

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

研究課題

「病原微生物の宿主免疫系との
共生戦略の解明による治療・制御法の開発」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：小安重夫
(慶應義塾大学医学部、教授)

1 研究実施の概要

研究の背景とねらい

病原微生物は宿主の免疫反応に巧みに干渉し、感染を成立・持続させる。本研究は、消化管、中でも胃と腸に炎症を起こすヘリコバクターピロリと病原性大腸菌を主な対象とし、病原因子と宿主免疫担当細胞の相互作用の解析を通じて、病原微生物の共生戦略と宿主の感染防御戦略の分子機構を解明することを目指した。そして、その成果を基に新たな感染制御法の開発を目指した。

ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*: 以下ヘリコバクター) は世界的にみても約半数の人口に感染している。多くの感染者にとってはそれほどの症状はあらわさないが、一部の感染者においては胃炎や胃潰瘍の原因となり、また長期的には MALT リンホーマや胃癌を誘発する。ヘリコバクターは胃酸への適応や胃上皮への付着などの戦略を駆使して胃に定着し炎症を誘導する。胃には明確なリンパ組織は存在しないにもかかわらず、どのようにして免疫系が感染を検知して炎症が誘導されるかは謎であった。

一方、病原性大腸菌 (*Enteropathogenic E. coli*: EPEC) は腸に感染し、腸管上皮に侵入はせず強く付着して微絨毛を破壊し下痢症を誘導する。このような感染様式をとる病原細菌を総称して A/E (attaching/effacing) 病原菌と呼ぶ。A/E 病原菌には EPEC だけではなく、O157 に代表される腸管出血性大腸菌を始めとしてヒトの病原細菌のみならず家畜の病原細菌に至るまで多くの病原細菌が含まれる。EPEC は小児下痢症の原因となり、世界中で見られるが特に発展途上国において大きな問題となっている。

これらの感染微生物の感染戦略を知ることは、逆に微生物の裏をかいて宿主免疫系を活性化する新たな感染制御の方向性に繋がると期待される。また、消化管における免疫活性化機構を明らかにすることは感染制御のみならず炎症性腸疾患をはじめとする炎症性病態の理解やその治療法の開発にも資すると期待される。

そこで、本研究では感染の初期防御ならびに獲得免疫の起動に重要な自然免疫系の活性化機構とそれに干渉する微生物の共生機構を明らかにすることを目指した。具体的には、自然免疫系の担当細胞として特に樹状細胞と肥満細胞に着目し、病原細菌やそれが発現する病原因子が粘膜上皮細胞などとともにこれらの細胞の機能にどのように干渉するかを精査した。宿主側の因子としては、これまでの研究代表者による研究から、樹状細胞からの炎症性サイトカインの発現調節や消化管の肥満細胞の分化に重要な役割を果たすことが明らかにされている脂質リン酸化酵素の1つであるフォスフォイノシチド3キナーゼ (PI3K) 系の役割に特に注目した。

樹状細胞は抗原を消化し、MHC と共に T 細胞に提示することで抗原特異的な獲得免疫系の起動に重要な役割を果たす。したがって、樹状細胞は感染体の検知から獲得免疫の起動に至るまで宿主側において重要な位置を占めるといえる。樹状細胞による抗原提示の分子機構を知ることは効果的なワクチン開発にも重要な情報を与えると期待され、本研究では抗原提示機構の理解にも取り組んだ。

研究結果

(1) ヘリコバクターによる胃炎の発症機構の解明

ヘリコバクター感染による胃炎の発症機構として、ヘリコバクター感染によって上皮細胞から生産されるサイトカインやケモカインが好中球を誘引し、炎症のきっかけになるとい

うのがこれまでの考え方であった。T細胞もB細胞も持たず、したがって獲得免疫系が機能しない Rag2 欠損マウスにおいて、ヘリコバクターは胃粘膜に感染・定着するものの、胃粘膜固有層に血球浸潤を引き起こすことができない。しかしヘリコバクターが感染した Rag2 欠損マウスに未感染マウス由来のナイーブ CD4 陽性 T 細胞を移入することによって、T細胞と好中球の浸潤を伴う強い炎症が誘導され、菌が排除された。移植する T細胞を卵白アルブミン (OVA) に特異的な T細胞受容体を発現する T細胞受容体トランスジェニックマウス (OT-II マウス) 由来の CD4 陽性 T細胞にした場合には全く炎症は誘導されなかった。したがって、上皮細胞から生産されるサイトカインやケモカインが炎症のきっかけになるという従来のモデルは否定され、抗原特異的な CD4 陽性 T細胞の活性化が重要であることが示唆された。

明確なリンパ組織が存在しない胃においてどのような分子機構で抗原特異的な T細胞の活性化が誘導されるかは全く不明であったが、様々なマウスを用いた実験から、T細胞感作には腸管のパイエル板が必要であることが明らかになった。ヘリコバクターは食事に抵抗することが知られる。しかし、嫌気性条件下ではラセン状から球状に形態を変化し、球状菌は容易に樹状細胞によって貪食された。小腸結紮モデルを用いて精査したところ、腸管内に接種したラセン状ヘリコバクターは時間経過とともに球状化し、ラセン状菌は上皮の管腔側に留まるのに対し、パイエル板から樹状細胞に取り込まれた菌体は球状化していることが示された。これらのことから、ヘリコバクターは微好気性の胃においてはラセン状を保つが、腸管へ移行した場合にはラセン状から球状へ変化し、パイエル板経由で樹状細胞に取り込まれ宿主免疫系を活性化すると結論された。活性化された CD4 陽性 T細胞が胃上皮へ浸潤し、さらに抗原特異的にケモカインを生産することで好中球がさらに浸潤し、胃炎が発症すると考えられる。

(2) EPEC の感染戦略の解明

(i) EPEC による Th1 反応誘導

EPEC は宿主側で Th1 反応が優位に起こる場合には定着増殖して炎症や下痢などの症状が現れる。これは EPEC とほとんど同じ病原因子を持ち、マウス版 EPEC といえる *Citrobacter rodentium* を用いた感染実験により示すことができた。*C. rodentium* を Th2 反応が優位に誘導される BALB/c マウスに感染した場合には菌は速やかに排除され、炎症も誘導されないが、Th1 反応が優位に誘導される C57BL/6 あるいは B10. D2 マウスにおいては菌の増殖や定着とともに強い炎症と下痢が誘導された。

EPEC や *C. rodentium* は III 型分泌装置を介して宿主細胞内に様々なエフェクター分子を注入し、宿主細胞の性質に変化を与えることが知られる。興味深いことに、EPEC はマクロファージと共培養した場合、TLR 刺激で活性化された PI3K の下流に位置する Akt が速やかに不活化されることが報告されていた。研究代表者らはこれまでに、PI3K が樹状細胞からのインターロイキン (IL) -12 の発現を負に制御することを明らかにしてきた。IL-12 は Th1 反応の起動に必須のサイトカインである。これらの事実から、我々は「EPEC が樹状細胞の PI3K 活性を抑制することで IL-12 の発現を亢進し、自らに有利な Th1 反応を誘導する戦略をとる」という仮説を立て、これを実証するために一連の実験を行った。

樹状細胞と EPEC を共培養すると、PI3K の下流でリン酸化される Akt は一旦はリン酸化されるものの速やかに脱リン酸化された。III 型分泌装置の変異によってエフェクターを宿主細胞に注入できない変異体を用いた場合には、非病原性大腸菌を用いた場合と同様に PI3K/Akt 経路の長時間にわたる活性化が観察された。IL-12 の遺伝子発現と、IL-12 とは逆に抗炎症に機能する IL-10 の遺伝子発現を検討すると、感染後の樹状細胞における IL-12 の発現は野生型の EPEC の場合に高く、IL-10 の発現は低いのにに対し、III 型分泌装置の変異株の感染では IL-12 の発現は低く、IL-10 の発現が亢進した。この事実は EPEC から注入されるエフェクターを介して PI3K 経路を抑制する因子が IL-12 や IL-10 の発現を制御することを示唆する。さらに EPEC の様々な変異体を検討し、*esph* 遺伝子の変異体を用いた場合に樹状細胞の PI3K-Akt 経路の不活化が起こらないことが明らかになった。さらに IL-12 や

IL-10 の発現を検討したところ、*espH* 変異体との共培養で樹状細胞からの IL-12 の発現が低下し、IL-10 の発現が亢進することも示された。

C. rodentium の *espH* 変異体を作製してマウスに感染させたところ、*espH* 変異体では野生型の *C. rodentium* と比較して菌の定着が低く、炎症も軽微であり、感染性が低下することが明らかになった。この際に、腸間膜リンパ節由来の細胞を用いた二次免疫応答において γ インターフェロン (IFN γ) の生産が低下しており、Th1 反応の低下が確認された。興味深いことに、同じ *espH* 変異体を PI3K 欠損マウスに感染させた場合には、病勢は野生型の *C. rodentium* を感染させた場合とほとんど差はなく、野生型も変異体もほぼ同程度の増殖・定着が見られ、EPEC が PI3K を標的とするという解釈と矛盾しない結果が得られた。これらの実験結果は、「EPEC が樹状細胞の PI3K 活性を抑制することで IL-12 の発現を亢進し、自らに有利な Th1 反応を誘導する戦略をとる」という我々の仮説を支持する。

(3) 免疫細胞における PI3K 経路の精査

(i) 樹状細胞における PI3K による IL-12 の発現制御

樹状細胞を用い、TLR 刺激によって活性化される PI3K 経路の下流を精査した。その結果、Akt の下流において二通りのシグナル伝達経路が IL-12 の発現を制御することが明らかになった。1 つは Akt によって活性が正に制御される mTOR である。IL-10 は IL-12 発現を抑制する機能を持つことが知られる。mTOR は IL-10 の発現を正に制御しており、IL-10 がオートクリンに作用することで IL-12 の発現を間接的に抑制することが明らかになった。一方、Akt の別の基質である GSK3 β は IL-10 とは独立に IL-12 の発現を正に制御することが示された。GSK3 β は Akt によってリン酸化されることで活性が抑制される。ゆえに PI3K を阻害することで GSK3 β の活性が上昇し、IL-12 の発現が亢進されると理解された。

(ii) B 細胞の活性化における PI3K 経路の機能

PI3K の欠損マウスを用いた詳細な解析結果から、B 細胞抗原受容体下流のシグナル伝達系において、PI3K が Tec ファミリーキナーゼの Btk の上流で機能するというこれまでの定説を覆し、Btk の活性化は PI3K 活性とは独立に誘導されることを示した。さらに下流のシグナル伝達系の解析から、Btk と PI3K は共に転写因子 NF- κ B の活性化に必要であり、Btk が I κ B キナーゼの活性化を介して NF- κ B 経路を活性化するのに対し、PI3K は NF- κ B の構成因子である c-Rel の発現に必須であることを明らかにし、Btk と PI3K が異なる経路で NF- κ B の活性化に寄与することを明らかにした。

(4) 病原細菌の感染戦略の理解に基づく治療法の開発：PI3K 経路への干渉による EPEC の感染制御

樹状細胞における PI3K 経路の解析結果から、IL-12 の発現を人為的に制御する方法が浮かび上がった。すなわち、mTOR を阻害することで IL-12 の発現を亢進することができる一方で、GSK3 β を阻害することで IL-12 の発現を抑制できる。

EPEC による Th1 反応の亢進という戦略に対して Th1 反応を抑制する方向で対抗するために、GSK3 β の阻害剤であり、かつ精神科領域で実際に臨床において用いられるリチウムに注目した。野生型の *C. rodentium* を感染させて 3 日後から飲水中に炭酸リチウムを添加したところ、その 3 日後には菌の定着が対照に比較して有意に低く、炎症も軽微であり、感染性が低下することが明らかになった。腸間膜リンパ節由来の細胞を用いた二次免疫応答において IFN γ の生産が低下しており、Th1 反応の低下が確認された。したがって、PI3K 経路への干渉で Th1 反応を制御することで EPEC の感染制御が可能になると考えられる。

一方、*in vitro* で Rapamycin が Th1 反応を亢進することが明らかになり、これは将来的にはがん治療における樹状細胞療法などに応用できる可能性が示された。

(5) 肥満細胞による寄生虫感染制御の分子機構の理解

PI3K 欠損マウスにおいては消化管の肥満細胞数が激減している。このマウスに、腸管に

寄生するベネズエラ糞線虫を感染すると虫体の排除が遅れる。これまでにこれが Th2 反応の誘導不全と消化管肥満細胞の欠損によることを示した。しかし興味深いことに糞線虫の感染によってそれまで全く観察されなかった肥満細胞が腸管に出現する。したがって、感染時には肥満細胞の動員に機能する別の分子機構が存在することが推定された。

未感染の定常状態では SCF による増殖と生存シグナルが PI3K 依存的であること、さらに PI3K が SCF によって誘導されるインテグリンを足場とした極性を持った細胞移動の過程において重要な役割を果たしている事が明らかとなった。これが、定常状態で腸管に肥満細胞が欠損することに理由を考えられた。一方、IL-3 欠損マウスを用いた解析から、感染時には IL-3 が肥満細胞の分裂や増殖・生存の維持に重要であることが明らかになった。定常状態においては c-Kit/PI3K 経路が消化管肥満細胞の分化に重要であり、感染時には IL-3 経路が重要であるという、肥満細胞内に二つのシグナル伝達系の感染防御における役割分担が明らかになった。

(6) 樹状細胞によるクロスプレゼンテーションの分子機構の解明と抗原提示の増強を介した効率の良い免疫賦活化法の開発

細胞傷害性 T 細胞は CD8 陽性の T 細胞から分化するが、そのためには微生物抗原の MHC クラス II 経路への抗原提示が重要である。樹状細胞は細胞外から取り込んだ抗原を MHC クラス II 経路のみならず MHC クラス I 経路へも提示するというクロスプレゼンテーションの能力を持つことが特徴である。クロスプレゼンテーションにおいては貪食などによって取り込んだ抗原を細胞質内へ輸送することが必要であるが、この分子機構は不明であった。

本研究では、クロスプレゼンテーションにおいて抗原を細胞質内に移行させる分子機構として小胞体品質管理機構 (Endoplasmic reticulum-associated degradation: ERAD) が用いられることを明らかにした。樹状細胞に取り込まれた抗原の細胞内局在を共焦点顕微鏡を用いて調べたところ、抗原の染色像と ER マーカーの染色像とは部分的ではあるがよく一致した。同時に、少数の細胞において、抗原の一部は後期エンドソームのマーカーである Lamp1 と局在が一致したが、ゴルジマーカー GM130 の局在はまったく重なっていなかった。さらに、密度勾配遠心による細胞分画を行なったところ、大部分の抗原は全長のまま膜分画に回収された。同じ膜分画には小胞体シャペロンである BiP, 小胞体膜の膜透過装置構成因子である Sec61 などが含まれていた。さらに、これらの ERAD 関連分子は OVA を免疫沈降する際に共沈することも分かった。これらの結果から、樹状細胞は取り込んだ抗原を小胞体における ERAD を介して分解し、MHC クラス I に提示すると結論した。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

研究目的

微生物感染に対する生体防御において、自然免疫系と獲得免疫系の協調は重要である。最終的な感染体の除去には特異的な抗体の生産、1 型ヘルパーT 細胞(Th1)を介したマクロファージや細胞傷害性 T 細胞を中心とした炎症反応や 2 型ヘルパーT 細胞(Th2)による肥満細胞や好酸球を中心とした炎症反応、さらに最近明らかにされた、IL-17 を生産する 17 型ヘルパーT 細胞(Th17)を介した好中球を中心とした炎症反応などの獲得免疫系の機能が必要であるが、感染初期の感染体の増殖を抑制する自然免疫系はまた、獲得免疫系の起動にも重要である。

興味深いことに、病原微生物は宿主の細胞機能とともに免疫反応を巧みに利用して感染を成立・持続させる。たとえば、本研究で主に取り上げるヘリコバクターや EPEC などの感染においては、Th1 反応の亢進によって粘膜の肥厚や潰瘍の形成が誘起され、感染を拡大・持続する。しかし感染初期の免疫応答に関わる病原体と宿主因子、あるいはその反応の誘導機序の実体は、これまで免疫学者と微生物学者による個別的な研究に多く依存したため、その解明は十分とは言い難かった。感染症の理解と治療戦略の構築には両者の協力が不可欠であるとの認識から、本研究では両者の緊密な関係のもと、病原微生物の感染の検知から特異的なリンパ球の活性化へと、自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しをする過程を遺伝学、細胞生物学、生化学的に解明し、病原微生物の戦略を明らかにすることで治療法の開発に有用な情報を得ることを目指した。

本研究では、感染初期に病原微生物の侵入をとらえて自然免疫系の活性化に機能する細胞として樹状細胞と肥満細胞の役割に注目した。また、その過程における微生物側の因子と宿主側の様々な因子の相互作用を明らかにし、その知見を基に微生物側の因子の影響を阻害し免疫系のバランスを適切に保つ治療・制御法の開発を目指すこととした。宿主側の因子としては PI3K が肥満細胞の分化や樹状細胞の機能調節を介して Th1 反応と Th2 反応の決定に重要であるという代表者らの知見をもとに、宿主側の因子の人為的操作によって免疫系を制御し得る可能性が示唆されていた。微生物側の因子が宿主免疫系を自らに有利に機能させるように干渉するならば、それを逆手にとり、当該微生物由来物質を改変し免疫系を人為的に制御しうる創薬の可能性が期待される。

