). The difference in SIP<sub>1</sub> expression in CD4<sup>+</sup> T cells from mice with diarrhea (systemic priming plus oral challenge) and mice showing no symptoms (systemic priming only) may imply the involvement of the SIP<sub>1</sub> receptor-mediated pathway in the cell trafficking of effector CD4<sup>+</sup> T cells from the spleen to the large intestine for the induction of intestinal allergic responses.

### FTY720 prevents OVA-specific allergic diarrhea

The findings we report in this study (Figs. 1 and 2) lead us to speculate that manipulation of the SIP-mediated pathway could