

平成21(2009)年度 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kuwabara, H., Fushimi, K.	The impact of new payment system with case-mix measurement on hospital practice behavior for breast cancer patients in Japan	Health Policy	92	62-72	2009
Sato, E., Fushimi, K.	What has influenced patient health-care expenditures in Japan?: Variables of age, death length of stay and medical care	Health Economics	18	843-853	2009
Yamamoto, K., Fushimi, K.	Travel of patients to distant hospitals for elective surgery in Japan: A cross-sectional analysis of a nationally representative sample	Surgery Today	39	758-763	2009
川島 孝一郎	特集2 在宅医療と「ひとつの全体」 生きる上での構成概念と実体について	日本在宅医学会雑誌	第11巻 第2号	pp55-74	2010
川島 孝一郎	「地域の全体医療の中での在宅医療の役割」～地域の限られた医療資源を最大限に生かすために	新・医療連携 (エルゼビア・ジャパン)	第5号	pp14-17	2010
川島 孝一郎	実例に沿った在宅医療と展開のための基礎知識	難病と在宅ケア	Vol.15 No.3	pp16-20	2010
川島 孝一郎	地域の中で高齢者の生活情報・健康情報を どう共有するか 1. 医師の立場から	日本歯科医師会雑誌	Vol.62 No.2	pp72-75	2010
川島 孝一郎	在宅療養支援診療所の必要性	日本在宅ケア学会誌	第12巻第 2号	pp13-17	2009
川島 孝一郎	介護員のための重度介護時代の危機管理 (目くばり気くばり思いやり安全・安心ケア)	厚生科学研究所 GPnet	第55巻 11号	pp57-63	2009
川島 孝一郎	『家での看取り』を支えるための医療者の心構えとシステム	日総研出版 地域連携 network	Vol.1 No.6	pp 95- 101	2009. 1-2
川島 孝一郎	治す医療から生き方を支える医療へ 巻頭コラム『プラタナス』	日本医事新報社 日本医事新報	No.4419	p1	2009

平成21(2009)年度 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yanagawa K, Kawachi I, Yokoseki A, Arakawa M, Hasegawa A, Ito Y, Kojima N, Koike R, Tanaka K, Kosaka T, Tan C-F, Toyoshima Y, Kakita A, Tsuji M, Sakimura K, Takahashi H, <u>Nishizawa M</u> :	Pathologic and immunologic profiles of a limited form of neuromyelitis optica with myelitis	Neurology	73 (20)	1628-1637	2009
Tada M, Kakita A, Toyoshima Y, Onodera O, Ozawa T, Morita T, <u>Nishizawa M</u> , Takahashi H	Depletion of medullary serotonergic neurons in patients with MSA who succumbed to sudden death	Brain	132 (Pt 7)	1810-1819	2009
Kanazawa M, Shimohata T, Toyoshima Y, Tada M, Kakita A, Morita T, Ozawa T, Takahashi H, <u>Nishizawa M</u>	Cerebellar involvement in progressive supranuclear palsy: a clinicopathological study	Mov Disord	24 (9)	1312-1318	2009
Terajima K, Matsuzawa H, Shimohata T, Akazawa K, <u>Nishizawa M</u> , Nakada T	Tract-by-tract morphometric and diffusivity analyses in vivo of spinocerebellar degeneration	J Neuroimaging	19 (3)	220-226	2009
Hara K, Shiga A, Nozaki H, Mitsui J, Takahashi Y, Ishiguro H, Yomono H, Kurisaki H, Goto J, Ikeuchi T, Tsuji S, <u>Nishizawa M</u> , Onodera O	Total deletion and a missense mutation of ITPR1 in Japanese SCA15 families	Neurology	71(8)	547-551	2009

平成21(2009)年度 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yokoseki A, Shiga A, Tan C-F, Tagawa A, Kaneko H, Koyama A, Eguchi H, Tsujino A, Ikeuchi T, Kakita A, Okamoto K, <u>Nishizawa M</u> , Takahashi H, Onodera O	<i>TDP-43</i> mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis	Ann Neurol	63(4)	538-542	2009
Tani T, Sakimura K, Tsujita M, Nakada T, Tanaka M, <u>Nishizawa M</u> , Tanaka K	Identification of binding sites for anti- aquaporin 4 antibodies in patients with neuromyelitis optica	Neuroimmun o	211 (1-2)	110-113	2009
Hara K, Shiga A, Fukutake T, Nozaki H, Miyashita A, Yokoseki A, Kawata H, Koyama A, Arima K, Takahashi T, Ikeda M, Shiota H, Tamura M, Shimoe Y, Hirayama M, Arisato T, Yanagawa S, Tanaka A, Nakano I, Ikeda S, Yoshida Y, Yamamoto T, Ikeuchi T, Kuвано R, <u>Nishizawa M</u> , Tsuji S, Onodera	Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease.	n engl j med	360 (17)	1729- 1739	2009
Kitahara M, Shimohata T, Tokunaga J, <u>Nishizawa M</u>	Cervical dystonia associated with spinocerebellar ataxia type 2 successfully treated with levodopa: a case report	Mov Disord	[Epub ahead of print]		2009

平成21(2009)年度 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shimizu H, Yamada M, Matsubara N, Takano H, Umeda Y, Kawase Y, Kitamoto T, <u>Nishizawa M</u> , Takahashi H	Creutzfeldt-Jakob disease with an M232R substitution: report of a patient showing slowly progressive disease with abundant plaque-type PrP deposits in the cerebellum	Neuropathology	[Epub ahead of print]		2009
Takagi M, Tanaka K, Suzuki T, Miki A, <u>Nishizawa M</u> Abe H	Anti-aquaporin-4 antibody-positive optic neuritis	Acta Ophthalmol	87 (5)	562-566	2009
Nishihira Y, Tan C-F, Hoshi Y, Iwanaga K, Yamada M, Kawachi I, Tsujihata M, Hozumi I, Morita T, Onodera O, <u>Nishizawa M</u> , Kakita A, Takahashi H	Sporadic amyotrophic lateral sclerosis of long duration is associated with relatively mild TDP-43 pathology	Acta Neuropathol	117 (1)	45-53	2009
山下 和彦, 今泉一哉, 岩上 優美, 佐藤 満, 中島 佐和子, 井野秀一, 小山 裕徳, 川澄 正史, 伊福部 達	高齢者の定量的下肢筋力評価のための膝間力計測器の開発	電気学会論文誌	vol. 130 / No. 2	267-274	2010
野本洋平, 山下和彦, 大矢哲也, 小山裕徳, 川澄正史	主成分分析を用いた高齢者と若年者の下肢機能の評価手法の開発	電気学会論文誌	vol. 130 / No. 3	370-375	2010

平成21(2009)年度 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
<u>Kazuhiko Yamashita</u> , Yumi Iwakami, Kazuya Imaizumi Hirohide Komatsu, Hiroshi Honda, Masaru Komino, Toshihiko Obayashi, Yuhei Saito, Hiroshi Yasumura, Ryosuke Hosaka, Shigenobu Shimada, Shuichi Ino, Toru Ifukube, Takashi Okubo	Development of Computerized Surgical Instrument by the ceramic RFID Tag	World Congress 2009, Medical Physics and Biomedical Engineering			2009
Shuichi Ino, Mitsuru Sato, <u>Kazuhiko Yamashita</u> , Takashi Izumi.	A Preliminary Study of a Power Assist System for Toe Exercise using a Metal Hydride Actuator	World Congress 2009, Medical Physics and Biomedical Engineering			2009
Sawako Nakajima, Shuichi Ino, <u>Kazuhiko Yamashita</u> , Mitsuru Sato, A Kimura	Evaluation of Mixed Reality Sickness by Changing the Time Lag between Real Images and Virtual Images in an Advanced Driver Assistance System	World Congress 2009, Medical Physics and Biomedical Engineering			2009
Shuichi Ino, Minako Hosono, Mitsuru Sato, Sawako Nakajima, <u>Kazuhiko Yamashita</u> , Takashi Izumi	A Soft Metal Hydride Actuator Using LaNi ₅ Alloy and a Laminate Film Bellows	IEEE International Conference on Industrial Technology			2009