また、獲得免疫反応の起動には樹状細胞による抗原提示が必要である。抗ウイルス免疫や抗腫瘍免疫などにおいては、MHC クラス I を介した抗原提示による細胞傷害性 T 細胞の活性化が重要であり、ワクチン開発などにおいては効率の良い抗原提示が可能な抗原の選択が肝要である。樹状細胞は通常細胞質内抗原とともに細胞外抗原も MHC クラス I へ提示するクロスプレゼンテーションと名付けられた能力を持つことが特徴である。MHC クラス I へ提示されやすい抗原の選択法の開発とともに、クロスプレゼンテーションの分子機構の理解は効率の良い抗ウイルス免疫や抗腫瘍免疫の誘導に重要と考えられ、本研究ではこの分子機構の解明も目指した。

研究材料としては、マウスを宿主としたモデル系を用いて研究を進めた。マウスにおける感染はヒトの感染症と異なるという議論もあるが、様々な遺伝子改変マウスを駆使できるという利点は無視できず、感染免疫の様々な局面で感染体側の病原因子のみならず、宿主側の重要な細胞やその機能を遺伝学的に明らかにするために最適のアプローチと結論した。ただし、成果をヒトの感染症研究に生かすことも重要である。そこで、本研究においては

H. pylori のマウス感染株 (SS1 株) と EPEC や腸管出血性大腸菌 (EHEC) のマウスモデルとして最適な *C. rodentium* を主な感染モデルとして利用した。*C. rodentium* は大腸菌と近縁であるのみならず、EPEC や EHEC と極めて相同性の高い病原性遺伝子塊をゲノムに持ち、その接着機構もほぼ同様と考えられている。ヘリコバクターと *C. rodentium* は共に様々な変異株が存在し、それらを用いることによって寄生体側の因子を検討することができることも利点と考えた。

研究項目

1) ヘリコバクターの感染検知機構と胃炎の発症機序の解明

ヘリコバクター感染による胃炎の発症機構として、これまでヘリコバクター感染によって上皮細胞から生産されるサイトカインやケモカインが炎症のきっかけになると考えられてきた。同時に、Th1 型の免疫反応が重要であるという報告も数多く見られた。しかし、明確なリンパ組織が存在しない胃においてどのような分子機構で抗原特異的な T 細胞の活性化が誘導されるか、という宿主側の免疫戦略は全く不明であったことから、この問題の解決を目指した (小安グループ)。

2) EPEC の感染戦略の解明

EPEC や *C. rodentium* は III 型分泌装置を介して宿主細胞内に様々なエフェクター分子を注入し、宿主細胞の性質に変化を与えることが知られる。興味深いことに、EPEC はマクロファージと共培養した場合、TLR の下流で活性化された PI3K が速やかに不活化されることが報告されていた。研究代表者らはこれまでに、PI3K が樹状細胞からの IL-12 の発現を負に制御することを明らかにしてきた。これらの事実から、我々は「EPEC が樹状細胞の PI3K 活性を抑制することで IL-12 の発現を亢進し、自らに有利な Th1 反応を誘導する戦略をとる」という仮説を立て、これを実証することを目指した (吉田 CREST 研究員と小安グループ)。

また、食食に抵抗することも EPEC の戦略と考えられる。貪食への抵抗には PI3K の関与も考えられていたが、それ以外のエフェクターの機能である可能性も否定できない。そこで細菌遺伝学と細胞生物学的アプローチを組み合わせることでこの問題を解決することを目指した (吉田 CREST 研究員と笹川グループ)。

3) 免疫細胞における PI3K 経路の精査

PI3K 経路に注目していることから、免疫系における PI3K の機能を明らかにすることも重要であり、解析を続けた。これまでの多くの研究を見渡すと、EPEC のみならず、リステリア、サルモネラなどの病原細菌や C 型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルスをはじめとする多くの病原性ウイルスもウイルスタンパク質を使って宿主細胞の PI3K 経路に干渉することが明らかにされているが、その意味は不明であった。感染体が戦略として宿主の PI3K 経路の干渉するのであれば、それを逆手に取る制御法が考えられることから、PI3K 経路を介した IL-12 を中心としたサイトカインの制御機構や他の免疫担当細胞における PI3K 経路を介したシグナル伝達経路を精査した (小安グループ)。

4) 病原細菌の感染戦略の理解に基づく治療法の開発 : PI3K 経路への干渉による EPEC の感染制御

ヘリコバクターや EPEC の感染戦略が明らかになればその裏をかいた治療戦略の立案が可能になる。そこで、感染戦略が明らかになった場合にはその理解に基づいた治療法の開発を目指す。実際にはヘリコバクターの場合には炎症の誘導は菌の排除に結びつくことから、むしろワクチンの開発への戦略を立案することが重要と思われたが、EPEC の場合には炎症の誘導はむしろ菌の感染戦略と思われた。そのため、本研究では EPEC の戦略の裏をかいた治療法の開発を目指した (吉田 CREST 研究員と小安グループ)

5) 肥満細胞による寄生虫感染制御の分子機構の理解

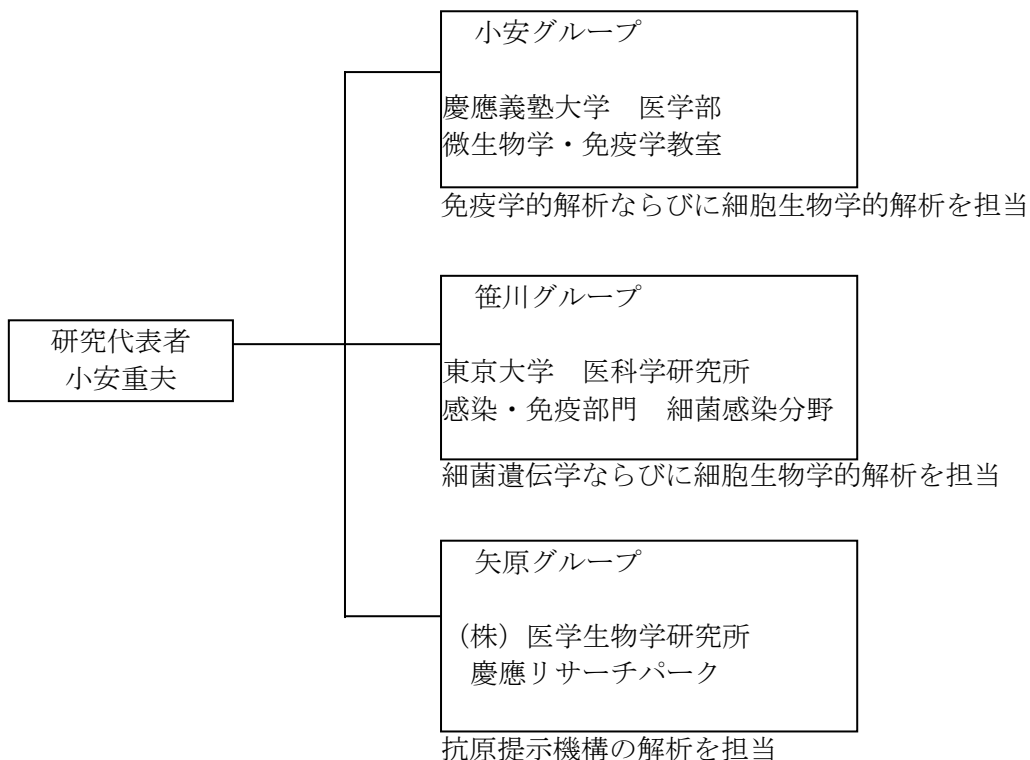
消化管寄生虫への防御には腸管の肥満細胞前駆体が様々なエフェクター分子を獲得し、成熟肥満細胞となって粘膜固有層へ動員されること重要であることが知られる。我々のこれまでの研究から PI3K が消化管肥満細胞の分化や機能に重要であることが示されていた。そこで消化管寄生虫に対する生体防御における肥満細胞の活性化と粘膜固有層への動員における PI3K の機能を明らかにし、肥満細胞の成熟と動員機構を明らかにすることを目指した (小安グループ)。

6) 樹状細胞によるクロスプレゼンテーションの分子機構の解明と抗原提示の増強を介した効率の良い免疫賦活化法の開発

微生物感染に対処するために、細胞傷害性 T 細胞の誘導は重要である。細胞傷害性 T 細胞は CD8 陽性の T 細胞から分化するが、そのためには微生物抗原の MHC クラス I 経路への抗原提示が重要である。樹状細胞は細胞外から取り込んだ抗原を MHC クラス II 経路のみならず MHC クラス I 経路へも提示するというクロスプレゼンテーションの能力を持つことが特徴である。クロスプレゼンテーションにおいては貪食などによって取り込んだ抗原を細胞質内へ輸送することが必要であるが、この分子機構は不明であった。この分子機構の解明を目指し、さらにそれを増強する方法を開発することで免疫増強や効果的なワクチン開発へ資することを目指した (矢原グループ)。

(2) 実施体制

免疫学者のみならず微生物学者と細胞生物学者が加わった強力なチームを形成する目的で本プロジェクトには東京大学医科学研究所の笹川教授のグループと (株) 医学生物学研究所の矢原一郎伊那研究所長 (兼慶應義塾大学医学部訪問教授) の参加を得て研究を進めた。しかし、平成 15 年度に笹川教授が自ら CREST の研究代表者となったため、それ以降も笹川教授との共同研究は継続したが、研究費配分は行わなかった。



3 研究実施内容及び成果

3. 1 ヘリコバクターの感染検知機構と胃炎の発症機序の解明 (慶應義塾大学 小安グループ)

(1)研究実施内容及び成果

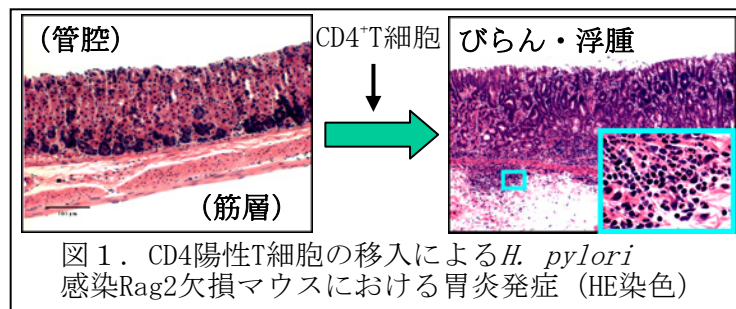
ヘリコバクターの感染による胃炎発症機構について解析し、感染検知に腸管のパイエル板が重要な役割を果たすことを示した。

ヘリコバクター感染による胃炎の発症機構として、これまでヘリコバクター感染によって上皮細胞から生産されるサイトカインやケモカインが炎症のきっかけになると考えられてきた。T細胞もB細胞も持たず、したがって獲得免疫系が機能しない Rag2 欠損マウスにおいては、ヘリコバクターは胃粘膜に感染・定着するものの、胃粘膜固有層に血球浸潤を引き起こすことが出来ない。

しかしこの感染 Rag2 欠損マウスに未感染マウスのナイーブ CD4 陽性 T 細胞を移入することによって、好中球とともに T 細胞の浸潤を伴う強い炎症が誘導され、菌の排除が観察された (図 1)。これは以前、Eaton らが行った SCID マウスを用いた実験結果と良く一致した。

しかしこれまでの報告からは抗原特異的な T 細胞の活性化が必要であるかは必ずしも明らかではなかった。そこで、移植する T 細胞を卵白アルブミン (OVA) に特異的な T 細胞受容体を発現する T 細胞受容体トランスジェニックマウス (OT-II マウス) 由来の CD4 陽性 T 細胞にしたところ、炎症は全く誘導されなかった。同様に、Rag2 欠損マウスと OT-II マウスを交配して得た Rag2 欠損 OT-II マウスにヘリコバクターを感染させても炎症は見られなかった。これらの結果から、ヘリコバクター感染によって上皮細胞から生産されるサイトカインやケモカインが炎症のきっかけになるという従来のモデルは否定され、抗原特異的な T 細胞の活性化が重要であることが示唆された。詳細は省くが、炎症の持続にも CD4 陽性 T 細胞の存在が必要であった。

さらに、Rag2 欠損マウスとサイトカインの共通γ鎖 (γc) の欠損マウスを交配した 2 重欠損マウスを用いて同様な実験を行ったところ、野生型のナイーブな CD4 陽性 T 細胞を移植しても炎症は起こらず、ヘリコバクターが感染した野生型のマウスの CD4 陽性 T 細胞を移植して初めて炎症が誘導された。この事実は抗原特異的な T 細胞の活性化が重要であることをさらに支持するとともに、Rag2 と γc の 2 重欠損マウスにおいては抗原特異的な反応が誘導されないことを意味する。γc 欠損マウスでは IL-15 シグナルの欠損によって樹状細胞からの炎症性サイトカインの発現が低下しているため、樹状細胞の抗原提示に問題がある可能性が考えられた。ところが、野生型と γc 欠損マウス由来の樹状細胞の *in vitro* での抗原提示能の比較からは差は見られなかった。したがって、γc 欠損マウスでは樹状細胞の機能以外で抗原提示と T 細胞の感作に欠陥があることが示唆された。そこで、さらに上記の様々なマウスの表現系を再検討したところ、γc 欠損マウスにおいてはパイエル板や孤立リンパ小節などの腸管免疫系を構成する腸管関連リンパ組織 (GALT) が分化・発達しないことに気がついた。これらの結果から、ヘリコバクターの感染を検知するためには GALT が重要な役割を果たすのではないかという仮説が浮かび上がった。そこでさらに、妊娠中のマウスに抗 IL-7 受容体抗体を投与することによってパイエル板を欠損するマウスを作成したところ、ヘリコバクターを感染させても発症しないことが明らかになった。続いて Rag2 欠損マウスを用いてパイエル板を持たない Rag2 欠損マウスを作成したところ、Rag2 欠損マウスと γc の 2 重欠損マウスの場合と同様に、ヘリコバクターを感染後に野生型のナイーブな CD4



陽性 T 細胞を移植しても炎症は起こらず、ヘリコバクターが感染した野生型のマウスの CD4 陽性 T 細胞を移植して初めて炎症が誘導された。これらの結果から、ヘリコバクターに対する反応の開始にパイエル板がかかわることが示された。

これをさらに確認するために小腸結紮モデルを用いて検討したところ、菌体がパイエル板から取り込まれ、パイエル板内の樹状細胞によって貪食されることが明らかになった (図 2)。ヘリコバクターは貪食に抵抗することが知られるにもかかわらず、効率良くパイエル板内の樹状細胞に取り込まれたことは意外であった。ヘリコバクターは嫌気性条件下ではラセン状から球状に形態を変化するが球状菌は容易に樹状細胞によって貪食されることが培養系で明らかになった。さらに小腸結紮モデルを用いて精査したところ、腸管内に接種したラセン状菌は時間経過とともに球状化し、ラセン型の菌体は上皮の管腔側に留まるのに対し、パイエル板から樹状細胞に取り込まれた菌体は球状化していることが示された。これらのことから、ヘリコバクターは微好気性の胃においてはラセン状を保つが、腸管へ移行する際にラセン状から球状へ変化し、パイエル板経由で樹状細胞に取り込まれ宿主免疫系を活性化すると結論した。活性化された CD4 陽性 T 細胞が胃上皮へ浸潤し、さらに胃粘膜固有層で抗原特異的にケモカインを生産することで好中球がさらに浸潤し、胃炎が発症すると考えられる (図 3)。

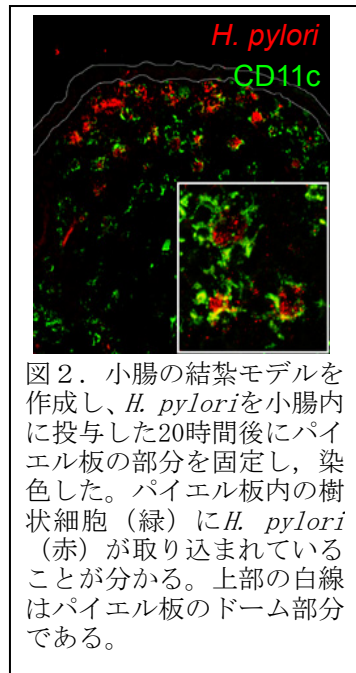


図 2. 小腸の結紮モデルを作成し、*H. pylori*を小腸内に投与した20時間後にパイエル板の部分を固定し、染色した。パイエル板内の樹状細胞 (緑) に *H. pylori* (赤) が取り込まれていることが分かる。上部の白線はパイエル板のドーム部分である。

