The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	実験的大腸炎におけるγδ型T細胞の役割
Author(s)	土屋, 孝弘
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2121
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

博士論文

実験的大腸炎における$\gamma\delta$型T細胞の役割

土屋 孝弘

目次

目次 1
緒論 2
本論 5
第 1 章　実験的炎症性腸疾患における T 細胞の役割 5
第 1 節　実験材料と実験方法 5
第 2 節　マウスの系統の違いによる DSS の感受性の差 9
第 3 節　IL-4$^{-/-}$マウスと IFN-γR$^{-/-}$マウス 10
第 4 節　*scid* マウス 11
第 5 節　IL-7Rα$^{-/-}$マウス 13
第 6 節　TCR-β$^{-/-}$δ$^{-/-}$マウス 15
第 7 節　TCR-δ$^{-/-}$マウス 17
第 8 節　小括 21
第 2 章　好中球の遊走におけるγδ型 T 細胞の役割 23
第 1 節　実験材料と実験方法 23
第 2 節　末梢血中の好中球の割合 25
第 3 節　大腸培養上清による好中球の遊走 26
第 4 節　IEL, IEC におけるケモカインの発現 28
第 5 節　小括 29
総括 30
結論 33
謝辞 34
参考文献 35

緒論

γδ型 T 細胞は，脾臓やリンパ節にはほとんど存在しないが，腸管や皮膚の上皮層には多数存在する T 細胞サブセットである[1,2,3,4]． γδ型 T 細胞は，非ペプチド抗原や[5]，MHC 非拘束性に外来抗原を認識したり[6]，あるいはストレスにより発現が増加する自己抗原などを認識するなど[7]，様々な抗原を認識すると報告されている． また *Listeria monocytogenes*[8,9,10,11]，*Mycobacterium tuberculosis*[12]のような細菌，*Influenza virus*[13]のようなウイルス，*Leishmania*[14]， *Vermiformis*[15]のような寄生虫による感染時に，γδ型 T 細胞は細胞障害活性（Fas-L/パーフォリン）により感染細胞や細胞内の細菌を殺し，また IFN-γなどの Th1 型のサイトカインを産生することで，マクロファージの活性化と肉芽腫の形成を促し，感染に防御的に働くと考えられている． しかしγδ型 T 細胞の生体内での役割は未だ不明な点が多く残されている．

腸管は内なる外といわれており，絶えず様々な抗原に暴露されている． 外来性蛋白質を消化，吸収するという機能を持ちながら，病原性微生物を体内に侵入させないという相反する機能を持ち合わせている． こうした病原性微生物の侵入を第一線で防御しているのが腸管上皮層である． 小腸の模式図を Figure 1 に示した． 小腸の腸管上皮層は，粘液産生細胞であるゴブレット(杯)細胞，抗菌物質を産生するパネート細胞，腸管上皮

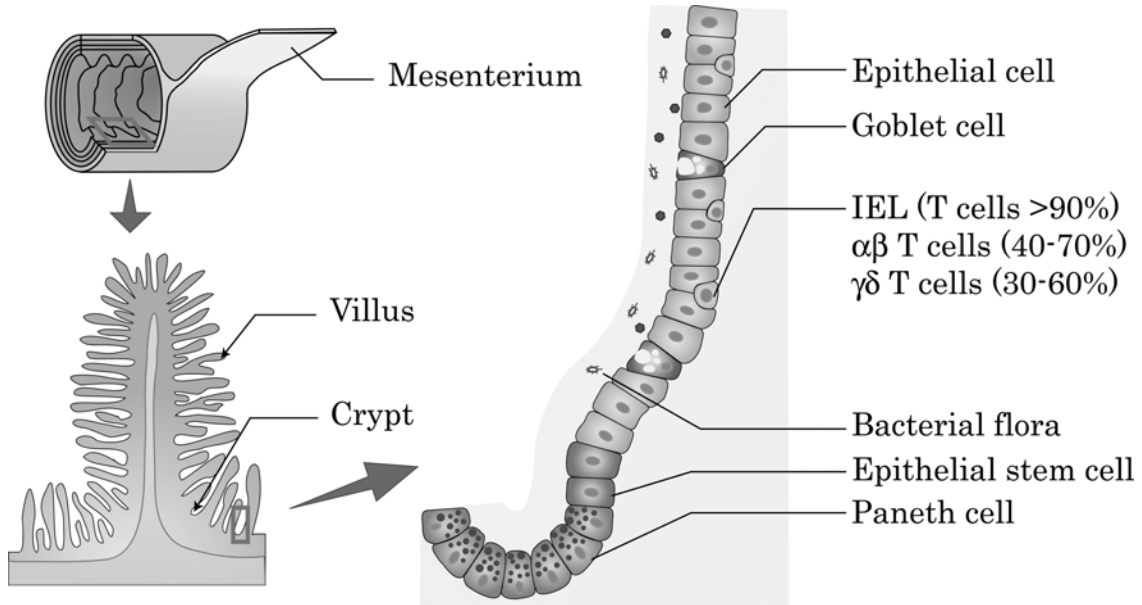

Figure 1. Structures of small intestine.

幹細胞，腸管上皮幹細胞より分化し単一層に並んだ腸管上皮細胞，腸管上皮細胞間に存在する多数のリンパ球によって構成されている．このリンパ球は腸管上皮細胞間リンパ球（Intestinal Intraepithelial Lymphocyte；IEL）と呼ばれている．マウスにおいては，IEL の 90% 以上が T 細胞であり，そのうちα β型 T 細胞は 40-70%，γ δ型 T 細胞は 30-60% 存在するといわれている[16,17]．この IEL と腸管上皮細胞とは密に相互作用をしている．腸管上皮細胞は，IEL の増殖やサイトカイン産生を抑制するが，末梢血リンパ球に対してはそのような作用はないと報告されており，IEL は末梢血リンパ球とは性質の異なる細胞であると報告されている[18]．またγ δ型 T 細胞を欠損させることによって上皮細胞の増殖が抑制され[19]，この抑制にはγ δ型 T 細胞により分泌される KGF-1 (Keratinocyte Growth Factor-1, Fibroblast Growth Factor-7）が上皮細胞の増殖を調節しているのではないかといわれている[20]．このように，IEL 特にγ δ型 T 細胞が腸管上皮の正常な構築，すなわちホメオスタシスに非常に重要であると考えられている．

マウスの小腸と大腸との構造上の違いを Figure 2 に示した．下の写真を拡大し，模式的に示したのが上の図である．小腸は前述したように，上皮層に覆われている．その上皮層は上皮細胞がほとんどを占めており上皮細胞 5 個から 10 個に 1 つの割合で IEL が

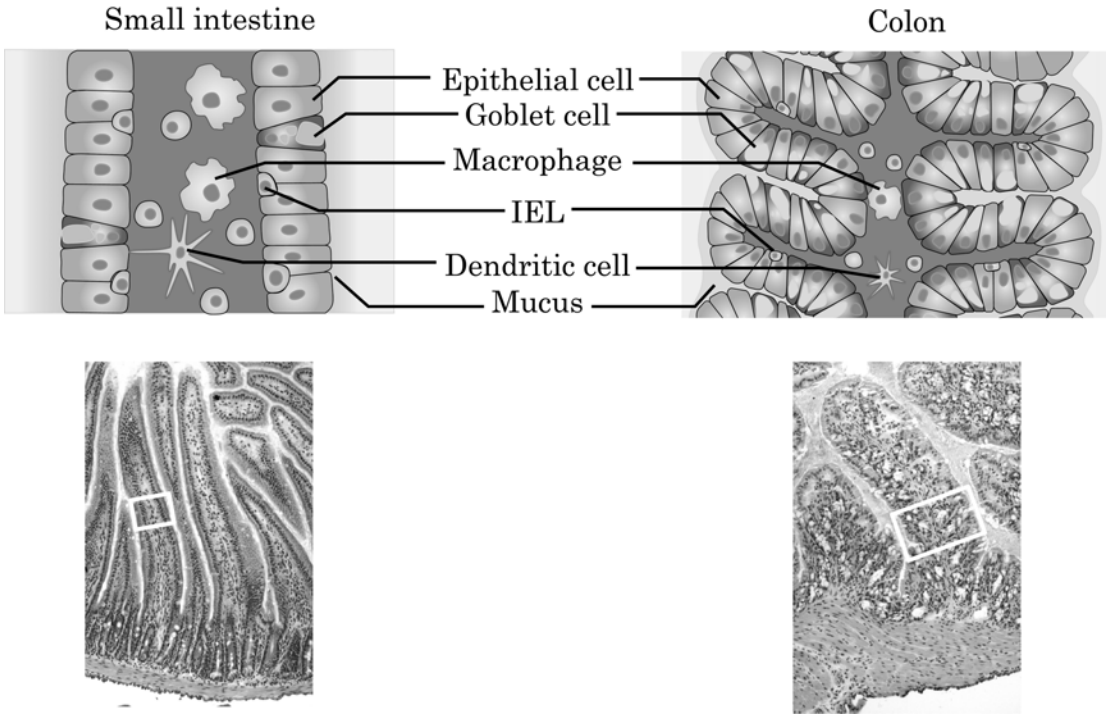

Figure 2. Structures of small intestine and colon.

存在する．上皮細胞の内側の粘膜固有層には，マクロファージ，樹状細胞やリンパ球が存在し，絶えず外来抗原に対して，免疫応答やトレランスを誘導できるように監視している．

一方大腸は，小腸ほど詳しく調べられていないが，上皮層に上皮細胞や IEL が存在する．その他に粘液産生細胞であるゴブレット細胞が小腸よりも数多く確認される．また，小腸のように管腔へ突出するパイエル板は存在せず，白血球やリンパ球は粘膜固有層や粘膜下層にクラスターを形成して存在している．

このように，小腸と大腸では構造上に違いがあり，また機能面でも異なることから，免疫応答にも違いがあると考えられているが，前述したように，大腸は小腸ほど詳しく調べられていないため，実際どのような違いがあるのかはあまりよく判ってはいない．

近年，クローン病（Crohn's Disease；CD）や潰瘍性大腸炎（Ulcerative Colitis；UC）を代表とする炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease；IBD）に，γδ型 T 細胞の関与を示した報告が数多くある[21,22,23]．IBD は，消化管における過剰な免疫応答によって引き起こされると考えられている．そこで筆者は，γδ型 T 細胞によって，消化管における免疫応答が調節されていると推測し，炎症性腸疾患モデルマウスを用いて腸管での炎症におけるγδ型 T 細胞の機能について検討した．

炎症性腸疾患のモデルマウスの作製には，硫酸多糖体である Dextran Sulfate Sodium（DSS）を用いた．DSS をマウス[24]，ハムスター[25]，ラット[26]やモルモット[27]に自由摂取させると実験的炎症性腸疾患（Experimental Colitis；EC）を誘導することができる．このモデルマウスは体重減少，血便，背中を丸めるなどの症状を示し，またヒト IBD とよく似た組織像を示すと報告されている[24]．これらの疾患の発症機序は現在のところはっきりとはわかってはいないが，腸管粘膜免疫機能が破綻した結果起こると考えられている．

このモデルマウスを用いて，炎症時における腸管でのγδ型 T 細胞の役割について新たな知見を得たので博士論文としてまとめた．

本論

第 1 章　実験的炎症性腸疾患における T 細胞の役割

第 1 節　実験材料と実験方法

マウス

・BALB/c マウス, C57BL/6 マウス（いずれも 5 週齢, 雌）は, 日本チャールスリバー (Yokohama, Japan) より購入した.

・Interferon-γ receptor 欠損（IFN-γ$R^{-/-}$）（背景は(129xC57BL/6)Fn)マウス[28]及び C57BL/6 Interleukin-4 欠損（IL-$4^{-/-}$)マウス[29]は山形大学医学部より供与された. BALB/c IFN-γ$R^{-/-}$マウスは, IFN-γ$R^{-/-}$マウスを, BALB/c マウスにより 7 世代戻し交配することによって作製した.

・C.B-17 *scid* マウス（5 週齢, 雌)は, 日本クレア（Tokyo, Japan）より購入した.

・C57BL/6 Interleukin-7 receptor α chain 欠損（IL-$7R^{-/-}$)マウス[30]は, 京都大学医学部より, C57BL/6 T 細胞抗原受容体-β鎖欠損（TCR-$β^{-/-}$）マウス[31]は慶應義塾大学医学部より供与された.

