

200936089A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

難治性腸管吸収機能障害に関する調査研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡 辺 守

平成 22 (2010) 年 3 月

序

原因不明の難治性下痢症を呈する Microscopic colitis(以下 MC)は欧米で確立した疾患概念であり、従って同地域では多数の患者が存在し、また広く認知されている。これに対し、我が国における MC 患者は従来稀少であり、これまで日常診療に於いて念頭に置くべき疾患として認知されて来なかった。しかしながら、我が国の生活様式の欧米化に伴い MC 患者の増加が予想されており、実際、日常診療で遭遇する機会が近年急速に増加していることは各臨床医の実感するところであろう。

今後我が国各地で急速に展開するであろう MC 患者の増加に対して、我々は現在の診療体制で十分対応できるであろうか。残念ながら、我が国には MC に対する明確な診断・治療指針が存在しないばかりでなく、疾患そのものが認知されず、全国的な調査に基づく実態把握すら全く行われていないのが実情である。従って我が国における MC の臨床的特徴を踏まえ、実情に即し、なおかつエビデンスに立脚した診療を実施する事は現時点では大変困難な状況にある。

本研究班では全国規模の実態調査を通して、本邦における MC の疫学的・臨床的特徴を明らかにし、これに即した診断・治療指針の策定、国民全体への疾患認知の普及を目指し、平成21年4月より活動を開始した。研究班では我が国初の MC 患者を対象とした全国調査を実施し、各施設の協力を得て、これまで全く明らかとされて来なかった MC 患者の実態を明確に示す事に成功している。本年度調査研究では、重症・難治例の疫学的な特徴から各中核施設における診断・治療の実態まで、患者側・施療者側双方の実情と問題点が具体的な資料として明示されており、これは今後の診断・治療指針作成には欠かせない成果であると言える。さらに我が国 MC 患者は、欧米の概念には全く欠如していた「小腸病変の合併」という際だった特徴を有することも明らかとされており、MC の新たな疾患概念を我が国から世界に向けて発信する事を可能とする画期的成果と考えている。

加えてこれら調査研究から明らかとなったことは、原因究明に向けた基礎研究の重要さである。少なからず存在することが明らかとなった重症・難治例に対する現在の治療は、いずれに於いても患者 QOL の長期的かつ著しい低下を避ける事ができない。従って MC 患者全体の QOL を損なわない、十分な治療体制の確立には病因に基づく新規治療開発が必須であり、これに向けた基礎研究体制は一刻も早く確立する必要がある。

本年度における研究班の活動を端緒に、実態調査の推進・診療指針策定・基礎研究による病因究明を次年度以降さらに展開していく事により、我が国における MC 診療体制が整備・強化されることが十分期待される。この様な研究班の活動は、我が国で急速に増加しつつある MC 患者が早期に適切な治療を受けられる体制を確立するという、差し迫った重要な課題を解決する使命を負っていると認識している。

最後に、この1年間研究班の活動に協力頂き、多くの成果を挙げて頂いた諸先生に、この場を借りて深謝申し上げたい。

平成22年3月

研究代表者 渡辺 守

目 次

I. 総括研究報告	1
難治性腸管吸収機能障害に関する調査研究 渡辺 守 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学)	
II. 研究成果に関する一覧	7
III. 学会発表に関する一覧	11
IV. 研究成果の別刷り	13
V. 研究班構成	69

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
難治性腸管吸収機能障害に関する調査研究
総括研究報告書

難治性腸管吸収機能障害に関する調査研究

研究代表者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：本研究は難治性腸管吸収機能障害 Microscopic Colitis(以下 MC)に対し、わが国における現状・実態を調査し、発症病因や増悪因子を明らかにするとともに標準治療の確立と発症予防の追究を行うことを目的とした。本年度は MC に関するわが国初の全国実態調査を実施した。難治性腸管疾患を専門とする地域中核病院を対象とした調査の結果、1) MC には難治・重症例が約 16%存在し、働き盛りの 40 歳代に集中する為、著しい QOL の低下が認められる事、2) MC は疾患概念が不明瞭であり、診断困難例が少なからず存在する事、3) MC には 13 種に上る薬剤が使用され、明確で統一した治療指針が存在しない事、4) 小腸病変を伴う本邦独自の疾患カテゴリーの存在の可能性、が示された。病因究明を目指した基礎研究プロジェクトに於いては本疾患の本質的病因が腸管上皮細胞機能の破綻に有ると考えられ、研究代表者ら独自の腸管上皮機能解析手法を用いた病因解明研究に本年度既に着手している。本年度の成果を更に発展させる事により、MC 患者に対する我が国独自の診療体系の確立のみならず、新たな疾患概念の確立と病因究明を達成し得るものと期待される。

共同研究者

(研究協力者)

九州大学大学院・病態機能内科学	飯田 三雄
防衛医科大学校・第 2 内科	三浦総一郎
藤田保健衛生大学・消化管内科学	平田 一郎
福岡大学筑紫病院・消化器科	松井 敏幸
東京医科歯科大学・消化器病態学	岡本 隆一
東京医科歯科大学・消化器病態学	土屋輝一郎

