

目次

はしがき	1
研究組織	1
交付決定額	1
研究発表	2
研究成果による工業所有権の出願・取得状況	2
研究成果	3
I. 研究の背景	3
II. これまでの研究の流れ	4
III. 研究成果の概要	5
1. CD25 ⁺ lamina propria T cells (LPT) の分離	5
2. CD25 ⁺ LPT における刺激後のタイロシンリン酸化の変化	5
3. CD25 ⁺ LPT における刺激後のリン酸化 LAT の変化	6
4. LPT の T 細胞受容体刺激におけるダウンストリームシグナリング	8
5. LPT におけるタイロシン脱リン酸化酵素	10
IV. 研究成果のもたらす意義	11
V. 今後展望	12
VI. おわりに	13
VII. 参考文献	14

<はしがき>

粘膜T細胞におけるT細胞受容体を介した刺激における低応答は、無数の抗原刺激に対し腸管の恒常性を維持するために必要不可欠の機能と考えられるが、その機序に関しては未だ解明されていない。我々は腸管に存在する CD25^{bright} CD4⁺制御性T細胞が粘膜T細胞の低応答を惹起していると仮定し研究を進めたが粘膜T細胞から制御性T細胞を除いてもその低応答は改善しなかった。粘膜T細胞のT細胞受容体を介した刺激における低応答はより本質的なものと考えられ、今後もその機序を追求していく必要がある。

研究組織

研究代表者:伊東 重豪(弘前大学医学部講師)

研究分担者:下山 克 (弘前大学附属病院講師)

研究協力者:菊池 英純(弘前大学医学部大学院)

交付決定額(配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	1,400,000	0	1,400,000
平成17年度	1,000,000	0	1,000,000
平成18年度	1,100,000	0	1,100,000
総計	3,500,000	0	3,500,000

研究発表

(1) 学会誌等

(2) 口演

Itoh J, et al. Impaired phosphorylation of linker for activation of T cell (LAT) is associated with T cell receptor (TCR)-dependent hyporesponsiveness of human lamina propria T cells (LPT). The 13th UEGW 18 October 2005, Copenhagen, Denmark

(3) 出版物

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

研究成果

I. 研究の背景

経口免疫寛容は古くから知られている概念であるが、近年自己免疫性疾患の治療という概念から、新たな研究が進んでいる。既に動物実験では成果が認められ、ヒトへの応用も進んでいるが、未だ十分とはいえない状況である。しかし、経口免疫寛容がヒト自己免疫性疾患に臨床応用可能となれば、莫大な利益を生むことは間違いない。臨床応用への障害としては、経口免疫寛容の機序がまだ詳細にわかっておらず、効率良く免疫寛容を誘導できないところにある。経口免疫寛容の概念は経口摂取した抗原により全身の免疫寛容を誘導するということだが、我々はこの機構の成因は、もともと腸管における無数の常在細菌や食餌などの抗原に対する防御機構ではないかと想定している。すなわち、経口免疫寛容により腸管粘膜免疫細胞は常在抗原に対し抗原特異的寛容を獲得しているが故に、不必要な炎症を惹起せず腸管の恒常性を維持できるというものである。我々はこれを“腸管免疫寛容”と名付けている。一方、新たにチャレンジしてきた抗原に関しては炎症を惹起しそれを排除する方向に働くと考えられる。

経口免疫寛容の成立機序としては多量の抗原を摂取した際に起こるクローン排除やクローナルアナジー、少量の抗原を摂取した時に起こる Th2 細胞や Th3 細胞などの免疫調節性 T 細胞の成立などが証明されている¹⁾。また、最近末梢免疫寛容の一端を担うものとして CD25⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞が同定された²⁻⁵⁾。また経口免疫寛容においても CD25⁺CD4⁺ 制御性 T 細胞の増加と経口免疫寛容の成立における関与が推定されている⁶⁾。一方、経口免疫寛容を誘導するとパイエル板にて抗原特異的な抑制作用を持つ CD25⁺CD4⁺ T 細胞が生じ、この T 細胞は腸管特異的接着因子である $\alpha 4$

$\beta 7$ を表出するようになり全身循環から腸管へ遊走してくる可能性も示唆されている⁷⁾. さらに最近ヒト粘膜固有層リンパ球内にこの T 細胞集団が同定された. これらは $CD25^+CD4^+$ 制御性 T 細胞による“腸管免疫寛容”への関与を強く示唆する⁸⁾.