平成21(2009)年度 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Mitsuru Sato, Minako Hosono, Sawako Nakajima, Kazuhiko Yamashita, Takashi Izumi, and Shuichi Ino	Surplus Heat Drive Actuators using MH Alloys for Assistive Devices	IEEE International Conference on Industrial Technology		pp.10-13	2009
渋谷明隆	5' -ヌクレオチダーゼ	日本臨床	67増刊号8	543-545	2009
渋谷明隆	DPCデータ分析からみた北里4病院の位置づけ	北里医学	39	117-128	2009
渋谷明隆	Repeat radiofrequency ablation provides survival benefit in patients with intrahepatic distant recurrence of hepatocellular carcinoma.	Am J Gastroenterol	104	2747-2753	2009
渋谷明隆	Therapeutic benefits of partial splenic embolization for thrombocytopenia in hepatocellular carcinoma patients treated with radiofrequency ablation.	Hepatol Res.	39	772-778	2009
渋谷明隆	日本人PBC患者におけるFisk Fatigue Severity Score (FFSS) 日本語版の妥当性の検証	肝臓	50	51-59	2009
渋谷明隆	Vitamin D receptor polymorphisms are associated with increased susceptibility to primary biliary cirrhosis in Japanese and Italian populations.	J Hepatol.	50	1202-1209	2009
渋谷明隆	A randomized trial of 24 versus 48 weeks of peginterferon alpha-2a in patients infected with chronic hepatitis C virus genotype 2 or low viral load genotype 1: a multicenter national study in Japan.	Hepatol Int.	3	468-479	2009
渋谷明隆	The Cost of Adverse Events in Hospitalized Patients.	Kitasato Medical Journal.	39	165-170	2009
渋谷明隆	High serum alanine aminotransferase levels for the first three successive years can predict very high incidence of hepatocellular carcinoma in patients with Child Stage A HCV-associated liver cirrhosis.	Scand J Gastroenterol.	44	1340-1348	2009
森實敏夫	Rを用いたシミュレーションによるサンプルサイズの算出	あいみつく	31	10-14	2010

V. 研究成果の刊行物・別刷

Annual Review

神 経

編集 | 鈴木 則宏 慶應義塾大学教授
祖父江 元 名古屋大学教授
荒木 信夫 埼玉医科大学教授
宇川 義一 福島県立医科大学教授
川原 信隆 横浜市立大学教授

Ann Intern Med
New Engl J Med
Circulation JAMA
Lancet Endocr Rev Science
Ann Neurol
Ann Rev Biochem
Ann Surg Gastroenterology
Nature Cell J Natl Cancer I
Annu Rev Neurosci
Annu Rev Immunol

中外医学社

2010

□ II. 本年の動向

1) 神経難病疾患の医療費構造解析の問題点

北里大学医学部神経内科学講師 荻野美恵子

key words intractable disease, nanbyo, medical cost, social security budget

要 旨

日本は難治性疾患に対し世界に類をみない誇るべき制度を制定し、難治性疾患に罹患している患者を援助してきた。しかし、国家財政難により社会保障費が潤沢でないなかで、特定疾患治療研究事業の公費負担制度のあり方に関して研究が必要となっている。医療費助成が行われている45対象疾患以外の85難病についてはどの程度の医療費が掛かっているのかさえ不明である。医療費の内容を含め各特定疾患にどの程度の医療費助成が必要なのか、有用性、妥当性、公平性の詳細なデータは得られていない。そのため2008(平成20)年度より厚生労働省治療研究事業「難治性疾患の医療費構造に関する研究」にて解析を進めているところである。現在までパイロットスタディを通して主に分析の方法論につき検討してきた。最終的には難病になったがためにどの程度の経済的負担が掛かっているのかを分析し、最善の助成方法を模索するデータを提供できればと考えている。

動 向

現在、特定疾患治療研究事業では指定した45特定疾患〔2009(平成21)年9月現在〕に対して医療費の助成が行われているが、制定された当時と医療状況が変化してきており、対象疾患や制

度そのものの妥当性を検討する必要性が指摘されている。そのため厚生労働省治療研究事業「難治性疾患の医療費構造に関する研究」が公募され、2008年度より主任研究者として、難治性疾患にどのように医療費が使われているかを解析し、どのような補助が必要であるかを考える基礎となる資料を作成するべく研究を進めている。

これまでは現状把握および具体的な分析方法の検討に重きをおき、医療機関、調査期間、対象疾患などを限定してパイロットスタディを行った。調査していくなかでわかったことは日本においては医療費を網羅的に解析するための蓄積データ、ツールがないということであった。そのため、様々な方向から独自にデータを収集検討する必要がある。本稿ではデータ収集の方法論と今後の展望について報告する。

A. 難治性疾患の医療費構造を研究する目的、意義、社会的影響に関する検討

今回の対象疾患が難治性疾患であるため、多くの疾患が進行性の身体障害を伴うなど患者本人の経済的生産性が低いことが予想される。そのため医療経済分野でよく用いられる費用対経済効果の考え方だけで医療費の適正配分を論ずることは不適

66 Annual Review 神経 2010 II. 本年の動向

切である。調査対象としてどの程度の治療効果があったかという視点は重要ではあるが、その取り扱いについては注意が必要であり、疾患特異性を勘案してなされるべきである。

基本的には実際の医療費の使われ方の現状把握について優先的に研究を行う方針とし、実際の患者負担は医療費のみならず介護・福祉にわたるため、どこまで調査・分析対象を拡大するかについても討論した。

レセプトデータでは現在保険診療の対象となっている医療費については解析できるが、保険診療対象外の医療費および介護保険や自立支援法による費用などはレセプトデータのみでは把握することができない。

また、短期間で安定が見込まれる疾患と長期間におよび治療が必要となる疾患もあり、横断的調査では生涯医療費を論じることはできない。限られた調査期間で生涯医療費を前向き調査することには限界があるため、横断的調査を利用する場合にも、病期別、重症度別などの解析を加え、疾患ごとの典型的な経過を想定して生涯医療費の推計を行うなど工夫が必要と考えられた。

B. 研究班発足以前の特定疾患医療費に関するデータ

これまでに明らかとなっている公的なデータとしては、特定疾患治療研究事業対象45疾患に関して、実施主体である都道府県から国に対して特定疾患番号別総医療費が報告されているものがある。これは医療保険や高額医療費制度適用後の自己負担分について、所得に応じて国と都道府県が折半して軽減を行っているために報告されるものであり、実際に掛かった医療費および入院中の食費を元に計算された金額となっている。

この各都道府県からの報告を合算することにより国全体の特定疾患番号別総医療費が積算でき

る。また、患者総数も報告されているため、各特定疾患番号別の患者一人当たりの平均医療費は算出できる。しかし、個人によるばらつきや薬剤費や手術・処置費などの医療費構造などについては情報が無い。

そのほか公的データではないが、研究者や患者会等が調査した医療費の報告も散見されるが、いずれも一定の基準をもって収集されたものではないため、比較検討は困難である。

C. 特定疾患の医療費調査の方法論の検討および現状把握

1. 特定疾患推定患者数

特定疾患治療研究事業として医療費補助の受給者対象45疾患の患者数については申請状況から把握することが可能であるが、疾患によっては重症にならないと認定されていないため、軽症者の把握はできない可能性がある。

また、難治性疾患克服研究事業の調査研究対象130疾患のうち医療費補助の対象ではない疾患については個々の調査研究の疫学調査から導き出された推計値がある疾患とない疾患があった。主に「特定疾患の疫学に関する研究」班の研究報告書である患者調査に基づく難病の受療状況データブックを参考に過去の報告についてまとめた。また、個々の調査研究班による疫学研究について難病情報センター¹⁾に公開されている情報および「難病30年の研究成果」報告書(平成16年)²⁾をもとに検索した。さらにそれらを医療受給者証所有者数と対比させることにより、推計値とのずれを把握できるようにした。

「患者調査による難病の受療状況データブック」³⁾にも記載されているように、このデータは患者調査日当日に受診した受療者から推計したものであり、一般に難病患者は患者数が比較的小さいため一日のみの調査ではばらつきが大きくなることが

予想される。この方法による推計値が必ずしも現状を把握できていない場合がある。

2. 特定疾患患者の受診医療機関分布

一人の患者に注目したときに、受療している医療機関は多岐にわたることが予想される。医療機関だけでも数カ所平行して受療している可能性や院外薬局を利用している場合、医療保険による訪問看護を利用している場合もあり、一時点の医療費だけでも多岐にわたる。また、時間軸でみたときにも急性期病院、亜急性期病院、慢性期病院、在宅医療など患者の病像によって様々な医療機関にて受療している可能性があり、一部の医療機関のデータで推測することに無理がある。調査に当たっては医療形態別にも検索し、どのような点が異なるのかも分析する必要がある。