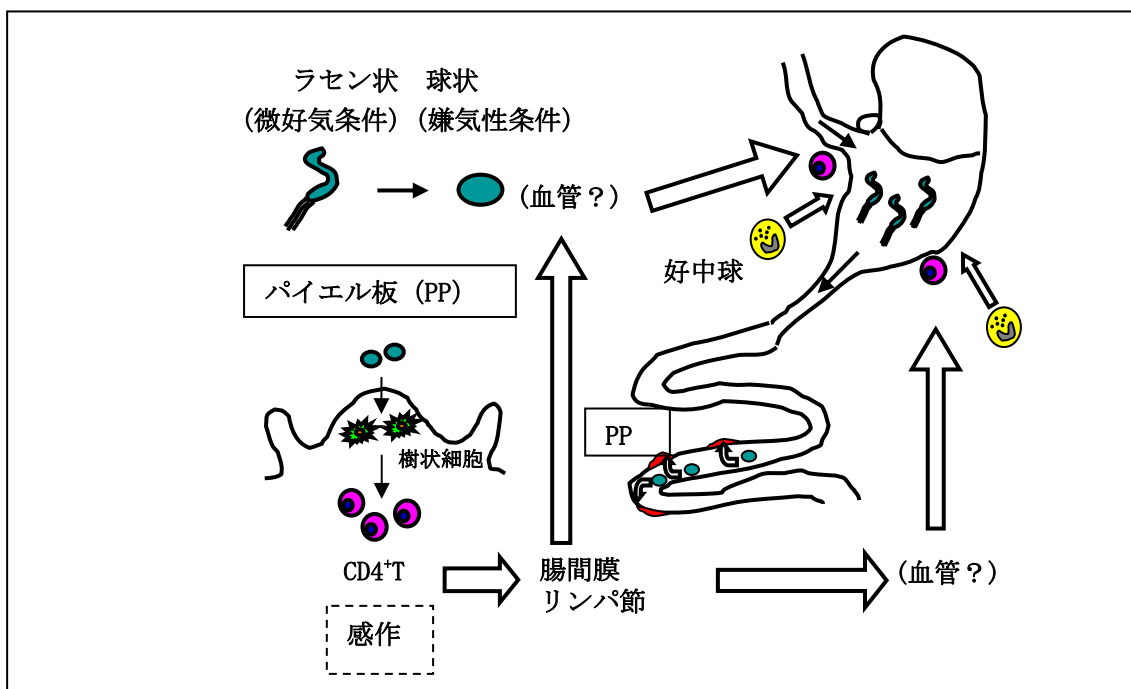


図 3. 宿主によるヘリコバクターの検知機構に関する新しいモデル

微好気性の胃から嫌気性条件下の腸管へ移動したヘリコバクターはラセン状から球状へ変化し、パイエル板を介して取り込まれパイエル板内の樹状細胞によって貪食される。パイエル板内、あるいは腸間膜リンパ節においてヘリコバクター特異的なCD4陽性 T 細胞が活性化され、血行性に胃上皮へ浸潤する。CD4陽性 T 細胞によって生産されるケモカインによってさらに好中球が浸潤し胃炎を発症する。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究から、粘膜免疫系における腸管と胃のクロストークの存在が明らかにされた。今後は腸管において感作された T 細胞が胃粘膜へ移動して定着し、炎症を誘導する分子機構を明らかにしていくことで、胃炎の制御法を開発して行く必要がある。一方、球状菌は胃に定着することができないために胃炎を誘導することない。しかし、パイエル板から取り込まれて T 細胞を感作することはできる。この性質を利用することによって効率的な経口免疫誘導が可能になるのではないかと考えられる。すなわち、目的の抗原を発現した後に不活化した球状菌を経口接種することで胃炎を誘導することなく、目的の抗原に対する免疫反応を誘導する効率の良いアジュバントになる可能性がある。解決すべき問題も多いが、この点を検討中である。

また、本研究から、腸管においても上皮に侵入せずに付着することで腸炎を誘起する病原細菌（たとえば EPEC）の感染検知においてもパイエル板が重要である可能性が浮かび上がった。この点も今後検討したい。

3. 2 EPEC の感染戦略の解明 (慶應義塾大学 小安グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

(i) EPEC による Th1 反応誘導機構の解明

宿主が感染体に対して特異的な免疫反応を起動するためには、樹状細胞が感染体を貪食し、感染体由来の抗原を提示することが重要である。同時に Toll-like receptor (TLR) を介したシグナルに代表される自然免疫系の活性化が必要である。TLR を介した刺激により、樹状細胞は成熟して強い抗原提示能を持つと同時にインターロイキン 12 (IL-12) をはじめとする炎症性サイトカインを発現・分泌する。活性化された CD4 陽性 T 細胞は 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1)、17 型ヘルパー T 細胞、あるいは 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) へ分化するが、IL-12 は Th1 の分化を誘導するために重要なサイトカインである。

EPEC は宿主側の中和抗体の生産によって制御されるが、Th1 反応が優位に起こる場合には定着増殖して炎症や下痢などの症状が現れる。これは EPEC とほとんど同じ病原因子を持ち、マウス版 EPEC といえる *C. rodentium* を用いた感染実験を行うことで示すことができた。*C. rodentium* を Th2 反応が優位に誘導される BALB/c マウスに感染した場合には菌は速やかに排除され、炎症も誘導されないが、Th1 反応が優位に誘導される C57BL/6 あるいは B10. D2 マウスにおいては菌の増殖や定着とともに強い炎症と下痢が誘導された。

先人の研究から、EPEC や *C. rodentium* は III 型分泌装置を介して宿主細胞内に様々なエフェクター分子を導入し、宿主細胞の性質に変化を与えることが知られる。EPEC においても *C. rodentium* においても、III 型分泌装置やエフェクター分子の多くは LEE (locus of enterocyte effacement) と呼ばれる病原遺伝子塊にコードされる。これらの細菌は、エフェクター分子として自らの接着に必要な受容体を送り込み、宿主細胞のアクチン繊維を再構成して接着を安定化することが知られる。また、マクロファージによる貪食に抵抗することも知られる。それ以外にも様々なエフェクター分子を送り込むが、多くのエフェクター分子の機能は必ずしも明らかではない。

我々はこれまでに、PI3K が樹状細胞からの IL-12 の発現を負に制御することを明らかにしてきた。事実、PI3K 欠損マウスにおいては樹状細胞からの IL-12 の生産が亢進しており、結果として Th1 反応の増強と Th2 反応の誘導不全が見られる。多くの細菌は宿主細胞と共培養した場合、TLR を介した刺激を介して細胞内の PI3K を長時間にわたって活性化する。興味深いことに、EPEC は上皮細胞やマクロファージなどの宿主細胞と共培養した場合、活性化された PI3K が速やかに不活化されることが報告されている。これらの事実から、我々は「EPEC が樹状細胞の PI3K 活性を抑制することで IL-12 の発現を亢進し、自らに有利な Th1 反応を誘導する戦略をとる」という仮説を立て、これを実証するために一連の実験を行

った。

EPEC にとっての宿主細胞内の標的の一つが PI3K であるとする、PI3K 欠損マウス（クラス IA PI3K の制御サブユニットである p85 α の欠損マウス）において、EPEC は自らに有利な Th1 反応を誘導しやすく、定着しやすいことが予想された。実際、*C. rodentium* を用いた感染実験の結果、予想通り野生型の BALB/c マウスでは全く起こらない炎症が BALB/c バックグラウンドの PI3K 欠損マウスにおいては B10.D2 マウスと同程度まで誘導され、菌の増殖・定着も見られた（図 4B 参照）。この際に樹状細胞などの骨髄由来の細胞における PI3K が重要であることは、野生型の BALB/c マウスに致死量の放射線を照射した後に BALB/c バックグラウンドの PI3K 欠損マウス由来の骨髄を移植して作製した骨髄キメラマウスにおいて同様の表現型が観察されたことから確認された。

そこで、樹状細胞と EPEC を共培養する系を用いて PI3K の活性化を下流の Akt のリン酸化を指標として検討したところ、樹状細胞においても一旦活性化された PI3K は速やかに不活化されることが明らかになった（図 3A）。この際に III 型分泌装置の変異によってエフェクターを宿主細胞に注入できない変異体を用いた場合には、非病原性大腸菌を用いた場合と同様に PI3K の長時間にわたる活性化が観察された。この事実は EPEC から注入されるエフェクターの中に PI3K 経路を抑制する因子があることを示唆する。そこで、EPEC の様々な変異体を検討し、*espH* 遺伝子の変異体を用いた場合に樹状細胞の PI3K-Akt 経路の不活性化が起こらないことが明らかになった（図 3A）。さらに IL-12 の発現を検討したところ、*espH* 変異体との共培養で樹状細胞からの IL-12 の発現が低下することも示された（図 3B）。

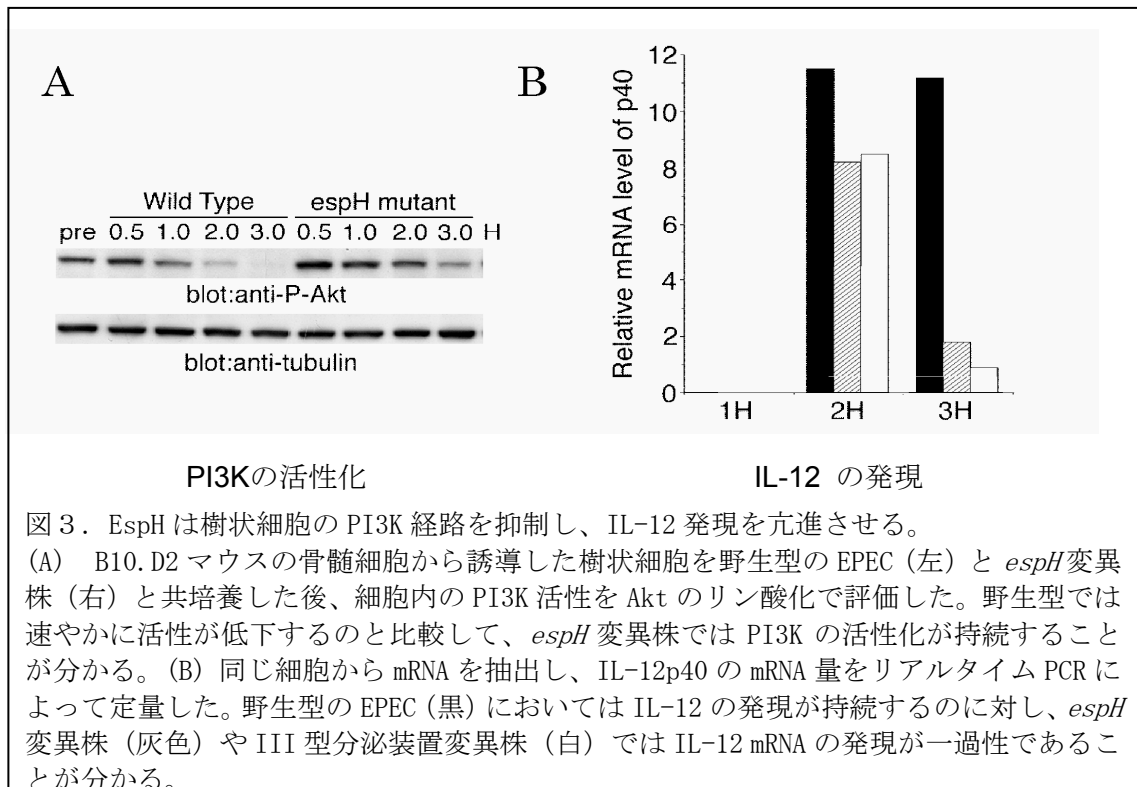


図 3. EspH は樹状細胞の PI3K 経路を抑制し、IL-12 発現を亢進させる。

(A) B10.D2 マウスの骨髄細胞から誘導した樹状細胞を野生型の EPEC (左) と *espH* 変異株 (右) と共培養した後、細胞内の PI3K 活性を Akt のリン酸化で評価した。野生型では速やかに活性が低下するのと比較して、*espH* 変異株では PI3K の活性化が持続することが分かる。(B) 同じ細胞から mRNA を抽出し、IL-12p40 の mRNA 量をリアルタイム PCR によって定量した。野生型の EPEC (黒) においては IL-12 の発現が持続するのに対し、*espH* 変異株 (灰色) や III 型分泌装置変異株 (白) では IL-12 mRNA の発現が一過性であることが分かる。

EspH による PI3K-Akt 経路への干渉が *in vivo* における感染においても機能するか否かを検討するために、*C. rodentium* の *espH* 変異体を作製してマウスに感染させた。その結果、*espH* 変異体では野生型の *C. rodentium* と比較して菌の定着が低く、炎症も軽微であり、感染性が低下することが明らかになった（図 4A）。この際に、腸間膜リンパ節由来の細胞を用いた二次免疫応答において IFN γ の生産が低下しており、Th1 反応の低下が確認された。興味深いことに、同じ *espH* 変異体を PI3K 欠損マウスに感染させた場合には、病勢は野生型

の *C. rodentium* を感染させた場合とほとんど差はなく、野生型も変異体もほぼ同程度の増殖・定着が見られた (図 4B)。この事実は EPEC が PI3K を標的とするという解釈と矛盾しない。

以上の結果は、「EPEC が樹状細胞の PI3K 活性を抑制することで IL-12 の発現を亢進し、自らに有利な Th1 反応を誘導する戦略をとる」という我々の仮説を支持する。現在さらに *espH* 変異体の性質を精査するとともに、EspH の性質を詳細に検討中である。

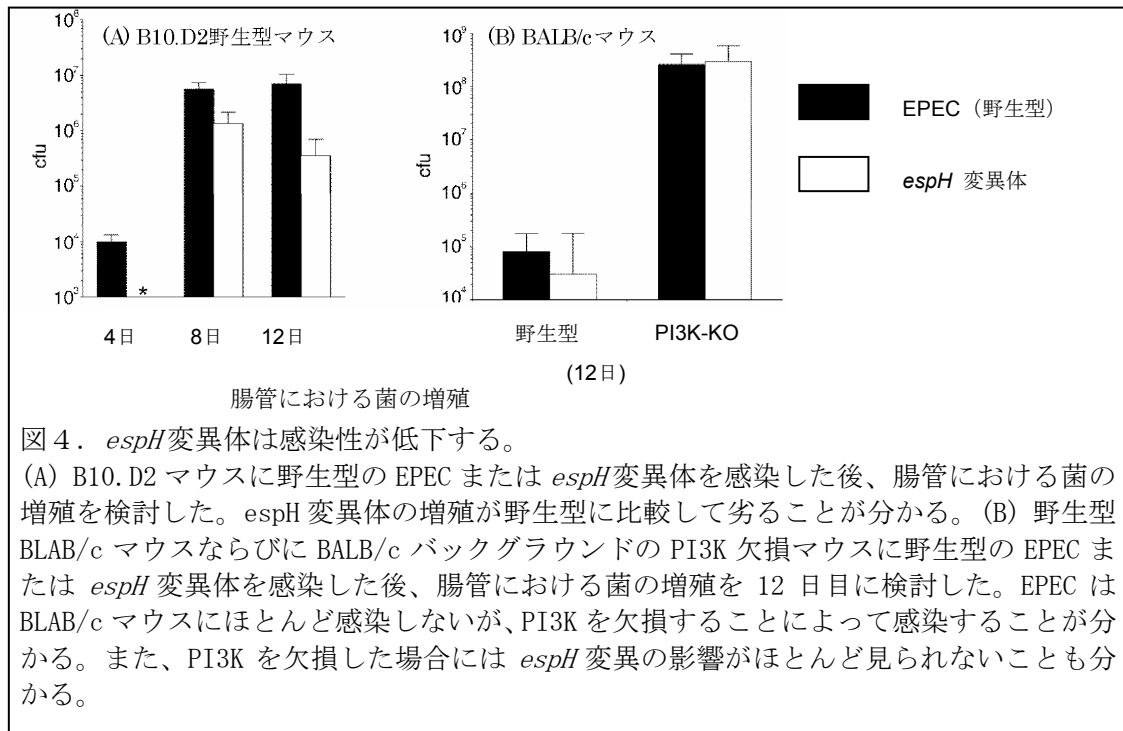


図 4. *espH* 変異体は感染性が低下する。

(A) B10.D2 マウスに野生型の EPEC または *espH* 変異体を感染した後、腸管における菌の増殖を検討した。*espH* 変異体の増殖が野生型に比較して劣ることが分かる。(B) 野生型 BLAB/c マウスならびに BALB/c バックグラウンドの PI3K 欠損マウスに野生型の EPEC または *espH* 変異体を感染した後、腸管における菌の増殖を 12 日目に検討した。EPEC は BLAB/c マウスにほとんど感染しないが、PI3K を欠損することによって感染することが分かる。また、PI3K を欠損した場合には *espH* 変異の影響がほとんど見られないことも分かる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

細菌の感染戦略の解明は、その戦略の裏をかいた治療法の開発へと繋がる。後で述べるように、EPEC による Th1 誘導を抑制することで治療に繋がる可能性が開けてきた。また、EspH そのものあるいはその改変体を用いて PI3K 経路に干渉することで Th1/Th2 反応の人為的な制御への道が開ける可能性があり、さらに研究を進めている。

3. 3 免疫細胞における PI3K 経路の精査 (慶應義塾大学 小安グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