II. これまでの研究の流れ

我々は粘膜固有層 T 細胞 (lamina propria T cells; LPT) の抗原応答に関し研究を進めてきた. LPT は T 細胞受容体 (TCR) に対する刺激に増殖反応, サイトカイン産生に関して低応答であることが報告されており⁹⁻¹²⁾, “腸管免疫寛容”に寄与していると考えられたが, その機構は不明であった. また, 炎症性腸疾患 (IBD) ではこの機構が破綻しており, 炎症が慢性に持続するわけだが, その成因を考える上でも興味深かった. ここで我々は LPT を抗 CD3 抗体にて刺激した後, その細胞内伝達系を解析することにより T 細胞刺激情報伝達系において重要な役割を果たしている LAT (linker of activation of T cells) のタイロシンリン酸化が末梢血 T 細胞 (peripheral blood T cells: PBT) に比べて著しく低下しており, LPT の低応答の原因になっていることを明らかにした (投稿中). そこで次にこのような LPT の低応答がどのようにして獲得されるのかを検討し, この低応答は LPT の亜集団である腸管粘膜内の抗原特異的調節性 T 細胞によるものであるという仮説をたてた. この研究では TCR 刺激後の LPT の低応答ならびに LAT のリン酸化の減弱が腸管粘膜内調節性 T 細胞によるものであることを明らかにすることを目的とした.

III. 研究成果の概要

1. CD25⁻ lamina propria T cells (LPT) の分離

正常大腸粘膜より酵素法により腸粘膜固有層単核球(LPMC)を分離した. lamina propria T-cells (LPT) は Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いマグネティックビーズ法によるネガティブセレクションにより単離した. 次に CD25 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用い CD25⁻ LPT を分離した. 制御性 T 細胞は CD25^{bright} CD4⁺ T 細胞とされるが, CD25⁺ LPT は $1.18 \pm 0.44\%$ であり, 効率よく制御性 T 細胞を含む CD25⁺ LPT を排除できていた. (図 1)

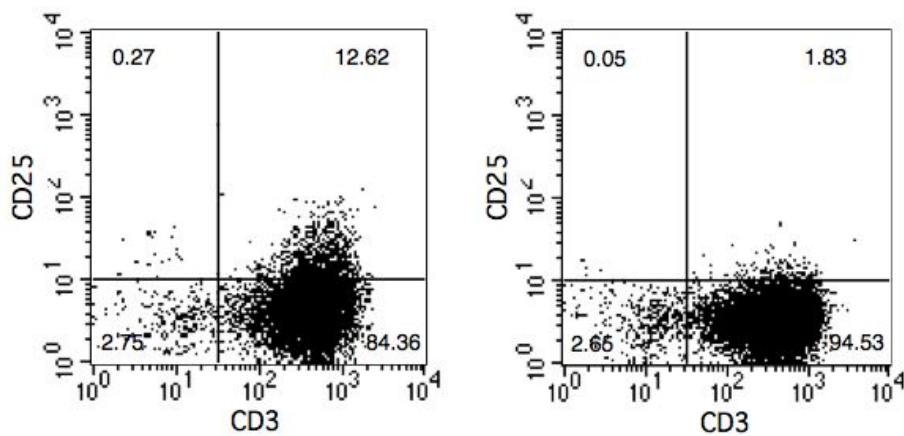


図1. CD25陰性LPTの分離

2. CD25⁻ LPT における刺激後のタイロシンリン酸化の変化

ネガティブセレクションにて得られ末梢血 T 細胞 (peripheral blood T cells: PBT), LPT および CD25⁻ LPT を CD3 抗体 (OKT3) で刺激し, その刺激前後の蛋白を抽

出した. 全蛋白のタイロシンリン酸化を抗タイロシンリン酸抗体 (PY-20) を用いウエスタンブロット法にて評価した.

CD3 抗体で刺激後 PBT とは異なり LPT ではほぼタイロシンリン酸化の増加を認めなかった. CD25⁻ LPT でも同様にタイロシンリン酸化の増加を認めず, 粘膜制御性 T 細胞が LPT の低応答性を惹起しているという仮説は否定的であった.