・C57BL/6 TCR-δ鎖欠損（TCR-$δ^{-/-}$)マウス[32]はマサチューセッツ工科大学, 利根川進教授より供与され, BALB/c マウスにより 8 世代戻し交配することによって BALB/c TCR-$δ^{-/-}$マウスを作製した.

IFN-γ$R^{-/-}$マウス, IL-$4^{-/-}$マウス, IL-$7R^{-/-}$マウス及び TCR-$δ^{-/-}$マウスは雌の欠損ヘテロのマウスに雄の欠損ホモのマウスを交配し, その仔を実験に用いた. 遺伝子型は, それぞれのマウスの尾から抽出した DNA について, 以下に示した IFN-γR, IL-4, TCR-δ鎖, または IL-7Rα鎖及びノックアウトの際の選択マーカーに用いた *neo* 遺伝子の特異的プライマーを用いた PCR 法により判定した.

・C57BL/6 TCR-$β^{-/-}$マウスと C57BL/6 TCR-$δ^{-/-}$マウスを交配し, C57BL/6 TCR-$β^{+/-}δ^{+/-}$マウスを作製し, 次いで C57BL/6 TCR-$β^{+/-}δ^{+/-}$マウスと C57BL/6 TCR-$δ^{-/-}$マウスを交配し, C57BL/6 TCR-$β^{+/-}δ^{-/-}$マウスを作製した. さらに C57BL/6 TCR-$β^{+/-}δ^{+/-}$マウスと C57BL/6 TCR-$β^{+/-}δ^{-/-}$マウスを交配する事により, TCR-$β^{-/-}δ^{-/-}$マウス, TCR-$δ^{-/-}$マウス及び TCR-$β^{-/-}$マウスを作製し実験に用いた. TCR-$β^{+/-}$マウスの遺伝子型は, 以下に示した TCRβ鎖-neo のプライマーと TCRβ鎖のプライマーを用いて,

PCR 法で決定した．TCRβ鎖-neo のプライマーは，Cβと *neo* 遺伝子との結合部位をはさむように設計した．

すべてのマウスは 6-8 週齢を用いた．

プライマー

IFN-γR	5' primer：	5'-CCT ACA TAC GAA ACA TAC G-3'
	3' primer：	5'-ATC ATG GAA AGG AGG GAT ACA-3'
IL-4	5' primer：	5'-TCC AAG TTG AGC AGA TGA CAT-3'
	3' primer：	5'-CCT TGT CTG GTA GTC AGC CAT-3'
TCRδ鎖	5' primer：	5'-AAA AGC CAG CCT CCG GCC AAA-3'
	3' primer：	5'-AAC TGA ACA TGT CAC TGA ATT-3'
TCRβ鎖	5' primer：	5'-AAG GTC TCC TTG TTT GAG CC-3'
	3' primer：	5'-GCT ATA ATT GCT CTC CTT GT-3'
TCRβ鎖-neo	5' primer：	5'-CCG GTG GAT GTG GAA TGT GTG CGA GGC C-3'
	3' primer：	5'-CAG AGT CCT GGA GAG TCT AC-3'
IL-7Rα鎖	5' primer：	5'-CCC CAT AAC GAT TAC TTC AAA GGC TTC TGG-3'
	3' primer：	5'-AGA GTT TGG CAG CAA GTC TTG ATA CAC AGG-3'
neo	5' primer：	5'-CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC-3'
	3' primer：	5'-AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC-3'

実験的炎症性腸疾患マウスの作製

実験的炎症性腸疾患（EC）マウスの作製は大草らの方法に従った[24]．2.5% もしくは 5% の DSS (Dextran Sulfate Sodium 5000，和光純薬，Osaka, Japan）水溶液を，給水ビンに入れて 7 日間マウスに自由摂取させることにより作製した．マウスは，毎日体重を測定し，体重測定時に便を採取し，潜血テストワコー（和光純薬）を用いて便潜血を測定した．

抗体

免疫組織化学染色には以下の抗体を用いた．ラット抗 CD4 抗体（GK1.5)，ラット抗

CD8α鎖抗体（53-6.72）はハイブリドーマの培養上清を用いた．ラット抗 Mac1 抗体(M1/70）は，ハイブリドーマの培養上清を 50% 硫酸アンモニウムで塩析して用いた．ラット抗 Gr-1 抗体（RB6-8C5）は PharMingen（San Diego, CA）より購入した．2 次抗体は，ビオチン標識ヤギ抗ラット IgG (H+L) 抗体を Cedarlane (Ontario, Canada) より購入し用いた．

大腸凍結ブロックの作成

マウスより大腸を摘出し，腸管の内容物及び粘液を包埋剤（Tissue-Tec O.C.T. Compound，サクラ精機，Tokyo, Japan）でよく洗浄すると共に包埋剤を管腔内に充填した．腸管を約 1cm に切断し，Cryomold 2 号（サクラ精機）内に立てた状態で置き，包埋剤で包埋後，直ちにドライアイスで-80℃に冷却したヘキサンに浸し凍結した．

免疫組織化学

凍結ブロックをクリオスタットを用いて 6μm の厚さに切り，切片をシランコートスライドガラス（Dako, Tokyo, Japan）に貼りつけ，室温で 30 分間以上風乾した．乾燥後，室温で 10 分間アセトン固定をした後，5% BSA にて 37℃で 10 分間ブロッキングを行なった．PBS で洗浄後，1 次抗体を 37℃で 30 分間反応させた．反応後，PBS で洗浄し，さらにビオチン標識ヤギ抗ラット IgG (H+L) 抗体を 37℃で 30 分間反応させた．PBS で洗浄後，内因性のペルオキシダーゼ活性を阻害するために，0.3% 過酸化水素，0.1% アジ化ナトリウム水にて室温で 10 分間処理し，さらに PBS で洗浄した．洗浄後，アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体を形成させるため Vectastain ABC elite Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を室温で 45 分間反応させ PBS で洗浄した．1mg/mL DAB (3,3'-Diaminobenzidine, Dojindo, Kumamoto, Japan)/0.1M tris-HCl と 0.02% H_2O_2 とを等量混合した反応液で発色させた．水洗後，酢酸加カラッチのヘマトキシリンで対染色を行い，エタノールで脱水後キシレンで透徹し，mount-quick (大道産業, Tokyo, Japan) で封入した．

ヘマトキシリン－エオジン（HE）染色

免疫組織化学と同様に，6μm の厚さの切片を，シランコートスライドガラスに貼りつけ，室温で 30 分間以上風乾した．乾燥後 10% ホルマリンで 10 分間固定し，1 分間水洗後，マイヤーのヘマトキシリン（和光純薬）で 4 分間染色をした後 1 分間水洗した．次に

4 分間エオジン溶液にて染色をし，エタノールで脱水後キシレンで透徹し，mount-quick で封入した．

第 2 節　マウスの系統の違いによる DSS の感受性の差

マウスの系統によって, DSS に対する感受性が違うと報告されているが[33], BALB/c マウスと C57BL/6 マウスとの差については判っていない. そこで今後実験に用いる BALB/c マウスと C57BL/6 マウスについて, DSS の投与濃度や投与期間を決定するための基礎的な検討を加えた.

結果と考察

正常 BALB/c マウスと C57BL/6 マウスに 2.5% または 5% DSS を自由摂取させ, その時の体重変化を測定した (Figure 3). BALB/c マウスは, 2.5% DSS 投与群では外見的症状は認められなかったが, 5% DSS 投与群では体重減少, 便潜血, 背中を丸めるといった大腸炎特有の症状が見られた. また, これらの症状は DSS 投与を中止することによって消失し, 20 日目頃には体重もほぼ正常レベルまで回復した. 一方 C57BL/6 マウスは, 2.5% DSS 投与群でも体重減少等の症状が見られ, DSS 投与を中止することにより, 正常レベルまで回復した. しかし, 5% DSS 投与群では DSS 投与中止後も回復できずに 10 日目から 12 日目までにすべてのマウスが死亡した.

この結果から, C57BL/6 マウスの方が BALB/c マウスより DSS に対する感受性が高い

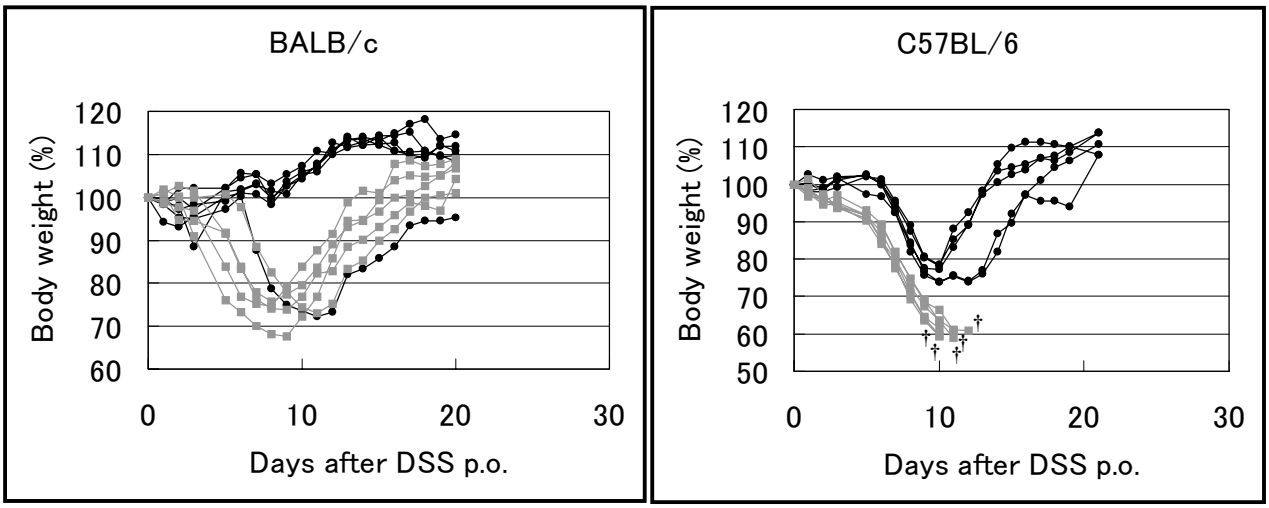

Figure 3. Body weight changes of EC mice. BALB/c and C57BL/6 mice were continuously orally administered 2.5% DSS (closed circle) or 5% DSS (closed square) in drinking water for 7 days. †, death of mouse.

ことがわかった.

また, 以降の実験では DSS の濃度はワイルドタイプ（WT）で EC を発症するが, 投与中止後に回復する濃度として, BALB/c 系統では 5%, C57BL/6 系統では 2.5% と設定した. ここでは示していないが, BALB/cと C57BL/6 の F1 マウスでは, DSS に対する感受性はそれぞれの系統の中間的な感受性を示した.

第 3 節　IL-4$^{-/-}$マウスと IFN-γR$^{-/-}$マウス

Th1 優位の C57BL/6 マウスの方が Th2 優位の BALB/c マウスより DSS に対する感受性が高いことが前節より明らかとなった. そこで DSS による EC は Th1 型免疫応答が主に作用しているのではないかと考え, Th1 型サイトカインである IFN-γ のレセプターを欠損した IFN-γR$^{-/-}$マウスと Th2 型サイトカインである IL-4 を欠損した IL-4$^{-/-}$マウスを用いて検討した.