過去の受療データとしては前述の「患者調査による難病の受療状況データブック」に外来状況と入院状況について診療費等支払い方法の調査結果があり参考になると思われた。

3. 特定疾患を抽出するための病名検索方法

主にレセプトデータを用いるときに、検索方法によっては結果が大きく異なることになるため、病名検索方法を統一する必要がある。現在使用されている病名は各医療機関で異なる可能性があり、できるだけ共通の検索病名を指定するために、現在広く用いられているいくつかの病名コードと特定疾患との対応表の作成を試みた。

具体的にはDPCでも用いられている国際分類であるICD10、および多くの病院で用いていると思われる標準病名マスター Ver2.64の対応表を作成した。

また、医療機関に受療している患者レセプトデータと病歴データは必ずしも連動しているわけではないこともわかった。たとえば患者レセプトデータで特定疾患受給者証を用いて医療会計が発

1) 神経難病疾患の医療費構造解析の問題点 67

生している患者の絞り込みは比較的容易にできるものの、何番の特定疾患であるかというコードまでレセプトデータのなかで管理している医療機関は少ない。そのため、一人一人レセプトで確認しなければならない医療機関もでてくる。各医療機関で病歴およびレセプト管理の仕方が、使用している電子レセプトソフトによっても異なり、統一したフォーマットで行うのは困難が予想された。

4. レセプトデータおよびDPCデータを用いた医療費の検索方法

現在DPC対応病院であれば少なくとも入院データはEFファイル形式で検索可能であるが、外来レセプトに関しては電子レセプト対応になっている医療機関が多いものの、DPCデータと直接比較は困難である。また、病院形態による調査を考えたとき、DPC対応病院以外の病院の解析も重要なため、電子レセプトベースの解析が不可避である。

電子レセプトファイルは個々の患者の個票データベースであり統計解析するためには集計用データに変換する専用の変換ソフトが必要であることが考えられた。どのような項目を取り上げて解析するかを検討し、電子レセプト情報からEFファイルと対応させるための変換ソフトを開発した。検討項目としては現在の診療報酬体系にのっとりしたものとし、A. 基本診療料、B. 医学管理料、C. 在宅医療、D. 検査、E. 画像診断、F. 投薬、G. 注射、H. リハビリテーション、I. 精神科専門療法、J. 処置、K. 手術、L. 麻酔、M. 放射線治療、N. 病理診断を反映するものとした。

病院や医院からのレセプトデータの場合、院外薬局での投薬が多いと薬剤費が網羅できない。EFファイルの場合は出された薬剤から推計することは可能であるが、膨大な労力を要する。また、電子レセプトデータの場合は前向き調査でないと薬剤費の推計は困難であり、調査依頼医療機関事

68 Annual Review 神経 2010 II. 本年の動向

務部門への負担が大きい。保険者番号等をデータにとれば他の医療機関からのレセプトデータも連結可能とすることはできるものの、個人情報となるおそれがあり、保険者番号を用いての解析は困難と考え、今回は連結不可能な解析にせざるを得ないと結論した。連結不可能匿名化された全DPCデータをそのまま収集して、委託機関で疾患抽出をする方法をとらざるを得ない。

全体にレセプト病名で患者検索を行い、集計していくときに、いわゆるレセプト病名（診療報酬の適用を受けるための診断名をつけること）が含まれる可能性を考えておかねばならない。診断確実例に絞って検索するためには、専門家により、診断確実例を抽出し、分析する必要がある。連結不可能匿名化した保険者データなどではこのような解析は不可能であるので、研究協力いただく個々の医療機関で診断確実例につき連結可能匿名化した分析が必要となる。重症度など臨床データと対比させて分析を行う場合も同様である。その際、分担研究者の各病院からのデータだけでは希少疾患ゆえに患者数に偏りが出る可能性や治療方針の違いが医療費に影響を与える可能性もあることを考慮して評価すべきである。

国全体のデータを調べるためには現在行われている受療調査のデータを使用できないか検討する必要がある。その一つとして社会医療診療行為別調査のデータアクセスの申請を行うこととした。ただし、限定された患者数の調査のため希少疾患がどの程度反映されるかについては検討が必要である。

5. 現在の保険診療に含まれない医療費、介護福祉にかかわる費用

特定疾患患者が病気になったがゆえに増加する支出は診療報酬でカバーされている医療費のみならず、自己負担で行っている医療費、民間療法に投じる医療費、介護福祉にかかわる費用など様々

な形態が予想される。このような費用は単純にレセプトデータの解析では把握できず、患者ベースの調査が必要である。分担研究者の研究にも患者費用負担に着目した報告があり、その実態が明らかになっている。

D. 限定した特定疾患を用いたパイロットスタディ

特に数の多い疾患について医療費項目ごとの費用分布の解析を行った。厚生労働省より提供された2007（平成19）年11月の社会保険診療報酬支払基金のデータおよび今回協力を得られた3大学病院（A病院・B病院・C病院）の2008（平成20）年7～10月のDPC抽出データを基に解析した。

入手できた2007年度の支払基金データは医科、歯科、訪問などのおおまかな医療行為別に入院・外来別に集計されたもので、おのおのの医療行為について同一人で連結させることはできず、個人ベースの医療費としては把握できない。そのため疾患ごとの総医療費として解析した。また、1カ月分のみデータのため、希少疾患によっては十分に把握できていない可能性がある。そのため、2008年度のデータとしてさらに3カ月分のデータを入手することとした。本データに関しては2009年度に解析し、月ごとでどの程度異なるかも検証する。

また、入院も在院日数の記載がないためその月にかかった入院医療費として集計されており、一日当たりや一入院当たりの医療費としては把握できない。

大学病院からのデータは患者ごとに医療費区別に点数がでており、個人ベースで医療費を把握できる。しかし、3病院の検討では、大学ごとに患者数・診療内容が異なる疾患があるためばらつ

きを生じていた。病院からのデータは個人ベースで考えても他の受療機関と連結できず、網羅的にはならないためと保険者からのデータを突き合わせて妥当性を検討する予定である。

E. 保険者情報の検討

各医療機関の調査では一人の患者の受療をすべて網羅することはできないため、むしろ保険者が把握しているデータを用いるほうが取りこぼしがないと考えられる。そのため、社会保険診療報酬支払基金および国民健康保険中央会より完全匿名化した特定疾患受給者証を保持しているほうの疾患番号別レセプトデータの一部を入手し、分析した。

F. 各分担研究者による研究

一部医療機関において患者調査に基づくフィールド調査を施行分析したところ、今後の調査研究の進め方に示唆に富む内容であった。また、DPCデータを用いた解析の報告も一施設ごとでも様々な実態がわかり、今後の調査、分析の礎となる。医療保険で特定疾患を用いるとき、障害者自立支援法の施設として入院するときの特定疾患の扱いが異なることも注目すべき点である。詳細は平成20年度研究班報告書に記載されているので参照にされたい。

むすび

これまで特定疾患の医療費において、特定疾患ごとの総医療費は明らかであったものの、医療費構造に注目して研究したものはない。既存の入手可能なデータからでは患者別の医療費を求めることは困難で、総医療費はわかってもばらつきや内容に踏み込んだ分析を行うことはできず、新たに調査解析する必要があることがあらためてわかっ

1) 神経難病疾患の医療費構造解析の問題点 69

た。

調査していくなかでわかったことは日本においては医療費を網羅的に解析するための蓄積データ、ツールがないということである。そのなかでDPCデータについては網羅的に把握できる重要なツールであることを再認識したが、あくまで急性期病院での分析であり、今回解析しようとしている難治性疾患が必ずしも急性期病院にて受療しているとは限らないこと、たとえ受診していたとしても希少疾患ゆえにDPC分類では対応できない疾患が多く存在することは認識する必要がある。DPC以外には同じフォーマットで解析できるデータはないといってよい。保険者データにしても各保険者で独自にデータ管理しているため、各保険者に個別にデータ提供の交渉をせねばならず、大変な労力を要する。電子レセプトも大規模病院では行っているが、2009年2月現在全医療機関の40%の医療機関しか対応しておらず、全レセプト数に対するカバー率も60%と発表されているので、たとえすべての電子レセプトデータを入手できたとしても6割程度の把握にしかならないということになる。加えて電子レセプトデータを統計処理する際にもそのままでは使用できず、変換ソフトを開発しなければならないことも確認できた。また、特定疾患症例の絞り込みについて病名コードが必要となるが、保険上の病名の使用状況も必ずしも全国で統一されておらず、多施設での検索においてはさらに困難を極めることもわかった。

また、全国一律で行われる患者調査も重要なデータソースではあるが、難治性疾患に関しては希少疾患ゆえに一日で網羅できるとは限らない。

以上のように今回の難治性疾患に限らず、残念ながら日本において医療費構造を分析するだけのデータベースが存在せず、医療費分析のための基礎データ蓄積が非常に希薄な状態であるということは、今後の医療政策を検討するうえでも大きな

70 Annual Review 神経 2010 II. 本年の動向

問題と考える。

データ収集は困難ではあるが、本研究は具体的に今後の特定疾患治療研究事業の進め方と公費負担制度を判断する際の基礎的資料になるだけでなく、難治性疾患の医療・福祉の医療費研究を通して、さらに、広く公共の福祉を考えたとき、現代社会において社会保障のあるべき姿を考える際の縮図となり得る。国民のだれもが難治性疾患に罹患する可能性はあるが、ひとたび難治性疾患患者となると社会的弱者となりやすい。介護保険、障害者自立支援法など他の社会福祉施策との関連も

踏まえつつ、医療費の視点で、特定疾患治療事業のあるべき姿を研究することにより、国民の保健・医療・福祉の向上に役立てることができると考えている。

文献

- 1) 難病情報センター <http://www.nanbyou.or.jp>
- 2) 「難病30年の研究結果」報告書。平成16年3月特定疾患の疫学に関する研究班。難病の研究成果に関する調査報告書。
- 3) 土井由利子, 他. 患者調査による難病の免疫状況データブック. 国立保健医療科学院. 2008年3月.