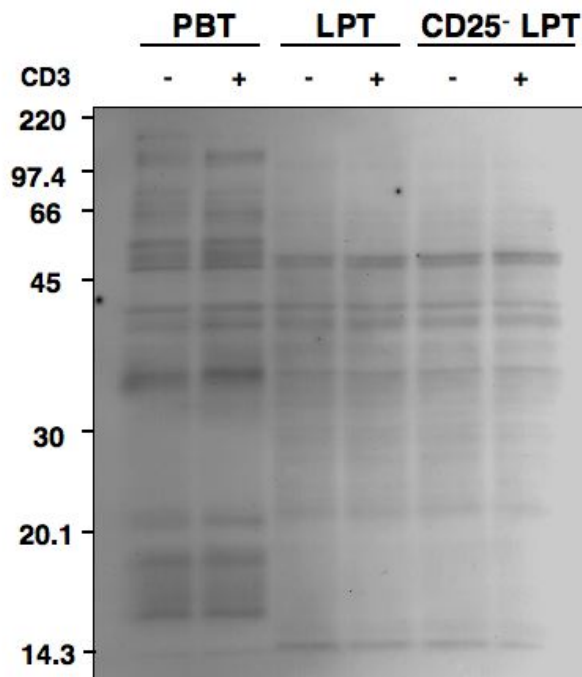


図2. PBT, LPT, CD25⁻ LPTの刺激後におけるタイロシンリン酸化の変化

3. CD25⁻ LPT における刺激後のリン酸化 LAT の変化

そこで次により特異的な T 細胞受容体を介した特異的な細胞内情報伝達系を解析することを試みた. 同様に PBT, LPT および CD25⁻ LPT を CD3 抗体 (OKT3) で刺激し, 抗 LAT 抗体および抗リン酸化 LAT (phospho-LAT) 抗体を用いウエスタンブロット法にて評価した.

LPT では刺激前後で phospho-LAT の増加は認めなかったが、制御性 T 細胞を除去した CD25⁻ LPT でも刺激後の phospho-LAT の増加は認めなかった. (図 3)

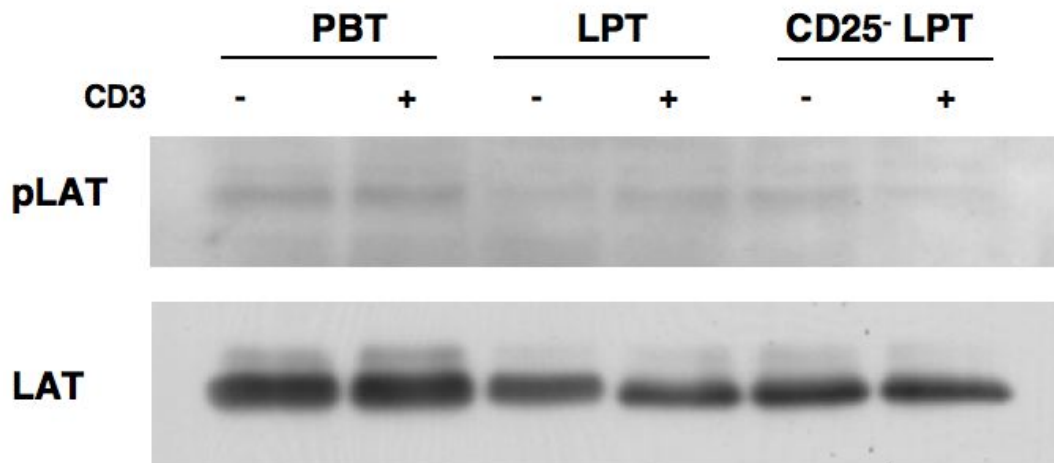


図3. PBT, LPT, CD25⁻ LPTの刺激前後における phospho-LATの変化

このことは LPT の T 細胞受容体を介する刺激に対する低応答がより、本質的なものであり、LPT においても末梢血 T 細胞と同様にその存在が明らかとなっている制御性 T 細胞 (CD25^{bright} CD4⁺ T 細胞) によるものでないことが明らかにされた.

4. LPT の T 細胞受容体刺激におけるダウンストリームシグナリング

さらに LPT の T 細胞受容体を介する刺激に対する低応答の機序を解明するため、PBT に比べ LPT においてタイロシンリン酸化の減弱していた lipid raft におけるシグナル伝達分子 (ZAP-70, LAT) のダウンストリームを検索した。まず T 細胞受容体刺激後の細胞増殖やサイトカイン産生に重要であると考えられる MAPK 系を解析した。PBT を用いた予備実験では抗 CD3 抗体で刺激後、経時的に蛋白を抽出しリン酸化 MAPK 抗体 (anti-phospho MAPK: Promega) を用いたウエスタンブロット法にて MAPK のリン酸化を検討した。PBT では 10 分後をピークに 5 分から 30 分までリン酸化 MAPK の増加を認めた。(図 4)