ている。また、同疾患の実態を包括的に調査した資料は皆無であり、現時点では欧米の資料に基づく経験的治療で対応することを強いられている。従って、正確な診断・治療の指針を明確化し、同疾患の病因・病態を究明し、根本的な新しい治療法を開発することは急務であり国民的要請と考えられる。

従って、本研究では国民生活の欧米化に伴い、潜在的に増加が予想されている MC に対し、わが国における現状・実態を調査し、発症病因や増悪因子を明らかにするとともに標準的な診断・治療指針の策定と難治・重症化を回避する診断・治療システムの確立を目指す。さらに遺伝学的・免疫学的・分子生物学的な基礎研究を通じて病因の解明をすすめ、病因に立脚した新規治療法の開発を推進する。また、本症の診療に携わる医師、コメディカル、患者、家族および国民に正しい医療情報を伝達・普及することにより本症の国民的認知を高め、患者の QOL 向上に努める。

これら研究の推進により、現在のわが国におけ

1. 研究目的

MC は、1970 年代に確立された疾患概念であり、欧米で罹患患者数の急速な増加が示されている原因不明の疾患である。現在まで根本的な治療法が無く、時に慢性の経過をとり日常生活・学業・就労に大きな制限を生じ、QOL が大きく損なわれる。欧米における罹患数の増加はわが国における同疾患の増加を予言するものであり、実際わが国における同疾患の症例が近年になり十数例報告されている。しかしながら、わが国に於ける同疾患の国民・一般医家に於ける認知度は著しく低く、潜在的な罹患患者が多数存在し、他疾患、例えば過敏性腸症候群等の診断の下で不適切な治療を施され

る本疾患の実態を明らかにするとともに難病としての科学的な疫学統計の整備が可能となる。また、現行の経験的治療の実態、治療成績の実態調査により、本疾患のわが国における特徴を抽出し、これに基づく診断基準、特に重症例の判定基準の明確化、およびエビデンスとコンセンサスに立脚した治療指針の提示と普及および診療ガイドラインの策定により、診療レベルの向上、標準化を可能とし総国民医療費の抑制に寄与するものである。さらに、これらの全国的な調査研究を通じ、本疾患の一般医家の認知の実態を明らかとし、疾患概念の統一・普及と診断・治療指針の啓蒙を行うことにより、潜在的な患者の早期発見と適切な治療による重症化の回避・治療成績の向上が期待される。また、本疾患の重症例の包括的解析により、重症化を正確に予測する予後因子の抽出と予後予測アルゴリズムの確立を目指す。一方、遺伝学的・免疫学的・組織修復学的・分子生物学的な観点から基礎研究を横断的に連携させ、これに基づく病因解明を目標としたプロジェクトを遂行することにより、MCの病因の全貌を明らかとする成果が期待できる。これらの調査研究で得られた成果を、正しい情報として国民に還元し、広く普及させる事により、本症の国民的重要性の認識拡大と患者QOL向上が期待されるものである。

2. 研究方法

本研究は難治性腸疾患を専門とする全国の各施設を拠点とし、これを統合するセンターを申請者の施設に配置した組織により遂行され、横断的基盤研究班との密接な連携のもとに、難治性腸管吸収機能障害であるMCに対して、発症・増悪に関わる因子解析により多因子疾患としての病因を明確化し、その解明を通じて難治症例に対する新しい治療法の開発を計ることを目的とする。また全国調査に基づく疫学的解析を加え、わが国に於ける同疾患の実態と社会的意義を明確にし、これを通じて国民、患者、一般医家への疾患概念の認知・普及、治療レベルの向上と標準化および早期からの適切な診断治療の普及を図ることにより、本症患者のQOL向上を目指す。以上の目的を達成するために下記のプロジェクト研究を行う。

p-A 包括的疫学解析プロジェクト

A1) MCの患者分布及び新規発症・診断の実態調査

わが国におけるMCの地域・性別・年齢層別の患者分布、及び経年的な調査による新規診断症例の調査を行い、MCのリスク要因の抽出と同時にわが国におけるMC罹患患者の将来予測を行う基本的資料として活用する。

A2) 臨床調査個人票の作成と普及

今後予想される患者総数の増加の実態を正確に追跡する全国的な患者登録システムを構築する。このため、本研究の臨床プロジェクトと密に連携し、統一した診断・重症度評価の基準を逐次採用、臨床調査個人票に反映させ、これを集計・分析・管理する拠点を形成する。

A3) 重症化予測因子の疫学的解析と予測アルゴリズムの作成

臨床調査個人票の集計を基に重症化を予測するパラメーターを抽出し、診断時にこれを予測するアルゴリズムの作成を目指す。

p-B 臨床プロジェクト

B1) 診断基準および重症度判定基準の作成

欧米におけるMCの調査・研究に依存した現在の診断手法を見直し、わが国の実態に合わせた診断基準の作成を行う。特に欧米に比し卓越した内視鏡技術が一般臨床家にまで普及しているわが国の医療体制は欧米と際立つ特徴を有するものであり、従来病理診断に依存していた診断手法を見直し、より侵襲の少ない診断手法で特異度・感度の高い独自の診断基準の作成を目指す。また、各臨床パラメータを用いた重症度による患者の層別化の基準を提示し、現行治療の標準化、疫学研究による重症化予測パラメーターの抽出と予測アルゴリズム作成の基盤とする。