Annual Review ^{しんけい} 神経 2010 ©

発行 2010年 1月25日 初版 1刷

編集者 ^{すず} 鈴木 ^{のり} 則 ^{ひろ} 宏
^そ 祖父 ^え 江 ^{げん} 元
^あ 荒 ^き 木 ^{のぶ} 信 ^お 夫
^う 宇 ^{がわ} 川 ^{よし} 義 ^{かず} 一
^{かわ} 川 ^{はら} 原 ^{のぶ} 信 ^{たか} 隆

発行者 株式会社 中外医学社

代表取締役 青木 滋

〒162-0805 東京都新宿区矢来町 62

電・話 03-3268-2701 (代)

振替口座 00190-1-98814 番

印刷 / 東京リスマチック (株) < KS・TM >

製本 / 田中製本 (株) Printed in Japan

ISBN978-4-498-12868-2

JCOPY < (社) 出版者著作権管理機構 委託出版物 >

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。
複写される場合は、そのつど事前に、(社)出版者著作権管理機構
(電話 03-3513-6969, FAX 03-3513-6979, e-mail: info@jcopy.
or.jp) の許諾を得てください。

RANK-RANKL Signaling Pathway Is Critically Involved in the Function of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Chronic Colitis¹

Teruji Totsuka,^{2*} Takanori Kanai,^{2,3*} Yasuhiro Nemoto,* Takayuki Tomita,*
Ryuichi Okamoto,* Kiichiro Tsuchiya,* Tetsuya Nakamura,* Naoya Sakamoto,*
Hisaya Akiba,[†] Ko Okumura,[†] Hideo Yagita,[†] and Mamoru Watanabe*

It is now clear that functional CD4⁺CD25⁺ regulatory T (T_R) cells exist as part of the normal immune population and prevent the development of intestinal inflammation. We have recently shown that CD4⁺CD25⁺ T_R cells reside in the intestine and control intestinal homeostasis in humans and mice. In this study, we demonstrate that the TNF family molecule RANKL and its receptor RANK are critically involved in controlling the function of CD4⁺CD25⁺ T_R cells in the intestine. We first found that RANKL was preferentially expressed on both CD4⁺CD25⁺ T_R cells and colitogenic CD4⁺ T cells, whereas RANK was expressed on dendritic cells. Although neutralizing anti-RANKL mAb did not affect T_R activity of CD4⁺CD25⁺ T_R cells to suppress the proliferation of CD4⁺ responder cells in vitro, in vivo administration of anti-RANKL mAb abrogated CD4⁺CD25⁺ T_R cell-mediated suppression of colitis induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{high} T cells into SCID mice. Interestingly, an adoptive transfer experiment using Ly5.1⁺CD4⁺CD45RB^{high} cells and Ly5.2⁺CD4⁺CD25⁺ T_R cells revealed that the ratio of CD4⁺CD25⁺ T_R cells in total CD4⁺ T cells in inflamed mucosa was significantly decreased by anti-RANKL mAb treatment. Consistent with this, the expression of RANK on lamina propria CD11c⁺ cells from colitic mice was significantly increased as compared with that from normal mice, and in vitro treatment with anti-RANKL mAb suppressed the expansion of CD4⁺Foxp3⁺ T_R cells in culture with colitic lamina propria CD11c⁺ cells. Together, these results suggest that the RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in regulating the function of CD4⁺CD25⁺ T_R cells in colitis. *The Journal of Immunology*, 2009, 182: 6079–6087.

Intestinal mucosal surfaces are exposed to a large number of dietary and bacterial Ags (1–5). However, the gut-associated immune system fences off harmful Ags from systemic circulation and induces systemic tolerance against luminal Ags. In contrast, inflammatory bowel diseases (IBD)⁴ and animal models of T cell-mediated chronic colitis are associated with the activation of intestinal and systemic immune responses (2, 3). In this regard, CD4⁺CD25⁺ regulatory T (T_R) cells play a central role in the maintenance of immunological homeostasis (6, 7). CD4⁺CD25⁺ T_R cells have been detected mainly in lymphoid sites, including thymus, lymph nodes, and spleen. Because numerous studies have demonstrated the capacity of CD4⁺CD25⁺ T_R cells to prevent the

induction of immune responses and this suppression requires direct cell-cell contact with responder T cells or APCs, it is conceivable that CD4⁺CD25⁺ T_R cells act as a central regulator within lymphoid tissues (6–8).

The GALT can be divided into effector sites, which consist of lymphocytes scattered throughout the lamina propria (LP) of the intestinal mucosa and organized lymphoid tissues (inductive sites) such as mesenteric lymph nodes (MLNs) and Peyer's patches, which are responsible for the induction phase of immune responses (2, 9). It is thought that presentation of Ags to naive, effector, and memory T cells is concentrated at these inductive sites of organized mucosal lymphoid follicles, and thus APCs finely tune the balance between intestinal immune tolerance and inflammation.

In addition to the inductive sites, however, it remains unclear where CD4⁺CD25⁺ T_R cells suppress the development of colitis. Although it is reasonable to hypothesize that mechanisms for the induction, maintenance, and suppression of colitis would be centrally controlled in the inductive sites by CD4⁺CD25⁺ T_R cells, two-thirds of which constitutively express the lymph node-homing receptor CD62L (10), we previously demonstrated that human intestinal LP CD4⁺CD25^{bright} T cells obtained from normal individuals possess T_R activity in vitro and therefore questioned whether these inductive sites alone were involved in the induction and suppression of intestinal inflammation (11). We also reported that peripheral CD4⁺CD25⁺ T_R cells actually migrated to the intestine and suppressed the development of colitis in the CD4⁺CD45RB^{high} cell transfer model of colitis without the involvement of lymph nodes in lymph node-null LTα^{-/-} × RAG-2^{-/-} recipient mice (12). Consistent with our previous reports, it has recently been reported that CD4⁺CD25⁺ T_R cells were detected in peripheral tissues and at sites of ongoing immune responses, such as synovial fluid from rheumatoid arthritis patients (13), tumors (14), transplants (15), skin lesions in mice infected

*Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo; and [†]Department of Immunology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Received for publication July 5, 2007. Accepted for publication March 13, 2009.

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.

¹ This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research, Scientific Research on Priority Areas, Exploratory Research and Creative Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology; the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare, the Japan Medical Association, and the Foundation for Advancement of International Science.

² T.T. and T.K. contributed equally to this work.

³ Address correspondence to Dr. Takanori Kanai at the current address: Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan. E-mail address: takagast@sc.itc.keio.ac.jp

⁴ Abbreviations used in this paper: IBD, inflammatory bowel disease; LP, lamina propria; MLN, mesenteric lymph node; RANK, receptor activator of NF-κB; SP, spleen; RANKL, receptor activator of NF-κB ligand; T_R, regulatory T; IEL, intraepithelial lymphocyte; HPF, high-power field; Fwd, forward; Rev, reverse; MMC, mitomycin C; DC, dendritic cell; RA, retinoic acid.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

with *Leishmania major* (16), lungs from mice infected with *Pneumocystis carinii* (17), and diseased lesions in delayed-type hypersensitivity models (18), as well as in inflamed mucosa of colitic mice (8, 19).

