

200936143A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

# 特定難治性疾患患者の回腸・大腸生検組織 バンク構築

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

消化管は、免疫・代謝異常で惹起される全身性難治性疾患の病変の一部としても重要であり、消化管出血・吸収不良などを介し患者 QOL に著しい影響を及ぼすのみならず、これら疾患の病態をより複雑にし、生命を脅かす直接の原因となることも少なくない。さらに多臓器にわたる病変を生じるがゆえ、個々の患者が異なる診療科に分散することが多く、消化管病変の詳細に関する臨床研究は不十分なままである。

本研究では、消化管病変を併発する全身性難治疾患に注目し、我が国が優位性を有する消化管内視鏡を用いた生体試料収集により大規模な消化管組織・遺伝子バンクを構築することを目指して、平成 21 年 4 月研究班がスタートした。研究班では小腸を含めた腸管内をライブ環境で観察しその状態での腸粘膜の収集、解析が可能となり、さらに生検採取、検体収集、保存、解析までの大規模解析に向けたバンクシステムを構築している。また膠原病患者における微細な腸管炎症および上皮細胞異常を発見している。これまでライブ環境における同一人物の回腸・大腸を解析できた例はなく、本結果が初めて膠原病患者の腸内環境を解析することができたことから学術的意義は非常に高く、欧米ではカプセル内視鏡が主な小腸検査となっており、本邦で開発された内視鏡による腸生検検体は本邦独自の解析手法であることから国際的な評価は高い。

1 年間の限られた期間内ではあったものの、各々のプロジェクトの順調な遂行により、予想を超える大きな成果を得ることができた。腸管はヒトで最大の器官であり、多機能である組織であることから基本構造を理解し病態を解明することは社会的意義も多いため、本研究班の成果を基礎とし、さらなる研究の発展を図ることにより、多数の検体収集、保存、解析が期待でき、全身性難治性疾患の腸管病変に対する病態の解明に繋がると期待される。

この 1 年間、実りある研究成果を挙げていただいた研究分担者および研究協力者の諸先生に深謝致したい。

平成 22 年 3 月

研究代表者 渡 辺 守

# 目 次

I. 総括研究報告 .....	1
特定難治性疾患患者の回腸・大腸生検組織バンク構築 渡辺 守 (東京医科歯科大学大学院消化器病態学)	
II. 分担研究報告 .....	5
特定難治性疾患患者の回腸・大腸生検組織バンク構築 宮坂 信之 (東京医科歯科大学大学院膠原病・リウマチ内科学分野)	
III. 研究成果に関する一覧 .....	9
IV. 学会発表に関する一覧 .....	11
V. 研究成果の別刷り .....	13
VI. 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  
特定難治性疾患患者の回腸・大腸生検組織バンク構築  
総括研究報告書

特定難治性疾患患者の回腸・大腸生検組織バンク構築

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：本研究は小腸というこれまで暗黒大陸であった器官に対して、ダブルバルーン内視鏡という本邦で開発された内視鏡により全小腸、大腸が一度に観察可能になったことを機に、生検検体を用いて回腸、大腸の構造差異、難治性疾患の腸病変の病態理解を目的とすることである。まず正常小腸の全小腸のマッピング生検にて今回長軸方向の細胞構成制御を明らかとし、腸管分化に必須の転写因子群が空腸から回腸まで局在を変化させることで各細胞種への分化を制御することが判明した。さらに各細胞が分泌する蛋白群を解析することによって小腸の各部位での機能差異を明確にすることができた。以上より生検検体を用いた解析が小腸の機能制御理解に有用であり、大腸と比較検討することにより組織間の差異を明らかとし、腸病変の病変部位との関連の理解に繋がると考え、大規模生検検体収集を行っている。これは内視鏡を多施設で多数の患者に対して行う本邦の特徴を生かした計画であり、既に 300 を超える生検検体の収集に成功した。また難治疾患の腸病変に関しても収集を開始し、膠原病などの難治疾患の腸病変を回腸、大腸を同時に生検採取することで、腸内のライブ環境を詳細に検討できる基盤が整えられた。以上より収集された生検検体が難治疾患病態理解、新規治療法の開発のためには非常に貴重な試料であると思われ、今後バンク化されることが期待される。

共同研究者

東京医科歯科大学大学院膠原病・  
リウマチ内科学分野 宮坂 信之  
慶應義塾大学医学部リウマチ内科 竹内 勤  
東京大学大学院新領域創成科学研究科・ゲノム科学  
服部 正平  
理化学研究所免疫系構築研究チーム腸管免疫学  
大野 博司