B2) 現行治療の評価と治療指針の作成

現行治療のエビデンスを調査・評価し、重症度に層別化した推奨ランクを設定する。疫学調査と連携し、各治療のわが国における普及と治療効果の実態を評価し、これに即した治療指針の作成を行う。

B3) 診療ガイドライン作成

一般医家への普及を図る基盤となる MC 診療ガイドラインの作成を行う。

B4) 外科的治療の予後と合併症対策

MC 手術の長期予後を調査する。術後合併症に対する対策を構築する。

p-C 病因解明および治療応用のための基礎研究プロジェクト

C1) 日本人特有の疾患関連遺伝子解析

全国規模の症例対照研究で日本人に特有な疾患感受性領域の特定を行う。

C2) 免疫異常機構の解析と治療応用

自然免疫と獲得免疫、免疫担当細胞における免疫異常を明らかとし、新規治療法の標的になりうる分子を追求する。

C3) 発症機序における腸内細菌叢の関与の追究と治療応用

腸内細菌叢の異常が MC の発症や疾患の進展・維持に関与する機序の解明を目標とする。

p-D 啓蒙・広報プロジェクト

D1) 国民・患者・一般臨床医に対する啓蒙活動・広報活動・情報企画

疾患に関する正しい情報や調査研究で得られた成果を CCFJ ホームページや市民公開講座を通じて広く普及させる。

(倫理面への配慮)

研究対象者に対しては、個人情報・秘密保持・人権保護に配慮し、血液や生検検体、手術検体などからの資料採取に際しては、研究目的の十分な説明を行う。また、被検者が研究協力を拒否しても不利益を受けないことを十分に説明し、インフォームドコンセントを得る。研究班を通じて行う臨床試験は、各施設の倫理委員会の認可を受け、目的、必要性、安全性、副作用、さらには拒否しても不利益を受けないことの説明を徹底させる。また、文書における同意を得た上で実施するものとするとともに、同意後の中止の受付を認めるものである。動物実験に関しては、各施設の動物実験ガイドラインに準拠して、動物実験委員会の承認を受けて実施する。

3. 研究結果及び考察

本研究は難治性腸管吸収障害 Microscopic

colitis (以下 MC) に対し、我が国独自の疾患構造に基づいた診断基準・治療指針の策定を目的とした。当初研究計画に則り、平成 21 年度は MC に関するわが国初の全国実態調査を実施した。難治性腸管疾患を専門とする地域中核病院(全国 59 施設)に調査を依頼し、総計 30 施設より回答を得た(回答率 51%)。その結果、以下の事実が示された。

1) 重症・難治例の存在と患者 QOL の低下

全国調査に於いて、総計 75 例に上る診断・治療例が確認された。男女比は 4:6 であり、年齢分布は 60 歳代が最も多いが、重症例は 40 歳代に集中し、特に長期ステロイド剤投与・免疫調節剤投与・長期中心静脈栄養・大腸全摘術を要した重症・難治例が 16% 存在し、働き盛り世代における著しい患者 QOL の低下が確認された。この結果は現在我が国に MC 患者が従来考えられていたよりはるかに多く存在し、難治・治療抵抗性の経過を辿る症例が少なからず存在する事を明らかとした。さらに重症・難治例は共通して 40 歳代に発症しており、重症・難治化のリスク因子として発症年齢が挙げられる可能性が示された。これら研究成果から導きだされた事実は、欧米の資料に基づき従来考えられていた MC に対する認識を大きく覆すものである。

2) 疾患概念の不一致と診断困難例の存在

MC 患者の多くは診断確定まで 1-6 ヶ月を要し、1 年以上要した症例も確認された。各施設の疾患認識は「薬剤副作用による予後の良い疾患」から「難治・重篤となり外科治療を考慮する疾患」と重症度に於いて相違が著しく、過敏性腸症候群と誤診されている可能性も指摘された。診断に於いて臨床症状(慢性水様性下痢)と病理学的所見(コラーゲンバンド又は上皮間リンパ球の増多)を重視する施設が多い一方、薬剤服用歴や内視鏡所見を重視する施設もあり、統一した診断基準は存在しない。本結果により、欧米に於いては MC の診断・治療に一定のコンセンサスが存在する一方、我が国に於いては疾患認知そのものが統一されておらず、本研究により過敏性腸症候群の様な類縁疾患との概念の混乱が存在する事が示された。従って、疾患概念の啓蒙と明確な診断基準の提示が急務である事が確認された。

3) エビデンスに基づく治療体系の欠如

治療薬剤は延べ 13 種に上るなど治療法は施設により大きく異なり、明確な治療指針は存在しないことが確認された。その為 1) の難治例が存在することが考えられた。従って、診断・治療のいずれのステップに於いてもエビデンスに基づく診断及び治療選択ではなく、経験的・対症的治療が各施設個々の判断で行われている実態が明らかとなった。これにより診断・治