結果と考察

BALB/c 背景の IL-4$^{-/-}$マウスと IFN-γR$^{-/-}$マウスに 5% DSS を 7 日間自由摂取させ, その時の体重変化を測定した（Figure 4). IL-4$^{-/-}$マウス及び IFN-γR$^{-/-}$マウスは, どちらもそのコントロール群である IL-4$^{+/-}$マウス, IFN-γR$^{+/-}$マウスと比較して, 体重の減少

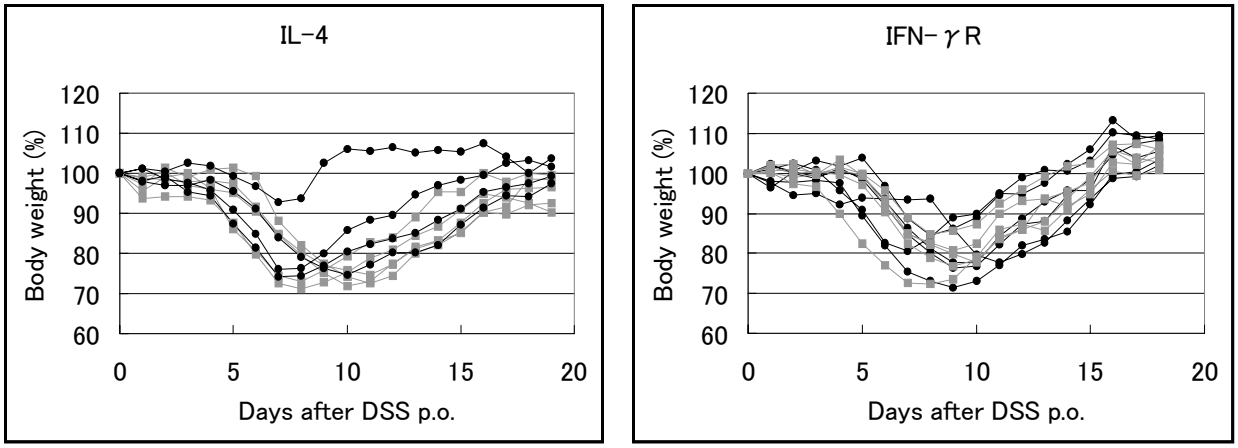

Figure 4. Body weight changes of EC mice. BALB/c IL-4$^{+/-}$ (closed circle), IL-4$^{-/-}$ (closed square) and IFN-γR$^{+/-}$ (closed circle), IFN-γR$^{-/-}$ (closed square) mice were continuously orally administered 5% DSS in drinking water for 7 days.

及び，体重の回復に違いは認めなかった．

DSS を 7 日間自由摂取させた BALB/c 背景の IL-4$^{+/-}$マウス及び IL-4$^{-/-}$マウスより大腸を摘出し，免疫組織化学的検討を行い，浸潤細胞の種類を解析した（Figure 5）．ここで用いた抗体は，顆粒球，マクロファージ，樹状細胞などを染める抗 Mac1 抗体，好中球などの多形核白血球を染める抗 Gr-1 抗体である．HE 染色により IL-4$^{+/-}$マウス及び IL-4$^{-/-}$マウスいずれにおいても，粘膜固有層や粘膜下層に多くの細胞が浸潤しているのが観察された．IL-4$^{+/-}$マウス及び IL-4$^{-/-}$マウスでは，炎症の程度にそれほど大きな違いは見られなかった．またいずれのマウスとも浸潤細胞の多くは，Mac1^{+}，Gr-1^{+}の顆粒球であった．

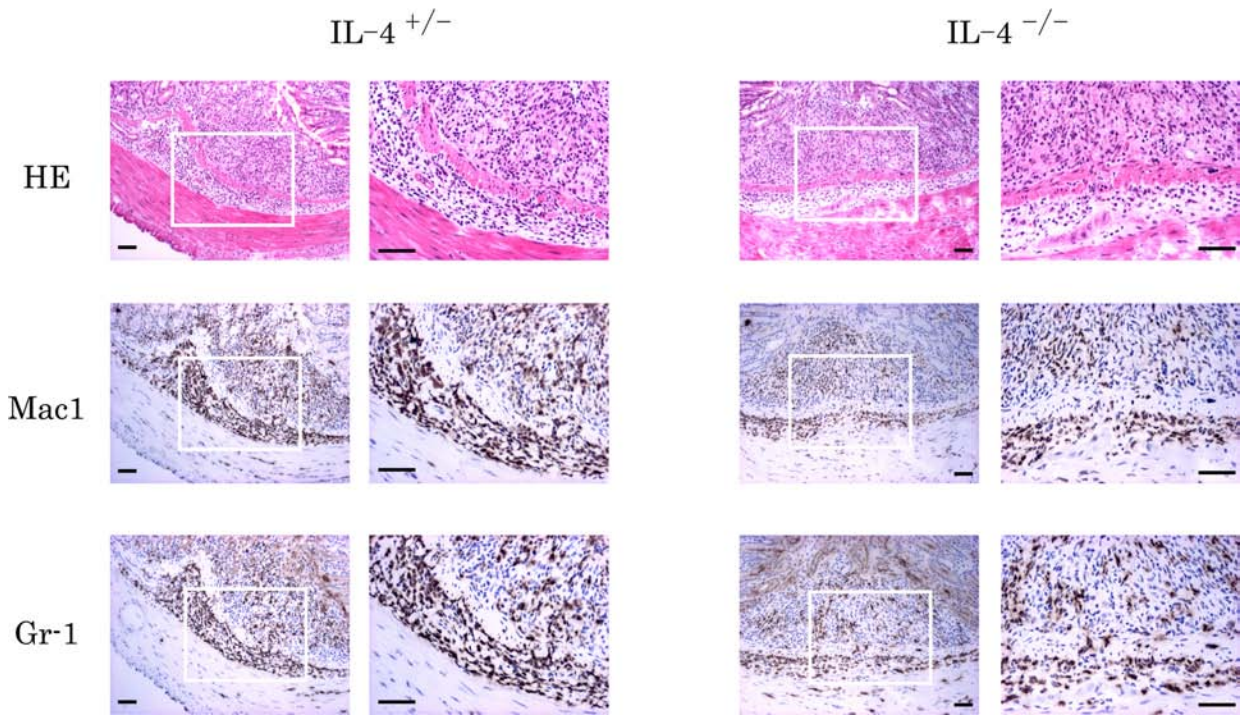

Figure 5. Immunohistochemistry of the colon of BALB/c IL-4$^{+/-}$ and IL-4$^{-/-}$ mouse. Mice were administered 5% DSS for 7 days. The cryosections were stained with anti-Mac1, anti-Gr-1 or hematoxylin-eosin. scale bar = 50μm.

第 4 節　*scid* マウス

C.B-17*scid* マウスはリコンビナーゼ活性に異常があり，先天的に遺伝子再構成が起こらず，パイエル板や腸管のリンパ濾胞を欠損し，胸腺，脾臓，末梢のリンパ節が萎縮し，

末梢の機能的 T 細胞, B 細胞を欠損したマウスである. 機能的 T 細胞, B 細胞が EC の誘導や回復過程に関与するかどうかを調べるために, C.B-17*scid* マウスを用いて同様の実験を行った.

結果と考察

C.B-17 系統は BALB/c 系統とほぼ同じ背景を持つので, DSS の濃度は 5% とした. その時の体重変化と, 便潜血を測定した (Figure 6). コントロール群である BALB/c マウスでは DSS 投与中止後すべてのマウスが回復した. 便潜血が増加し始めると体重が減少し始め, 便潜血がおさまると体重も回復することから, EC の病状は体重変動のみで判断できると考えられたため, 以降の実験では体重変動のみをグラフに示した.

C.B-17*scid* マウスの群では DSS 投与を中止しても回復せずに 9 日目から 22 日目までの間にすべてのマウスが死亡した.

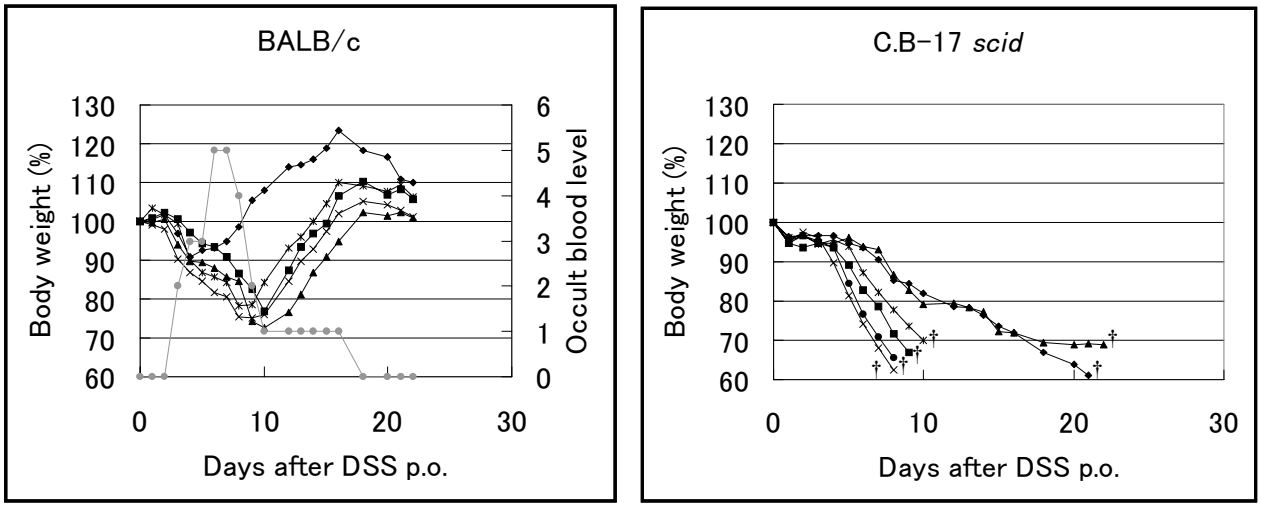

Figure 6. Body weight changes (black line) and occult blood level (gray line) of EC mice. BALB/c and C.B-17 *scid* mice were continuously orally administered 5% DSS in drinking water for 7 days. †, death of mouse.

DSSを7日間自由摂取させたBALB/cマウスまたはC.B-17*scid*マウスより大腸を摘出し, その凍結組織切片を作製し, 免疫組織化学的検討を行い, 浸潤細胞の種類を解析した (Figure 7).

HE 染色では, BALB/cマウス, C.B-17*scid* マウスいずれにおいても, 粘膜固有層や粘膜下層に多くの細胞が浸潤しているのが観察された. BALB/c マウスでは, 浸潤して

いる細胞の多くは多形核の細胞であることが観察された． またこれらの細胞は Mac1^{+}, Gr-1^{+}細胞であり，顆粒球であることが明らかとなった．

一方 C.B-17*scid* マウスでは浸潤している細胞の多くは単核球であった． また浸潤細胞の大多数は Mac1^{+}, Gr-1^{-}の単球/マクロファージであり，Mac1^{+}, Gr-1^{+}の顆粒球は BALB/cマウスほどには浸潤していなかった． つまり，BALB/cマウスでは，浸潤細胞の大多数は顆粒球であるのに対し C.B-17*scid* マウスでは浸潤細胞の大多数が単球/マクロファージであることが明らかとなった．

この結果より，機能的リンパ球がなくても EC は発症するが，回復できないことが明らかとなった．

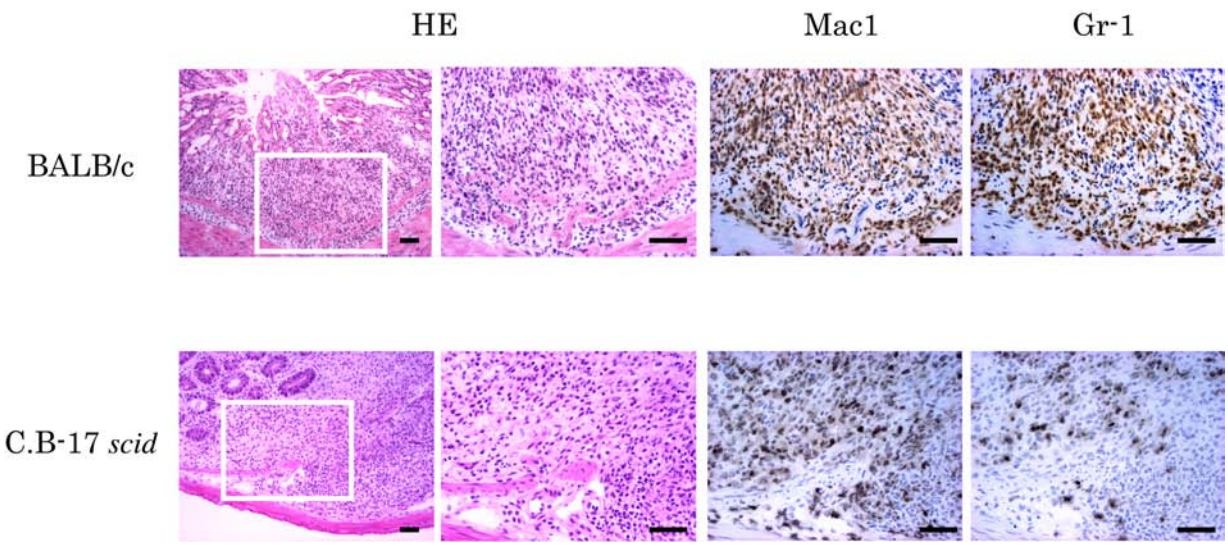

Figure 7. Immunohistochemistry of the colon of BALB/c and C.B-17 *scid* mouse. Mice were administered 5% DSS for 7 days. The cryosections were stained with anti-Mac1, anti-Gr-1 or hematoxylin-eosin. scale bar = 50μm.