1. 研究目的

本研究では、全身性難治性疾患における消化管病変の包括的・系統的解析のため、当初は全身性エリテマトーデスと多発性筋炎・皮膚筋炎に絞られ、内視鏡検査で得られる生体試料を収集するシステム構築を目的とする。これら疾患での消化管病変は、出血・吸収不良など重篤な症状を通し患者 QOL に著しい低下を招くのみならず、悪性腫瘍の合併など生命を脅かす直接の原因となることも少なくないにもかかわらず、全身性疾患であるがゆえに個々の患者が異なる診療科で多元的に管理されることが多く、その詳細についての臨床研究が不十分であった。我が国における消化管疾患研究の特徴が内視鏡検査技術の先進性にある点を鑑み、本

申請研究では、消化管病変を中心に据えたこれら疾患の系統的解析をおこなうこと、そのために品質の高いしかも将来の大規模バンク構築を視野にいたした生体試料収集を目指すものである。具体的には、両疾患患者の十分な同意に基づいた上でダブルバルーン内視鏡により回腸深部まで観察し、病変の有無によらない回腸、大腸のマッピング生検を施行する。採取した検体は部位別に病理学的・免疫組織学的解析や、発現遺伝子解析を行うほか、ゲノム DNA、mRNA、凍結組織片、パラフィン標本として保存するシステムを構築し試料を管理する。本邦開発されたダブルバルーン内視鏡は大腸内視鏡よりも負担が少ないことから同一患者の繰り返す検査も可能であり、これまで有症状者に対するオンデマンドでの検査が主であった状況に代えて、稀少疾患ではあれ消化管病変の無いものから不顕性病変を有するもの、有症状の病変まで幅広い症例における系統的解析は十分可能である。分担研究者との協力および 2 年目以後に予定する研究組織の拡大で得られる検体の集積は、比較的稀少な難治性疾患の消化管組織・遺伝子試料を経時的に採取しうる生体試料バンクとしては、質的にも量的にも十分世界的に評価される独創性の高いものと考えられる。また、本研究で提示す

る内視鏡による生体試料収集の試みは、他の難治疾患群に対象を広げることにも可能で、日本が世界をリードする臨床研究手法のモデルとなる可能性をも有する意義の高いものであると考える。

## 2. 研究方法

本研究は初年度においては東京医科歯科大学施設内の消化器病態学研究室、膠原病・リウマチ内科学研究室、および光学医療診療部で施行されるものであり、研究計画遂行のための設備は全て整っている。2年度目以降においては、全国約10大学の拠点施設に分担研究者を選び、症例の登録と生体試料の収集を全国レベルで展開する。初年度における研究組織と各々の役割分担は以下の通り予定する。

### 1) 生検検体採取および内視鏡所見の集約

東京医科歯科大学光学医療診療部および全国10大学の拠点施設

### 2) 症例登録および臨床データ解析

東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科学研究室

東京医科歯科大学 消化器病態学研究室

### 3) 遺伝子発現解析

東京医科歯科大学 消化器病態学研究室

### 4) 免疫組織学的解析

東京医科歯科大学 消化器病態学研究室

### 5) 生体試料の処理・保存・管理および解析

東京医科歯科大学 消化器病態学研究室の分担により各スタッフおよび大学院生が実行する。

具体的な方法としては、研究代表者および分担研究者により症例登録を行い、所定の患者情報（基本情報・臨床情報）のリストを作成する。ダブルバルーン内視鏡検査施行時に、回腸深部から20センチメートル間隔で4個ずつのステップバイオペシーを施行する。詳細な内視鏡所見記入とあわせ、一カ所毎に生検をおこない採取する4個については、それぞれそのまま凍結保存、パラフィン固定、ホルマリン固定後OCT包埋、RNA抽出試薬処理をおこなうものに分け、冷凍庫に保存する。目標症例としては初年度に正常人10例、全身性エリテマトーデス10例、多発性筋炎・皮膚筋炎10例を目標とする。

初年度は主として試料収集と保存・管理システムの構築をおこなうこと、および病理学的解析および検体解析の条件設定をおこなうことを予定し、次年度以降、多施設から得られる試料を用いる検討を開始する。

### 1) 試料の保存・管理システムの構築

#### a) 症例情報の収集

基本患者情報（氏名・性別・生年月日・生活状況など）、疾患情報（発病年月日・初診年月日・発症と経過の要約・入院歴・罹患部位・内科治療歴・手術歴、各種検査データ、画像データなど）、内視鏡所見（内視鏡所見、病変部の病理所見）に大別