療指針策定の重要性が再確認された。

4) 本邦独自の疾患カテゴリ存在の可能性

一部の症例では従来病変が存在しないとされてきた小腸に病変が確認された。これは多くの施設が本邦で開発された小腸内視鏡を診断に用いていた事に因る。小腸病変の存在は従来の疾患概念と異にするものである。

我が国はダブルバルーン小腸内視鏡を独自に開発し、更にカプセル小腸内視鏡の開発・普及により容易に小腸疾患の診断、病変確認が可能な世界的に稀な環境にある。また我が国で急速に普及している特殊光内視鏡は粘膜微細構造の観察能力を飛躍的に高める事が可能である。従って次年度以降は、これら我が国独自の先進的診断デバイスを用い、MCの小腸・大腸粘膜の包括的且つ詳細なサーベイランスを行うことにより、本邦独自の疾患概念・診断基準を確立し、同時に世界に向け発信することが期待できる。

5) 上皮細胞機能を標的とする病因究明・新規治療法開発

一連の調査研究を通し、本疾患は腸管上皮細胞機能の破綻に本質的病因があると考えられ、研究代表者ら独自の腸管上皮機能解析手法を用いた病因解明研究に本年度既に着手している

4. 評価

1) 達成度について

本年度の調査研究の結果、消化管専門治療施設間に於いても疾患概念・診断・治療にコンセンサスが存在しない事、欧米の既存概念と異なる症例の存在が明らかとなり、更なる研究の必要性が確認された。上記問題の解決の為、本邦初のMCを標的とした本研究班を立ち上げた結果、MCに関する実態調査を通して患者分布と疾患認知の施設間相違を浮き彫りとし、診断・治療指針策定に必須な基礎資料の蓄積に成功しており、当初計画を十分に達成し得たと考える。今後本研究班を通じ、我が国独自の診断基準・治療指針の作成を行う。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本年度成果は我が国及びアジア地域に於ける生活習慣の欧米化と同疾患患者の増加の関連を具体的に示し、疾患成立の疫学的背景を考える上で学術的・国際的な意義の高い成果と言える。また、重症例が多く患者の生活の質に影響することや、小腸病変の存在の可能性は欧米の疾患概念と異にするものであり、MCの新たな疾患概念につながる学術的意義の高い知見である。

一連の研究成果から導きだされた事実は、

欧米の資料に基づき従来考えられていたMCに対する認識を大きく覆すものである。従って、本研究によって明らかとされたMCの実態を広く一般市民及び医療者に認知・普及させることにより、MCに対する認識を転換し、特に重症化が予想される若年発症例に対する早期の疾患認知を促進する事を可能とする社会的インパクトへ有する成果である。

3) 今後の展望について

本年度の研究の結果、MCは重症・難治例が存在することが確認され、なおかつ疾患に精通する専門医が少ないことが明らかとなった。従って診断基準・治療指針の早急な策定の必要があるものと考えられた。従って以下の課題が次年度以降急務の課題であると考えられた。

1) MCの診断・治療に関する全国実態調査の継続

本年度初めて実施した全国調査を継続的に実施する事により、診断・治療指針策定の根拠となる重要なエビデンスの蓄積が可能となり、本疾患のわが国における特徴を踏まえ、同時に科学的根拠に基づいた診断基準の運用と、重症度による患者の層別化・治療指針決定アルゴリズムによる診断・治療プロセスの統一・標準化を行う為の基盤が構築可能となる。さらに特定の調査対象施設に於いて定点観測を行う事により、同施設に於けるMCに対する注意喚起を促す効果も期待され、より多くの症例の拾い上げと早期診断の促進につなげる。

2) MC診断基準の策定

本年度実態調査では医療者・医療施設間に於けるMCの疾患認識の著しい相違が浮き彫りとなっている。我が国に於いてMCの明確な診断基準が存在しない事が主因であり、本年度調査において集計された各施設に於ける診断方針を統括し、我が国独自の診断指針を策定・普及させることにより、共通した疾患認識の下での調査・研究及び標準治療の普及を可能とする。

3) MC治療指針の策定

本年度実態調査に於いて医療施設間に於けるMCの治療方針にも大幅な相違が見られ、これも我が

国に明確な治療指針が存在しない為と考えられる。本研究で集積された各施設の治療法を比較検討し、欧米での使用実績等を踏まえ、臨床効果が期待される治療法を順位付けする事により、我が国に於ける MC の治療選択に一定の指針を与える。これを基盤とし、各治療法の臨床効果を前向きに追跡していく事により、逐時客観的な評価を加え、我が国の標準的治療法確立に向け体系化を推進する。提示した診断・治療指針の啓蒙・普及を推進する事により、MC 患者の発症早期に於ける疾患認知と適切な治療への誘導が促進され、これにより早期寛解と難治・重症化の阻止を達成し、患者コホート全体の治療成績向上と長期罹患患者の減少を得る事により、患者 QOL の向上と同時に総国民医療費の抑制に寄与することが可能となる。