第 5 節　IL-7R$\alpha^{-/-}$マウス

機能的リンパ球がなくても EC は発症するが，回復には機能的なリンパ球が必須であるということが前節で明らかとなった． そこで EC からの回復に T 細胞がどの程度関与するのかを調べるために，IL-7Rα 鎖欠損（IL-7R$^{-/-}$）マウスを用いて同様の実験を行った．

IL-7R$^{-/-}$マウスは，B 細胞及び T 細胞の分化に異常をきたし，γ δ 型 T 細胞を完全に欠損し，また B 細胞やα β 型 T 細胞の数も大幅に減少しているマウスである．このIL-7R$^{-/-}$マウスを用いることによって，わずかに残存した T 細胞によって，EC から回復できるかどうかを調べた．

結果と考察

C57BL/6 を背景に持つ IL-7R$^{-/-}$マウスとそのコントロールである IL-7R$^{+/-}$マウスに 2.5% DSS を 7 日間自由摂取させた時の体重変化を測定した（Figure 8）．IL-7R$^{-/-}$マウスは，前節の C.B-17 *scid* マウスと同様に，EC の発症が認められた．しかし DSS 投与中止後も回復することが出来ずに，11 日目と 12 日目に実験に供した 3 例とも死亡した．IL-7R$^{+/-}$マウスでは，DSS 投与中止後 15 日目には体重は正常レベルまで回復した．

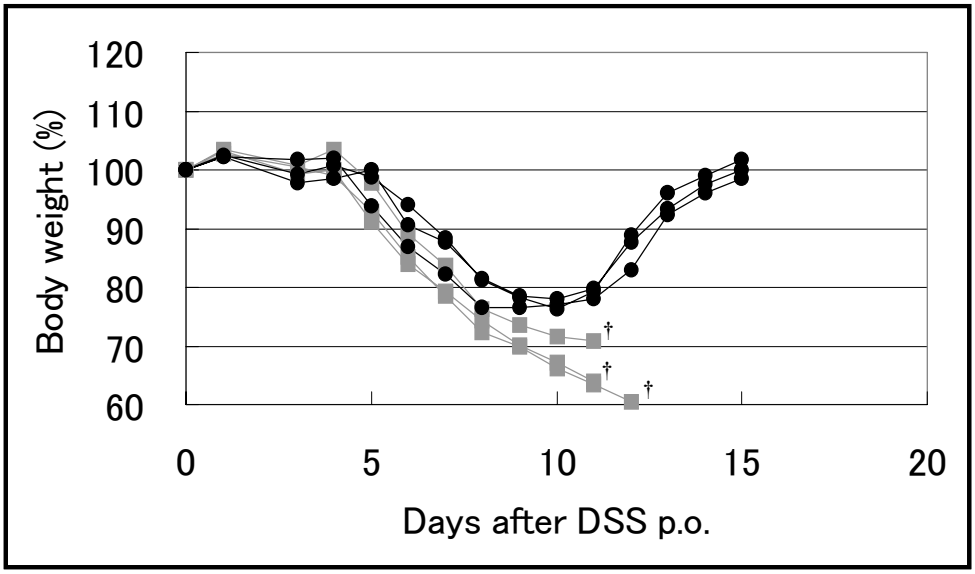

Figure 8. Body weight changes of EC mice. C57BL/6 IL-7R$^{+/-}$ (closed circle) and IL-7R$^{-/-}$ (closed square) mice were continuously orally administered 2.5% DSS in drinking water for 7 days. †, death of mouse.

DSS を 7 日間自由摂取させた IL-7R$^{-/-}$マウスの大腸の免疫組織化学的検討を行い，浸潤細胞の種類を解析した（Figure 9）．前節と同様に，HE 染色，抗 Mac1 抗体，抗 Gr-1 抗体及び抗 CD4 抗体，抗 CD8 抗体で染色した．やはり，浸潤細胞の多くは Mac1^{+}細胞であり，次いで Gr-1^{+}の顆粒球であった．わずかに残存していると思われる CD4^{+}細胞，CD8^{+}細胞の浸潤はほとんど確認されなかった．

これらの結果より，わずかに残存した T 細胞，B 細胞だけでは，EC から回復できないと考えられた．そこで，EC からの回復に T 細胞がどのように関与しているのかを調べた．

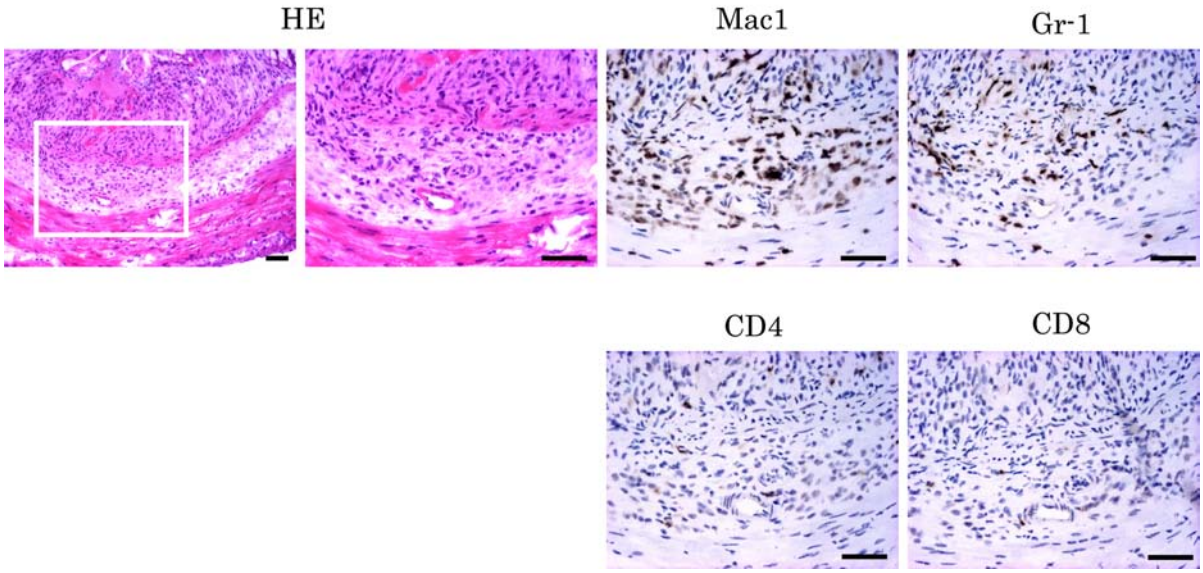

Figure 9. Immunohistochemistry of the colon of C57BL/6 IL-7R$^{-/-}$ mouse. Mice were administered 2.5% DSS for 7 days. The cryosections were stained with anti-Mac1, anti-Gr-1, anti-CD4, anti-CD8 or hematoxylin-eosin. scale bar = 50μm.

第 6 節　TCR-β$^{-/-}$δ$^{-/-}$マウス

αβ型 T 細胞，γδ型 T 細胞のいずれも欠損した，TCR-β$^{-/-}$δ$^{-/-}$マウス，αβ型 T 細胞を欠損した TCR-β$^{-/-}$マウス及びγδ型 T 細胞を欠損した TCR-δ$^{-/-}$マウスを用いることで，それぞれのT細胞サブセットの関与を調べた．

結果と考察

C57BL/6 背景の TCR-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$マウス, TCR-$\beta^{-/-}$マウス及び TCR-$\delta^{-/-}$マウスに 2.5% DSS を 7 日間自由摂取させた時の体重変化を測定した (Figure 10). $\alpha\beta$型 T 細胞, $\gamma\delta$型 T 細胞のいずれも欠損した TCR-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$マウスでは EC の発症をみとめたが, DSS 投与を中止した後も全てのマウスが回復できなかった. $\alpha\beta$型 T 細胞を欠損した TCR-$\beta^{-/-}$マウスは, 5 匹中 2 匹のマウスは回復できなかったが, 3 匹のマウスは回復した. $\gamma\delta$型 T 細胞を欠損した TCR-$\delta^{-/-}$マウス 7 匹中 4 匹のマウスが回復できず, また 1 匹のマウスは回復が遅れたが, 2 匹のマウスは回復した.

この様に, $\alpha\beta$型及び$\gamma\delta$型 T 細胞を両方欠損した C.B-17*scid* マウスや TCR-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$マウスでは EC からの回復が認められなかった. また, $\gamma\delta$型 T 細胞を欠損したマウスの方が$\alpha\beta$型 T 細胞を欠損したマウスに比べて強い症状を示す傾向があることがわかった.

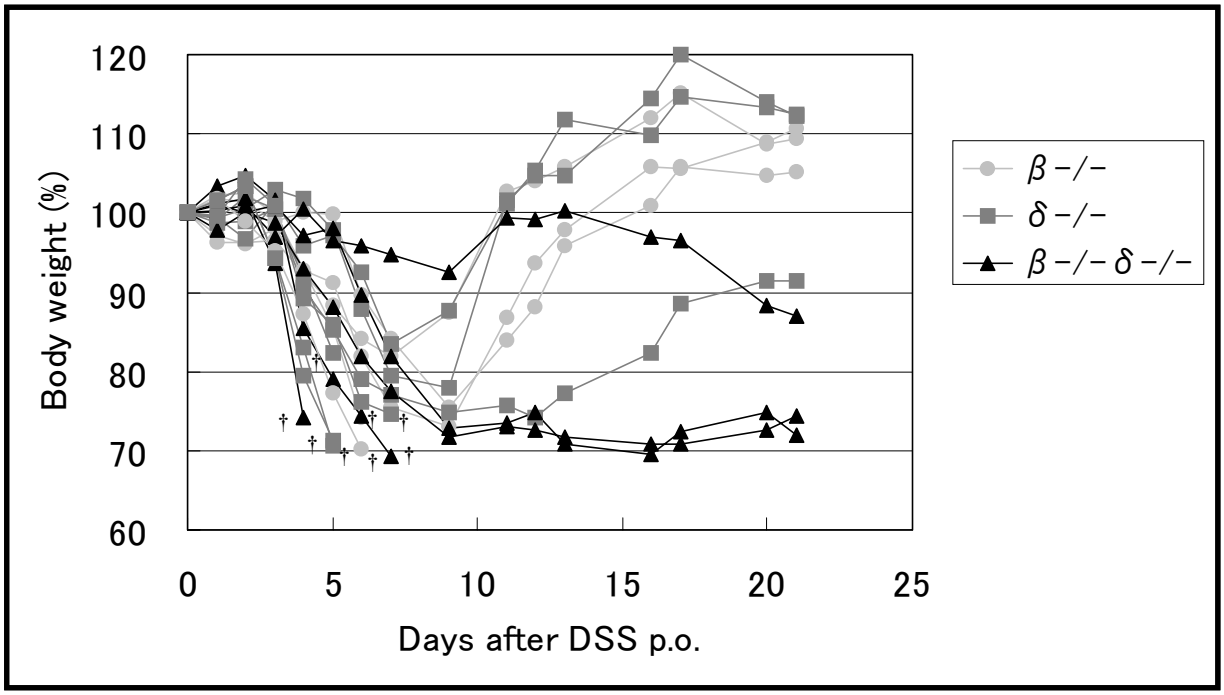

Figure 10. Body weight changes of EC mice. C57BL/6 TCR-$\beta^{-/-}$ (closed circle), TCR-$\delta^{-/-}$ (closed square) and TCR-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$ (closed triangle) mice were continuously orally administered 2.5% DSS in drinking water for 7 days. †, death of mouse.