However, it remains largely unknown which molecular mechanisms actually control the function of CD4⁺CD25⁺ T_R cells in the intestine to suppress intestinal inflammation. In the present study, we show that both CD4⁺CD25⁺ T_R cells and colitogenic CD4⁺ T cells preferentially express a TNF family member, receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), and that blockade of the signaling pathway via RANKL and its receptor activator of NF- κ B (RANK) (20) by administering neutralizing anti-RANKL mAb abrogates the CD4⁺CD25⁺ T_R cell-mediated suppression of colitis induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{high} T cells into SCID mice, indicating a critical role for the RANKL/RANK signaling pathway in the function of intestinal CD4⁺CD25⁺ T_R cells in attenuating colitis.

Materials and Methods

Animals

Female BALB/c, CB-17 SCID, and C57BL/6-Ly5.2 mice were purchased from Japan Clea. C57BL/6-Ly5.1 mice and C57BL/6-Ly5.2 RAG-2-deficient (RAG-2^{-/-}) mice were obtained from Taconic Farms and Central Laboratories for Experimental Animals. Mice were maintained under specific pathogen-free conditions in the animal care facility of Tokyo Medical and Dental University. Mice were used at 7–12 wk of age. All experiments were approved by the regional animal study committees.

Antibodies

The following mAbs except anti-CCR9 mAb (R&D Systems) and reagents were purchased from BD Pharmingen: RM4-5, PE-, or PerCP-conjugated anti-mouse CD4 (rat IgG2a); 7D4, FITC-conjugated anti-mouse CD25 (rat IgM); PC61, PE-conjugated anti-mouse CD25 (rat IgG1); H1.3F3, FITC-conjugated anti-CD69 (Ham IgG1); FJK-16s, allophycocyanin-conjugated anti-mouse Foxp3 (rat IgG2a); DATK32, PE-conjugated anti-integrin α _F β ₇ (rat IgG2a); M290, PE-conjugated anti-integrin α _F β ₇ (rat IgG2a); 242503, PE-conjugated anti-CCR9 (rat IgG2b); isotype control Abs, biotin-conjugated rat IgG2, FITC-conjugated rat IgM, PE-conjugated rat IgG2a, and PE-conjugated mouse IgG2a; PE-conjugated streptavidin; and CyChrome-conjugated streptavidin. The neutralizing anti-mouse RANKL mAb (IK22-5, rat IgG2a), and anti-mouse RANK mAb (12-31, rat IgG2a) were prepared as described previously (21).

Purification of T cell subsets

CD4⁺ T cells were isolated from spleen cells of BALB/c mice using the anti-CD4 (L3T4) MACS system (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Enriched CD4⁺ T cells (96–97% pure, as estimated by FACSCalibur; BD Biosciences) were then labeled with PE-conjugated anti-mouse CD4 (RM4-5), FITC-conjugated anti-CD45RB (16A), FITC-conjugated anti-CD25 (7D4), and streptavidin-PE. Subpopulations of CD4⁺ cells were isolated by two-color sorting on a FACS Vantage (BD Biosciences). All populations were >98.0% pure on reanalysis.

In vivo adoptive transfer experiments

A series of in vivo experiments was conducted to investigate the role of the RANK/RANKL pathway in the expansion and function of CD4⁺CD25⁺ T_R cells in the suppression of murine chronic colitis. In experiment 1, chronic colitis was induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{high} T cells into SCID mice (22). CB-17 SCID mice were injected i.p. with one or two subpopulations of sorted CD4⁺ T cells in PBS and then administered 250 μ g of anti-RANKL mAb or control rat IgG in 250 μ l of PBS three times per week for 6 wk as follows: 1) CD4⁺CD45RB^{high} alone (3×10^5 /mouse) plus control IgG ($n = 8$), 2) CD4⁺CD45RB^{high} alone (3×10^5) plus anti-RANKL mAb ($n = 8$), 3) CD4⁺CD45RB^{high} (3×10^5) plus CD4⁺CD25⁺ (1×10^5) plus control IgG ($n = 8$), or 4) CD4⁺CD45RB^{high} (3×10^5) plus CD4⁺CD25⁺ (1×10^5) plus anti-RANKL mAb ($n = 8$). Mice were sacrificed at 6 wk after T cell transfer. For experiment 2, to further assess the localization of effector T cells and T_R cells in the recipients, we used Ly5.1⁺CD4⁺CD45RB^{high} cells and Ly5.2⁺CD4⁺CD25⁺ cells as donors and C57BL/6 RAG-2^{-/-} mice as recipients in the same treatment setting as experiment 1 (12). In experiment 3, to more properly assess the effect of anti-RANKL mAb on the trafficking of T_R cells to

inflamed mucosa of colitic mice, we conducted another in vivo setting. First, RAG-2^{-/-} mice were transferred with CD4⁺CD45RB^{high} T cells and, 4 wk after transfer, these colitic mice were treated with 250 μ g of anti-RANKL mAb or control IgG two times within 1 day. Then they were retransferred with splenic Ly5.1⁺CD4⁺ T cells from normal mice, and we evaluated the cell number of Ly5.1⁺CD4⁺Foxp3⁺ and Foxp3⁻ cells recovered from LP, spleen (SP), and MLNs at 24 h after the retransfer.

Disease monitoring and clinical scoring

The recipient SCID mice after T cell transfer were weighed initially, then three times per week thereafter. They were observed for clinical signs of illness: hunched over appearance, piloerection of the coat, diarrhea, and blood in the stool. Mice were sacrificed and assessed for a clinical score as the sum of four parameters: hunching and wasting, 0 or 1; colon thickening, 0–3 (0, no colon thickening; 1, mild thickening; 2, moderate thickening; 3, extensive thickening); and stool consistency, 0–3 (0, normal beaded stool; 1, soft stool; 2, diarrhea; and an additional point was added if gross blood was noted) (12).

Histological examination

Tissue samples were fixed in PBS containing 6% neutral-buffered formalin. Paraffin-embedded sections (5 μ m) were stained with H&E. Three tissue samples from the proximal, middle, and distal parts of the colon were prepared. The sections were analyzed without prior knowledge of the type of T cell reconstitution or treatment. The area most affected was graded by the number and severity of lesions. The mean degree of inflammation in the colon was calculated using a modification of a previously described scoring system (12), as follows: mucosal damage, 0; normal, 1; 3–10 intraepithelial lymphocytes (IEL)/high-power field (HPF) and focal damage, 2; >10 IEL/HPF and rare crypt abscesses, 3; and >10 IEL/HPF, multiple crypt abscesses and erosion/ulceration, submucosal damage, 0; normal or widely scattered leukocytes, 1; focal aggregates of leukocytes, 2; diffuse leukocyte infiltration with expansion of submucosa, 3; diffuse leukocyte infiltration, muscularis damage, 0; normal or widely scattered leukocytes, 1; widely scattered leukocyte aggregates between muscle layers, 2; leukocyte infiltration with focal effacement of the muscularis, and 3; extensive leukocyte infiltration with transmural effacement of the muscularis.

Preparation of mucosal LP mononuclear cells

Colonic LP mononuclear cells were isolated using a method described previously (22). In brief, the entire length of intestine was opened longitudinally, washed with PBS, and cut into small (~5-mm) pieces. To remove epithelium including IEL, the dissected mucosa was incubated two times with Ca²⁺Mg²⁺-free HBSS containing 1 mM DTT (Sigma-Aldrich) for 30 min and then serially incubated two times in medium containing 0.75 mM EDTA (Sigma-Aldrich) for 60 min at 37°C under gentle shaking. The supernatants from these incubations, which included the epithelium and IEL, were desalted, and the residual fragments were pooled and treated with 2 mg/ml collagenase A (Worthington Biomedical) and 0.01% DNase (Worthington Biochemical) in 5% CO₂ humidified air at 37°C for 2 h. The cells were then pelleted two times through a 40% isotonic Percoll solution and further purified by Ficoll-Hypaque (Pharmacia) density gradient centrifugation (40%/75%). Enriched CD4⁺ LP T cells were obtained by positive selection using an anti-CD4 (L3T4) MACS magnetic separation system. The resultant cells when analyzed by FACSCalibur contained >96% CD4⁺ cells.

RT-PCR

Total cellular RNA was extracted from 7×10^5 cells using a RNeasy Mini Kit (Qiagen). Five micrograms of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). RANK and RANKL levels were measured with a QuantiTect SYBER green PCR kit using Applied Biosystems 17500 real-time PCR system and 7500 system SDS software with the following primers: RANK: forward (Fwd), 5'-GGT CTG CAG CTC TTC CAT GAC-3' and reverse (Rev) 5'-TGA GAC TGG GCA GGT AAG CC-3'; RANKL: Fwd, 5'-TTG CAC ACC TCA CCA TCA ATG-3' and Rev, 5'-TTA GAG ATC TTG GCC CAG CCT-3'; and G3PDH: Fwd, 5'-CTA CTG GCG CTG CCA AGG CAG T-3' and Rev, 5'-GCC ATG AGG TCC ACC CTG-3'. PCR cycling conditions consisted of 95°C for 15 min, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 40 s. Data are expressed as the relative amount of indicated mRNA as normalized against G3PDH.