4) 腸管上皮機能の解析による病因究明

本疾患の本質的病因は腸管上皮細胞機能の破綻にあると考えられ、研究代表者ら独自の腸管上皮機能解析技術を基盤とし MC 患者の腸管上皮機能異常を分子レベルで解明し、病因に立脚した治療法開発の基盤整備を行う。同研究は本年度より既に着手しており、次年度以降も継続的に推進する。

5. 結論

本年度研究により、初めて我が国の MC の実態が明らかとなったのみならず、我が国独自の疫学的特徴と疾患像が示されている。これら成果は我が国が独自の疾患診断・治療体系を整備し、かつ病因究明を推進する必要性を明確に提示している。本研究班が今後も継続的な調査研究活動を推進することにより、MC のさらなる実態解明と診療体制の向上、患者 QOL の改善につながる事が期待される。

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表 (論文)

執筆者氏名	論文題名	雑誌名	巻(号)	ページ	出版年
Akiyama J, Okamoto R, Iwasaki M, Zheng X, Yui S, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M	Delta-like 1 expression promotes goblet cell differentiation in Notch-inactivated human colonic epithelial cells	Biochemical and Biophysical Research Communications	393(4)	662-667	2010
Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, Watanabe M	Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia	Am J Physiol GI & Liver	296	G23-G35	2009
Murayama M, Okamoto R, Tsuchiya K, Akiyama J, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, Watanabe M	Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell specific genes in human intestinal epithelial cells	J Gastroenterol	44	173-182	2009
Totsuka T, Kanai T, Nemoto Y, Tomita T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sakamoto N, Akiba H, Okumura K, Yagita H, Watanabe M	RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4+CD25+ regulatory T Cells in chronic colitis	J Immunol	182	6079-6087	2009
Tomita T, Kanai T, Totsuka T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Ohteki T, Hibi T, Watanabe M	IL-7 is essential for lymphopenia-driven turnover of colitogenic CD4+ memory T cells in chronic colitis	Eur J Immunol	39	2737-2747	2009
Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, Nagano K, Oshima S, Nemoto Y, Yoshioka A, Totsuka T, Okamoto R, Nakamura T, Sakamoto N, Tsuchiya K, Aoki A, Ohya K, Yagita H, Watanabe M	Signaling pathway via TNF α /NF κ B in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis	Am J Physiol GI & Liver	296	G850-G859	2009
Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Shinohara T, Sakamoto N, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Sudo T, Matsumoto S, Watanabe M	Long-Lived colitogenic CD4+ Memory T Cells residing outside the intestine participate in the perpetuation of chronic colitis	J Immunol	183	5059-5068	2009
Yano T, Yamamoto H	Current state of double balloon endoscopy: the latest approach to small intestinal diseases	J Gastroenterol Hepatol	24(2)	185-192	2009
Yano T, Yamamoto H	Vascular, polypoid, and other lesions of the small bowel	Best Pract Res Clin Gastroenterol	23(1)	61-74	2009
Sunada K, Yamamoto H	Double-balloon endoscopy: past, present, and future	J Gastroenterol	44(1)	1-12	2009
Sunada K, Yamamoto H	Technology and indications	Gastrointest Endosc Clin N Am	19(3)	325-333	2009
Hayashi Y, Yamamoto H, Taguchi H, Sunada K, Miyata T, Yano T, Arashiro M, Sugano K	Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small-bowel lesions identified by double-balloon endoscopy: endoscopic features of the lesions and endoscopic treatments for diaphragm disease	J Gastroenterol	44 Suppl (19)	57-63	2009
Matsumoto T, Nakamura S, Moriyama T, Hirahashi M, Iida M	Auto-fluorescence imaging colonoscopy for the detection of dysplastic lesions in ulcerative colitis. A pilot study	Colorectal Dis.		Epub ahead of print	2009
Asano K, Kubo M, Takahashi A, Kawaguchi T, Matsushita T, Ashikawa K, Umeno J, Matsumoto T, Matsui T, Kakuta Y, Kinouchi Y, Kiyohara Y, Tsunoda T, Kamatani N, Iida M, Nakamura Y	A genome-wide study identifies two novel susceptible loci for ulcerative colitis	Nature Genetics	41(12)	1325-1329	2009

研究成果の刊行に関する一覧表 (論 文)