DSSを7日間自由摂取させたTCR-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$マウスとTCR-$\beta^{-/-}$マウスについて，浸潤細胞を免疫組織化学的に検討した（Figure 11）．TCR-$\beta^{-/-}$マウスでは，Mac1^{+}細胞とほぼ同程度の Gr-1^{+}の顆粒球が確認された．つまり，浸潤細胞のほとんどが顆粒球であることが確認された．一方 TCR-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$マウスでは，浸潤細胞のほとんどが Mac1^{+}細胞であった．Gr-1^{+}の顆粒球はTCR-$\beta^{-/-}$マウスほど浸潤していなかった．

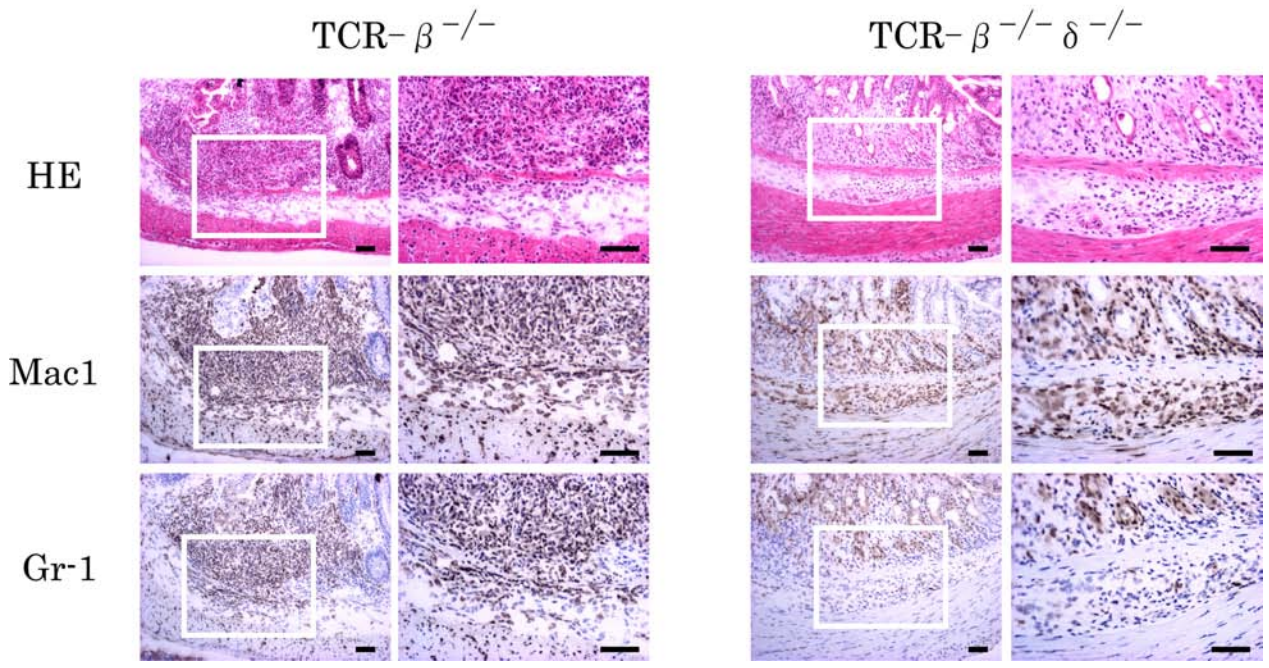

Figure 11. Immunohistochemistry of the colon of C57BL/6 TCR-$\beta^{-/-}$ and TCR-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$ mouse. Mice were administered 2.5% DSS for 7 days. The cryosections were stained with anti-Mac1, anti-Gr-1 or hematoxylin-eosin. scale bar = 50μm.

第 7 節　TCR-$\delta^{-/-}$マウス

これまでの結果より，EC からの回復にはα β型またはγ δ型 T 細胞が必須であることが明らかとなった．また，γ δ型 T 細胞を欠損したマウスの方がα β型 T 細胞を欠損したマウスに比べて強い症状を示す傾向があった．そこで，γ δ型 T 細胞の機能についてより詳しく解析するためにTCR-$\delta^{-/-}$マウスを用いて，DSSによるECからの回復過程におけるγ δ型 T 細胞の役割について調べた．

結果と考察

BALB/c 背景の TCR-δ$^{-/-}$マウスとそのコントロール群として TCR-δ$^{+/-}$マウスに 5% DSS を7日間自由摂取させた時の体重変動を測定した（Figure 12）. TCR-δ$^{+/-}$マウスでは, すべてのマウスが回復したのに対し, TCR-δ$^{-/-}$マウスでは 7 匹中 4 匹のマウスが回復できなかった.

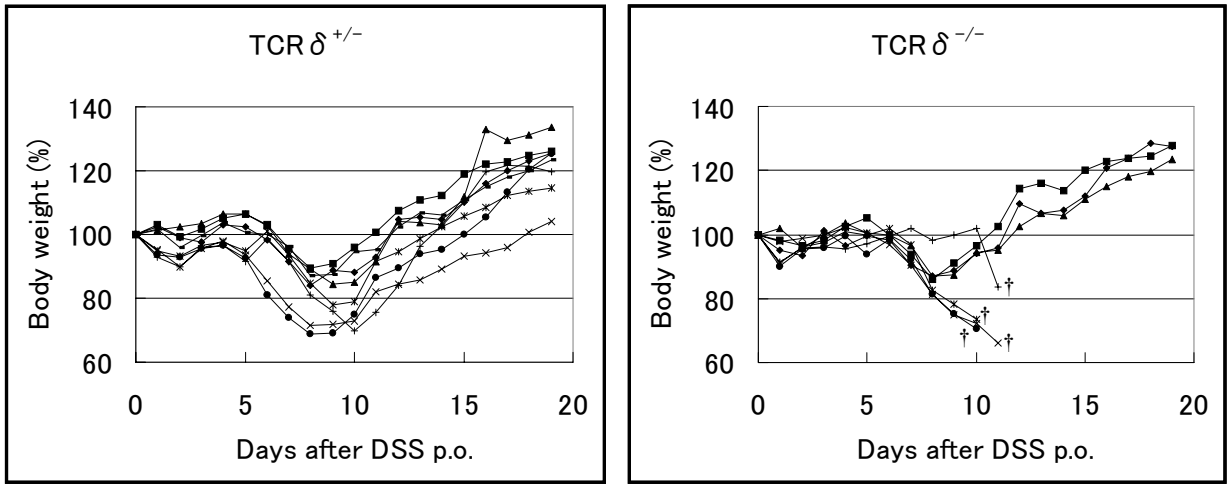

Figure 12. Body weight changes of EC mice. BALB/c TCR-δ$^{+/-}$ and TCR-δ$^{-/-}$ mice were continuously orally administered 5% DSS in drinking water for 7 days. †, death of mouse.

DSS を 7 日間自由摂取させた BALB/c 背景の TCR-δ$^{+/-}$マウス及び TCR-δ$^{-/-}$マウスより大腸を摘出し, 免疫組織化学的検討を行い, 浸潤細胞の種類を解析した（Figure 13）. HE 染色により TCR-δ$^{+/-}$マウスと TCR-δ$^{-/-}$マウスでは, 炎症の程度にはそれほど大きな差は見られなかった. 抗 Mac1 抗体, 抗 Gr-1 抗体, 抗 CD4 抗体及び抗 CD8 抗体を用いて免疫組織化学的検討を行った. TCR-δ$^{+/-}$マウスと TCR-δ$^{-/-}$マウスとを比較すると, どちらも Mac1^{+}細胞が大多数であった. しかし, TCR-δ$^{-/-}$マウスでは C.B-17*scid*マウスや TCR-β$^{-/-}$δ$^{-/-}$マウスと同様に Gr-1^{+}の顆粒球が少ないことが認められた.

一方 TCR-δ$^{+/-}$マウスでは，浸潤細胞の多くは Gr-1^{+}細胞であった． また HE 染色により核の形態を確認したところ Gr-1^{+} 細胞は多形核白血球であり，Diff-Quik 染色によりそれらは好中球であることが明らかとなった． また浸潤細胞中の CD4^{+}細胞や CD8^{+}細胞に大きな差は認められなかった．

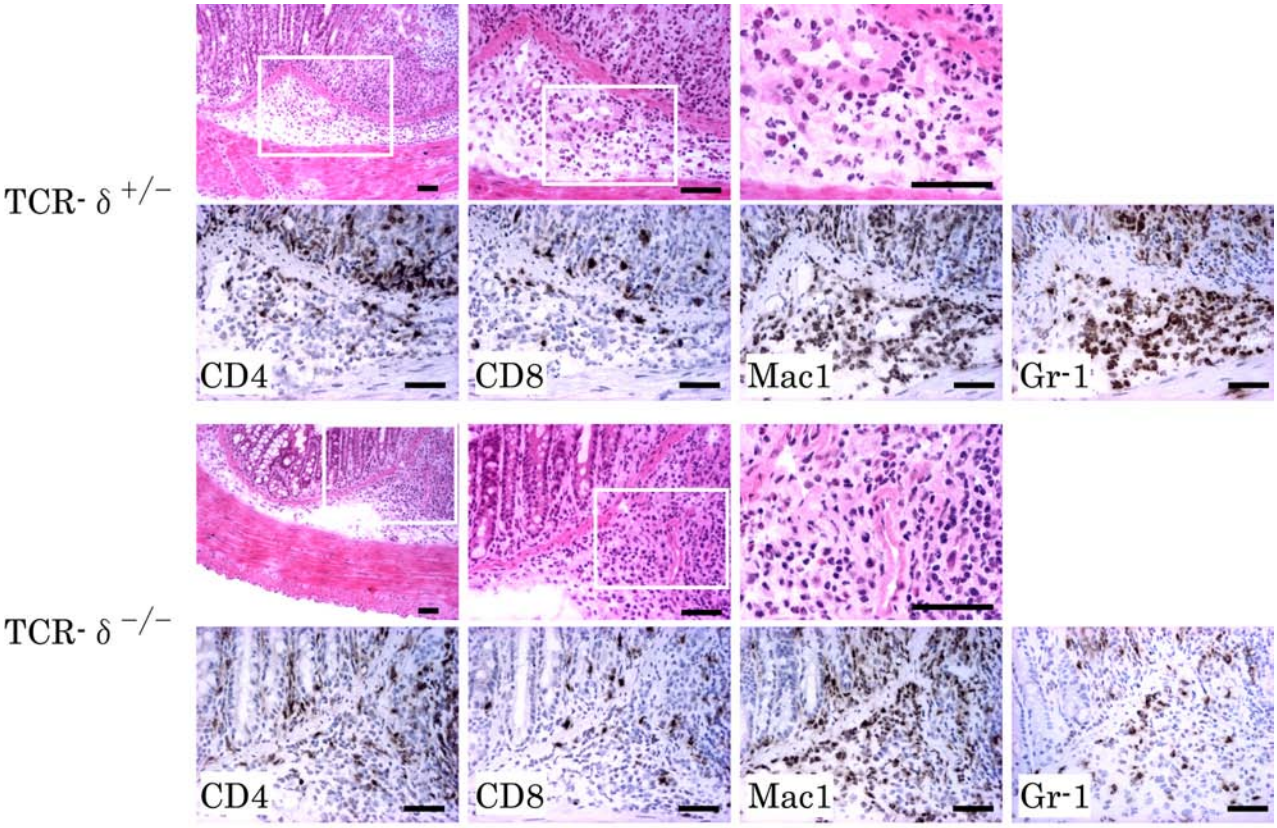

Figure 13. Immunohistochemistry of the colon of BALB/c TCR-δ$^{+/-}$ and TCR-δ$^{-/-}$ mouse. Mice were administered 5% DSS for 7 days. The cryosections were stained with anti-Mac1, anti-Gr-1, anti-CD4, anti-CD8 or hematoxylin-eosin. scale bar = 50μm.