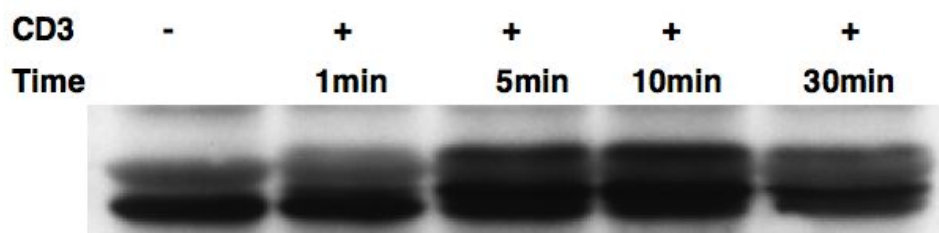


図4. PBTにおける刺激後のphospho MAPKの経時的変化

次に抗 CD3 抗体刺激前と刺激後 5 分において PBT と LPT から蛋白を抽出し, 抗 MAPK 抗体と抗 phospho MAPK 抗体を用いウエスタンブロット法にて解析した. MAPK 蛋白は PBT, LPT とも同様に認められ, 刺激後も両者において MAPK のリン酸化の増加が認められた. (図 5)

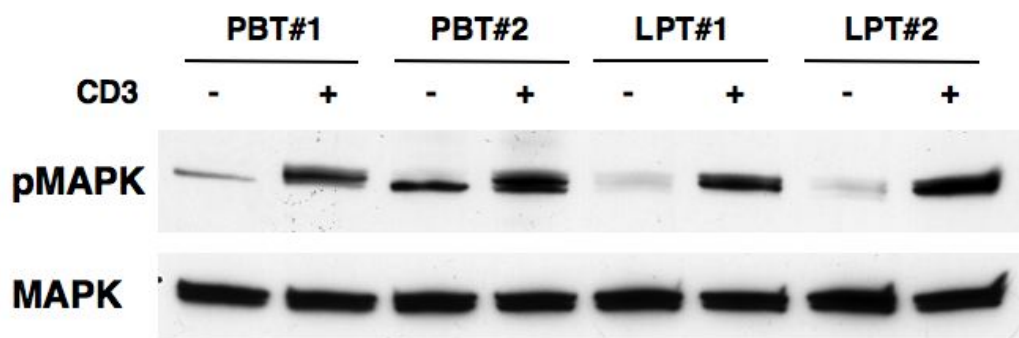


図5. PBTとLPTにおける刺激前後のMAPKおよび phospho MAPKの変化

この結果から LPT の T 細胞受容体を介する刺激後のアップストリームにおけるシグナル分子のタイロシンリン酸化の減弱は MAPK 系にはあまり影響を与えていないように考えられ PLC γ 1 や PKC を介した系が重要である可能性が示唆された.

5. LPT におけるタイロシン脱リン酸化酵素

T 細胞受容体を介する刺激伝達系にはタイロシン脱リン酸化酵素が重要な役割を果たしている. PBT と LPT から蛋白を抽出し抗 SHP-1 および SHP-2 抗体を用い, その蛋白発現量をウエスタンブロット法にて検討した.

SHP-2 の発現量は PBT と LPT で差を認めなかったが, SHP-1 は両者に発現するも LPT では恒常的に僅かに分子量の少ない二つのバンドが検出された. (図 6)

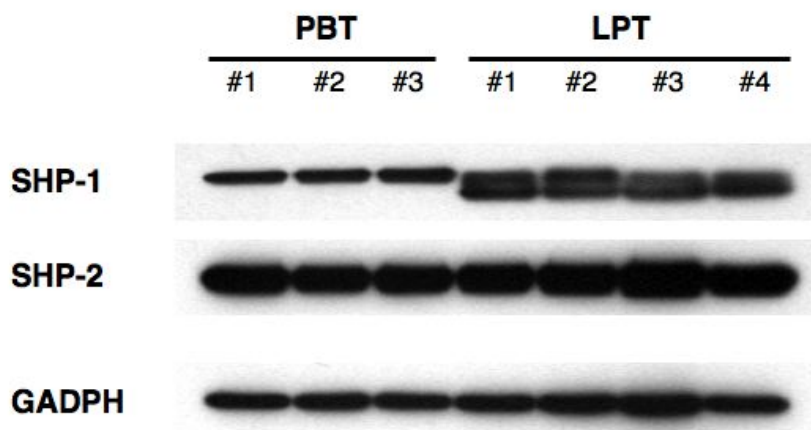


図6. PBTとLPTにおけるタイロシン脱リン酸化酵素

この LPT で特異的に認められた SHP-1 が機能的にも変化しているとすれば, LPT の低応答性を説明する鍵となる可能性もあり今後の検討が必要であると考えられた.