執筆者氏名	論文題名	雑誌名	巻(号)	ページ	出版年
Gushima M, Hirahashi M, Matsumoto T, Fujita K, Fujisawa R, Mizumoto K, Nakabeppu Y, <u>Iida M</u> , Yao T, Tsuneyoshi M	Altered expression of MUTYH and an increase in 8-hydroxydeoxyguanosine are early events in ulcerative colitis-associated carcinogenesis	J Pathology	219	77-86	2009
Yada S, Matsumoto T, Esaki M, Jo Y, Koga H, Nakamura S, <u>Iida M</u>	Effect of infliximab on leukocyte function associated antigen-1 (LFA-1) expression in peripheral blood mononuclear cells in patients with Crohn's disease	Inflamm Bowel Dis	15	1379-1384	2009
Matsunaga H, Hokari R, Kurihara C, Okada Y, Takebayashi K, Okudaira K, Watanabe C, Komoto S, Nakamura M, Tsuzuki Y, Kawaguchi A, Nagao S, <u>Miura S</u>	Omega-3 polyunsaturated fatty acid ameliorate the severity of ileitis in the senescence accelerated mice (SAM)P1/Yit mice model	ClinExp Immunol	158(3)	325-333	2009
Matsunaga H, Hokari R, Higashiyama M, Kurihara C, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Nakamura M, Kawaguchi A, Nagao S, <u>Miura S</u>	Cilostazol, a specific PDE-3 inhibitor ameliorates chronic ileitis via suppression of interaction of platelets with monocytes	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	297(6)	G1077-G1084	2009
Higashiyama M, Ogata S, Adachi Y, Nishiyama J, Ohara I, Okamura M, Matsuzaki K, Okusa Y, Sato K, Hokari R, <u>Miura S</u>	Human intestinal spirochetosis accompanied by human immunodeficiency virus infection: a case report	Acta Med Okayama	63	217-221	2009
Kishikawa H, Nishida J, Ichikawa H, Kaida S, Morishita T, <u>Miura S</u> , Hibi T	Lipopolysaccharides stimulate adrenomedullin synthesis in intestinal epithelial cells: release kinetics and secretion polarity	Peptides	30	906-912	2009
Okada Y, Tsuzuki Y, Hokari R, Komoto S, Kurihara C, Kawaguchi A, Nagao S, <u>Miura S</u>	Anti-inflammatory effects of the genus Bifidobacterium on macrophages by modification of phospho-I kappa B and SOCS gene expression	Int J Exp Pathol	90	131-140	2009
Takebayashi K, Hokari R, Kurihara C, Okada Y, Okudaira K, Matsunaga H, Komoto S, Watanabe C, Kawaguchi A, Nagao S, Tsuzuki Y, <u>Miura S</u>	Oral tolerance induced by enterobacteria altered the process of lymphocyte recruitment to intestinal microvessels: roles of endothelial cell adhesion molecules, TGF-beta and negative regulators of TLR signaling	Microcirculation	16	251-264	2009
Han JY, Horie Y, Fan JY, Sun K, Guo J, <u>Miura S</u> , Hibi T	Potential of 3,4-dihydroxy-phenyl lactic acid for ameliorating ischemia-reperfusion-induced microvascular disturbance in rat mesentery	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	296	G36-G44	2009
Ishikawa C, Tanabe H, Maemoto A, Ito T, Watari J, Kono T, Fujiya M, Ashida T, Ayabe T, <u>Kohgo Y</u>	Precursor Processing of Human Defensin-5 Is Essential to the Multiple Functions in vitro and in vivo	J Innate Immunity	47(10)	3191-3196	2009
Ikuta K, Torimoto Y, Shindo M, Sato K, <u>Kohgo Y</u>	Atypical Takayasu arteritis with solitary stenosis in the short segment of right axillary artery	Rheumatol Int		Epub ahead of print	2009
Watari J, Moriichi K, Tanabe H, Sato R, Fujiya M, Miwa H, Das KM, <u>Kohgo Y</u>	Differences in genetic instability and cellular phenotype among Barrett's, cardiac, and gastric intestinal metaplasia in a Japanese population with Helicobacter pylori	Histopathology	55(3)	261-269	2009
Miyake K, Kusunoki M, Shindo T, Ueki N, Kawagoe T, Gudis K, Tatsuguchi A, Futagami S, Tsukui T, <u>Sakamoto C</u>	Duodenogastric reflux induced by endoscopic submucosal dissection	Endoscopy	41(11)	934-940	2009
Yonezawa M, Wada K, Tatsuguchi A, Akamatsu T, Gudis K, Seo T, Mitsui K, Nagata K, Tanaka S, Fujimori S, <u>Sakamoto C</u>	Hereglin-Induced VEGF Expression via the ErbB3 Signaling Pathway in Colon Cancer	Digestion	80(4)	215-225	2009
Mitsui K, Tanaka S, Yamamoto H, Kobayashi T, Ehara A, Yano T, Goto H, Nakase H, Tanaka S, Matsui T, Iida M, Sugano K, <u>Sakamoto C</u>	Role of double balloon endoscopy in the diagnosis of small-bowel tumors: the first Japanese multicenter study	Gastrointest Endosc	70(3)	498-504	2009

研究成果の刊行に関する一覧表 (論文)