Flow cytometry

To detect the surface expression of various molecules, isolated splenocytes or LP mononuclear cells were preincubated with a Fc γ R-blocking mAb

(CD16/32, 2.4G2; BD Pharmingen) for 15 min, then incubated with specific FITC-, PE-, or biotin-labeled Abs for 20 min on ice. Biotinylated Abs were detected with PE- or CyChrome-streptavidin. Intracellular Foxp3 staining was performed with the allophycocyanin-anti-mouse Foxp3 staining set (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Standard two- or three-color flow cytometric analyses were obtained using the FACSCalibur with CellQuest software. Background fluorescence was assessed by staining with control isotype-matched mAbs.

Cytokine ELISA

To measure cytokine production, 1×10^5 LP CD4⁺ T cells were cultured in 200 μ l of culture medium at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in 96-well plates (Costar) precoated with 5 μ g/ml hamster anti-mouse CD3 ϵ mAb (145-2C11; BD Pharmingen) and 2 μ g/ml hamster anti-mouse CD28 mAb (37.51; BD Pharmingen) in PBS overnight at 4°C. Culture supernatants were removed after 48 h and assayed for cytokine production. Cytokine concentrations were determined by specific ELISA per the manufacturer's recommendation (R&D Systems).

In vitro regulatory function of CD4⁺CD25⁺ T cells

Spleen cells from BALB/c mice were separated into unfractionated whole CD4⁺ T cells and CD4⁺CD25⁺ T cells using the anti-CD4 (L3T4) MACS magnetic separation system and/or FACS Vantage as described above. Responder CD4⁺ cells (7×10^4) and mitomycin C (MMC)-treated CD4⁺ cells (5×10^4) as APCs, with or without CD4⁺CD25⁺ cells (1×10^4), were cultured in the presence or absence of neutralizing anti-RANKL mAb or anti-RANK mAb (1, 3, or 10 μ g/ml) for 72 h in round-bottom 96-well plates in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 100 IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 50 μ M 2-ME. Incorporation of [³H]thymidine (1 μ Ci/well) by proliferating cells was measured during the last 9 h of culture. In some experiments, a CFSE dilution assay was performed. To this end, splenic CD4⁺ T cells were negatively obtained from whole spleen cells of normal C57BL/6 mice using a CD4 T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec). CD4⁺CD25⁻ responder T and CD4⁺CD25⁺ T_R cells were separately isolated using anti-CD25 MACS beads (Miltenyi Biotec) from the CD4⁺ T cells. CD11c⁺ dendritic cells (DC) were isolated from SP and LP of normal C57BL/6 mice and colitic C57BL/6 background RAG-2^{-/-} mice previously transferred with CD4⁺CD45RB^{high} T cells. All populations were >92% pure on reanalysis. Then, CD4⁺CD25⁻ responder T cells were labeled with 1 μ M CFSE (Molecular Probes). CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ responder T cells (1×10^5) were cocultured with unlabeled Ly5.2⁺CD4⁺CD25⁺ T_R cells (0.33×10^5) with CD11c⁺ DC (2×10^4) and anti-CD3 (1 μ g/ml) in the presence of anti-RANKL mAb (1 μ g/ml) or control IgG (1 μ g/ml) in 96-well round-bottom plates for 120 h in triplicates. After incubation, cells were collected and analyzed by FACS. Propidium iodide was added to exclude dead cells. Proliferation analysis was based on division times of responder CFSE⁻CD4⁺ T cells at the condition that can discriminate the unlabeled CD4⁺CD25⁺ T_R cells and CD11c⁺ DC cells.

In vitro induction of gut-homing receptors and CD4⁺Foxp3⁺ T_R cells

For the isolation of DC from LP, MLN, and SP of colitic mice, total cells obtained by digestion with collagenase were passed through a 40- μ m cell strainer. CD11c⁺ DC were further purified using an anti-CD11c MACS magnetic separation system, resulting in >80% purity. In vitro assay for the induction of gut-homing receptors was performed by the modified protocol established by others (23). In short, 2×10^5 CD4⁺ T cells purified from normal BALB/c mice were cultured with 2×10^3 purified LP, MLN, or splenic CD11c⁺ DC from colitic mice in addition to a soluble 1 μ g/ml anti-CD3 mAb (BD Biosciences), human 10 ng/ml rTGF- β (PeproTech), all-trans retinoic acid (RA), and 5 ng/ml human rIL-2 (Shionogi Pharm) with or without 1 μ g/ml anti-RANKL mAb. On day 4, cells were stained with PE-conjugated anti-CD4 mAb and FITC-conjugated anti-integrin $\alpha_4\beta_7$, FITC-conjugated anti-integrin $\alpha_4\beta_1$, or FITC-conjugated anti-CCR9 mAb. In some experiments, 2×10^5 CD4⁺ T cells purified from normal BALB/c mice were cultured with 2×10^3 purified LP, MLN, or SP CD11c⁺ DC from colitic mice in addition to soluble 1 μ g/ml anti-CD3 mAb (BD Biosciences) with or without 1 μ g/ml anti-RANKL mAb. On day 4, intracellular Foxp3 staining was performed with the allophycocyanin-anti-mouse Foxp3 staining set (eBioscience) according to the manufacturer's instructions.

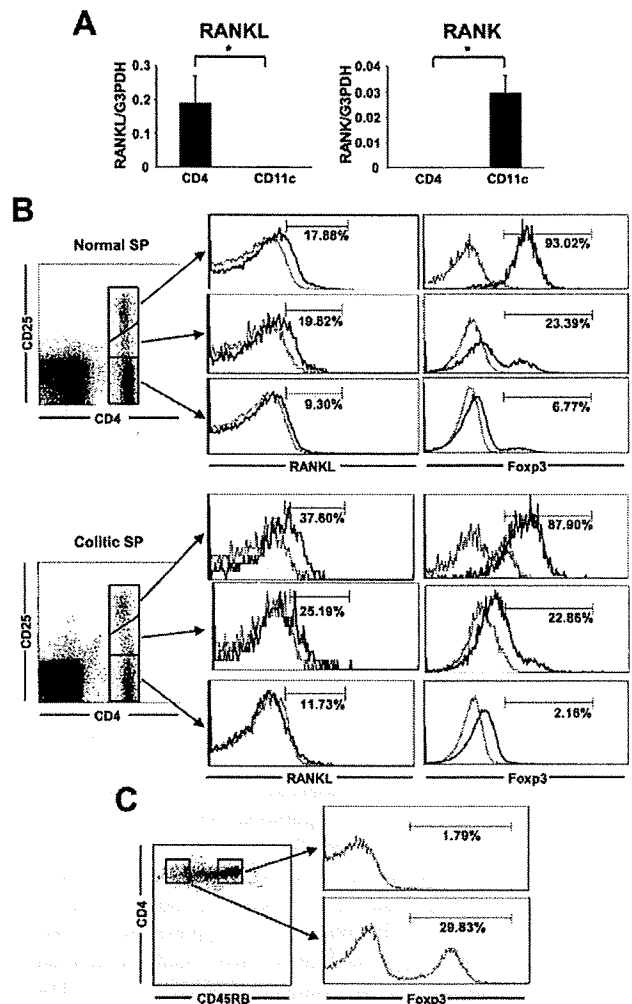


FIGURE 1. Expression of RANK/RANKL in spleen cells from normal and colitic mice. **A**, Expression of RANK, RANKL, and G3PDH mRNA was determined by RT-PCR using five SP samples each from normal and colitic mice and is shown as relative amount of the indicated mRNA normalized to G3PDH. Data are represented as the mean \pm SEM of five samples. *, $p < 0.005$. **B**, Phenotypic characterization of splenic CD4⁺ T cells expressing CD25 and Foxp3 by FACS. Correlation of CD25/Foxp3 and RANKL expression on/in splenic CD4⁺ T cells obtained from normal or colitic mice. Representatives of four separate samples in each group. **C**, Expression of Foxp3 in a population of CD4⁺CD45RB^{high} or CD45RB^{low} T cells purified from spleen of normal BALB/c mice.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm SEM. Groups of data were compared using the Mann-Whitney *U* test. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