(i) 樹状細胞における PI3K による IL-12 の発現制御機構

TLR 刺激による IL-12 発現が PI3K 欠損マウス由来の樹状細胞で亢進しており、また野生型の樹状細胞からの IL-12 発現も PI3K の阻害剤によって亢進することから、我々は PI3K が IL-12 発現を負に制御すると結論した。この制御が PI3K によるフォスホイノシタイドのリン酸化産物によるものであることを確認するために、PI3K の逆反応を司る Pten を遺伝子操作することで IL-12 発現がどのように影響を受けるかを検討した。Pten の欠損マウスは胎生致死であるために Pten^{flox} マウスと LysM-Cre マウスを交配し、そのマウスの骨髄から GM-CSF を用いて樹状細胞を調製したところ、Pten の発現は著減していた。LPS 刺激によって生産される IL-12 は対照に比較して減少した。これらのデータから、PI3K-Pten 系は樹状細胞における IL-12 発現をフォスホイノシタイドのリン酸化を介して調節すること

が確認された。興味深い点は Pten を欠損しても IL-12 発現がゼロにならない点であり、この事実から、PI3K-Pten 系が IL-12 発現に必須ではなく、その発現量を調節する役目を持っていると解釈される。

次に PI3K の下流でどの経路が IL-12 発現を調節するかを検討した。PI3K の下流で生産されるフォスホイノシタイドのリン酸化物、特にフォスファチジルイノシトール (3, 4, 5) 3リン酸 (PI(3, 4, 5)P3) によって活性化される経路の中では Akt が最も中心的な経路である。そこで Akt の下流 (図 5) を精査した。まず樹状細胞を LPS で刺激した際に下流に位置すると考えられる分子のリン酸化を検討した。その結果、Akt によってリン酸化されると報告されている TSC1/2、GSK3 β 、mTOR によってリン酸化される p70S6 などのリン酸化が観察された。PI3K の阻害剤である Wortmannin で処理すると、Akt や TSC2 のリン酸化はほぼ完全に抑制されたが、p70S6 のリン酸化は部分的にしか抑制されなかった。これは mTOR の上流にはアミノ酸などが存在することと矛盾しない。GSK3 β のリン酸化も部分的に抑制されたが、GSK3 β の上流も Akt のみではないといわれていることと矛盾しない。一方、Rapamycin 処理することで p70S6 のリン酸化は完全に抑制されたがその他の経路は影響を受けなかった。また ERK1/2、JNK、p38 などの MAPK ファミリーの活性化や I κ B α の分解はいずれの薬剤によっても影響を受けなかった。

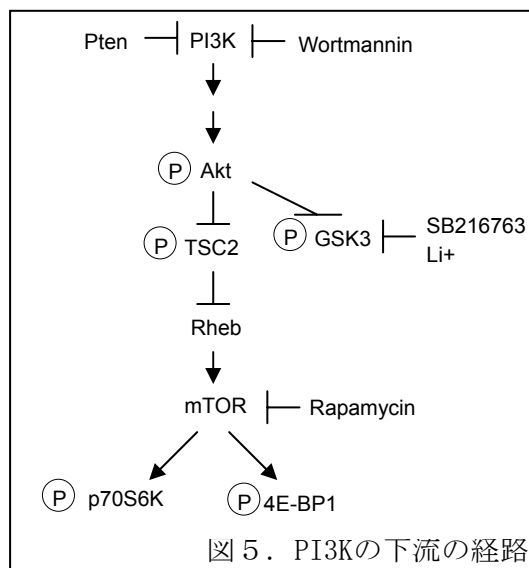


図 5. PI3K の下流の経路

次に下流の分子を阻害することで IL-12 発現に影響が現れるかを検討した。mTOR の阻害剤として知られる Rapamycin が PI3K の阻害剤と同様に IL-12 の発現を亢進した。Rapamycin が確かに mTOR の阻害を介しているかを確認するために、Akt と mTOR の間で機能する Rheb (図 5) を樹状細胞に強制発現したところ、IL-12 の発現が減少した。したがって確かに mTOR が関与していると考えられる。一方、Akt によってリン酸化されることでその活性が抑制される GSK3 β の阻害剤である SB216763 やリチウムを用いると IL-12 発現は抑制された。この事実は GSK3 β が IL-12 発現を正に制御するという報告と矛盾しない。

次に下流の分子を阻害することで IL-12 発現に影響が現れるかを検討した。mTOR の阻害剤として知られる Rapamycin が PI3K の阻害剤と同様に IL-12 の発現を亢進した。Rapamycin が確かに mTOR の阻害を介しているかを確認するために、Akt と mTOR の間で機能する Rheb

(図 5) を樹状細胞に強制発現したところ、IL-12 の発現が減少した。したがって確かに mTOR が関与していると考えられる。一方、Akt によってリン酸化されることでその活性が抑制される GSK3 β の阻害剤である SB216763 やリチウムを用いると IL-12 発現は抑制された。この事実は GSK3 β が IL-12 発現を正に制御するという報告と矛盾しない。

樹状細胞は TLR 刺激によって IL-6、IL-10、TNF α など複数のサイトカインを発現する。上記の阻害剤によって影響を受けるサイトカインを検討すると IL-6 や TNF α はその発現に影響がなかったが、IL-10 の発現は Rapamycin によって亢進した。Wortmannin によっては IL-10 の発現はそれ程影響を受けない。また Pten の欠損によってもそれ程影響を受けなかった。IL-10 の発現は SB216763 やリチウムによって IL-12 とは逆にその発現が亢進した。IL-10 が IL-12 の発現を抑制することはよく知られる。そこで、Rapamycin や GSK3 β の阻害剤の効果が IL-10 の発現調節を介して間接的に見られているかを検討した。IL-10 欠損

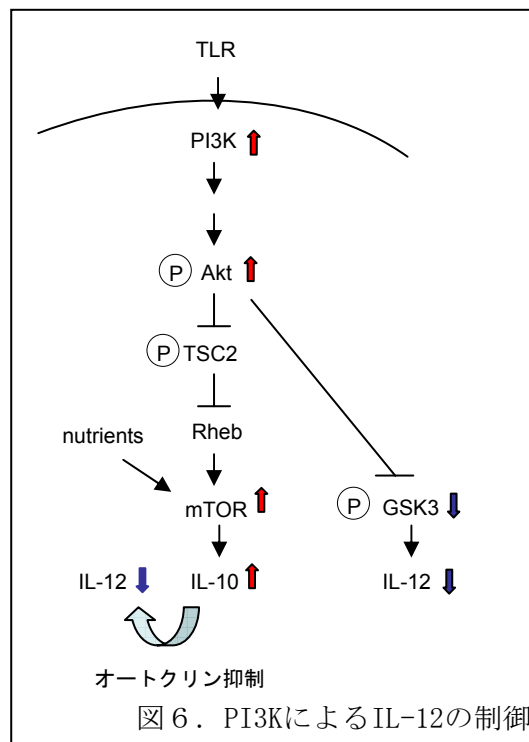


図 6. PI3K による IL-12 の制御

マウスの骨髄から樹状細胞を調製し、種々の阻害剤の効果を検討したところ、Rapamycinの効果は消失したが、WortmanninやSB216763の効果は消失しなかった。これらの事実から、mTORの下流ではIL-10がオートクリンで機能してIL-12の発現を抑制し、一方GSK3 β はIL-10を介さずにIL-12の発現を正に制御していると考えられた(図6)。

(ii) B細胞の活性化におけるPI3K経路の機能

PI3Kの欠損マウスにおけるB細胞の表現系は、PI3KがTecファミリーキナーゼのBtkの上流で機能するというこれまでの定説と矛盾しない。TecファミリーキナーゼはPHドメインを持つことからPI3Kによって生成されるPI(3,4,5)P₃に結合して膜へ移行し、さらにsrcファミリーキナーゼによってリン酸化されて機能すると考えられてきた。B細胞においてはBtkと呼ばれるTecファミリーキナーゼがB細胞分化やシグナル伝達に重要であることが知られる。PI3K欠損マウスはBtk欠損マウスとよく似た表現系を示すことは、BtkがPI3Kの下流で機能するというドグマを支持する結果と考えられた。

しかしながら、B細胞におけるシグナル伝達系を詳細に検討したところ、Btkの活性化はPI3K活性とは独立に誘導されることが示された。すなわち、チロシンリン酸化を指標にしてBtkの活性化を検討したところ、Btkのチロシンリン酸化はPI3Kの阻害剤の影響を全く受けなかった(図7)。さらにBtkの酵素活性を指標にした場合でも、Btkの活性化はPI3K活性を完全に阻害しても影響を受けなかった。さらに下流のシグナル伝達系の解析から、Btk欠損マウスとPI3K欠損マウスではどちらの場合にも転写因子NF- κ Bの活性化に障害が見られた。さらに、NF- κ Bの活性化にBtkとPI3Kがそれぞれどのようにかわるかを検討したところ、Btkの欠損はI κ Bキナーゼの活性化によるI κ Bの分解に障害が見られたのに対し、PI3Kの欠損によってNF- κ Bの構成因子であるc-Relの発現が著減することが示された。これらの結果から、BtkがI κ Bキナーゼの活性化を、PI3Kがc-Relの発現を介してNF- κ B経路を活性化すること、すなわちBtkとPI3Kが異なる経路でNF- κ Bの活性化に寄与すると結論した(図8)。

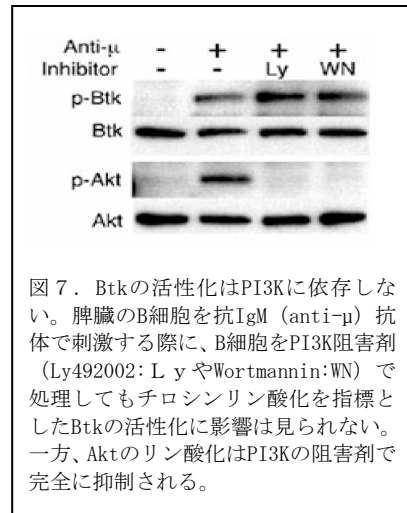


図7. Btkの活性化はPI3Kに依存しない。脾臓のB細胞を抗IgM (anti- μ)抗体で刺激する際に、B細胞をPI3K阻害剤(Ly492002: LyやWortmannin: WN)で処理してもチロシンリン酸化を指標としたBtkの活性化に影響は見られない。一方、Aktのリン酸化はPI3Kの阻害剤で完全に抑制される。

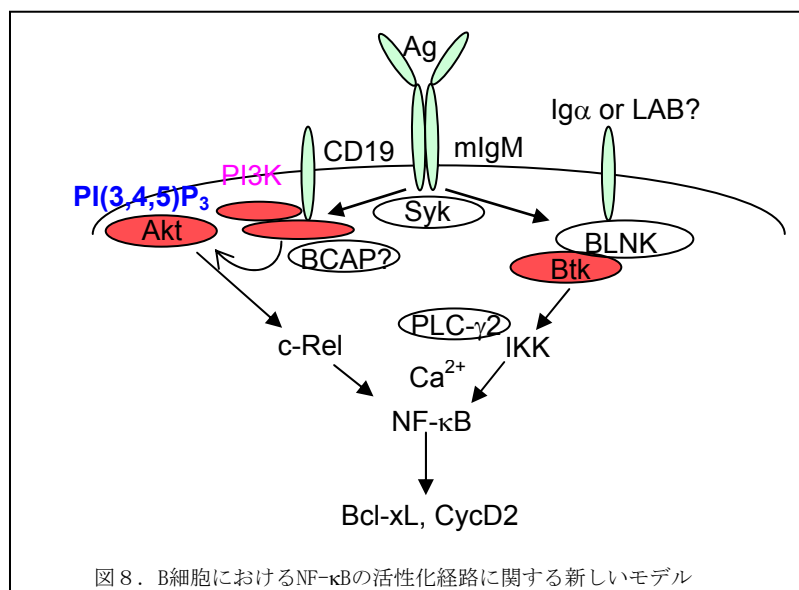


図8. B細胞におけるNF- κ Bの活性化経路に関する新しいモデル

(2) 研究成果の今後期待される効果

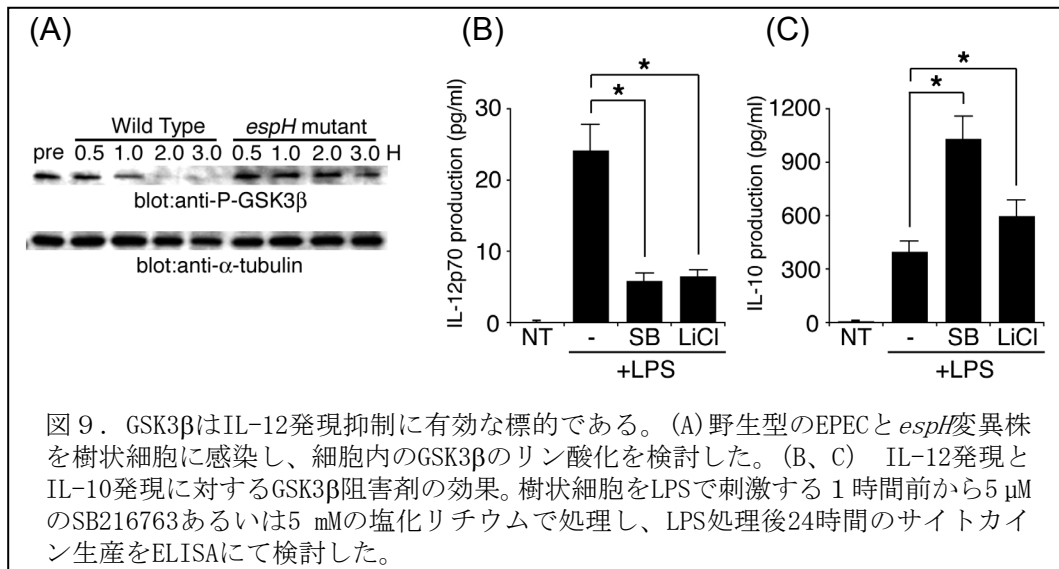
多くの病原細菌やウイルスが宿主細胞のPI3K経路に干渉することが明らかになりつつあるが、その分子機構を知ることで病原微生物に対抗する手段を得ることが出来ると期待される。そのためにも宿主細胞におけるPI3Kシグナル伝達経路ならびにその下流における遺伝子発現調節機構を明らかにすることは重要である。本研究で得られた成果は次項で述べる新たなEPEC制御法に繋がるとともに、さらに病原微生物の制御にとどまらず、免疫関連疾患の制御にも応用が可能になると期待される。

3. 4 病原細菌の感染戦略の理解に基づく治療法の開発：PI3K経路への干渉によるEPECの感染制御

(慶應義塾大学 小安グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

EPECの戦略を逆にとれば治療法の開発につながるはずと考え、前項で得られた、PI3K-Akt-GSK3 β 経路がIL-12の発現調節にかかわることに注目し、Th1反応の人為的制御法の開発を試みた。PI3Kの下流でAktはGSK3 β をリン酸化する。樹状細胞とEPECを共培養した場合にもAktのリン酸化状態と並行して樹状細胞内のGSK3 β のリン酸化は速やかに消失するのに対し、*espH*変異株ではリン酸化が持続した(図9A)。GSK3 β はリン酸化されることによって活性が低下することが知られ、したがってPI3Kの活性化はGSK3 β の活性を抑制することになる。GSK3 β がIL-12の発現を正に調節するという報告があり、事実GSK3 β の阻害剤であるSB216763やリチウムは樹状細胞におけるIL-12の発現を強く抑制し(図9B)、逆にIL-10の発現を亢進した(図9C)。



そこで、マウスに *C. rodentium* を感染させた3日後に飲水中に炭酸リチウムを添加してその効果を検討した。無添加水を与えられたマウスにおいては腸管の肥厚や菌の定着が増加したが、リチウム添加水を与えられた群では腸管の肥厚や菌の付着のどちらも抑制された(図10A、B)。さらに、感染6日後のマウスの腸管膜リンパ節細胞を単離し、EPECの抽出物を用いた2次刺激を行ってTh1反応を検討すると、IFN γ の発現が有意に低く、Th1反応の抑制が観察された(図10C)。これらの結果から、EPECは宿主のPI3K-Akt経路を抑制し、GSK3 β を活性化することでIL-12の発現を増強しTh1反応を誘導するが、GSK3 β を直接阻害することでTh1反応を抑制し、EPECの感染を制御できる、と結論した。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究で示したように、EPECはTh1環境下でより定着し、増殖する。Th1反応によって腸管が肥厚し面積が増大する

ことはEPECの付着に有利であると思われる。また下痢の誘導は宿主から見れば有害な菌を排出することであるが、病原細菌から見れば次の宿主を求めて体外へ脱出するための一つの方法とも考えられる。これも一つの共生の形ではないか。EPECは共生のための戦略としてエフェクターを用いて宿主免疫系を自らに都合の良い方向へ向かわせていると考えられる。そこでその逆を取ることによって感染を制御する可能性が我々の研究から示された

(図11)。EPECは腸管上皮に侵入はしないが強く付着

して微絨毛を破壊し下痢症を誘導するが、このような感染様式をとるA/E病原菌にはEPECだけではなく、0157に代表される腸管出血性大腸菌を始めとしてヒトの病原細菌のみならず家畜の病原細菌に至るまで多くの病原細菌が含まれる。EPECにおけるIII型分泌装置やエフェクターなどの病原因子はLEE (locus of enterocyte effacement) と名付けられた染