し、情報の収集をおこなう。

#### b) 登録システムの構築

電子化データとしての登録システムに必要な調査項目の最適化につき検討をおこなう。すでに難病指定を受けている患者も多いことが予想され、各指定疾患における指定形式の調査表との情報の共有を目指す。

c) 2年度以降の多施設にわたる試料収集システムの構築のため、個人情報の管理、セキュリティーに十分配慮したリストの管理方法を検討する。

## 2) 試料を用いた基礎的検討

患者基本情報、疾患情報、内視鏡所見等に加え、下記の項目のいくつかを登録データに組み込むことが可能か否かにつき、その有用性、実施可能性の観点から検討を加える。

### a) HE染色

### b) 粘膜固有層及び上皮内リンパ球解析

固定標本を用い、粘膜内あるいは上皮内リンパ球の免疫組織学的解析をこころみる。

### c) 上皮細胞分化形質解析

固定標本を用い、上皮細胞分化形質を、杯細胞、内分泌細胞、吸収上皮細胞のマーカー蛋白の免疫組織染色等で解析する

### d) 発現遺伝子解析

各検体のRNAを用い、発現遺伝子の変化をRT-PCRにより確認する。マイクロアレイ解析等も考慮する。

（倫理面への配慮）

申請者らがヒトの細胞および組織を用いた研究にあたっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、人権及び利益の確保を下記のように行うよう配慮する。検体の提供に関しては「ダブルバルーン内視鏡を用いた特定難治性疾患患者の大規模回腸・大腸組織バンク構築」として申請し、当学の倫理審査委員会で、研究の適否などを議論・審査するための準備を行っている。意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。代諾による同意は今回の研究では無効とする。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。個人のプライバシーの保護を厳密に行う。希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない。

## 3. 研究結果及び考察

### 1) 腸管粘膜の検体採取

申請者の施設の倫理審査委員会において「膠原病に伴う腸管病変の遺伝子発現解析に関する研究」（承認No.106）として承認され、消化管出血疑い、腸管腫瘍疑いなど、ダブルバルーン内視鏡の

適応のある患者に対し十分なインフォームドコンセントを行ったところ、ほとんどの患者から同意を得ることができた。

予算執行が10月にも関わらず、12月までに4例のダブルバルーン内視鏡を施行し腸管粘膜生検検体を採取した。

そのうち特定難治性疾患においては皮膚筋炎2例、ベーチェット病1例であった。のこりの1症例は慢性関節リウマチであった。

## 2) 検体保存方法の検討

まずバンクシステムが機能するかを当施設にて試みた。回腸、大腸それぞれ一カ所から生検検体を3個採取し、パラフィンブロック保存、凍結切片にてOCT包埋にて保存、RNA試薬にて保存をそれぞれ行った。

パラフィンブロックは常温、凍結切片及びRNA検体は-80℃冷凍庫にて保存した。

パラフィンブロックにて回腸、大腸粘膜のHE染色を行ったところ、病理学的評価可能な状態であった。また免疫染色にてもTFF3, CgAなどの染色も可能であった。

凍結切片にても分化マーカーであるHath1, Hes1, Klf4などの免疫染色が可能であり、局在解析による分化評価が可能と判断した。

RNA用の検体ではRNAを抽出し、逆転写反応を行いcDNAを作成した。各種遺伝子の発現量をPCR法にて解析可能であった。

以上から生検検体の処理および保存は当研究計画に十分耐えうる品質を維持することを明らかとした。

## 3) バンクシステムの構築

上記検体保存にて有用な情報が得られることが判明したため、バンクシステムの構築を開始した。

厚生労働省 難易疾患克服事業 「難治性疾患克服のための難病研究資源バンク開発研究」の代表者である独立行政法人医薬基盤研究所 亀岡洋祐氏と当施設において会議を行い、保存方法、輸送方法について具体的に協議を行ったところ、基盤研において各種収集検体の保存が可能であるとの結論であり、現在さらに実現にむけて調整中である。

## 3) 正常腸管部位別の構造解析

結果的に基礎疾患がなく、内視鏡観察にて正常所見であった患者を健常人とし、それら10例、計50検体を用いて部位別構造解析を行った。

A) 絨毛形態解析 パラフィンブロックからのHE染色標本ではそれぞれ絨毛の形態及び杯細胞、パネート細胞の構成の評価が可能であった。絨毛の形態は全小腸に渡って絨毛長および幅に変化を認めなかった。