Results

Murine splenic CD4⁺CD25⁺ cells constitutively express RANKL

To assess the role of the RANK/RANKL axis in the pathogenesis of chronic colitis in terms of stimulatory and inhibitory effects, we first assessed the expression of RANK and RANKL molecules in normal splenic CD4⁺ T cells and CD11c⁺ DC by RT-PCR. As shown in Fig. 1A, CD4⁺ T cells preferentially expressed RANKL, but not RANK mRNA, while CD11c⁺ cells preferentially expressed RANK, but not RANKL mRNA. We further assessed the expression of RANKL on CD4⁺ T cells obtained from colitic SCID mice induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{high} T

cells and age-matched normal BALB/c mice at a protein level by flow cytometry. As shown in Fig. 1B, splenic CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{low} T cells in normal mice slightly but substantially expressed RANKL, while CD4⁺CD25⁻ cells did not. We confirmed that almost all CD4⁺CD25^{high} T cells expressed Foxp3, while CD4⁺CD25^{low} T cells did not, indicating that CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{low} T cells are T_R and previously activated effector T cells, respectively (Fig. 1B). Interestingly, although colitic SCID mice were reconstituted with a splenic CD4⁺CD45RB^{high} T cell population that lacks CD4⁺CD25⁺ T_R cells, inducible CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells as well as activated CD4⁺CD25^{low}Foxp3⁻ T cells were found in the spleen and these cells expressed the RANKL molecule, in contrast to CD4⁺CD25⁻ T cells (Fig. 1B). To exclude the possibility that isolated CD4⁺CD45RB^{high} T cells were contaminated with CD4⁺Foxp3⁺ T_R cells, we examined the expression of Foxp3 in those cells by flow cytometry. Although almost one-third of the control CD4⁺CD45RB^{low} T cells expressed Foxp3, we confirmed that CD4⁺CD45RB^{high} T cells did not (Fig. 1C), indicating that a small part of CD4⁺CD45RB^{high}Foxp3⁻ T cells had differentiated into CD4⁺Foxp3⁺ T_R cells in LP or MLNs in the periphery and migrated to the spleen in colitic mice.

Blockade of the RANK/RANKL signaling pathway did not affect in vitro T_R activity of CD4⁺CD25⁺ cells

Having evidence that activated CD4⁺ T cells or CD4⁺CD25⁺ T_R cells express RANKL, we next assessed whether T_R activity of splenic CD4⁺CD25⁺ T cells is modulated by blocking the RANK/RANKL pathway using neutralizing anti-RANKL and anti-RANK mAbs in in vitro coculture assay. To this end, we used two approaches, [³H]thymidine uptake and CFSE dilution assay, to assess the proliferation of responder CD4⁺ T cells. As shown in Fig. 2A, splenic CD4⁺CD25⁺ T cells were able to suppress the proliferation of splenic CD4⁺ responder T cells when cocultured at a ratio of 1 T_R to 1 responder in the presence of MMC-treated CD4⁻ APCs, soluble anti-CD3 mAb, and control rat IgG. Similarly, neither anti-RANKL nor anti-RANK mAb at concentrations of 1–10 μg/ml affected the T_R activity of CD4⁺CD25⁺ T_R cells (Fig. 2A). To further precisely assess the role of the RANK/RANKL pathway in the suppressive activity of CD4⁺CD25⁺ T_R cells to block the proliferation of CD4⁺CD25⁻ responder T cells at the same ratio of the following in vivo adoptive transfer experiment, we next used CD4⁺CD25⁻ T cells as responder T cells and SP or LP CD11c⁺ DC from normal or colitic mice and adopted the CFSE dilution assay to assess the proliferation of responder CD4⁺CD25⁻ T cells without the impact of the proliferation of cocultured CD4⁺CD25⁺ T_R cells. As shown in Fig. 2B, the proliferation of CD4⁺CD25⁻ responder T cells is seen in the right part of the histogram, and they extensively proliferated in response to anti-CD3 mAb in the absence of CD4⁺CD25⁺ T_R cells with any CD11c⁺ DC regardless of SP or LP and normal or colitic DC. In contrast, the addition of CD4⁺CD25⁺ T_R cells prevented the proliferation of CD4⁺CD25⁻ responder T cells in the presence of anti-RANKL mAb to a similar extent in the presence of control IgG, indicating that the blockade of the RANK/RANKL pathway does not affect the suppressive activity of CD4⁺CD25⁺ T_R cells at least in vitro.

Blockade of the RANK/RANKL signaling pathway abolished CD4⁺CD25⁺ T_R cell-mediated suppression of colitis in vivo

Although blockade of the RANK/RANKL signaling pathway did not affect the T_R function of CD4⁺CD25⁺ cells in the coculture assay (Fig. 2), in vitro assays do not always reflect function in vivo. Thus, we next administered neutralizing anti-RANKL mAb to SCID mice transferred with CD4⁺CD45RB^{high} cells alone or a

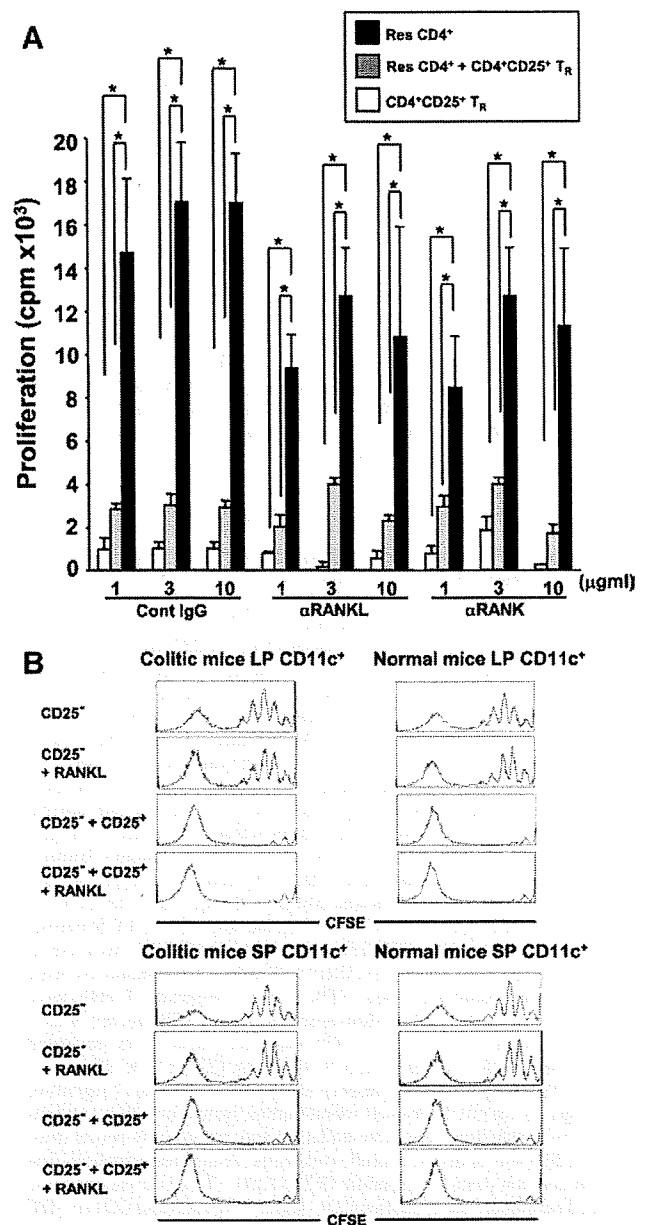


FIGURE 2. Blockade of the RANK/RANKL signaling pathway does not affect T_R activity in vitro coculture assay. **A**, Splenic CD4⁺CD25⁺ T cells suppress the proliferation of responder (Res) CD4⁺ T cells in vitro in the presence of neutralizing anti-RANKL or anti-RANK mAb. Responder CD4⁺ T cells and sorted CD4⁺CD25⁺ T cells were cocultured for 72 h with anti-CD3 mAb at a 1:1 ratio in the presence of MMC-treated APCs and in the presence of various concentrations (1, 3, or 10 μg/ml) of control IgG, anti-RANKL, or anti-RANK mAb. [³H]Thymidine ([³H]TdR) uptake was determined for the last 9 h. Data are represented as the mean ± SEM of triplicate samples. *, *p* < 0.05. **B**, Splenic CD4⁺CD25⁺ T_R cells suppress the proliferation of CD4⁺CD25⁻ responder T cells in vitro in the presence of anti-RANKL mAb. CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ responder T cells (1 × 10⁵) and CD4⁺CD25⁺ T_R cells (0.33 × 10⁵) were cocultured for 120 h with CD11c⁺ DC obtained from SP or LP of normal or colitic mice (2 × 10⁴) in the presence of anti-RANKL mAb (1 μg/ml) or control IgG (1 μg/ml) in addition to anti-CD3 mAb (1 μg/ml). Proliferation of the CD4⁺CD25⁻ responder T cells was measured by the dilution of CFSE on CD4⁺CD25⁻ responder T cells that is shown at the right part of the histogram at 120 h after culture. The unlabeled cells including CD4⁺CD25⁺ T_R cells and contaminated DC are seen at the left part of the histogram. Data are represented from four independent experiments.