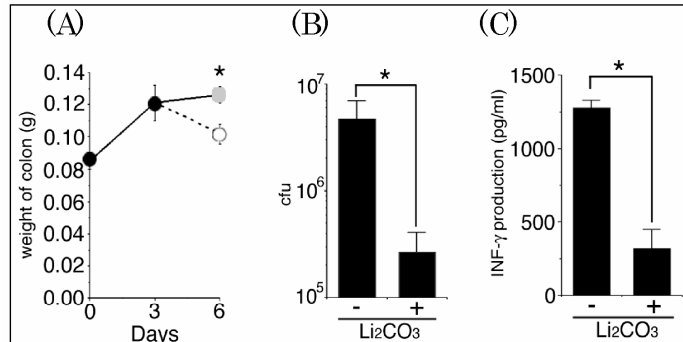
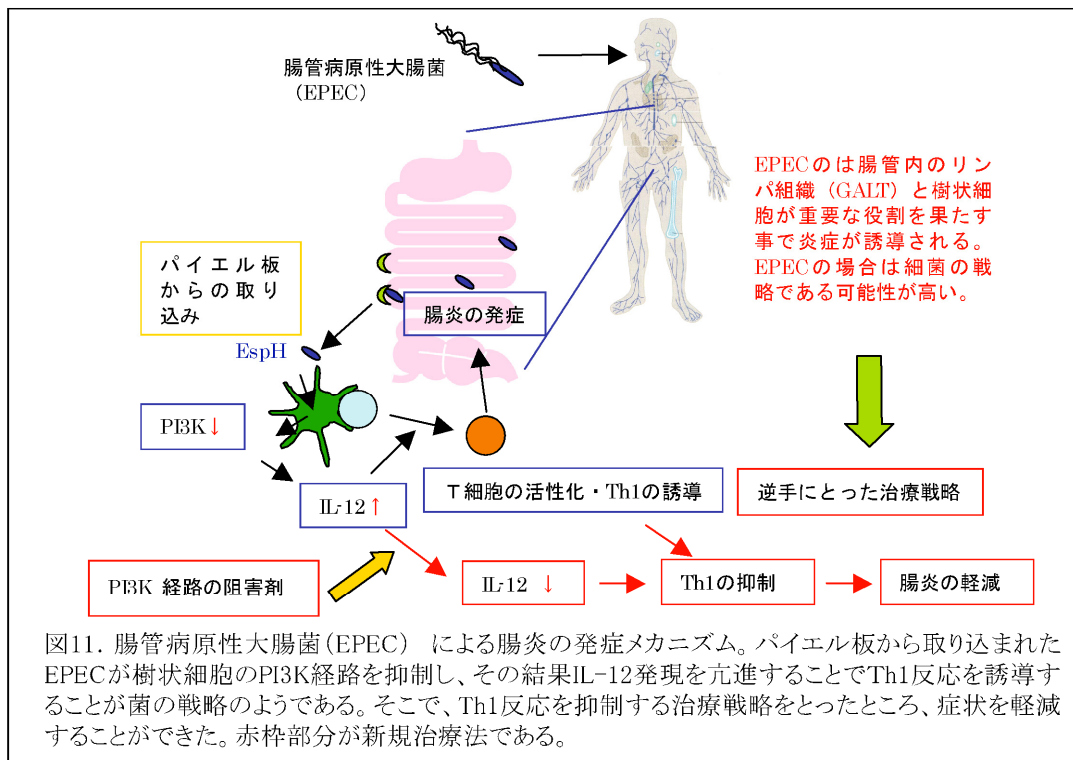


図10. リチウムはEPECの感染制御に有効である。野生型のマウスEPEC (*C. rodentium*) を3群のB10.D2マウスに感染し、3日後に1群の腸重量を計測した。残りの2群のうちの1群には飲水に30 mMの炭酸リチウムを添加し、対照の1群はそのまま通常の給水を継続した。さらに3日後の頃に2群を解析し、腸重量 (A)、定着した菌数 (B)、腸間膜リンパ節T細胞からのIFN γ 生産 (C) を検討した。

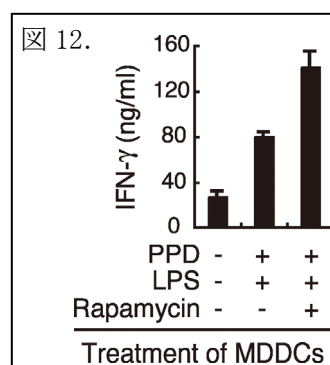
侵入はしないが強く付着

して微絨毛を破壊し下痢症を誘導するが、このような感染様式をとるA/E病原菌にはEPECだけではなく、0157に代表される腸管出血性大腸菌を始めとしてヒトの病原細菌のみならず家畜の病原細菌に至るまで多くの病原細菌が含まれる。EPECにおけるIII型分泌装置やエフェクターなどの病原因子はLEE (locus of enterocyte effacement) と名付けられた染



色体領域 (LEE 病原遺伝子塊) にコードされているが、この LEE 病原遺伝子塊は A/E 病原菌に共通に見られる病原遺伝子塊である。したがって、我々の研究成果は 0157 を含む A/E 病原菌に広く適用が可能と考えられ、PI3K 経路に干渉して Th1 反応を抑制するという治療法も、ヒトの下痢症のみならず畜産の分野にまで広く適用が可能と考えている。

一方、Th1/Th2 バランスの制御は感染症のみならずアレルギーや自己免疫疾患、がん治療においても重要な位置を占める。GSK3 β の場合とは逆に、PI3K/mTOR 経路を抑制することで Th1 反応を亢進できる (図 12)。ツ反応陽性の健常者の単球由来樹状細胞を結核菌由来 PPD と共に培養したのちに LPS で成熟を誘導し、その後同一人の T 細胞を共培養することで IFN γ の発現を検討したところ、樹状細胞を Rapamycin で処理した場合に IFN γ 発現が亢進した。この方法は癌治療における樹状細胞療法における Th1 誘導に貢献できるものと考えてさらに研究を続けている。これらの結果から樹状細胞の PI3K 経路を標的とした免疫制御は広く応用可能な戦略となると期待している。



3. 5 肥満細胞による寄生虫感染制御の分子機構の理解 (慶應義塾大学 小安グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

PI3K 欠損マウスにおいては皮膚に存在する肥満細胞数は野生型マウスと同程度であるが、消化管 (特に腸管) に存在する肥満細胞の数が激減している。このマウスにベネズエラ糞線虫を感染すると虫体の排除がおくれること、これが Th2 反応の誘導不全と消化管肥満細胞の欠損によることを示してきた。しかし興味深いことに糞線虫の感染によってそれまで全く観察されなかった肥満細胞が腸管にあらわれることが分かり、これが感染が遷延化するものの最後には虫体を排除できる理由と考えられた。肥満細胞には主として二つの増殖因子が作用する。すなわち SCF と IL-3 である。PI3K 欠損マウスの骨髄細胞は IL-3 に対する反応性は正常であり、PI3K 欠損マウス由来の骨髄細胞から IL-3 によって肥満細胞を誘導することは可能であった。一方で SCF に対する反応性は著しく低下していた。そこでこれらの因子に注目しながら感染における肥満細胞の機能を解析した。

感染のない定常状態では SCF による増殖・生存維持シグナルは PI3K に依存する。また、PI3K が SCF によって誘導されるインテグリンを足場とした極性を持った細胞移動の過程において重要な役割を果たしている事が明らかとなり、前駆細胞が腸管へ移動し定着する段階にも重要であることが示された。一方、感染時には前駆体が Th2 サイトカインの作用によって成熟し、粘膜固有層に移動して虫体の駆除に機能する。この段階では IL-3 が肥満細胞の分裂や増殖・生存の維持に重要であることが、IL-3 欠損マウスを用いた解析で明らかになった。PI3K と IL-3 の 2 重欠損マウスにおいては感染が長期にわたって遷延化すると共に、粘膜固有層への肥満細胞の動員がほとんど観察されなかった。これらの結果から、定常状態においては c-Kit/PI3K 経路が消化管肥満細胞の分化に重要であり、感染時には IL-3 経路が重要であるという、肥満細胞における二つのシグナル伝達系の感染防御における役割分担が明らかになった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

腸管感染症における肥満細胞の役割に関しては限られた報告しかない。消化管寄生虫に対する免疫反応に重要であるだけでなく、食物アレルギーにおいても消化管の肥満細胞は重要な役割を果たす。ここで得られた知見からは食物アレルギーにおいては SCF/PI3K 経路よりも IL-3 を介した経路が重要ではないかと考えられ、食物アレルギーにおける消化管肥

満細胞の機能研究にも本研究成果が活かせると思われる。

3. 6 樹状細胞によるクロスプレゼンテーションの分子機構の解明と抗原提示の増強を介した効率の良い免疫賦活化法の開発

((株) 医学生物学研究所 慶應リサーチパーク 矢原グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

(i) 樹状細胞によるクロスプレゼンテーションの分子機構

樹状細胞株 DC2. 4 に外来抗原 OVA を取り込ませた後に、OVA を MHC クラス I とともに認識する T 細胞受容体のトランスジェニックマウスである OT-I マウス由来の CD8 陽性 T 細胞や、OVA を MHC クラス II とともに認識する T 細胞受容体のトランスジェニックマウスである OT-II マウス由来の CD4 陽性 T 細胞と共培養すると、どちらの場合にも T 細胞は活性化され、IL-2 の生産が見られた。つまり DC2. 4 は細胞外から取り込んだ抗原を MHC クラス I へも提示できることが示された。この培養系に様々なプロテアーゼ阻害剤を添加すると、OT-II マウス由来の CD4 陽性 T 細胞の活性化はリソゾーム系を抑制することで強く阻害されるが、一方で、OT-I マウス由来の CD8 陽性 T 細胞の活性化はプロテアソームの阻害剤で抑制された。この事実はクロスプレゼンテーションが細胞質内におけるプロテアソームに依存することを示す。この系にビオチン化した OVA を用いても全く同じ結果が得られたため、抗原取り込み後の細胞生物学的解析や生化学的解析にはビオチン化した OVA を抗原として用い、蛍光色素や酵素を結合したストレプトアビジンを検出に用いることとした。

細胞分画法と生化学的解析の組みあわせから、DC2. 4 に取り込まれた OVA は、細胞中では膜分画内に回収されるが、時間の経過と共に、プロテアソーム依存的に分解されることが示された。この過程で、一部の OVA は完全長のままポリ-ユビキチン化を受けていた。樹状細胞に取り込まれた OVA と結合しているタンパク質を解析したところ、小胞体 (ER) 関連タンパク質であり、かつ小胞体品質管理機構 (Endoplasmic reticulum-associated degradation: ERAD) において重要な役割を果たす様々なタンパク質、すなわち Sec61、BiP、Calreticulin、PDI、VCP 等が同定された。Sec61 と VCP は協調して ER 内の不要タンパク質を細胞質側へ逆行輸送する機能を担うが、その発現を siRNA によって抑制すると、OVA の分解やクロスプレゼンテーションによる抗原提示、すなわち OT-I マウス由来の CD8 陽性 T 細胞の活性化能は顕著に阻害された。したがって、これらの分子が機能的にもクロスプレゼンテーションに重要な役割を果たしている事が判明した。また Ca^{2+} 欠損や thapsigargin を用いて ERAD を阻害した場合にも外来抗原の分解は阻害された。

さらに、クロスプレゼンテーションにおける ERAD の意義を分子レベルで詳細に検討する目的で、試験管内でクロスプレゼンテーションの経路を再構成する系の確立を試みた。OVA を取り込んだ膜胞を網状赤血球のライセートと ATP と共にインキュベートすると、ATP 依存的に OVA が膜胞から引き出され、プロテアソーム系で分解されることが明らかになった。この場合にも OVA に結合するタンパク質として ERAD 関連タンパク質が回収された。またその膜系にはペプチドを ER の内腔側へ輸送する TAP 複合体も存在することが確認された。これらの結果、樹状細胞に取り込まれた OVA は ER に局在し、Sec61 複合体と VCP 複合体によって細胞質へと逆行輸送され、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解された後、ペプチドとなった外来抗原が内在抗原と同様に TAP 複合体を介して ER の内腔側へ輸送され、MHC クラス I に提示される事が明らかとなった。

さらに、樹状細胞に取り込まれた OVA の細胞内局在を共焦点顕微鏡を用いて精査した。予期したように、OVA の染色像と ER マーカーの染色像とは部分的ではあるがよく一致した (図 13)。同時に、少数の細胞において、一部の OVA は後期末ソームのマーカーである Lamp1 と局在が一致していた。OVA とゴルジマーカー GM130 の局在はまったく重なっていなかった。これらの染色像は骨髓由来の樹状細胞を用いた場合でもまったく同じように観察されたが、興味深いことに、マクロファージを用いて同様の実験を行ったところ、マクロファージにおいては OVA の ER

への局在はほとんど見られなかった。この事実は、クロスプレゼンテーションが樹状細胞に特異的な現象であることと良く一致する。マクロファージにおいてリソゾームの酵素活性が樹状細胞の10倍以上高く、分解速度が速いということが一因かも知れない。さらにOVAを取り込ませた樹状細胞をホモジナイズし、密度勾配遠心による細胞分画を行なったところ、大部分のOVAは全長のまま膜分画に回収された。同じ膜分画にはERシャペロンであるBiP

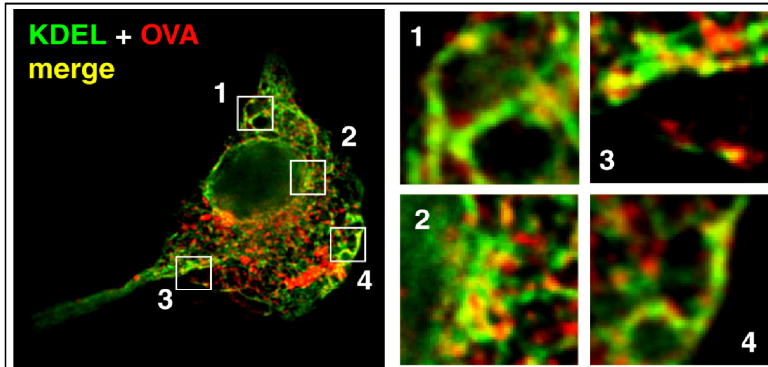


図13. 樹状細胞によってとりこまれた外来抗原は小胞体へ移行する。DC2.4細胞にビオチン化したOVAを取り込ませた後、ローダミン標識ストレプトアビジンで検出した。小胞体はFITC標識した抗KDEL抗体（小胞体タンパク質を認識する）で検出した。取り込まれたOVAの一部が小胞体に局在することが分かる。

やER膜の膜透過装置構成因子であるSec61などが含まれていた。Lamp1は比重の異なる2つの膜分画に分かれた。その重いほうの分画はERに比重が極めて近く、一方軽い比重の膜分画にはOVAは認められなかった。これらの結果も、樹状細胞が取り込んだOVAをERADを介して分解し、MHCクラスIに提示するという上記の仮説を支持する。以上の結果を元に我々は樹状細胞によるクロスプレゼンテーションに関する新しいモデルを提出した（図14）。

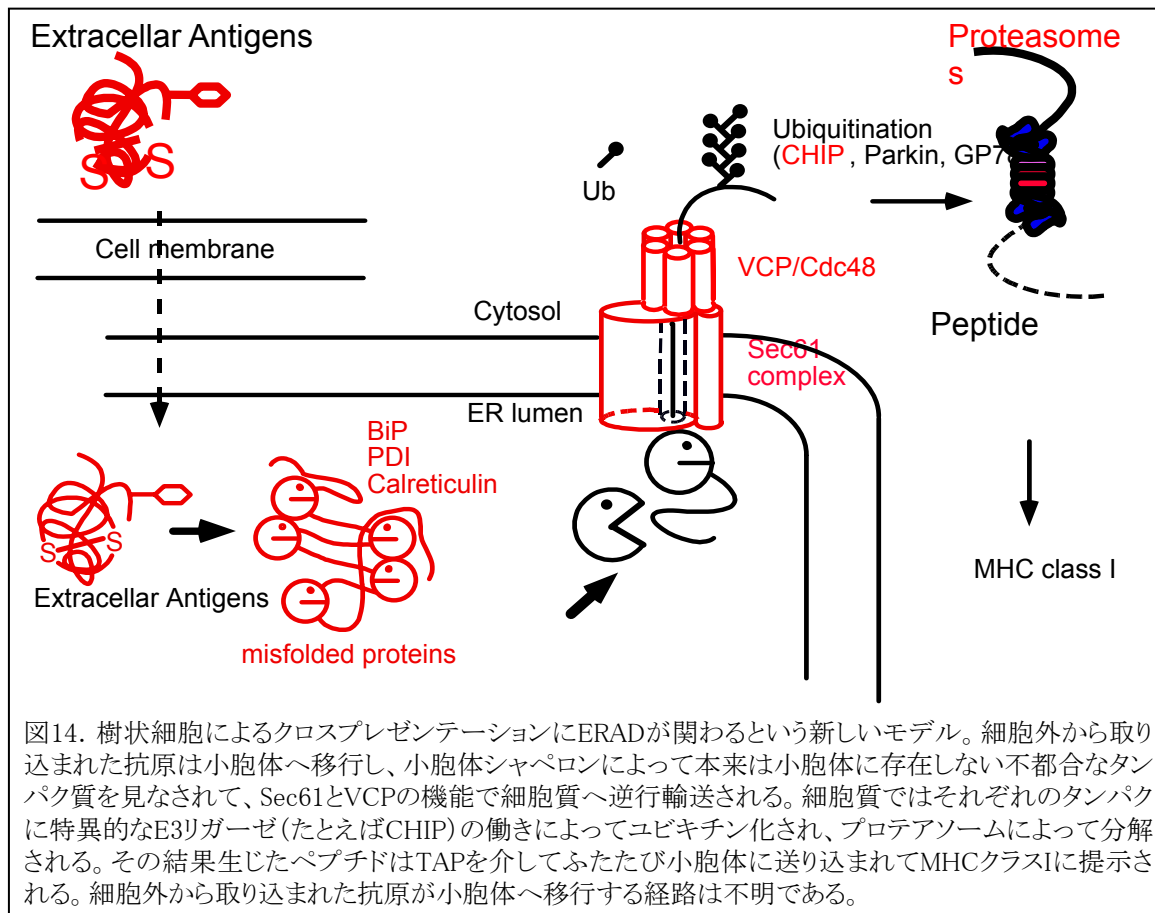


図14. 樹状細胞によるクロスプレゼンテーションにERADが関わるという新しいモデル。細胞外から取り込まれた抗原は小胞体へ移行し、小胞体シャペロンによって本来は小胞体に存在しない不都合なタンパク質を見なされて、Sec61とVCPの機能で細胞質へ逆行輸送される。細胞質ではそれぞれのタンパク質に特異的なE3リガーゼ（たとえばCHIP）の働きによってユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。その結果生じたペプチドはTAPを介してふたたび小胞体に送り込まれてMHCクラスIIに提示される。細胞外から取り込まれた抗原が小胞体へ移行する経路は不明である。