B) 細胞構成解析 HE染色にて杯細胞、パネート細胞の細胞数を各部位で計測した。またCgA染色にて内分泌細胞を描出し絨毛あたりの数を計測した。

その3種類以外の細胞を吸収上皮細胞としてカウントした。

空腸側では吸収上皮が多く、杯細胞が少ないが、回腸側では逆に吸収上皮は減少し、杯細胞は増加していた。パネート細胞、内分泌細胞は部位別にて数の変化を認めなかった。

## C) 形質遺伝子発現解析

部位別の生検検体からのRNAを用いてPCRを行い、各種形質発現検討を行った。杯細胞の形質発現マーカーであるMucin2の発現は杯細胞数と同様に回腸側で増加していた。吸収上皮形質であるラクターゼは細胞構成と同様に回腸側で発現低下を認めた。内分泌細胞の形質であるCgAおよびパネート細胞の形質であるディフェンシン5の発現は部位による変化を認めなかった。

## D) 分化遺伝子発現解析

回腸側における杯細胞増加機構解析のため、杯細胞への分化遺伝子であるHath1及びKlf4について発現解析を行った。PCRでの遺伝子発現は両者ともに回腸側での発現増加を認めた。免疫染色における局在解析では、興味深いことにHath1は空腸側では絨毛の基底側に発現し回腸になるにつれて管腔側まで徐々に発現細胞の増加を認めた。一方、Klf4は空腸側では管腔側のみに発現していたが、回腸になるにつれて基底側まで発現細胞が増加し結果として回腸側ではHath1とKlf4が共発現することで、杯細胞が回腸側で増加することを明らかとした。

## E) Notch シグナル制御

また吸収上皮細胞への分化はNotchシグナルが関わるため、HES1の遺伝子発現、局在を解析したが、全小腸で変化を認めなかった。

以上より同一人物の小腸内では空腸側と回腸側で細胞構成が異なり、それぞれの分化規定遺伝子の発現、局在により長軸方向の細胞構成が制御されていることを解明し得た。

## 4) 特定難治性疾患における腸管病態解析

上記の正常検体の基礎データを元に各特定難治性疾患における腸管病変の検討を行った。興味深いことに4例すべての膠原病患者において、回腸、大腸の間質に軽度の炎症細胞浸潤を認めた。これは内視鏡所見では正常であっても、病理学的評価を行うことで顕微鏡学的な炎症が常にある可能性を示唆していた。さらに驚いたことに2例の皮膚筋炎の患者に共通して、病理検査にて腸管の杯細胞が減少していることを見いだした。粘液低下が癌化を促進するという論文からも、この杯細胞減少が癌化と関連するか今後解析の必要がある。

## 4. 評価

### 1) 達成度について

本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができた。ダブルバルーン内視鏡の施行数が

多い本邦では期待通りの検体数を採取することが可能であった。その結果健常人における長軸方向の腸管の構造解析を可能とし、分子生物学的な厳密な制御により構造が規定されていることを世界で初めて明らかとできた。また難治疾患における回腸・大腸病変に関する解析も開始しており初年度としての達成度としては十分と思われる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでライブ環境における同一人物の回腸・大腸を解析できた例はなく、本結果が初めて膠原病患者の腸内環境を解析することができたことから学術的意義は非常に高い。また欧米ではカプセル内視鏡が主な小腸検査となっており、本邦で開発された内視鏡による腸生検検体は本邦独自の解析手法であることから国際的な評価は高いと考える。腸管はヒトで最大の器官であり、多機能である組織であることから基本構造を理解し病態を解明することは社会的意義も多い。

3) 今後の展望について

健常人における基本構造解析は、分子生物学的解析の進歩により多大な進歩が期待される。その一つとしては次世代シーケンスの登場であり、小腸生検検体内のすべての発現している遺伝子をすべて網羅的に同定することが可能となる。腸管生検検体内には①上皮に付着する腸内細菌、②上皮細胞③上皮内リンパ球、④間質細胞が含まれておりそれらをすべて解析することが可能であり、一部解析をスタートさせていることから大きなブレークスルーとなる機構を解明できると期待される。

また病態に関しても難治疾患の腸管生検検体の収集は進行中であり、本計画の継続により多施設共同研究を含めたさらなる検体の収集が期待できる。

4) 研究内容の効率性について

当初たてた目標を着実に遂行できており、施行件数の多さ、患者へのインフォームドコンセント、同意率の高さなどから検体収集の効率は非常に高い。また解析についてもそれぞれ得られた検体の品質の高さから十分な成果が挙げられた。

## 5. 結論

これまで到達できなかった小腸を含めた腸管内をライブ環境で観察しその状態での腸粘膜の収集、解析が可能となった。さらに生検採取、検体収集、保存、解析までの大規模解析に向けたシステムの構築を行うことができた。膠原病患者における微細な腸管炎症および上皮細胞異常を発見することに成功した。以上から今後本計画の継続により、