同様に C57BL/6 背景の TCR-δ$^{-/-}$マウスと TCR-δ$^{+/-}$マウスに 2.5% DSS を 7 日間自由摂取させ EC を発症させた時の体重変化を測定した（Figure 14）． BALB/c 背景と同様の結果が得られた． C57BL/6 背景の TCR-δ$^{+/-}$マウスはすべてのマウスが回復したのに対し，TCR-δ$^{-/-}$マウスでは 7 匹中 4 匹のマウスが回復できず，1 匹は回復しかけたが途中で死亡した．

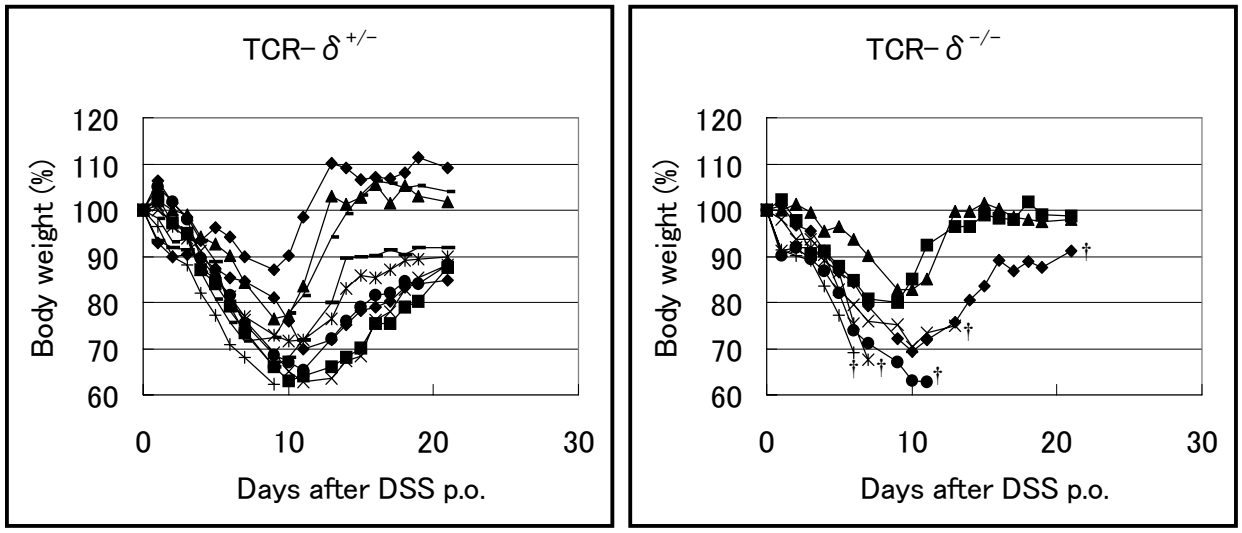

Figure 14. Body weight changes of EC mice. C57BL/6 TCR-$\delta^{+/-}$ and TCR-$\delta^{-/-}$ mice were continuously orally administered 2.5% DSS in drinking water for 7 days. †, death of mouse.

BALB/c背景の時と同様に DSS を 7 日間自由摂取させた C57BL/6 背景の TCR-$\delta^{+/-}$マウス及び TCR-$\delta^{-/-}$マウスより大腸を摘出し，免疫組織化学的検討を行い，浸潤細胞の種類を解析した．

HE 染色の結果より TCR-$\delta^{-/-}$マウスと TCR-$\delta^{+/-}$マウスでは，炎症の程度にはそれほど大きな差は認めなかった（Figure 15）．また BALB/c背景の場合と同様に TCR-$\delta^{-/-}$マウスと TCR-$\delta^{+/-}$マウスとでは，どちらも浸潤細胞は Mac1^{+}細胞が大多数であった．

また C57BL/6 背景のマウスにおいても TCR-$\delta^{-/-}$マウスでは TCR-$\delta^{+/-}$マウスと比較して Gr-1^{+}細胞，すなわち好中球の浸潤が少ないことが認められた． CD4^{+}細胞や CD8^{+}細胞には大きな差は認められなかった．

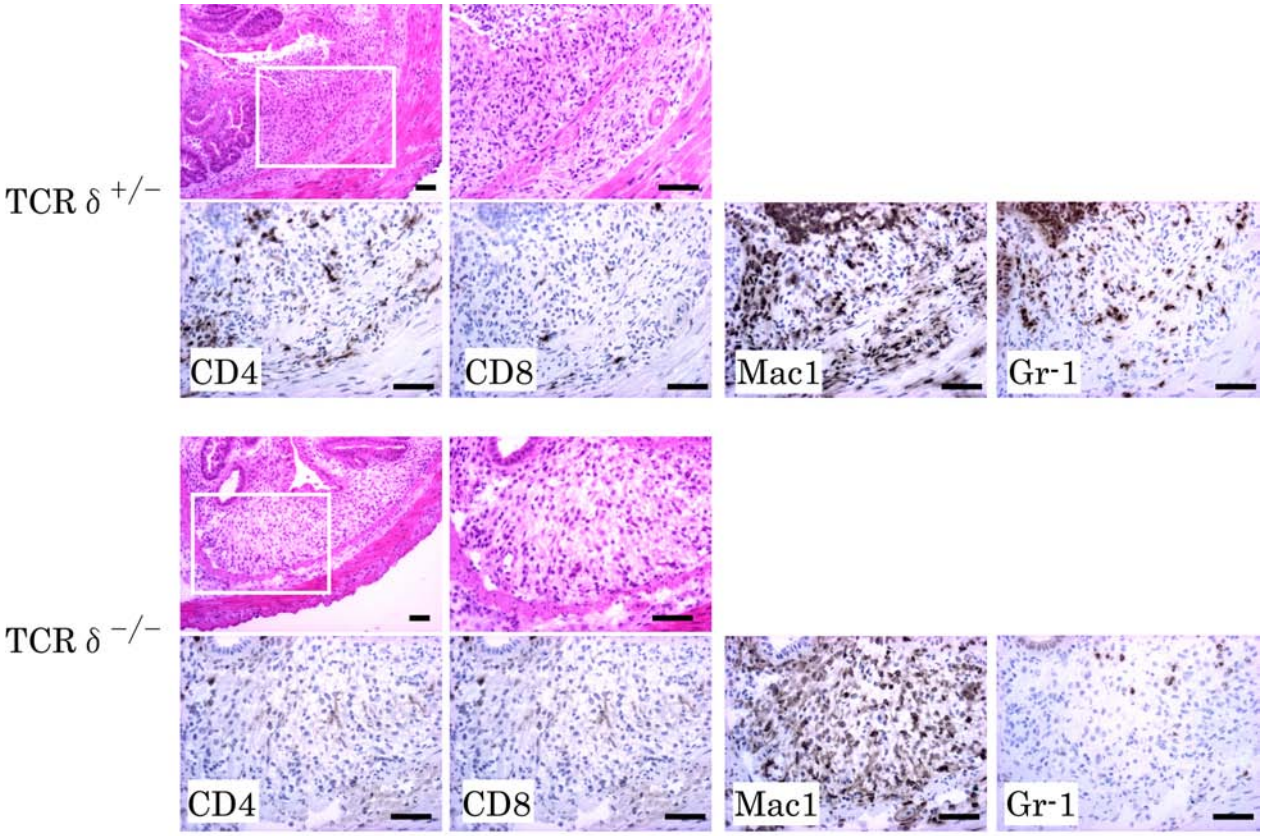

Figure 15. Immunohistochemistry of the colon of C57BL/6 TCR-δ$^{+/-}$ and TCR-δ$^{-/-}$ mouse. Mice were administered 2.5% DSS for 7 days. The cryosections were stained with anti-Mac1, anti-Gr-1, anti-CD4, anti-CD8 or hematoxylin-eosin. scale bar = 50μm.

第 8 節　小括

これらの結果より，α β 型 T 細胞，γ δ 型 T 細胞をいずれも欠損したマウスでは，EC から回復できないという結果が得られた（Table 1）．特にγ δ 型 T 細胞を欠損した C.B-17*scid* マウス，IL-7R$^{-/-}$マウス，TCR-δ$^{-/-}$マウス及び TCR-β$^{-/-}$δ$^{-/-}$マウスにおいて，回復できないマウスが数多く見られた．またこれらのマウスでは，炎症部位に顆粒球がほとんど浸潤しておらず，主として単球/マクロファージが多く浸潤していた．

Table 1. Participation of γδ T lymphocytes on the recovery from EC in the mice

Mice	Lymphocyte population			Result of EC	Infiltrated cells	
	αβT cell	γδT cell	B cell	Dead/total	Mφ	Granulocyte
Wild type	＋	＋	＋	0/13	＋	＋＋
C.B-17 *scid*	－	－	－	6/6	＋＋	±
IL-7R$^{-/-}$	±	－	±	3/3	＋＋	＋
TCR-β$^{-/-}$	－	＋	＋	2/5	＋	＋＋
TCR-δ$^{-/-}$	＋	－	＋	4/7	＋＋	±
TCR-β$^{-/-}$δ$^{-/-}$	－	－	＋	5/5	＋＋	±

Mφ ：monocyte/ macrophage

一方αβ型T細胞を欠損したTCR-β$^{-/-}$マウスでは，回復できないマウスが多少いたが，炎症部位には，WT 同様，顆粒球の浸潤が数多く見られた．前述したように，浸潤細胞の多くが単球/マクロファージであるγδ型 T 細胞を欠損したマウスの方が，浸潤細胞の多くが好中球である WT マウスやαβ型 T 細胞を欠損したマウスに比べて強い症状を示したことから，γδ型 T 細胞の有無は，これら両細胞群の浸潤の違いを決めていることが示唆された．

第 2 章　好中球の遊走におけるγδ型 T 細胞の役割

これまで，γδ型 T 細胞が炎症時における顆粒球の産生や遊走に関与するという報告はほとんどなかったが，前章でγδ型 T 細胞を欠損したマウスは WT と比較して，DSS によって強い EC の症状を示し，また前章に述べた様に，炎症部位に好中球の浸潤がほとんど見られないことが明らかとなった．そこで，γδ型 T 細胞が好中球の産生または炎症部位への遊走にどのように関与しているのかを検討した．

第 1 節　実験材料と実験方法

マウス末梢血細胞中の好中球，リンパ球の割合の測定

BALB/c 背景の TCR-$\delta^{-/-}$マウス及び TCR-$\delta^{+/-}$マウスに 5% DSS を自由摂取させ，EC を誘導させたマウスから経時的に末梢血を 100U/mL のヘパリン溶液中に採取し，0.2% 塩化ナトリウム溶液で赤血球を除去して得た細胞を末梢血細胞とした．末梢血細胞を Diff-Quik 染色し，好中球，リンパ球の細胞数を計数し，全細胞数で割ることによってそれぞれの細胞の割合とした．

大腸培養上清による好中球の遊走能の測定

大腸培養上清による好中球の遊走能測定法の概略を Figure 16 に示した．5% DSS を 3 日間自由摂取させ EC を誘導した BALB/c 背景の TCR-$\delta^{-/-}$マウス及び TCR-$\delta^{+/-}$マウスより大腸を摘出し，3 等分した．3 等分した大腸をそれぞれ縦方向に開き，6 ウェルプレート上に吊るしたポアサイズ 0.45μm のメンブランフィルター（Transwell, Costar, Acton MA)上で 10mM HEPES（和光純薬），5% FCS（Boehringer Mannheim, Castle Hill, Australia），100μg/mL kanamycin（明治製菓，Tokyo, Japan），100U/mL penicillin - 100μg/mL streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), 100μg/mL gentamycin（Sigma Chemical, St. Louis, MO）含有 RPMI1640 培地 (Sigma Chemical) 4mL で筋肉層を下にして，24 時間培養した．24 時間後に培養上清を回収しサンプルとした．

遊走させる好中球は，正常 BALB/c マウスに 12% カゼインナトリウムを 2mL 腹腔内投与し，6 時間後に腹腔洗浄液を回収することによって調整した．この時の腹腔洗浄液中には好中球が 70% 以上含まれていた．この好中球 rich の腹腔洗浄液中の細胞を

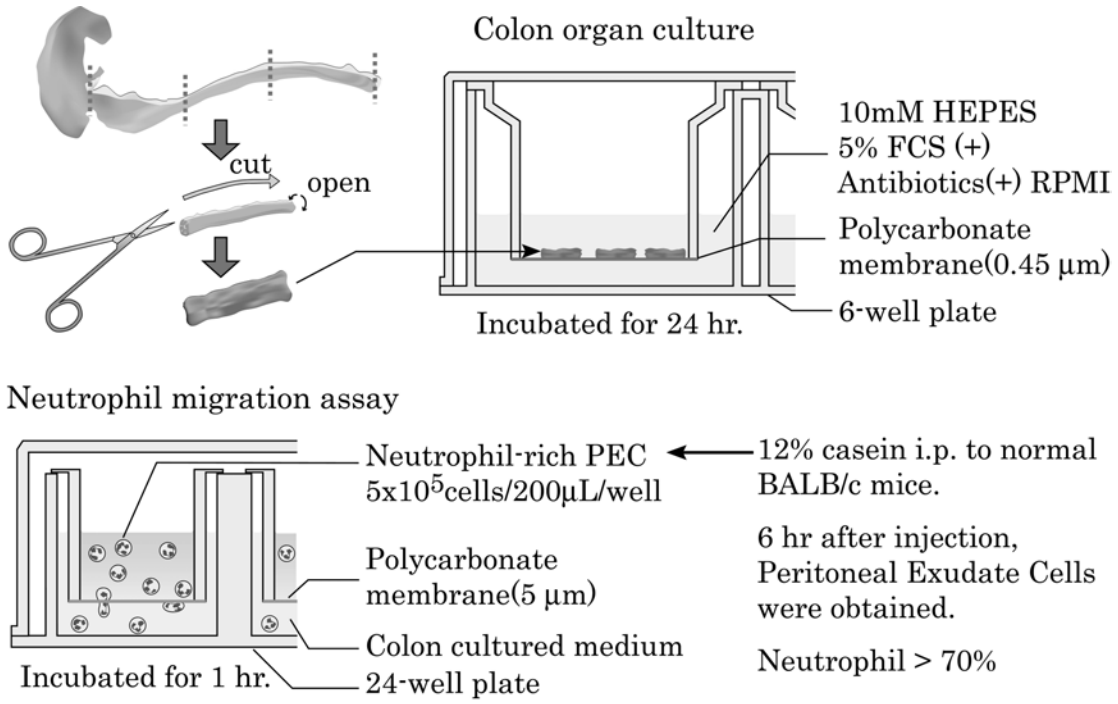

Figure 16. Methods of colon organ culture and neutrophil migration assay.