IV. 研究成果のもたらす意義

この研究は腸管粘膜 T 細胞の抗原刺激に対する低応答の機構を“腸管免疫寛容”という概念から説明を試みたユニークなものであった。LPT の抗原刺激における低応答の機序を証明できれば、腸管免疫の解析がより一層進むと思われる。本研究では LPT の抗原刺激における低応答を粘膜内調節性 T 細胞で説明しようと試みたが、くしくも調節性 T 細胞の関与が否定的であることを証明するに至った。これまでの研究からも経口免疫寛容の成立における調節性 T 細胞の関与は明らかであり、また最近の研究から腸管粘膜内に機能的な調節性 T 細胞が存在することが明らかとなっている。この粘膜内調節性 T 細胞の存在意義に関してはこれからの研究を待たざるをえないであろう。

しかしながら本研究では次なる二つのことが明らかとなった。一つは LPT の T 細胞受容体を介する刺激に対する低応答の原因が MAPK 系ではなく PLC γ 1 や PKC を介した系の障害である可能性である。また二つ目は T 細胞受容体細胞内情報伝達系に重要であるとされるタイロシン脱リン酸化酵素である SHP-1 の異常発現である。これは LPT が PBT とは本質的に異なっていることを示唆する発見であり興味深い。この LPT で特異的に認められた SHP-1 が機能的にも変化しているとしたら、LPT の低応答の機序を解き明かす鍵となる可能性もある。

この腸管粘膜 T 細胞の抗原刺激に対する低応答の機構を解明することは粘膜免疫の解明の一端を担い、さらには粘膜免疫における恒常が破綻した病態である IBD の病態解明にも大きく寄与するものであると考える。

V. 今後の研究展開

今回の検討は LPT の抗原刺激における低応答性には粘膜内調節性 T 細胞が関わっていないことを証明するに至ったが、今後の研究方針を明らかにするためには非常に有意義なものであった。

今後は LPT にて特異的に異常発現がみられる SHP-1 蛋白を機能的面から検討していくこと、およびそのダウンストリームとしては PLC γ 1 や PKC を介した系を重点的に検討していくこととなろう。

VI. おわりに

本研究では未だ解明することが多い粘膜免疫の一端を垣間みた印象がある。リンパ球が恒常的に存在し無数の抗原刺激に曝露されている腸管の恒常性維持に関しては重要な研究であったが、その機構を解明するには至らなかった。しかしながら今後の検討課題は明らかにすることができたという意味では大きな成果があった。いつの日か腸管免疫の全貌が明らかとなり、IBDや経口免疫寛容を応用した自己免疫性疾患の治療に寄与することを願ってやまない。

またこの研究をサポートしてくれた日本学術振興会には感謝の意を表したい。

VII. 参考文献

1. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2005;206:232–59.
2. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998;10:1969–80.
3. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188:287–96.
4. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* 2000;164:183–90.
5. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 1999;162:5317–26.
6. Zhang X, Izikson L, Liu L, et al. Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *J Immunol.* 2001;167:4245–53.
7. Hauet-Broere F, Unger WW, Garssen J, et al. Functional CD25- and CD25+ mucosal regulatory T cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application. *Eur J Immunol.* 2003;33:2801–10.
8. Makita S, Kanai T, Oshima S, et al. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol.* 2004;173:3119–30.

9. Qiao L, Schurmann G, Betzler M, et al. Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes. *Gastroenterology*. 1991;101:1529-36.
10. Targan SR, Deen RL, Liu M, et al. Definition of a lamina propria T cell responsive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway. *J Immunol*. 1995;154:664-75.
11. Gonsky R, Deem RL, Hughes CCW, et al. Activation of the CD2 pathway in lamina propria T cells up-regulates functionally active AP-1 binding to the IL-2 promoter, resulting in messenger RNA transcription and IL-2 secretion. *J Immunol*. 1998;160:4914-22.
12. Boirivant M, Marini M, Di Felice G, et al. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology*. 1999;116:557-65.