執筆者氏名	論文題名	雑誌名	巻(号)	ページ	出版年
Seo T, Tatsuguchi A, Shinji S, Yonezawa M, Mitsui K, Tanaka S, Fujimori S, Gudis K, Fukuda Y, Sakamoto C	Microsomal prostaglandin E synthase protein levels correlate with prognosis in colorectal cancer patients	Virchows Arch	454(6)	667-676	2009
Fujimori S, Seo T, Gudis K, Ehara A, Kobayashi T, Mitsui K, Yonezawa M, Tanaka S, Tatsuguchi A, Sakamoto C	Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced small-intestinal injury by prostaglandin: a pilot randomized controlled trial evaluated by capsule endoscopy	Gastrointest Endosc	69(7)	1339-1346	2009
Tanaka S, Mitsui K, Yamada Y, Ehara A, Kobayashi T, Seo T, Tatsuguchi A, Fujimori S, Gudis K, Sakamoto C	Diagnostic yield of double-balloon endoscopy in patients with obscure GI bleeding	Gastrointest Endosc	68(4)	683-691	2009
Morita H, Toh H, Oshima K, Murakami M, Taylor TD, Igimi, S, Hattori M	Complete genome sequence of probiotic Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103	J. Bacteriol	91(24)	7630-7631	2009
Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, Toh H, Asadulghani M, Oshima K, Yamashita A, Kodama T, Abe H, Kurokawa K, Nakayama K, Tobe T, Hattori M, Hayashi T	Comparative genomics revealed the mechanism of parallel evolution of enterohemorrhagic Escherichia coli	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	106	17939-17944	2009
Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Lindenbergh D, Willemsen R, Kaser A, Simons-Oosterhuis Y, Brugman S, Yamaguchi K, Ishikawa H, Aiba Y, Koga Y, Samsom J, Oshima K, Kikuchi M, Escher JC, Hattori M, Onderdonk AB, Blumberg RS	CD1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine	J. Clin. Invest	119	1241-1250	2009
Hattori M, Taylor TD	The human intestinal microbiome: A new frontier of human biology	DNA Res	16	1-2	2009
Hase K, Kimura S, Takatsu H, Ohmae M, Kawano S, Kitamura H, Ito M, Watarai H, Hazelet CC, Yeaman C, Ohno H	M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex	Nature Cell Biol	11(12)	1427-1432	2009
Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, Kadokura K, Tobe T, Fujimura Y, Kawano S, Nakato G, Kimura S, Murakami T, Iimura M, Hamura K, Fukuoka S, Lowe AW, Waguri S, Itoh K, Kiyono H, Ohno H	Uptake via Glycoprotein 2 of FimH+ bacteria by M cells initiates mucosal immune response	Nature	462	226-230	2009
Fukuda S, Nakanishi Y, Chikayama E, Ohno H, Hino T, Kikuchi J	Evaluation and characterization of bacterial metabolic dynamics with a novel profiling technique, real-time metabolotyping	PLoS ONE	4	e4893	2009
Nakato G, Fukuda S, Hase K, Goitsuka R, Cooper MD, Ohno H	New approach for M-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis	DNA Res	16	227-235	2009

Ⅲ. 学会発表に関する一覧

学会発表に関する一覧表

発表者名	演題名	学会名	会場	日時
Tsuchiya K, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M	Colon carcinogenesis is divided into the undifferentiation and proliferation regulated by Atoh1 and Beta-Catenin on wnt signaling, respectively	GASTRO 2009	London	2009年11月23日
Nemoto Y, Kanai T, Matsumoto S, Watanabe M	Long-lived colitogenic CD4+ Memory T cells can be maintained outside the intestine in the absence of commesal bacteria	JUCC	Tokyo	2009年11月20日
Tsuchiya K, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M	GSK3 inhibitor induces the intestinal differentiation by the protein stabilization of Atoh1	DDW2009	Chicago	2009年6月2日
Okamoto R	Notch1 activation promotes goblet cell depletion and expression of PLA2G2A in the inflamed mucosa of ulcerative colitis	DDW2009	Chicago	2009年6月1日
Watanabe M	Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: Current Understanding	Asia Pacific Working Group Inaugural Meeting on IBD	China	2009年3月7日
渡辺 守	炎症性腸疾患におけるNotchシグナル異常と分子標的の可能性	第37回日本臨床免疫学会総会	東京	2009年11月14日
岡本隆一、土屋輝一郎、渡辺 守	炎症性腸疾患における上皮分化・増殖機構の解析と粘膜再生治療への応用	JDDW2009	京都	2009年10月16日
根本泰宏、金井隆典、渡辺 守	腸内細菌から直接的自然免疫と抗原刺激を受ける炎症性腸疾患メモリーCD4+T細胞の維持機構	JDDW2009	京都	2009年10月15日
渡辺 守	IBD診療のシンボと近未来像ー治る時代へー	第6回 市民公開講座～ 炎症性腸疾患の治療をめぐって～	徳島	2009年5月17日
玄 世峰	潰瘍性大腸炎の長期予後ー重症潰瘍性大腸炎に対するサイクロスポリン持続静注療法の長期成績ー	第95回日本消化器病学会総会	札幌	2009年5月7日
渡辺 守	炎症性腸疾患と発癌	第106回日本内科学会総会・講演会	東京	2009年4月10日

IV. 研究成果の別刷

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 $\alpha_4\beta_7$ (rat IgG2a); M290, PE-conjugated anti-integrin $\alpha_E\beta_7$ (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 deserted, 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 I7500 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 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 $\alpha_E\beta_7$, 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.