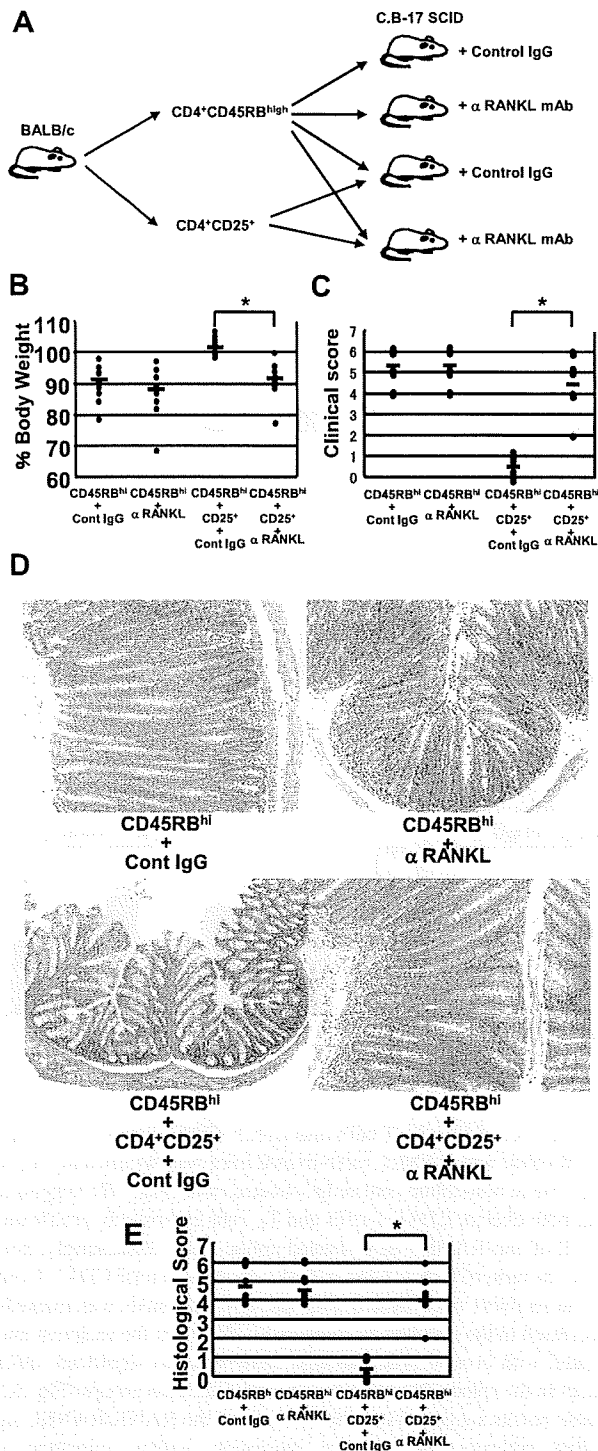


FIGURE 3. Anti-RANKL mAb abrogates CD4⁺CD25⁺ T_R cell-mediated suppression of colitis in vivo. *A*, C.B-17 SCID mice were injected i.p. with CD4⁺CD45RB^{high} (3×10^5 /mouse) alone or CD4⁺CD45RB^{high} (3×10^5) + CD4⁺CD25⁺ T cells (1×10^5) and treated with control IgG or anti-RANKL mAb by i.p. injection at a dose of 250 μg three times per week over 6 wk starting at the time of T cell transfer. *B*, Change in body weight over time is expressed as percentage of the original weight. Data are represented as the mean ± SEM of seven mice in each group. *, $p < 0.05$. *C*, Clinical scores were determined at 6 wk after transfer as described in *Materials and Methods*. Data are indicated as the mean ± SEM of seven mice in each group. *, $p < 0.05$. *D*, Histological examination of the colon at 6 wk after transfer. Original magnification, $\times 100$. *E*, Histological scores were determined at 6 wk after transfer as described in *Materials and Methods*. Data are indicated as the mean ± SEM of seven mice in each group. *, $p < 0.05$.

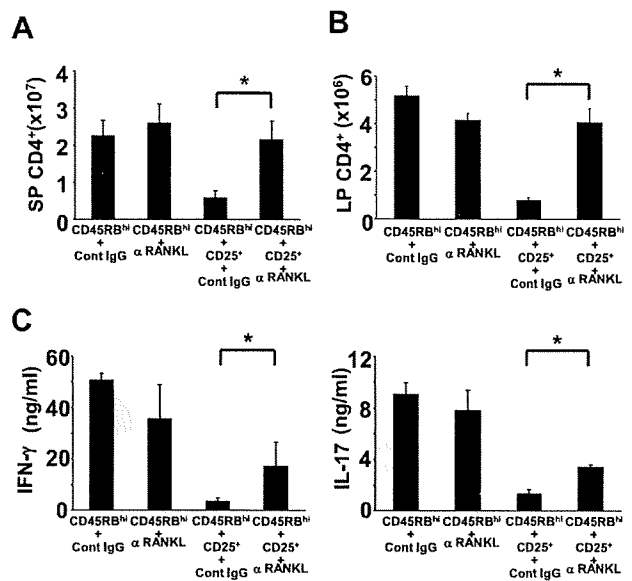


FIGURE 4. Anti-RANKL mAb abrogates CD4⁺CD25⁺ T_R cell-mediated suppression of Th1 and Th17 cells in vivo. *A*, SP and LP CD4⁺ T cells were isolated from the colon at 6 wk after adoptive T cell transfer and treated as described in Fig. 3, and the number of CD4⁺ cells was determined by flow cytometry. Data are indicated as the mean ± SEM of seven mice in each group. *, $p < 0.01$. *C*, Cytokine production by CD4⁺ lamina propria lymphocyte. LP CD4⁺ cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs for 48 h. IFN-γ and IL-17 concentrations in culture supernatants were measured by ELISA. Data are indicated as the mean ± SEM of six mice in each group. *, $p < 0.01$.

mixture of CD4⁺CD45RB^{high} cells and CD4⁺CD25⁺ T cells (Fig. 3A). As a positive control, mice transferred with CD4⁺CD45RB^{high} T cells alone and treated with control rat IgG developed wasting disease, which became evident 3–5 wk after transfer (Fig. 3B), and clinical (Fig. 3C) and histological evidence of severe chronic colitis as estimated at 6 wk after transfer (Fig. 3, D and E). As a negative control, mice transferred with both CD4⁺CD45RB^{high} and CD4⁺CD25⁺ T_R cell populations and administered with the control rat IgG did not develop wasting disease or colitis (Fig. 3, A–E). Although we showed that activated CD4⁺CD25^{low}Foxp3[−] effector T cells express RANKL (Fig. 1), the administration of anti-RANKL mAb to mice transferred with CD4⁺CD45RB^{high} cells alone did not affect the severity of colitis as compared with the control IgG-treated mice transferred with CD4⁺CD45RB^{high} cells alone (Fig. 3, A–E), suggesting that the RANK/RANKL pathway between RANKL-expressing activated effector CD4⁺ T cells and RANK-expressing APCs is not critically involved in the development of colitis. Surprisingly, however, the administration of anti-RANKL mAb did induce severe colitis in mice transferred with CD4⁺CD45RB^{high} cells and CD4⁺CD25⁺ T_R cell populations, indicating that the anti-RANKL mAb treatment abolished the CD4⁺CD25⁺ T_R cell-mediated in vivo suppression of colitis induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{high} T cells.

A further quantitative evaluation of CD4⁺ T cell infiltration was made by isolating spleen cells and LP cells from the resected bowels. Significantly higher numbers of CD4⁺ T cells were recovered from the spleen (Fig. 4A) and LP (Fig. 4B) of the mice transferred with both CD4⁺CD45RB^{high} and CD4⁺CD25⁺ T_R cell populations and administered with anti-RANKL mAb as compared with control IgG, being comparable to those from mice transferred with CD4⁺CD45RB^{high} T cells alone and treated with anti-RANKL mAb or the control rat IgG. We also examined the cytokine production by CD4⁺