0.5% FCS 含有 RPMI1640 培地に懸濁し, 5x10^{5}cells/200μL/well の細胞数でポアサイズ 5μm のメンブランフィルター（KURABO, Osaka, Japan）上に載せた. フィルターの下側にはサンプルである大腸培養上清を加えインキュベートし, 1 時間後にフィルターの下側に遊走した細胞を回収し, 細胞数をフローサイトメーターで測定した.

大腸上皮細胞間リンパ球（IEL), 大腸上皮細胞（IEC)の採取

BALB/c 背景の TCR-δ$^{-/-}$マウス及び TCR-δ$^{+/-}$マウスに 5% DSS を 7 日間自由摂取させ, EC を誘導したマウスから大腸を摘出した. 摘出した大腸を縦方向に開き, 5mm 程度の長さに細かく切り, 1mg/mL Dispase（Invitrogen), 10% Horse Serum (Invitrogen) 100μg/mL Kanamycin, 100μg/mL Gentamycin, 100U/mL Penicillin - 100μg/mL Streptomycin 含有 DMEM 培地に加え, 37℃で 30 分間振盪した後, 上清を回収した. この作業を 2 回繰り返した. 回収した上清を遠心し, 沈殿した細胞を回収し 25% Percoll (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden）に懸濁させ, その下に 44% Percoll を重層した. 室温で 1800rpm.で 20 分

間遠心し，界面にある細胞を IEC とし実験に供した． 沈殿した細胞を回収し，44% Percoll に懸濁させその下に 70% Percoll を重層した． 室温で 1800rpm.で 20 分間遠心し，界面にある細胞を IEL とし実験に供した．

RT-PCR

前項に従い，それぞれのマウスより IEL, IEC を採取し，RNeasy Mini Kit (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出し，DNase I (Perkin Elmer, Branchburg, NJ) 処理により DNA を除いた． RNA を M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写した後，AmpliTaq Gold (Perkin Elmer)で増幅した． GRO-1 (Growth-related Gene Product-1, KC), LIX (LPS-induced CXC Chemokine, GCP-2), MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2), MIF (Macrophage Migration Inhibitory Factor) に対するプライマーは以下に示した特異的プライマーを用いた． 内部標準として HPRT (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase) 遺伝子を用いた．

プライマー

GRO-1	5' primer：5'-TAT CGC CAA TGA GCT GCG C-3'
	3' primer：5'-AAG CCA GCG TTC ACC AGA C-3'
LIX	5' primer：5'-CTT CCT CAG TCA TAG CCG CAA C-3'
	3' primer：5'-CCT TTC TTC TCT TCA CTG GGG TC-3'
MIP-2	5' primer：5'-CAC ACT TCA GCC TAG CGC CA-3'
	3' primer：5'-TCA GAC AGC GAG GCA CAT CAG G-3'
MIF	5' primer：5'-CCG CAC AGT ACA TCG CAG TG-3'
	3' primer：5'-ACA GCG GTG CAG GTA AGT GG-3'
HPRT	5' primer：5'-CTG TAG ATT TTA TCA GAC TGA AGA G-3'
	3' primer：5'-GTC AAG GGC ATA TCC AAC AAC AAA-3'

第 2 節　末梢血中の好中球の割合

TCR-$\delta^{-/-}$マウス及び TCR-$\delta^{+/-}$マウスにおいて，EC の発症から回復に至る過程で日を追って末梢血を採取し，好中球，リンパ球の細胞数にどのような変化があるのかを確認

した.

結果と考察

DSS を 7 日間自由摂取させた TCR-δ$^{-/-}$マウス及び TCR-δ$^{+/-}$マウスより, 経時的に末梢血を採取し, 好中球, リンパ球の数を計数し, その割合を算出した (Figure 17). TCR-δ$^{+/-}$マウスでは DSS 投与開始 3 日目より末梢血中での好中球の増加がみられた. 7 日目頃からは, リンパ球の増加に伴い好中球の割合は減少した. しかし TCR-δ$^{-/-}$マウスでは, DSS 投与開始後 7 日目から好中球の増加が始まり, 増加した状態が持続された. これらの結果より, TCR-δ$^{-/-}$マウスでは, TCR-δ$^{+/-}$マウスと比較して, 好中球の産生が遅れて始まり, また炎症局所への遊走能が劣っているために末梢血中に好中球の割合が増加したと考えられる.

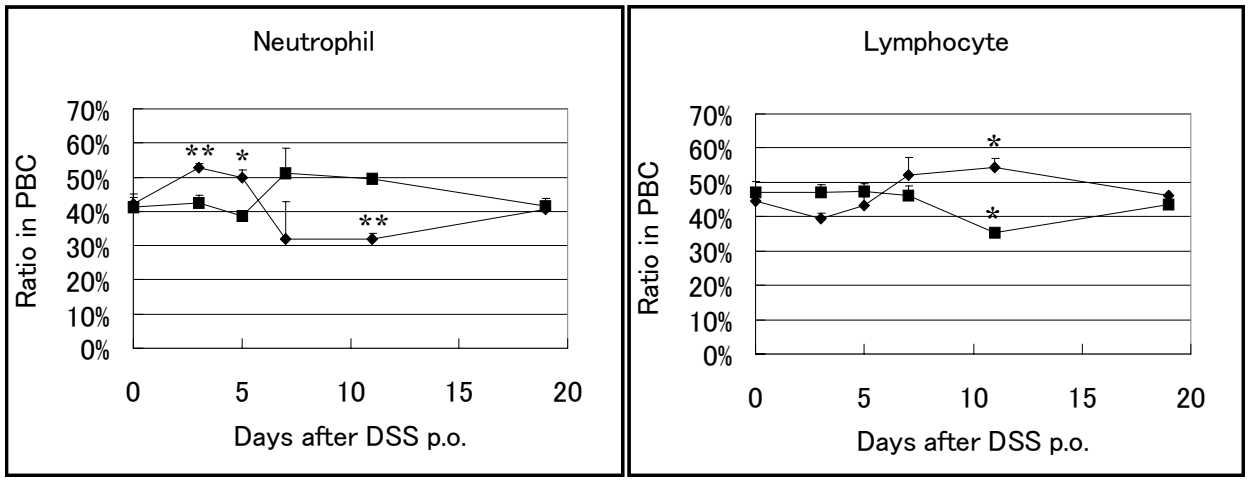

Figure 17. Peripheral blood cell ratio in EC mice. BALB/c TCR-δ$^{+/-}$ (closed diamond) or TCR-δ$^{-/-}$ (closed square) mice were continuously orally administered 5% DSS for 7 days. * and **, $p<0.05$ and $p<0.01$ (each day vs day 0). Error bars indicate means ± SEM. (n=5)

第 3 節　大腸培養上清による好中球の遊走

前節の結果から TCR-δ$^{-/-}$マウスでは, 炎症局所への好中球の遊走能が劣っているのではないかと考えられた. そこで TCR-δ$^{-/-}$マウスと TCR-δ$^{+/-}$マウスにおいて炎症局所で分泌されている様々な走化性因子に違いがあるのではないかと考え, 好中球の遊走能

について *in vitro* で検討した.

結果と考察

DSS を 3 日間自由摂取させた TCR-δ$^{+/-}$マウスと TCR-δ$^{-/-}$マウス, または DSS を投与していないマウスの大腸を摘出し, 培養した大腸培養上清をサンプルとして好中球の遊走能を測定した (Figure 18). DSS を投与していない, TCR-δ$^{+/-}$マウスと TCR-δ$^{-/-}$マウスの大腸培養上清では, 好中球の遊走に変化は見られなかった. DSS を投与し, EC を誘導した TCR-δ$^{+/-}$マウスの大腸培養上清では, 好中球の遊走が増加したが, TCR-δ$^{-/-}$マウスの大腸培養上清では, ほとんど変化がなかった. この結果は, 大腸炎を発症した TCR-δ$^{+/-}$マウスでは, 炎症部位に浸潤している細胞のほとんどが好中球であり, TCR-δ$^{-/-}$マウスでは, 好中球が炎症部位にほとんど浸潤していないという, 組織染色の結果を支持する.

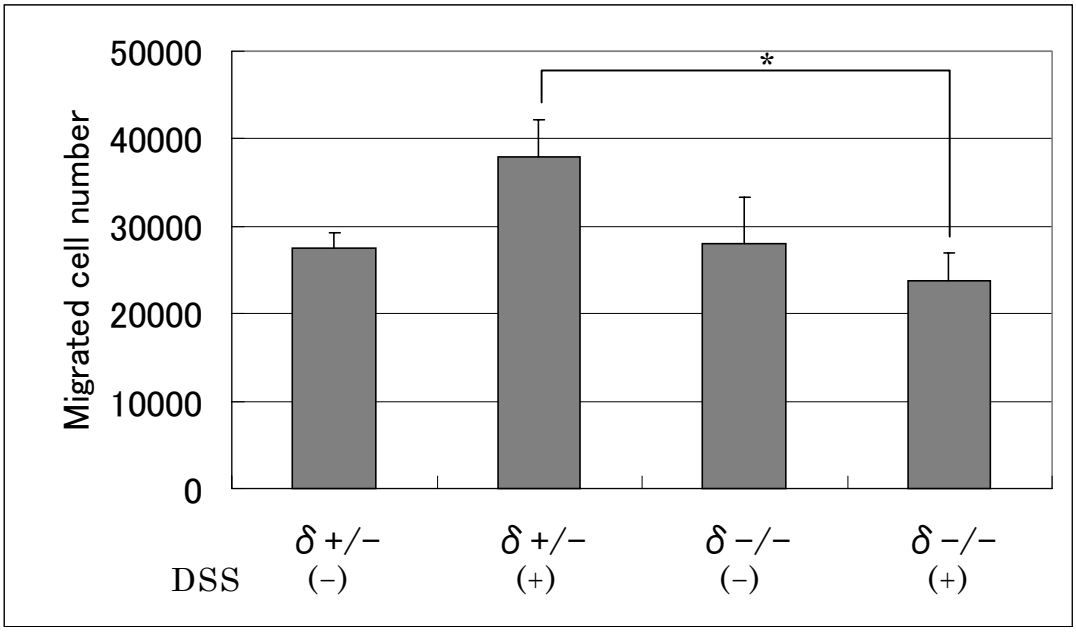

Figure 18. *In vitro* migration assay for neutrophil. Colon organ culture medium were obtained from BALB/c δ$^{+/-}$ or δ$^{-/-}$ mice. Colons were removed from either DSS administered (3 days) or non-administered BALB/c δ$^{+/-}$ or δ$^{-/-}$ mice. *$p<0.05$. Error bars indicate means ± SEM. (DSS (−) n=3, DSS(+) n=6)

これらの結果より，γδ型T細胞が炎症時に直接的あるいは間接的に好中球を遊走させる可溶性の因子，おそらくケモカインを分泌することが示唆された．

第4節　IEL, IECにおけるケモカインの発現

そこで，炎症を起こしている大腸上皮層のどの細胞が，どのようなケモカインを産生しているのかを調べた．大腸上皮層より，IEL及びIECを採取し，RT-PCR法によって好中球を遊走させる種々のCXCケモカインについて，その発現を調べた．

結果と考察

BALB/c背景のTCR-$\delta^{+/-}$マウスとTCR-$\delta^{-/-}$マウスに5% DSSを7日間自由摂取させ，DSS投与開始0日，3日，7日，11日後に大腸を摘出し，IEL及びIECを採取し，RT-PCR法により種々のCXCケモカイン及びサイトカインの発現について調べた(Figure 19).