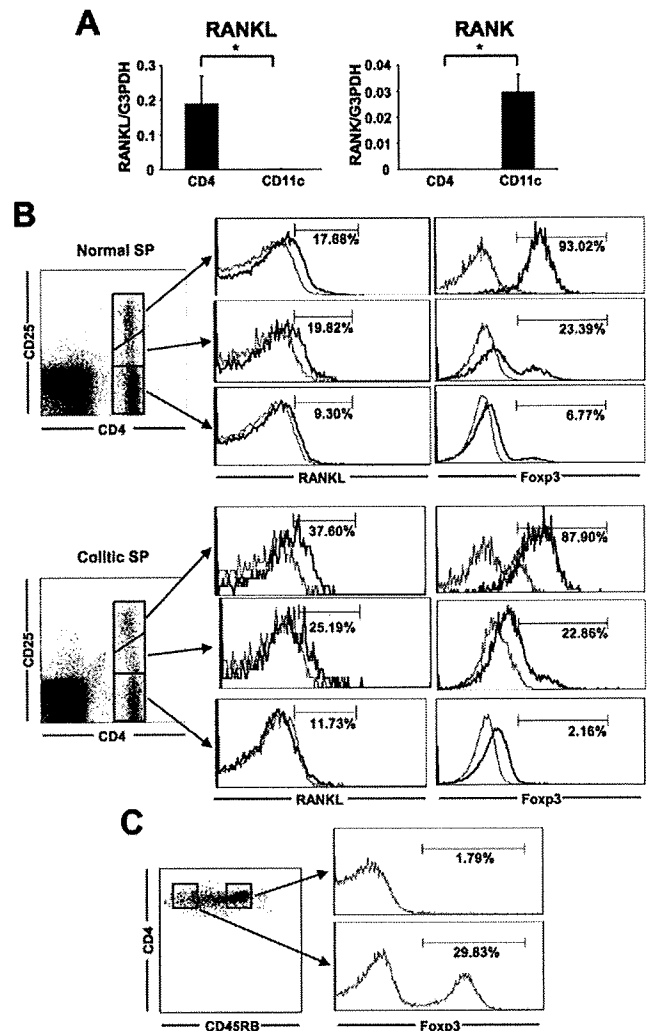


FIGURE 1. Expression of RANK/RANKL in spleen cells from normal and colitic mice. **A**, Expression of RANK, RANKL, and G3PDH mRNA was determined by RT-PCR using five SP samples each from normal and colitic mice and is shown as relative amount of the indicated mRNA normalized to G3PDH. Data are represented 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

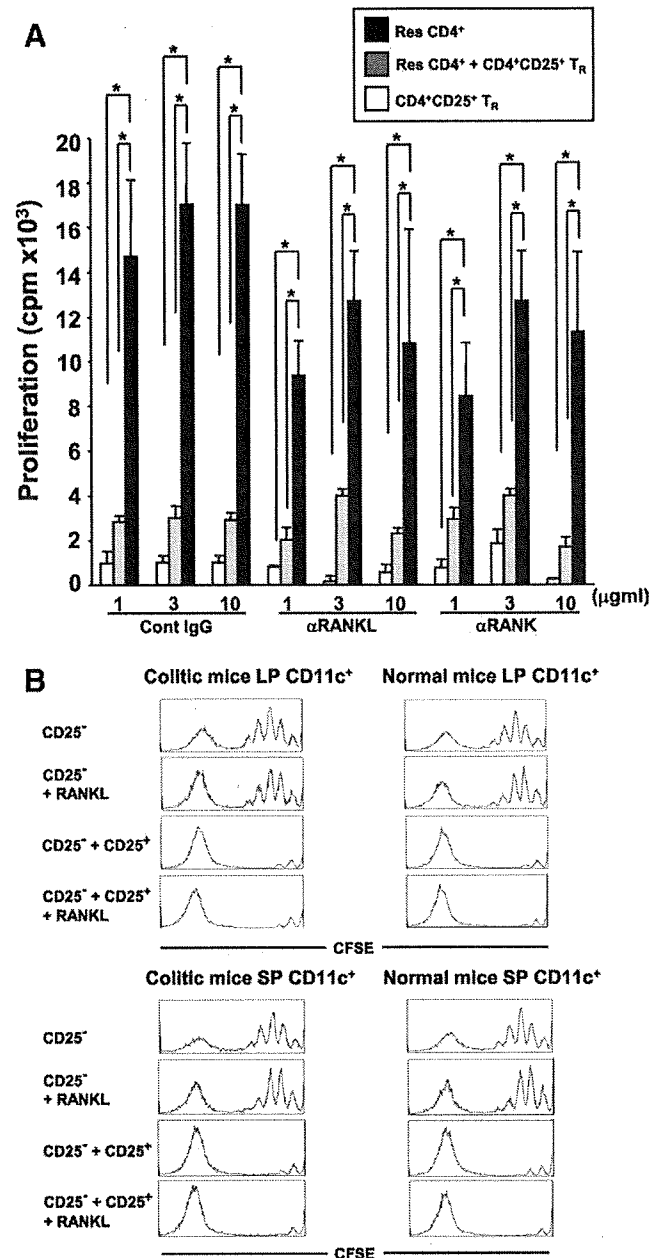


FIGURE 2. Blockade of the RANK/RANKL signaling pathway does not affect T_R activity in in vitro coculture assay. **A**, Splenic CD4⁺CD25⁺ T cells suppress the proliferation of responder (Res) CD4⁺ T cells in vitro in the presence of neutralizing anti-RANKL or anti-RANK mAb. Responder CD4⁺ T cells and 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-RANK 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.