(2)研究成果の今後期待される効果

抗ウイルス免疫や抗腫瘍免疫において MHC クラス I に提示された抗原に対していかに効率よく細胞傷害性 T 細胞を誘導できるかは重要な問題である。これはワクチンを考えた場合にさらに顕著になる。我々の成果は小胞体へ移行しやすい抗原はより効率よくクロスプレゼンテーションによって提示されることを予測させる。本研究の成果は今後ワクチンの標的候補の選択などに有用な情報を与えると期待される。また、今後外来性の抗原を効率よく小胞体へ移行させる方法や、効率よく小胞体へ移行できる抗原の開発などがワクチン開発において重要なアプローチになると期待される。

4 研究参加者

(1) 小安グループ

研究項目

研究の総括・遺伝子改変動物の維持管理
 遺伝子改変動物を用いた *H. pylori* 感染病態の解析
 遺伝子改変動物を用いた *C. rodentium* 感染病態の解析
 樹状細胞におけるシグナル伝達系の解析
 樹状細胞と細菌との相互作用の解析、Th1/Th2 分化の解析

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
小安 重夫	慶應義塾大学	教授	総括・肥満細胞研究	H14.11～
松田 達志	慶應義塾大学	専任講師	シグナル伝達解析	H14.11～H19.6
永井 重徳	慶應義塾大学	助手	<i>H. pylori</i> 研究	H14.11～
大谷 真志	慶應義塾大学	助手	シグナル伝達解析	H16.4～
藤猪 英樹	慶應義塾大学	助手	EPEC・樹状細胞研究	H17.4～
土井 知光	慶應義塾大学	訪問研究員	Th1/Th2 分化の解析	H16.4～H18.3
箕輪 明子	慶應義塾大学	技術員	肥満細胞研究	H14.11～
藤原 真理	慶應義塾大学	技術員	Th1/Th2 分化の解析	H14.11～H18.3
平田 泰子	慶應義塾大学	技術員	シグナル伝達解析	H14.11～
牧 稚佳子	慶應義塾大学	技術員	EPEC・樹状細胞研究	H14.11～H15.2
馬場 夕紀子	慶應義塾大学	技術員	<i>H. pylori</i> 研究	H15.4～
丸谷 美香子	慶應義塾大学	CREST 技術員	樹状細胞研究	H15.4～H18.3
本内 真生子	慶應義塾大学	動物飼育員	マウスの維持	H15.4～H18.3
湯本 直美	慶應義塾大学	動物飼育員	マウスの維持	H15.4～H18.3
武井 啓二	慶應義塾大学	動物飼育員	マウスの維持	H18.4～

(2) 笹川グループ

研究項目

H. pylori の遺伝子改変および病原性の解析
C. rodentium の遺伝子改変および病原性の解析

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
笹川 千尋	東京大学	教授	細菌学の総括	H14.11～
鈴木 敏彦	東京大学	講師	<i>H. pylori</i> 研究	H14.11～ H15.10
三室 仁美	東京大学	助手	<i>H. pylori</i> 研究	H14.11～
吉田 整	東京大学	CREST 研究員	EPEC・樹状細胞研究	H15.3～H17.4
吉田 整	東京大学	助手	EPEC・樹状細胞研究	H17.5～H18.7

(3) 矢原グループ

研究項目

樹状細胞によるクロスプレゼンテーションの分子機構の解明

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
矢原 一郎	(株)医学生物学研究所 慶應義塾大学	伊那研究所長 訪問教授	抗原提示研究	H14.11～
田路 真吾	(株)医学生物学研究所	研究員	抗原提示研究	H14.11～H15.9

中村 あや子	(株)医学生物学研究所	研究員	抗原提示研究	H14.11～H15.9
長谷川 洋典	(株)医学生物学研究所	研究員	抗原提示研究	H15.10～H16.10
今井 純	慶應リサーチパーク	講師	抗原提示研究	H15.10～H19.3

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 17 件)

1. Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens, T. W., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor mediated signal transduction. **Nat. Immunol.** 4:280-286.
2. Glassford, J., Soeiro, I., Skarell, S. M., Banerji, L., Holman, M., Klaus, G. G. B., Kadowaki, T., Koyasu, S., and Lam, E. W.-F. (2003) BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85 α subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse B cells. **Oncogene** 15:2248-2259.
3. Watanabe, N., Nakajima, H., Suzuki, H., Oda, A., Matsubara, Y., Moroi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Ikeda, Y. and Handa, M. (2003) Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 α null platelets characterized by an impaired response to GPVI stimulation. **Blood** 102:541-548.
4. Suzue, K., Asai, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S. (2003) *In vivo* role of IFN- γ produced by antigen presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. **Eur. J. Immunol.** 33:2666-2675.
5. Matsuda, S., Miwa, Y., Hirata, Y., Minowa, A., Tanaka, J., Nishida, E. and Koyasu, S. (2004) Negative feedback loop in T cell activation through MAPK-catalyzed threonine phosphorylation of LAT. **EMBO J.** 23: 2577-2585.
6. Imai, J., Hasegawa, H., Maruya, M., Koyasu, S., and Yahara, I. (2005) Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. **Int. Immunol.** 17:45-53.
7. Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. and Ichijo, H. (2005) ROS-dependent activation of TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. **Nat. Immunol.** 6:571-578.
8. Yajima, T., Yoshihara, K., Nakazato, K., Kumabe, S., Koyasu, S., Sad, S., Shen, H., Kuwano, H. and Yoshikai, Y. (2006) IL-15 Regulates CD8⁺ T Cell Contraction during Primary Infection. **J. Immunol.** 176:507-515.

9. Yu, Y., Nagai, S., Wu, H., Neish, A. S., Koyasu, S. and Gewirtz, A. T. (2006) TLR5-mediated PI3K activation negatively regulates flagellin-induced pro-inflammatory gene expression. **J. Immunol.** 176:6194-6201.
10. Sakai, K., Suzuki, H., Oda, H., Akaike, T., Azuma, Y., Murakami, T., Sugi, K., Ito, T., Ichinose, H., Koyasu, S. and Shirai, M. (2006) Phosphoinositide 3-kinase in nitric oxides synthesis in macrophage: critical dimerization of inducible nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.** 281:17736-17742.
11. Ohteki T., Tada, H., Ishida, K., Sato, T., Maki, C., Yamada, T., Hamuro, J. and Koyasu, S. (2006) Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses *in vivo*. **J. Exp. Med.** 203:2329-2338.
12. Shiroki, F., Matsuda, S., Doi, T., Fujiwara, M., Mochizuki, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H. and Koyasu S. (2007) The p85a regulatory subunit of class IA phosphoinositide 3-kinase regulates β -selection in thymocyte development. **J. Immunol.** 178:1349-1356.
13. Obayashi, K., Doi, T. and Koyasu, S. (2007) Dendritic cells suppress IgE production in B cells. **Int. Immunol.** 19:217-226.
15. Kishimoto, H., Ohteki, T., Yajima, N., Kawahara, K., Natsui, M., Kawarasaki, S., Hamada, K., Horie, Y., Kubo, Y., Arase, S., Taniguchi, M., Vanhaesebroeck, B., Mak, T. W., Nakano, T., Koyasu, S., Sasaki, T. and Suzuki, A. (2007) The Pten/PI3K pathway governs the homeostasis of V α 14 iNKT cells. **Blood** 15:3316-3324.
16. Nagai, S., Mimuro, H., Yamada, T., Baba, Y., Moro, K., Nochi, T., Kiyono, H., Suzuki, T., Sasakawa, C. and Koyasu S. (2007) Role of Peyer's patches in *Helicobacter pylori*-induced gastritis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104:8971-8976.
17. Mimuro, H., Suzuki, T., Nagai, S., Rieder, G., Suzuki, M., Nagai, T., Fujita, Y., Nagamatsu, K., Ishijima, N., Koyasu, S., Haas, R. and Sasakawa, C. (2007) *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. **Cell Host Microbe** 2:250-263.

CREST 以外の原著論文 (国内誌 0 件、国際誌 10 件)

1. Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N. H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature** 423:762-769.
2. Nakaoka, Y., Nishida, K., Fujio, Y., Izumi, M., Terai, K., Oshima, Y., Sugiyama, S., Matsuda, S., Koyasu, S., Yamauchi-Takahara, K., Hirano, T., Kawase, I. and Hirota, H. (2003) Activation of gp130 transduces hypertrophic signal through interaction of scaffolding/docking protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 in cardiomyocytes. **Circ. Res.** 93:221-229.
3. Esashi, E., Sekiguchi, T., Ito, H., Koyasu, S., and Miyajima, A. (2003) A possible role for CD4⁺ thymic macrophages as professional scavengers of apoptotic thymocytes. **J. Immunol.** 171:2773-2777.
4. Toyama-Sorimachi, N., Tsujimura, Y., Maruya, M., Onoda, A., Kubota, T., Koyasu, S., Inaba, K. and Karasuyama, H. (2004) Ly49Q, a novel member of Ly49 family that is

selectively expressed on myeloid lineage cells and involved in regulation of cytoskeletal architecture. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 101:1016-1021.

5. Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Ota, T., Iwasaki, T., Koyasu, S., Amagai, M. and Nishikawa, T. (2004) A mouse model of pemphigus vulgaris by adoptive transfer of naive splenocytes from desmoglein 3 knockout mice. **Br. J. Dermatol.** 151:346-354.
6. Ota, T., Aoki-Ota, M., Tsunoda, K., Shimoda, K., Nishikawa, T., Amagai, M. and Koyasu, S. (2004) Auto-reactive B cells against peripheral antigen, desmoglein 3, escape from tolerance mechanism. **Int. Immunol.** 16:1487-1495.
7. Esashi, E., Ito, H., Ishihara, K., Hirano, T., Koyasu, S., and Miyajima, A. (2004) Development of CD4⁺ macrophages from intrathymic T cell progenitors is induced by thymic epithelial cells. **J. Immunol.** 173:4360-4367.
8. Aoki-Ota, M., Kinoshita, M., Ota, T., Tsunoda, K., Iwasaki, T., Tanaka, S., Koyasu, S., Nishikawa, T. and Amagai, M. (2006) Tolerance induction by the blockade of CD40/CD154 interaction in pemphigus vulgaris mouse model. **J. Invest. Dermatol.** 126:105-113.
9. Murayama, T., Tanabe, M., Matsuda, S., Shimazu, M., Kamei, S., Wakabayashi, G., Kawachi, S., Matsumoto, K., Yamazaki, K., Matsumoto, K., Koyasu, S. and Kitajima, M. (2006) JNK (c-Jun NH2 terminal kinase) and p38 during ischemia reperfusion injury in the small intestine. **Transplantation** 81:1325-1330.
10. Zeyda, M., Geyeregger, R., Poglitsch, M., Weichhart, T., Zlabinger, G. J., Koyasu, S., Horl, W. H., Stulnig, T. M., Watschinger, B. and Saemann, M. D. (2006) Impairment of T cell interactions with antigen-presenting cells by immunosuppressive drugs reveals involvement of calcineurin and NF- κ B in immunological synapse formation. **J. Leukoc. Biol.** 81:319-327.

(2)その他の著作物 (総説、国内誌0件、国際誌8件)

1. Koyasu, S. (2003) The role of PI3K in immune cells. **Nat. Immunol.** 4:313-319.
2. Fukao, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K in negative regulation of TLR signaling. **Trends Immunol.** 24:358-363.
3. Matsuda, S. and Koyasu, S. (2003) Regulation of MAPK signaling pathways through immunophilin-ligand complex. **Curr. Top. Med. Chem.** 3:1358-1367.
4. Fukao, T., Terauchi, Y., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (2003) Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in mast cells: new insights from knockout mice. **J. Mol. Med.** 81:524-535.
5. Imai, J., Yashiroda, H., Maruya, M., Yahara, I., and Tanaka, K. (2003) Proteasomes and molecular chaperones: cellular machinery responsible for folding and destruction of unfolded proteins. **Cell Cycle** 2:585-590.
6. Koyasu, S. (2004) The role of class I_A PI3K in B lymphocyte development and functions. **Biochem. Soc. Trans.** 32:320-325.
7. Koyasu, S., Nagai, S., Ohtani, M., Fukao, T., Baba, Y., Fujiwara, M. and Matsuda, S. (2005) Regulatory role of phosphoinositide 3-kinase in immune response. *In* Taniguchi, M., Akira, S. and Nakayama, T. eds., **The innate immune system: strategies for disease**

control. pp114-120.

8. Koyasu, S., Minowa, A., Terauchi, Y., Kadowaki, T., and Matsuda, S. (2005) The role of phosphoinositide 3-kinase in mast cell homing to gastrointestinal tract. *In* Ono, S. J. eds., **Mast cells and basophils: development, activation and roles in allergic/autoimmune disease.** pp152-165.

(3)学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 25 件、国際会議 9 件)

1. 小安重夫.
T 細胞選択機構と自己寛容.
第 26 回日本医学会総会 (福岡), 2003 年 4 月.
福岡 (福岡) 2003 年 4 月 5 日発表
2. 小安重夫.
B 細胞における PI3 キナーゼの機能.
日本分子生物学会第 3 回春季シンポジウム (鳥取), 2003 年 5 月.
米子 (鳥取) 2003 年 5 月 12 日
3. 小安重夫.
樹状細胞による自然免疫と獲得免疫の橋渡し.
第 14 回日本樹状細胞研究会 (福岡), 2003 年 6 月.
福岡 (福岡) 2003 年 6 月 6 日発表
4. 小安重夫.
Phosphoinositide 3-kinase: a modulator of infectious immunity controlling host immune responses.
The Awaji International Forum on Infection and Immunity (第 3 回あわじしま感染症・免疫フォーラム) (兵庫), 2003 年 8 月.
兵庫、2003 年 8 月 28 日発表
5. 小安重夫.
樹状細胞による免疫制御.
千里ライフサイエンスシンポジウム「免疫制御と免疫疾患研究の最先端」(大阪),
2003 年 9 月.
豊中 (大阪) 2003 年 9 月 2 日発表
6. Koyasu, S.
A role of p85 α in lymphocyte development.
The UK Biochemical Society Symposium “PI 3-kinase in signalling and disease”
(Horsham, UK), November 11-12, 2003.
2003 年 11 月 11 日発表
7. 小安重夫.
感染免疫における PI3 キナーゼの役割.
第 24 回日本炎症・再生医学会 (京都), 2003 年 11 月.
京都 (京都) 2003 年 11 月 27 日発表
8. Koyasu, S.