多数の検体収集、保存、解析が期待でき、腸管病態の解明に繋がると考える。



## II. 分担研究報告

特定難治性疾患患者の回腸・大腸生検組織バンク構築

研究分担者 宮坂 信之 東京医科歯科大学大学院膠原病・リウマチ内科学分野 教授

研究要旨：本研究は小腸というこれまで暗黒大陸であった器官に対して、ダブルバルーン内視鏡という本邦で開発された内視鏡により全小腸、大腸が一度に観察可能になったことを機に、生検検体を用いて回腸、大腸の構造差異、難治性疾患の腸病変の病態理解を目的とすることである。まず正常小腸の全小腸のマッピング生検にて今回長軸方向の細胞構成制御を明らかとし、腸管分化に必須の転写因子群が空腸から回腸まで局在を変化させることで各細胞種への分化を制御することが判明した。さらに各細胞が分泌する蛋白群を解析することによって小腸の各部位での機能差異を明確にすることができた。以上より生検検体を用いた解析が小腸の機能制御理解に有用であり、大腸と比較検討することにより組織間の差異を明らかとし、腸病変の病変部位との関連の理解に繋がると考え、大規模生検検体収集を行っている。これは内視鏡を多施設で多数の患者に対して行う本邦の特徴を生かした計画であり、既に 300 を超える生検検体の収集に成功した。また難治疾患の腸病変に関しても収集を開始し、膠原病などの難治疾患の腸病変を回腸、大腸を同時に生検採取することで、腸内のライブ環境を詳細に検討できる基盤が整えられた。以上より収集された生検検体が難治疾患病態理解、新規治療法の開発のためには非常に貴重な試料であると思われ、今後バンク化されることが期待される。

## 1. 研究目的

本研究では、全身性難治性疾患における消化管病変の包括的・系統的解析のため、当初は全身性エリテマトーデスと多発性筋炎・皮膚筋炎に絞られ、内視鏡検査で得られる生体試料を収集するシステム構築を目的とする。これら疾患での消化管病変は、出血・吸収不良など重篤な症状を通し患者 QOL に著しい低下を招くのみならず、悪性腫瘍の合併など生命を脅かす直接の原因となることも少なくないにもかかわらず、全身性疾患であるがゆえに個々の患者が異なる診療科で多元的に管理されることが多く、その詳細についての臨床研究が不十分であった。我が国における消化管疾患研究の特徴が内視鏡検査技術の先進性にある点を鑑み、本申請研究では、消化管病変を中心に据えたこれら疾患の系統的解析をおこなうこと、そのために品質の高いしかも将来の大規模バンク構築を視野にいたした生体試料収集を目指すものである。具体的には、両疾患患者の十分な同意に基づいた上でダブルバルーン内視鏡により回腸深部まで観察し、病変の有無によらない回腸、大腸のマッピング生検を施行する。採取した検体は部位別に病理学的・免疫組織学的解析や、発現遺伝子解析を行うほか、ゲノム DNA、mRNA、凍結組織片、パラフィ

ン標本として保存するシステムを構築し試料を管理する。本邦開発されたダブルバルーン内視鏡は大腸内視鏡よりも負担が少ないことから同一患者の繰り返す検査も可能であり、これまで有症状者に対するオンデマンドでの検査が主であった状況に代えて、稀少疾患ではあれ消化管病変の無いものから不顕性病変を有するもの、有症状の病変まで幅広い症例における系統的解析は十分可能である。分担研究者との協力および 2 年目以後に予定する研究組織の拡大で得られる検体の集積は、比較的稀少な難治性疾患の消化管組織・遺伝子試料を経時的に採取しうる生体試料バンクとしては、質的にも量的にも十分世界的に評価される独創性の高いものと考えられる。また、本研究で提示する内視鏡による生体試料収集の試みは、他の難治疾患群に対象を広げることも可能で、日本が世界をリードする臨床研究手法のモデルとなる可能性をも有する意義の高いものであると考える。

## 2. 研究方法

本研究は初年度においては東京医科歯科大学施設内の消化器病態学研究室、膠原病・リウマチ内科学研究室、および光学医療診療部で施行されるものであり、研究計画遂行のための設備は全て整っている。2 年度目以降においては、全国約 10 大

学の拠点施設に分担研究者を選び、症例の登録と生体試料の収集を全国レベルで展開する。初年度における本分担研究の役割は以下の通り予定する。

#### 1) 生検検体採取および内視鏡所見の集約

東京医科歯科大学光学医療診療部および全国10大学の拠点施設

#### 2) 症例登録および臨床データ解析

東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科学研究室

東京医科歯科大学 消化器病態学研究室

具体的な方法としては、分担研究者により症例登録を行い、所定の患者情報（基本情報・臨床情報）のリストを作成する。

目標症例としては初年度に正常人10例、全身性エリテマトーデス10例、多発性筋炎・皮膚筋炎10例を目標とする。

#### 1) 試料の保存・管理システムの構築

##### a) 症例情報の収集

基本患者情報（氏名・性別・生年月日・生活状況など）、疾患情報（発病年月日・初診年月日・発症と経過の要約・入院歴・罹患部位・内科治療歴・手術歴、各種検査データ、画像データなど）、内視鏡所見（内視鏡所見、病変部の病理所見）に大別し、情報の収集をおこなう。

##### b) 登録システムの構築

電子化データとしての登録システムに必要な調査項目の最適化につき検討をおこなう。すでに難病指定を受けている患者も多いことが予想され、各指定疾患における指定形式の調査表との情報の共有を目指す。

##### （倫理面への配慮）

申請者がヒトの細胞および組織を用いた研究にあたっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、人権及び利益の確保を下記のように行うよう配慮する。検体の提供に関しては「ダブルバルーン内視鏡を用いた特定難治性疾患患者の大規模回腸・大腸組織バンク構築」として申請し、当学の倫理審査委員会で、研究の適否などを議論・審査するための準備を行っている。意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合のみ検体提供を受ける。代諾による同意は今回の研究では無効とする。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。個人のプライバシーの保護を厳密に行う。希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない。

### 3. 研究結果及び考察

#### 1) 症例の登録

申請者の施設の倫理審査委員会において「膠原病に伴う腸管病変の遺伝子発現解析に関する研

究」（承認No.106）として承認され、消化管出血疑い、腸管腫瘍疑いなど、ダブルバルーン内視鏡の適応のある患者に対し十分なインフォームドコンセントを行ったところ、ほとんどの患者から同意を得ることができた。

予算執行が10月にも関わらず、12月までに4例のダブルバルーン内視鏡を施行し腸管粘膜生検検体を採取した。

そのうち特定難治性疾患においては皮膚筋炎2例、ベーチェット病1例であった。のこりの1症例は慢性関節リウマチであった。

#### 2) 臨床データ解析

それぞれの患者に対し、基本情報（氏名・性別・生年月日・生活状況など）、疾患情報（発病年月日・初診年月日・発症と経過の要約・入院歴・罹患部位・内科治療歴・手術歴、各種検査データ、画像データなど）、内視鏡所見（内視鏡所見、病変部の病理所見）に大別し、情報の収集をおこなった。

### 4. 評価

#### 1) 達成度について

本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができた。ダブルバルーン内視鏡の施行数が多い本邦では期待通りの検体数を採取することが可能であった。膠原病難治疾患患者に対しても内視鏡適応患者が予想以上に多いことが判明し、短期間であっても相応の症例数、生検検体数を確保可能であったことより初年度としての達成度としては十分と思われる。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでライブ環境における同一人物の回腸・大腸を解析できた例はなく、本結果が初めて膠原病患者の腸内環境を解析することができたことから学術的意義は非常に高い。また欧米ではカプセル内視鏡が主な小腸検査となっており、本邦で開発された内視鏡による腸生検検体は本邦独自の解析手法であることから国際的な評価は高いと考える。腸管はヒトで最大の器官であり、多機能である組織であることから基本構造を理解し、膠原病の腸病変に対する病態を解明することは患者のQOLに直結することからも社会的意義も多い。

#### 3) 今後の展望について

難治疾患の腸管生検検体の収集は進行中であり、本計画の継続により多施設共同研究を含めたさらなる検体の収集が期待できる。

#### 4) 研究内容の効率性について

当初たてた目標を着実に遂行できており、施行件数の多さ、患者へのインフォームドコンセン

ト、同意率の高さなどから検体収集の効率は非常に高い。また解析についてもそれぞれ得られた検体の品質の高さから十分な成果が挙げられた。

## 5. 結論

これまで到達できなかった小腸を含めた腸管内をライブ環境で観察しその状態での腸粘膜の収集、解析が可能となった。さらに生検採取、検体収集、保存、解析までの大規模解析に向けたシステムの構築を行うことができた。膠原病患者における微細な腸管炎症および上皮細胞異常を発見することに成功した。以上から今後本計画の継続により、多数の検体収集、保存、解析が期待でき、腸管病態の解明に繋がると考える。