New aspects of the role of dendritic cells in infectious immunity.
German-Japan Immunology Symposium "Frontiers in immunology, interphase between innate and adaptive immune system" (Unzen, Nagasaki), December, 2003.
日本学術振興会日独科学協力事業「自然免疫、獲得免疫、そして疾病」、雲仙（長崎）2003年12月6日発表

9. Koyasu, S.
Phosphoinositide 3-kinase: a modulator of host immune responses.
RERF International Workshop "Regulation of immunological homeostasis in inflammatory response and disease development" (Hiroshima), Jan. 17, 2004.
2004年1月17日発表
10. Koyasu, S.
Role of phosphoinositide 3-kinase in differentiation and function of mast cells.
Keystone Symposium "Mast cells in physiology, host defense and disease: beyond IgE" (Taos, NM, USA), Feb. , 2004.
2004年2月29日発表
11. 小安重夫.
Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity.
The 13th International Symposium on Molecular cell Biology of Macrophages 2004 (July 1-2, 2004)
第13回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム（大阪）
2004年7月1日発表
12. Shigeo Koyasu.
Role of phosphoinositide 3-kinase in B cell signal transduction.
The 12th International Congress of Immunology and the 4th Annual Conference of the Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), Montreal, Quebec, Canada (July 18-23, 2004)
July 23, 2004 発表
13. 小安重夫.
感染免疫における樹状細胞の機能.
第28回阿蘇シンポジウム（2004年7月30-31日）（熊本）
2004年7月31日発表
14. 小安重夫.
T細胞の抗原認識と活性化機構.
第64回日本血液学会総会・第44回日本臨床血液学会総会（2004年9月12-15日）（東京）
2004年9月12、15日発表
15. 小安重夫.
PI3Kノックアウトマウスと寄生虫感染症.
第45回日本熱帯医学会大会（2004年10月15-16日）（東京）
2004年10月16日発表
16. Shigeo Koyasu.
Role of interferon- γ derived from antigen presenting cells in innate immune responses.
Aegean Conference, the 3rd International Conference on Innate Immunity, Crete, Greece (October 10-15, 2004)

October 10, 2004

17. Shigeo Koyasu.
Role of PI3K in mast cell homing to the gastrointestinal tract.
Novartis Foundation Symposium No.271 “Mast cells and basophils: Development ,
activation and roles in allergic/autoimmune disease”, London, UK (October 16-18,
2004)
November 17, 2004発表
18. Shigeo Koyasu.
Role of PI3-kinase in B cell development and function.
日米医学協力企画40周年記念事業シンポジウム京都（2004年12月8-9日）（京都）
2004年12月9日発表
19. Satoshi Matsuda, Yasuko Hirata, Akiko Minowa, Shigeo Koyasu.
SPRY1 functions as a negative-feedback loop in the TCR signaling pathway.
The 4th International Workshop of Kyoto T Cell Conference (April 8-10, 2005) (Kyoto)
2005年4月9日発表
20. Shigeo Koyasu.
Dendritic cell and immune cell biology.
The 3rd Congress of the Federation of Immunology Societies of Asia-Oceania (FIMSA
2005), Hangzhou, China (April 18-22, 2005)
April 20, 2005 発表
21. Shigeo Koyasu.
Role of PI3-kinase in B lymphocyte development and functions.
Aegean Conference, the 3rd Lymphocyte Signal Transduction Workshop, Crete, Greece
(May 27-June 1, 2005)
May 29, 2005 発表
22. Shigeo Koyasu, Jun Imai, Hironori Hasegawa, Mikako Maruya, Ichiro Yahara.
Cross-presentation of exogenous antigens by dendritic cells involves the endoplasmic
reticulum-associated degradation (ERAD).
RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2005 “Mechanisms of Immune
Responses in Health and Diseases” (June 17-19, 2005) (Kanagawa)
June 19, 2005
23. Shigeo Koyasu, Shigenori Nagai, Masashi Ohtani, Taro Fukao, Masanobu Tanabe, Yasuo
Terauchi, Takashi Kadowaki, Tsutomu Takeuchi, Yukiko Baba, Mari Fujiwara, Satoshi
Matsuda.
Regulatory Role of Phosphoinositide 3-kinase in immune response.
Uehara Memorial Foundation Symposium 2005 “The Innate Immune System: Strategies
for Disease Control” (July 11-13, 2005) (Tokyo)
July 12, 2005 発表
24. Shigeo Koyasu.
Dendritic cells in Th1/Th2 induction.
International Symposium “Molecular Bases Underlying Microbial Infections and the
Host Responses”, Chiyoda (July 19-20, 2005) (Tokyo)
July 19, 2005 発表（招待講演）
25. 永井重徳, 大谷真志, 馬場夕紀子, 深尾太郎, 水野慎大, 中村梢, 田中千草, 松
田達志, 小安重夫.

樹状細胞における IL-12 発現は PI3K-PTEN 経路によって調節される。
第 2 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 (秋田)
2005 年 8 月 3 日発表

26. Shigeo Koyasu.
Role of dendritic cells in infectious immunity.
The Awaji International Forum on Infection and Immunity (第 5 回あわじしま感染症・免疫フォーラム) (2005 年 9 月 5-8 日) (兵庫)
2005 年 9 月 5 日発表
27. Shigeo Koyasu.
Role of PI3-kinase in the immune system.
Basic Mechanisms Leading to Immunological Diseases, the 6th Meeting of the Japanese Society of Immunology (JSI) and Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Potsdam, Cecilienhof (Germany)(September 17-20, 2005)
September 20, 2005 発表
28. 小安重夫.
樹状細胞による抗原のクロスプレゼンテーションと小胞体品質管理機構 (ERAD)
特定領域研究「メンブレントラフィック」シンポジウム「メンブレントラフィックと感染・免疫」(東京)
2005 年 12 月 12 日発表
29. Shigenori Nagai.
T lymphocyte-mediated induction of inflammatory response in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection.
第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005 年 12 月 13-15 日) (神奈川)
2005 年 12 月 14 日発表
30. 小安重夫.
Approach to establish new autoimmune disease model animals.
第 50 回 (中) 日本リウマチ学会総会・学術集会、第 15 回国際リウマチシンポジウム (2006 年 4 月 23 日-26 日) (長崎)
2006 年 4 月 26 日発表
31. Shigeo Koyasu, Akiko Minowa, Satoshi Matsuda.
Role of PI3K in mast cell homing to the gastrointestinal tract.
The 2nd International Symposium of the 21st Century COE program, Akita Univ. School of Medicine “PI3-kinase and its related disease” (2006 年 6 月 23-25 日) (秋田)
2006 年 6 月 24 日発表
32. 小安重夫.
自然免疫と獲得免疫：自己・非自己の認識
第 27 回日本医学会総会 (2007 年 4 月 6-8 日) (大阪)
2007 年 4 月 6 日発表
33. Shigeo Koyasu.
Role of PI3K in immune receptor signaling.
The 13th International Congress of Immunology (August 21-25, 2007) (Rio de Janeiro, Brazil)
2007 年 8 月 25 日発表

34. 小安重夫.
Role of CD4 T cells primed in Peyer's patches for *Helicobacter pylori*-induced gastritis
The Awaji International Forum on Infection and Immunity (第7回あわじしま感染症・免疫フォーラム) (2007年9月2-5日) (兵庫県淡路市)
2007年9月3日発表

口頭発表 (国内会議39件、国際会議1件)

1. 鈴木春巳, 小田浩代, 酒井幸平, 松田達志, 小安重夫, 白井睦訓.
T細胞の胸腺内分化は Rac1 を介したアクチン再構成に依存する.
第25回日本分子生物学会年会 (横浜), 2002年12月.
2. Suzuki, H., Oda, H., Sakai, K., Matsuda, S., Koyasu, S. and Shirai, M.
Rac1 mediated cytoskeletal rearrangement is critical in positive selection of thymocytes.
第32回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), 2002年12月.
3. 加来寛明, 堀川啓介, 小安重夫, 高津聖志.
CD38 刺激によるマウス B 細胞の NF- κ B 活性化及び胚性型 γ 1 転写の誘導のメカニズム.
第32回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), 2002年12月.
4. Matsuda, S., Hirata, Y. and Koyasu, S.
Target genes of MAPK family in T cells.
第32回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), 2002年12月.
5. Koyasu, S., Fujiwara, M., Mochizuki, Y., Suzuki, H. and Doi, T.
Phosphoinositide 3-kinase is involved in the optimal pre-TCR signal transduction during thymocyte development.
第32回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), 2002年12月.
6. Ohteki, T., Maki, C. and Koyasu, S.
APC-derived IL-15 is required for memory-phenotype CD8⁺ T cell survival, whereas dispensable for development of NKT cells and intestinal TCR $\gamma\delta$ ⁺ IEL.
第32回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), 2002年12月.
7. Fukao, T., Tanabe, M., Ota, T., Matsuda, S., Takeuchi, T., Koyasu, S.
PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in dendritic cells.
第32回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), 2002年12月.
8. Koyasu, S., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Behrens, T. W., Takatsu, K., Kadowaki, T. and Suzuki, H.
PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction.
Annual meeting of the American Association of Immunologists 90th Anniversary Meeting (Denver, CO, USA), May 6-10, 2003.
2003年5月8日発表
9. 松田達志, 平田泰子, 小安重夫.
SPRY1 の発現調節機構の解析.
第13回 Kyoto T Cell Conference (京都), 2003年6月.
京都 (京都) 2003年6月28日発表

10. 樗木俊聡, 小安重夫.
サルコイドーシスモデルにおける IL-15 の役割.
第 13 回 Kyoto T Cell Conference (京都), 2003 年 6 月.
京都 (京都) 2003 年 6 月 28 日発表
11. 松田達志, 小安重夫.
Negative feedback loop in T cell activation through MAP kinase-catalyzed LAT phosphorylation.
第 76 回日本生化学会大会 (神奈川), 2003 年 10 月.
横浜 (神奈川) 2003 年 10 月 17 日発表
12. Shiroki, F., Fujiwara, M., Matsuda, S. and Koyasu, S.
Role of phosphoinositide 3-kinase in thymocyte development.
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡), 2003 年 12 月.
福岡 (福岡) 2003 年 12 月 8 日発表
13. Nagai, S., Yamada, T., Mimuro, H., Baba, Y., Suzuki, T., Sasakawa, C. and Koyasu, S.
Role of PI3K in immune response of *Helicobacter pylori* infection.
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡), 2003 年 12 月.
2003 年 12 月 8 日発表
14. Ohteki, T., Maki, C. and Koyasu, S.
IL-15 controls granuloma formation and subsequent endotoxin shock induced by *P. acnes* and LPS.
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡), 2003 年 12 月.
2003 年 12 月 10 日発表
15. Ota, T., Ota, M., Tsunoda, K., Shimoda, K., Nishikawa, T., Amagai, M. and Koyasu, S.
B cell tolerance against a peripheral auto antigen for Pemphigus vulgaris, desmoglein 3.
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡), 2003 年 12 月.
2003 年 12 月 10 日発表
16. 白木文子, 松田達志, 藤原真理, 小安重夫.
胸腺細胞の分化におけるPI3Kの機能解析.
第14回Kyoto T Cell Conference (2004年6月4-5日) (京都)
2004年6月4日発表
17. 松田達志, 平田泰子, 小安重夫.
T細胞におけるSPRY1の機能.
第14回Kyoto T Cell Conference (2004年6月4-5日) (京都)
2004年6月5日発表
18. 小安重夫.
PI3キナーゼによる免疫反応の調節機構.
上原記念生命科学財団特定研究助成「自然免疫-難治疾患の克服に向けた分子戦略-」研究発表会 (2004年6月13-14日) (静岡)
2004年6月14日発表
19. Akihiro Yoshizawa, Shigenori Nagai, Taketo Yamada, Tsunomu Yoshikawa, Satoshi Ogawa, Shigeo Koyasu.
Experimental autoimmune myocarditis and myocardial dysfunction induced by autoantibody against muscarinic acetylcholine receptor type 2 in mice.

- 第34回日本免疫学会総会・学術集会（2004年12月1-3日）（北海道）
2004年12月1日発表
20. 斉藤瑠美奈, 茶本健司, 松崎順子, 辻武正, 門脇孝, 小安重夫, 池田裕明, 西村孝司.
Th1/Th2の制御の新たなシグナル伝達経路：IL-4はSTAT6非依存的、PI3K依存的にCD8陽性T細胞からのIFN-g産生を誘発する.
第34回日本免疫学会総会・学術集会（2004年12月1-3日）（北海道）
2004年12月1日発表
21. 鈴江一友, 渡邊玲子, 西森まどか, 小安重夫, 鈴木守.
マラリア感染防御とヘルパーT細胞のサブセット.
第34回日本免疫学会総会・学術集会（2004年12月1-3日）（北海道）
2004年12月2日発表
22. 今井純, 長谷川洋典, 丸谷美香子, 小安重夫, 矢原一郎.
樹状細胞（DC）による抗原クロスプレゼンテーションは小胞体品質管理機構（ERAD）を利用する.
第34回日本免疫学会総会・学術集会（2004年12月1-3日）（北海道）
2004年12月2日発表
23. 長谷川洋典, 丸谷美香子, 今井純, 小安重夫, 矢原一郎.
抗原クロスプレゼンテーションにおいて樹状細胞に取り込まれたOVAはERに局在する.
第34回日本免疫学会総会・学術集会（2004年12月1-3日）（北海道）
2004年12月2日発表
24. Shigeonori Nagai, Shinta Mizuno, Satoshi Matsuda, Taro Fukao, Yukiko Baba, Akira Suzuki, Shigeo Koyasu.
PI3K-mTOR pathway negatively regulates interleukin-12 production by dendritic cells.
第34回日本免疫学会総会・学術集会（2004年12月1-3日）（北海道）
2004年12月2日発表
25. Tomomitsu Doi, Shigeo Koyasu.
The role of PI3K on B cell activation
第34回日本免疫学会総会・学術集会（2004年12月1-3日）（北海道）
2004年12月2日発表
26. Hiroyuki Tada, Kazuto Ishida, Taku Sato, Junji Hamuro, Shigeo Koyasu, Toshiaki Ohteki.
Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses *in vivo*.
第35回日本免疫学会総会・学術集会（2005年12月13-15日）（神奈川）
2005年12月13日発表
27. Satoshi Matsuda, Yasuko Hirata, Akiko Minowa, Shigeo Koyasu.
SPRY1 functions as a negative-feedback loop in the TCR signaling pathway.
第35回日本免疫学会総会・学術集会（2005年12月13-15日）（神奈川）
2005年12月14日発表
28. Jun Imai, Mikako Maruya, Hironori Hasegawa, Shigeo Koyasu, Ichiro Yahara.
In vitro translocation and degradation of exogenously added OVA in microsomes from

- dendritic cells.
第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005 年 12 月 13-15 日) (神奈川)
2005 年 12 月 15 日発表
29. Chigusa Iyama, Shigenori Nagai, Yukiko Baba, Shigeo Koyasu.
The role of PI3K on cytokine production by plasmacytoid dendritic cells.
第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005 年 12 月 13-15 日) (神奈川)
2005 年 12 月 15 日発表
30. 白木文子, 松田達志, 土井知光, 藤原真理, 鈴木春巳, 小安重夫.
胸腺 T 細胞の成熟過程における PI3K の役割.
Kyoto T Cell Conference 第 16 回集会 (2006 年 6 月 2 日-3 日) (京都)
2006 年 6 月 2 日発表
31. 大谷真志, 松田達志, 永井重徳, 小安重夫.
樹状細胞の LPS 誘導性 IL-12 産生における mTOR の役割.
Kyoto T Cell Conference 第 16 回集会 (2006 年 6 月 2 日-3 日) (京都)
2006 年 6 月 3 日発表
32. 大谷真志, 近藤修平, 永井重徳, 松田達志, 小安重夫.
mTOR は樹状細胞における LPS 刺激誘導性 IL-12 産生を負に制御する.
日本分子生物学会 2006 フォーラム (2006 年 12 月 6 日-8 日) (名古屋)
2006 年 12 月 6 日発表
33. Kazutomo Suzue, Takuya Shiroshita, Mai Udagawa, Madoka Nishimori, Shigeo Koyasu.
Bystander CD8⁺ T cell exacerbate the outcome of malaria.
第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006 年 12 月 11-13 日) (大阪)
2006 年 12 月 11 日発表
34. Shuhei Kondo, Satoshi Matsuda, Shigenori Nagai, Shigeo Koyasu.
The role of mTOR in TLRs-induced IL-12 production by dendritic cells.
第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006 年 12 月 11-13 日) (大阪)
2006 年 12 月 12 日発表
35. Akiko Minowa, Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu.
Development of mast cell progenitor in small intestine depends on PI3K.
第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006 年 12 月 11-13 日) (大阪)
2006 年 12 月 12 日発表
36. Akihiro Yoshizawa, Shigenori Nagai, Taketo Yamada, Shigeo Koyasu.
Pathological role of PI3K in pulmonary alveolar proteinosis-like lung disease.
第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006 年 12 月 11-13 日) (大阪)
2006 年 12 月 12 日発表
37. Toshiyuki Hayashi, Shigenori Nagai, Yukiko Baba, Shigeo Koyasu.
The role of acquired immunity on CNS listeriosis.
第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006 年 12 月 11-13 日) (大阪)
2006 年 12 月 13 日発表
38. Tomoaki Yokoyama, Yujiro Takae, Masayuki Amagai, Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu.
Suppressive effects on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in Pemphigus vulgaris model

mice.