## 6. 研究発表

### 論文発表

1. Miyasaka N, Kawai S, Hashimoto H : Efficacy and safety of tacrolimus for lupus nephritis: a placebo-controlled double-blind multicenter study. **Mod. Rheumatol.** 19(6):606-615, 2009.
2. Komano Y, Harigai M, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Ohtsubo H, Hiramatsu K, Iwamoto M, Minota S, Matsuoka N, Kageyama G, Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Kudo K, Tanaka Y, Takeuchi T, Miyasaka N : Pneumocystis jiroveci pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab : a retrospective review and case-control study of 21 patients. **Arthritis & Rheumatism.** 61(3):305-312, 2009.
3. Ohyanagi N, Ishido M, Suzuki F, Kaneko K, Kubota T, Miyasaka N, Nanki T : Retinoid ameliorates experimental autoimmune myositis, with modulation of th cell differentiation and antibody production in vivo. **Arthritis & Rheum.** 60(10):3118-3127, 2009.

### 学会発表

なし

## 7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

### 1) 特許取得

なし

### 2) 実用新案登録

なし

### 3) その他

なし

### Ⅲ. 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, <u>Tsuchiya K</u> , Nakamura T, <u>Watanabe M</u>	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, <u>Tsuchiya K</u> , Nemoto Y, Akiyama J, Nakamura T, Kanai T, <u>Watanabe M</u>	Requirement of Notch activation during regeneration of the intestinal epithelia	Am J Physiol GI & Liver	296	G23-G35	2009
Murayama M, Okamoto R, <u>Tsuchiya K</u> , Akiyama J, Nakamura T, Sakamoto N, Kanai T, <u>Watanabe M</u>	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, <u>Tsuchiya K</u> , Nakamura T, Sakamoto N, Akiba H, Okumura K, Yagita H, <u>Watanabe M</u>	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, <u>Tsuchiya K</u> , Sakamoto N, Ohteki T, Hibi T, <u>Watanabe M</u>	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, <u>Tsuchiya K</u> , Aoki A, Ohya K, Yagita H, <u>Watanabe M</u>	Signaling pathway via TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ 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, <u>Tsuchiya K</u> , Nakamura T, Sudo T, Matsumoto S, <u>Watanabe M</u>	Long-Lived colitogenic CD4+ Memory T Cells residing outside the intestine participate in the perpetuation of chronic colitis	J Immunol	183	5059-5068	2009
<u>Miyasaka N</u> , Kawai S, Hashimoto H	Efficacy and safety of tacrolimus for lupus nephritis: a placebo-controlled double-blind multicenter study	Mod. Rheumatol	19(6)	606-615	2009
Komano Y, Harigai M, Koike R, Sugiyama H, Ogawa J, Saito K, Sekiguchi N, Inoo M, Onishi I, Ohashi H, Amamoto F, Miyata M, Ohtsubo H, Hiramatsu K, Iwamoto M, Minota S, Matsuoka N, Kageyama G, Imaizumi K, Tokuda H, Okochi Y, Kudo K, Tanaka Y, Takeuchi T, <u>Miyasaka N</u>	Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab : a retrospective review and case-control study of 21 patients	Arthritis & Rheumatism	61(3)	305-312	2009
Ohyanagi N, Ishido M, Suzuki F, Kaneko K, Kubota T, <u>Miyasaka N</u> , Nanki T	Retinoid ameliorates experimental autoimmune myositis, with modulation of th cell differentiation and antibody production in vivo	Arthritis & Rheumatism	60(10)	3118-3127	2009
Morita H, Toh H, Oshima K, Murakami M, Taylor TD, Igimi, S, <u>Hattori M</u>	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, <u>Hattori M</u> , 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, <u>Hattori M</u> , Onderdonk AB, Blumberg RS	CD1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine	J. Clin. Invest	119	1241-1250	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
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

#### IV. 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, <u>Watanabe M</u>	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, <u>Watanabe M</u>	Long-lived colitogenic CD4+ Memory T cells can be maintained outside the intestine in the absence of commensal bacteria	JUCC	Tokyo	2009年11月20日
Tsuchiya K, Okamoto R, Nakamura T, <u>Watanabe M</u>	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
<u>Watanabe M</u>	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診療のシンポ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る～	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

## V. 研究成果の別刷

# RANK-RANKL Signaling Pathway Is Critically Involved in the Function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Chronic Colitis<sup>1</sup>

Teruji Totsuka,<sup>2\*</sup> Takanori Kanai,<sup>2,3\*</sup> Yasuhiro Nemoto,\* Takayuki Tomita,\*  
Ryuichi Okamoto,\* Kiichiro Tsuchiya,\* Tetsuya Nakamura,\* Naoya Sakamoto,\*  
Hisaya Akiba,<sup>†</sup> Ko Okumura,<sup>†</sup> Hideo Yagita,<sup>†</sup> and Mamoru Watanabe\*

It is now clear that functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T (T<sub>R</sub>) cells exist as part of the normal immune population and prevent the development of intestinal inflammation. We have recently shown that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells in the intestine. We first found that RANKL was preferentially expressed on both CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells and colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells, whereas RANK was expressed on dendritic cells. Although neutralizing anti-RANKL mAb did not affect T<sub>R</sub> activity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells to suppress the proliferation of CD4<sup>+</sup> responder cells in vitro, in vivo administration of anti-RANKL mAb abrogated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cell-mediated suppression of colitis induced by adoptive transfer of CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T cells into SCID mice. Interestingly, an adoptive transfer experiment using Ly5.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> cells and Ly5.2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells revealed that the ratio of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells in total CD4<sup>+</sup> T cells in inflamed mucosa was significantly decreased by anti-RANKL mAb treatment. Consistent with this, the expression of RANK on lamina propria CD11c<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells in culture with colitic lamina propria CD11c<sup>+</sup> cells. Together, these results suggest that the RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in regulating the function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> 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)<sup>4</sup> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T (T<sub>R</sub>) cells play a central role in the maintenance of immunological homeostasis (6, 7). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells have been detected mainly in lymphoid sites, including thymus, lymph nodes, and spleen. Because numerous studies have demonstrated the capacity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells, two-thirds of which constitutively express the lymph node-homing receptor CD62L (10), we previously demonstrated that human intestinal LP CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> T cells obtained from normal individuals possess T<sub>R</sub> 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells actually migrated to the intestine and suppressed the development of colitis in the CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> cell transfer model of colitis without the involvement of lymph nodes in lymph node-null LTα<sup>-/-</sup> × RAG-2<sup>-/-</sup> recipient mice (12). Consistent with our previous reports, it has recently been reported that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> 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 <sup>†</sup>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.

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> T.T. and T.K. contributed equally to this work.

<sup>3</sup> 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

<sup>4</sup> 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<sub>R</sub>, 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells in the intestine to suppress intestinal inflammation. In the present study, we show that both CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells and colitogenic CD4<sup>+</sup> T cells preferentially express a TNF family member, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL), and that blockade of the signaling pathway via RANKL and its receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) (20) by administering neutralizing anti-RANKL mAb abrogates the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cell-mediated suppression of colitis induced by adoptive transfer of CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T cells into SCID mice, indicating a critical role for the RANKL/RANK signaling pathway in the function of intestinal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> 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<sup>-/-</sup>) 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cells were isolated by two-color sorting on a FACSvantage (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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>R</sub> cells in the suppression of murine chronic colitis. In experiment 1, chronic colitis was induced by adoptive transfer of CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T cells into SCID mice (22). CB-17 SCID mice were injected i.p. with one or two subpopulations of sorted CD4<sup>+</sup> T cells in PBS and then administered 250  $\mu$ g of anti-RANKL mAb or control rat IgG in 250  $\mu$ l of PBS three times per week for 6 wk as follows: 1) CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> alone ( $3 \times 10^5$ /mouse) plus control IgG ( $n = 8$ ), 2) CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> alone ( $3 \times 10^5$ ) plus anti-RANKL mAb ( $n = 8$ ), 3) CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> ( $3 \times 10^5$ ) plus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $1 \times 10^5$ ) plus control IgG ( $n = 8$ ), or 4) CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> ( $3 \times 10^5$ ) plus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $1 \times 10^5$ ) 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<sub>R</sub> cells in the recipients, we used Ly5.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> cells and Ly5.2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells as donors and C57BL/6 RAG-2<sup>-/-</sup> 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<sub>R</sub> cells to

inflamed mucosa of colitic mice, we conducted another in vivo setting. First, RAG-2<sup>-/-</sup> mice were transferred with CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T cells and, 4 wk after transfer, these colitic mice were treated with 250  $\mu$ g of anti-RANKL mAb or control IgG two times within 1 day. Then they were retransferred with splenic Ly5.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells from normal mice, and we evaluated the cell number of Ly5.1<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> and Foxp3<sup>-</sup> 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  $\mu$ 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 Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>-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% CO<sub>2</sub> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> cells.

### RT-PCR

Total cellular RNA was extracted from  $7 \times 10^5$  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 $\gamma$ R-blocking mAb