第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006 年 12 月 11-13 日) (大阪)
2006 年 12 月 13 日発表

39. Shigenori Nagai, Hitomi Mimuro, Taketo Yamada, Yukiko Baba, Kazuyo Moro, Toshihiko Suzuki, Chihiro Sasakawa, Shigeo Koyasu.
The role of coccoid form of *Helicobacter pylori* on the induction of gastritis.
第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006 年 12 月 11-13 日) (大阪)
2006 年 12 月 13 日発表
40. 永井重徳, 三室仁美, 山田健人, 馬場夕紀子, 茂呂和世, 鈴木敏彦, 笹川千尋, 小安重夫.
胃炎発症における球状ヘリコバクターピロリの重要性
第 13 回日本ヘリコバクター学会 (2007 年 6 月 21-22 日) (滋賀)
2007 年 6 月 22 日発表 (上原 *H. pylori* 優秀賞受賞)

③ ポスター発表 (国内会議31件、国際会議7件)

1. 平田泰子, 松田達志, 小安重夫.
免疫抑制剤としての LL-Z1640-2 の可能性について.
第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜), 2002 年 12 月.
2. 角田和之, 大田孝幸, 中川種昭, 永井哲夫, 小安重夫, 西川武二, 天谷雅行.
天疱瘡モデルマウスより作製した抗デスマグレイン3病原性モノクローナル抗体
のエピトープ解析.
第 32 回日本免疫学会総会・学術集会 (東京), 2002 年 12 月 2-4 日.
2002 年 12 月 3 日発表
3. 松田達志, 平田泰子, 箕輪明子, 小安重夫.
PI3K 欠損 B 細胞におけるシグナル伝達経路の解析.
第 56 回日本細胞生物学会大会 (滋賀), 2003 年 5 月.
大津 (滋賀) 2003 年 5 月 15 日発表
4. Minowa, A., Matsuda, S. and Koyasu, S.
PI3K is involved in the FcεRI-induced cytokine gene expression in mast cells.
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡), 2003 年 12 月 8-10 日.
2003 年 12 月 9 日発表
5. Matsuda, S., Mikami, Y., Fujiwara, M. and Koyasu, S.
Signaling defect in PI3K-deficient B cells.
第 33 回日本免疫学会総会・学術集会 (福岡), 2003 年 12 月 8-10 日.
2003 年 12 月 10 日発表
6. Satoshi Matsuda, Yohei Mikami, Mari Fujiwara, Shigeo Koyasu.
Signaling defect in PI3K-deficient B cells.
第57回日本細胞生物学会大会 (2004年5月26-28日) (大阪)
2004年5月27日発表
7. Shigenori Nagai, Shinta Mizuno, Satoshi Matsuda, Yukiko Baba, Shigeo Koyasu.
Effect of rapamycin on interleukin-12 production by dendritic cells.

The 13th International Symposium on Molecular cell Biology of Macrophages 2004
(July 1-2, 2004)

第13回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム (大阪)

2004年7月1,2日 発表

8. Matsuda Satoshi, Mikami Yohei, Fujiwara Mari, Shigeo Koyasu.
Signal defection in PI3K-deficient B cells.
The 12th International Congress of Immunology and the 4th Annual Conference of the Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), Montreal, Quebec, Canada (July 18-23, 2004)
July 20, 2004 発表
9. Nagai Shigenori, Mizuno Shinta, Matsuda Satoshi, Fukao Taro, Shigeo Koyasu.
Effect of Rapamycin on interleukin-12 production by dendritic cells.
The 12th International Congress of Immunology and the 4th Annual Conference of the Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), Montreal, Quebec, Canada (July 18-23, 2004)
July 21, 2004 発表
10. 今井純, 長谷川洋典, 丸谷美香子, 小安重夫, 矢原一郎.
樹状細胞 (DC) による抗原クロスプレゼンテーションは小胞体品質管理機構 (ERAD) を利用する.
第27回日本分子生物学会年会 (2004年12月8-11日) (兵庫)
2004年12月8日 発表
11. 長谷川洋典, 丸谷美香子, 今井純, 小安重夫, 矢原一郎.
抗原クロスプレゼンテーションにおいて樹状細胞に取り込まれたOVAはERに局在する.
第27回日本分子生物学会年会 (2004年12月8-11日) (兵庫)
2004年12月8日 発表
12. Tomomitsu Doi, Shigeo Koyasu.
Simultaneous IgM cross-linking with CD40 and IL4 suppress AID expression through PI3K.
第27回日本分子生物学会年会 (2004年12月8-11日) (兵庫)
2004年12月8日 発表
13. 松田達志, 米田志保, 南木康作, 箕輪明子, 松田昭生, 小安重夫.
T細胞シグナル伝達におけるRNF5の役割.
第27回日本分子生物学会年会 (2004年12月8-11日) (兵庫)
2004年12月8日 発表
14. Fumiko Shiroki, Tomomitsu Doi, Mari Fujiwara, Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu.
Role of phosphoinositide 3-kinase in thymocyte development.
第34回日本免疫学会総会・学術集会 (2004年12月1-3日) (北海道)
2004年12月3日 発表
15. Satoshi Matsuda, Yasuko Hirata, Akiko Minowa, Shigeo Koyasu.
SPRY1 functions as a negative-feedback loop in the TCR signaling pathway
第34回日本免疫学会総会・学術集会 (2004年12月1-3日) (北海道)
2004年12月3日 発表

16. 中里健二, 矢島俊樹, 西村仁志, 桑野博行, 小安重夫, 吉開泰信.
インターロイキン15KOマウスでのBcl-2の強制発現によるNK細胞の分化.
第34回日本免疫学会総会・学術集会 (2004年12月1-3日) (北海道)
2004年12月3日発表
17. Mikako Maruya, Jun Imai, Hironori Hasegawa, Shigeo Koyasu, Ichiro Yahara.
Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells.
The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology (June 15-17, 2005)
(Saitama)
June 15, 2005
18. 松田達志, 藤原真理, 箕輪明子, 寺内康夫, 門脇孝, 小安重夫.
B細胞シグナル伝達におけるPI3K経路の役割.
第28回日本分子生物学会年会 (2005年12月7-10日) (福岡)
2005年12月7日発表
19. 大谷真志, 松田達志, 寺内康夫, 門脇孝, 小安重夫.
抗原提示細胞のTLR刺激誘導性サイトカイン産生におけるPI3Kの制御機構.
第28回日本分子生物学会年会 (2005年12月7-10日) (福岡)
2005年12月9日発表
20. 有村裕, 八木淳二, 小安重夫, 江崎太一, 内山竹彦.
PI3K p85 KOマウスにおけるT-B細胞間の相互作用の異常.
第35回日本免疫学会総会・学術集会 (2005年12月13-15日) (神奈川)
2005年12月13日発表
21. Tomomitsu Doi, Shigeo Koyasu.
PI3K selectively suppresses IgE production.
第35回日本免疫学会総会・学術集会 (2005年12月13-15日) (神奈川)
2005年12月13日発表
22. 藤猪英樹, 阿戸学, 高橋宣聖, 橋本修一, 中山俊憲, 谷口克, 小安重夫, 竹森利忠.
HIVnef発現により誘導される成熟T細胞の機能低下.
第35回日本免疫学会総会・学術集会 (2005年12月13-15日) (神奈川)
2005年12月14日発表
23. 山本紀一, 阿戸学, 藤猪英樹, 高橋宣聖, 橋本修一, 加地友弘, 竹森利忠.
不活化インフルエンザウイルス粒子に含まれる白血球数減少活性の解析.
第35回日本免疫学会総会・学術集会 (2005年12月13-15日) (神奈川)
2005年12月14日発表
24. 中里健二, 矢島俊樹, 小安重夫, 桑野博行, 吉開泰信.
インターロイキン15KOマウスでのBcl-2の強制発現による腸管上皮間γδT cellの分化.
第35回日本免疫学会総会・学術集会 (2005年12月13-15日) (神奈川)
2005年12月15日発表
25. 西森まどか, 小安重夫, 鈴木守, 鈴江一友.
マラリアで生じる貧血におけるT細胞の重要性.

- 第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005 年 12 月 13-15 日) (神奈川)
2005 年 12 月 15 日発表
26. Kazutomo Suzue, Madoka Nishimori, Reiko Watanabe, Shigeo Koyasu, Mamoru Suzuki.
Immune response to malaria which leads to the host defense as well as the host damage.
第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005 年 12 月 13-15 日) (神奈川)
2005 年 12 月 15 日発表
27. Takuya Shiroshita, Madoka Nishimori, Shigeo Koyasu, Mamoru Suzuki, Kazutomo Suzue.
T cells play a negative role in host survival upon malaria infection.
第 35 回日本免疫学会総会・学術集会 (2005 年 12 月 13-15 日) (神奈川)
2005 年 12 月 15 日発表
28. 今井 純.
樹状細胞のクロスプレゼンテーションは小胞体品質管理機構を利用する.
独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業「免疫難病・感染症等の
先進医療技術」第 2 回公開シンポジウム (東京)
2005 年 12 月 16 日発表
29. Shigeo Koyasu, Sei Yoshida, Shigenori Nagai, A. Abe, Chihiro Sasakawa.
Downregulation of PI3K signals by enteropathogenic Escherichia coli induces host Th1
immune response.
The 93rd Annual Meeting of the American Association of Immunologists, Boston
(USA)(May 12-16, 2006)
May 13, 2006 発表
30. Shigenori Nagai, Chigusa Tanaka-Iyama, Yukiko Baba, Shigeo Koyasu.
The role of PI3K on cytokine production by plasmacytoid dendritic cells.
International Symposium of Molecular Cell Biology of Macrophages and Dendritic Cells
2006 (June 9-10, 2006) (Tokyo)
2006 年 6 月 9-10 日発表
31. Masashi Ohtani, Satoshi Matsuda, Shigenori Nagai, Shigeo Koyasu.
The mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in LPS-induced IL-12
production in dendritic cells.
The 2nd International Symposium of the 21st Century COE program, Akita Univ. School
of Medicine “PI3-kinase and its related disease” (2006 年 6 月 23-25 日) (秋田)
2006 年 6 月 25 日発表
32. Masashi Ohtani, Satoshi Matsuda, Shigenori Naga, Shigeo Koyasu.
The mammalian target of rapamycin is involved in LPS-induced IL-12 production in
dendritic cells.
The 9th International Conference on Dendritic Cells (September 16-20, 2006)
(Edinburgh, Scotland, UK)
September 18, 2006 発表
33. Fumiko Shiroki, Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu.
Role of the PI3K-mTOR signaling pathway in thymocyte development.
第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (2006 年 12 月 11-13 日) (大阪)
2006 年 12 月 12 日発表

34. Satoshi Matsuda, Yasuko Hirata, Akiko Minowa, Shigeo Koyasu.
Vesicular localization of SPRY1 is essential for its function.
第36回日本免疫学会総会・学術集会（2006年12月11-13日）（大阪）
2006年12月13日発表
35. Fumika Koyano, Hideki Fujii, Kazuyo Moro, Shigeo Koyasu.
The role of DC subsets in NALT during influenza virus infection.
第36回日本免疫学会総会・学術集会（2006年12月11-13日）（大阪）
2006年12月13日発表
36. Satoshi Matsuda, Yohei Mikami, Masashi Ohtani, Mari Fujiwara, Yasuko Hirata, Akiko Minowa, Yasuo Terauchi, Takashi Kadowaki, Shigeo Koyasu.
Critical role of class IA PI3K for c-Rel expression in B lymphocytes.
Keystone Symposium “PI 3-kinase signaling pathways in disease” (February 15-20, 2007) (Santa Fe, New Mexico, USA)
February 17, 2007 発表
37. Fumiko Shiroki, Satoshi Matsuda, Shigeo Koyasu.
The class IA PI3-kinase regulates β -selection in thymocyte development.
Keystone Symposium “PI 3-kinase signaling pathways in disease” (February 15-20, 2007) (Santa Fe, New Mexico, USA)
February 18, 2007 発表 (Travel Award 受賞)
38. Shigeo Koyasu, Mari Fujiwara, Satoshi Matsuda, Takashi Kadowaki, Y. Kawano, K. Maki, Hajime Karasuyama.
Class IA PI3K is involved in the pre-B cell antigen receptor-mediated signaling.
The 94th Annual Meeting of the American Association of Immunologists (May 18-22, 2007) (Miami Beach, Florida, USA)
May 20, 2007 発表

(4)特許出願

①国内出願 (3件)

1. 発明の名称：PI3 キナーゼの阻害剤及びその利用
発明者：小安重夫、笹川千尋、吉田整
出願人：学校法人慶應義塾
出願日：2005年12月15日
出願番号：特願2005-362523号
2. 発明の名称：PI3 キナーゼ依存性炎症性サイトカイン合成阻害剤及び阻害方法
発明者：小安重夫、大谷真志、笹川千尋、吉田整
出願人：学校法人慶應義塾
出願日：2006/7/10
出願番号：特願2006-189417号
3. 発明の名称：キャリア
発明者：小安重夫、永井重徳、笹川千尋、三室仁美
出願人：学校法人慶應義塾
出願日：2006/11/20
出願番号：特願2006-313217号

②海外出願 (2件)

1. 発明の名称：樹状細胞において抗原提示されやすいタンパク質の選択方法
 発明者：今井純、丸谷美香子、長谷川洋典、小安重夫、矢原一郎
 出願人：学校法人慶應義塾、(株)医学生物学研究所
 出願日：2005年9月2日
 出願番号：PCT/JP2005/016110

2. 発明の名称：CTL誘導能を獲得した樹状細胞の製造方法
 発明者：今井純、丸谷美香子、長谷川洋典、小安重夫、矢原一郎
 出願人：学校法人慶應義塾、(株)医学生物学研究所
 出願日：2005年9月2日
 出願番号：PCT/JP2005/016111

(5)受賞等

① 受賞

なし

② 新聞報道

日本経済新聞 平成15年2月3日

「抗体作る細胞 仕組みを解明 慶大など」

③ その他

なし

(6)その他特記事項

国際出願した2件の特許に関しては(株)医学生物学研究所がさらに実用化に向けた研究を継続中である。

7 研究期間中の主な活動

“チーム内ミーティング”

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2004/5/6	笹川研・小安研研究交流会	東京大学医科学研究所	8人	各研究室の研究内容を報告しあい、議論した。
2005/12/26	笹川研・小安研研究交流会	慶應義塾大学・医学部	15人	各研究室の研究内容を報告しあい、議論した。

8 結び

本研究は免疫学者、細菌学者、細胞生物学者がその専門技術やアイデアを持ちよって病原微生物の感染戦略を明らかにしてその制御法を探ろうという概念のもとに開始された。特に遺伝学的な手法を駆使することによって微生物側の因子と宿主側因子の両方を浮き上がらせようと考えた。その際に、微生物感染を検知する細胞として樹状細胞、肥満細胞、上皮細胞などに注目し、細胞内の標的としては研究代表者らが世界的にも研究をリードしてきた PI3K 経路を一つの軸とし、PI3K に干渉する微生物を取り上げることで病原性微生物の戦略が見えてこないかと考えた。我々が立てた仮説は「病原微生物は宿主免疫担当細胞の細胞内シグナル伝達系に働き掛けて自らに好都合な環境を作り出すのではないか」というアイデアに基づくものである。

本報告書に記載したように、これまでに得られた EPEC に関する研究成果はこの点を立証したと考えている。EPEC は PI3K-Akt 経路に干渉することで自らに好都合な環境を生み出している。最近の研究からは多くの病原微生物が宿主細胞の PI3K を活性化したり抑制したり、何らかの干渉をすることが次々に明らかになりつつある。これまで病原微生物が宿主細胞の PI3K を標的とする意味は分からなかったが、本研究から病原体が宿主細胞機能や宿主免疫系を制御することが目的である可能性が浮かび上がってきた。この点は今後の重要な研究テーマとなる。ここでも示したが、少なくとも EPEC に対しては PI3K 経路を標的とした治療ということが成り立つと思われる。感染症のみならず炎症性の疾患の多くにも適用可能なアプローチとなる可能性があり、今後も追求して行きたい。

本研究は免疫学者と細菌学者の特徴が活かされた共同研究であった。成功の一つの理由は、CREST の研究員として採用した吉田整博士が東大医科研を本拠としながらも毎週慶應で行われる小安研のプログレスミーティングに参加して免疫学者と議論してきたことにあると考えられる。同時に免疫学者も細菌学者からのアイデアを沢山得ることができた。さらに両研究室が合同で研究発表会を持ったこともお互いの研究の理解に多いに役立った。

ヘリコバクターに関しては、上皮細胞に付着するという点で EPEC と共通点を持ちながらも明確なリンパ組織を持たない胃に感染するという点に注目して考えて取り上げた。予想外のことに、ヘリコバクターの感染を検知する器官としての腸管関連リンパ組織、特にパイエル板の機能が浮かび上がった。振り返ってみれば、これまでにヘリコバクター感染における抗原認識機構はほとんど分かっておらず、我々の研究成果はこれまでの考え方に変更を迫ることになった。このプロジェクトは研究開始直後から行なっているが、一回のヘリコバクターの感染実験には約 5 ヶ月が必要であるなど非常に時間のかかる研究である。CREST のような長期の計画が許されて初めて可能なプロジェクトであった。この点からは CREST の支援に特に感謝したい。本研究結果からは、腸管で感作された T 細胞がどこでどのようにしてエフェクターに分化するのか、という新しい疑問が生じてきた。また、パイエル板が欠損すると炎症が誘導されないということは、粘膜固有層に存在する樹状細胞やマクロファージによって取り込まれた抗原に対してはおしなべて寛容が誘導されるという可能性が浮かび上がる。これらは今後の重要な研究テーマとなる。

樹状細胞によるクロスプレゼンテーションの分子機構の研究も新しい概念を提唱することができた。事実我々の論文発表直後に刊行された Trends in Immunology 誌で紹介され、さらに Immunological Review 誌のクロスプレゼンテーションに関する 2 編の総説にも我々の成果が紹介されている。

本研究を通じて笹川研究室をはじめとする多くの微生物学を専門とする研究室と交流が持てたことは大変貴重であった。今後もここで得たネットワークを生かして宿主と感染体を大きな視野で眺めたダイナミックな微生物学と免疫学の融合研究を展開したい。



2004年ある日の小安研究室メンバーの集合写真