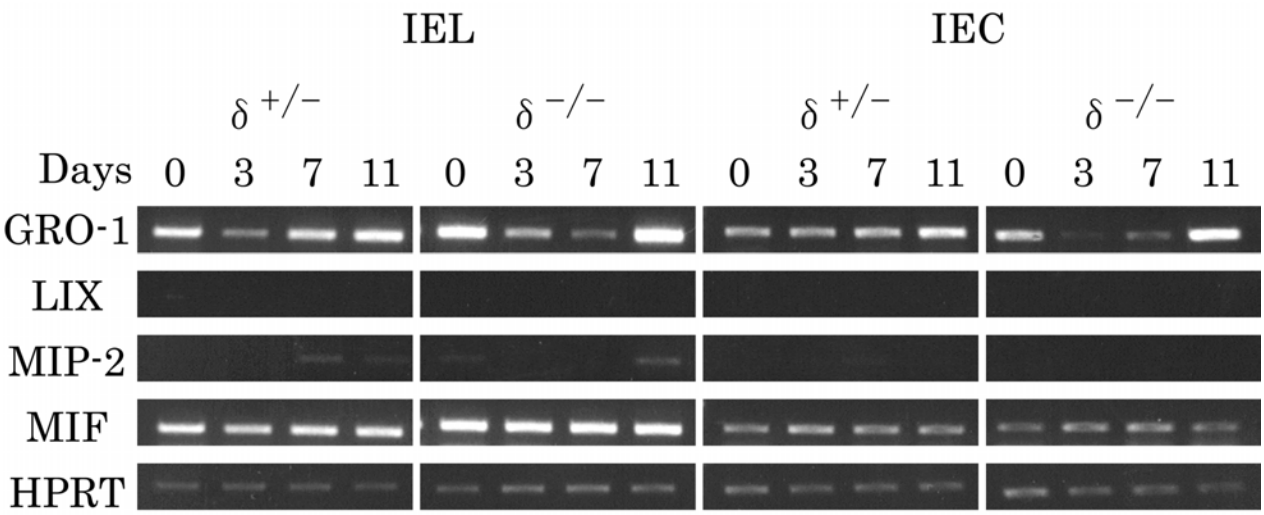

Figure 19. RT-PCR analysis of mouse CXC chemokines and cytokine in IEL or IEC. RNA were obtained from IEL or IEC of BALB/c $\delta^{+/-}$ or $\delta^{-/-}$ mice. Mice were administered 5% DSS for 7days.

TCR-$\delta^{+/-}$マウスとTCR-$\delta^{-/-}$マウスいずれにおいても，0日目でIEL及びIECでGRO-1とMIFの発現が認められた．また，MIP-2の発現はIELでのみわずかに認めら

れた．GRO-1の発現は，TCR-δ$^{+/-}$マウスのIELでは，3日目にわずかに減少しており，TCR-δ$^{-/-}$マウスのIELでは3日目，7日目に減少しているものの，大きな変化は認められなかった．また，TCR-δ$^{+/-}$マウスのIECでは，ほとんど発現の変化はなかった．しかし，TCR-δ$^{-/-}$マウスのIECでは，3日目，7日目に大きく減少していた．MIFの発現はIEL，IECとも変化は見られなかった．また，LIXは発現が認められなかった．

第5節　小括

γδ型T細胞が欠損することによって，好中球の産生が遅れて始まり，また炎症局所への遊走能が劣っているために末梢血中に好中球の割合が増加したと推測された．また，γδ型T細胞が炎症時に直接的あるいは間接的に好中球を遊走させる可溶性の因子を分泌することが示唆された．また，RT-PCRの結果より，好中球を遊走させるケモカインとしてGRO-1の関与が示唆された．大腸炎を自然発症するIL-10$^{-/-}$マウスにおいても，大腸炎の発症に伴いGRO-1の発現量が増加すると報告されており[34]，大腸での炎症に重要な役割を担っていると考えられている．またマクロファージの遊走を阻害するサイトカインであるMIFの発現も認められた．MIFをノックアウトしたマウスでは，TNBSモデルやCD4^{+}CD45RB^{high}細胞のRAG-2$^{-/-}$マウスへの移入モデルによるECが発症しないと報告されており[35]，ECの発症及び回復過程において発現量が変化していると推測されたが，ほとんど変化がなかった．GRO-1は，DSS投与3日目と7日目に，TCR-δ$^{-/-}$マウスのIEL及びIECでの発現が減少しており，γδ型T細胞が炎症時に直接的あるいは間接的に好中球を遊走させる可溶性の因子がGRO-1である可能性が示された．

総括

マウスの系統によって, DSS に対する感受性が違い, C3H/He や C57BL/6 は感受性が高く, DBA/2 は比較的感受性が低いと報告されている[33]. BALB/c マウスと C57BL/6 マウスとでは, DSS に対する感受性に差があり, C57BL/6 マウスの方が BALB/c マウスよりも感受性が高かった (Figure 3). Th1 優位である C57BL/6 マウスの方が Th2 優位である BALB/c マウスよりも感受性が高いことから, DSS による EC は Th1 優位に起こっている可能性が予想された. しかし, BALB/c と C57BL/6 の F1 マウスでは, DSS に対する感受性はそれぞれの系統の中間的な感受性を示し, また IL-4$^{-/-}$マウスや IFN-γR$^{-/-}$マウスにおいても WT と大きな差は見られなかったことから, C57BL/6 と BALB/c との差は Th1, Th2 のバランスの違いのみによる差ではないと考えられた.

CD4^{+} T 細胞を欠損したマウス, *scid* マウス, ヌードマウス, 抗 asialo GM1 抗体を投与し NK 細胞を欠損させた *scid* マウスにおいても, DSS による EC は発症すると報告されているが[36,37], 回復過程についてはまだ調べられたという報告はない. 本研究において, 機能的リンパ球を欠損した C.B-17 *scid* マウスにおいて, DSS による EC の発症が認められ, またこれらのマウスは回復ができないことから, EC からの回復には機能的なリンパ球が必要であることが明らかとなった (Figure 6).

γδ型 T 細胞を完全に欠損し, αβ型 T 細胞や, B 細胞が極度に減少した IL-7R$^{-/-}$マウスにおいても, C.B-17 *scid* マウス同様回復できなかった (Figure 8). しかし最近, IL-7 は腸管粘膜免疫の維持に非常に重要な役割を担っていると報告されている. IL-7R$^{-/-}$マウスは前述したようにγδ型 T 細胞を完全に欠損し, αβ型 T 細胞や, B 細胞も極度に減少しており, また抗 IL-7R 抗体を胎児期に投与すると, 新生児のパイエル板が欠損するなど[38], IL-7 及び IL-7R を介するシグナルが未熟リンパ球の分化, 増殖に重要な働きをしていると推定されている. さらに IL-7 トランスジェニックマウスは慢性大腸炎を自然発症すると報告されている[39]. このトランスジェニックマウスの解析より, 腸管上皮細胞によって IL-7 は産生, 分泌され腸管粘膜内の T 細胞の増殖を調節していると考えられるようになった[40]. こうした報告を考え合わせると, 今回の IL-7R$^{-/-}$マウスが回復できなかったという結果は, IL-7 のシグナルが入らないことによって EC からの回復に障害がでた可能性も否定はできないが, 機能的なリンパ球が存在しない場合は, EC からの回復はできないことが明らかとなった.

αβ型 T 細胞及びγδ型 T 細胞をいずれも欠損した TCR-β$^{-/-}$δ$^{-/-}$マウスにおいて

も，EC の発症が認められ，またこのマウスは回復ができないことから，EC からの回復には T 細胞が必須であることが明らかとなった（Figure 10）．さらに，αβ型 T 細胞を欠損した TCR-$\beta^{-/-}$マウスは多少回復できないマウスがいたが，γδ型 T 細胞を欠損した TCR-$\delta^{-/-}$マウスでは，数多くのマウスが回復できず，γδ型 T 細胞を欠損したマウスの方がαβ型 T 細胞を欠損したマウスに比べて強い症状を示す傾向があることが示された(Figure 10)．

炎症部位の浸潤細胞にも違いが見られた．WT マウスやαβ型 T 細胞を欠損した TCR-$\beta^{-/-}$マウスでは，炎症部位に浸潤している細胞のほとんどが好中球であったのに対し（Figure 11），γδ型 T 細胞を欠損した C.B-17*scid* マウス，IL-7R$^{-/-}$マウス，TCR-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$マウス及び TCR-$\delta^{-/-}$マウスでは，炎症部位に浸潤している細胞の大多数は単球/マクロファージであり，好中球の浸潤はほとんど認められなかった（Figure 7,9,11,13,15）．つまり，γδ型 T 細胞の存在の有無で浸潤してくる細胞の種類が変わること，すなわちγδ型 T 細胞が存在すると好中球が浸潤し，γδ型 T 細胞が存在しないと主に単球/マクロファージが浸潤してくることが明らかとなった．さらに，好中球の浸潤が主たる場合は DSS 投与中止後回復できるような軽症であり，単球/マクロファージの浸潤が主たる場合は重症化することが明らかとなった．

In vitro においても，TCR-$\delta^{-/-}$マウスでは WT マウスと比較して炎症を起こした大腸の培養上清中の好中球遊走因子が少ないことが示された（Figure 18）．TCR-$\delta^{-/-}$マウスでは WT マウスと比較して炎症を起こした大腸の好中球遊走因子，おそらくケモカインの産生量が少ないために，組織染色で好中球の浸潤が認められなかったと考えられる．

また，RT-PCR の結果より，そのケモカインが GRO-1 である可能性が示されたが，この結果は大腸全体を用いているため炎症局所での現象を直接反映できていないかもしれない．

ヒトにおいても，UC 患者や CD 患者の病変部位での IL-8 や GROα の産生量が増加していると報告されており[41]，またγδ型 T 細胞の数が増加し，TCR レパートリーも変化しているという報告[21,22,23]とをあわせて考えると，γδ型 T 細胞が直接的または間接的にこのようなケモカインを介して，好中球の遊走に関与していることが推測される．しかし，γδ型 T 細胞が好中球の遊走に関与しているという報告は，細菌感染による実験でいくつか報告されているのみである．*Listeria monocytogenes* 感染では，γδ型 T 細胞が欠損したマウスでは，好中球の浸潤が増加し[9]，*Nocardia asteroides* 感染では，好中球の浸潤が抑制されると報告されている[42]．このように，γδ型 T 細胞の新しい機能として炎

症時に浸潤してくる細胞の制御の一端を担っていると考えられ，本研究からもこれらの考え方を強く支持する結果となった．

γδ型T細胞の機能はいまだ解明されていないことが多いが，本研究において炎症反応の回復過程で重要な役割を担っており，γδ型 T 細胞の存在の有無で，炎症部位に浸潤してくる細胞に違いが生じることが示された． 今後γδ型 T 細胞や，その影響を受けた上皮細胞が産生するサイトカインやケモカインを明らかにすることによって，免疫異常を原因とする様々な炎症性疾患に対し，用途に応じた治療法の開発に役立つことを期待する．

結論

1. 機能的リンパ球を欠損したC.B-17*scid*マウスや，T細胞を欠損したTCR-$\beta^{-/-}\delta^{-/-}$マウスにおいてもECの発症が確認された．

2. しかしDSSによるECからの回復には，リンパ球，特にT細胞が必須であることが明らかとなった．

3. T細胞の中でもγδ型T細胞が回復に関与していることが明らかとなった．

4. DSS誘導ECでは，大腸の粘膜固有層に好中球が多数浸潤していたが，γδ型T細胞を欠損したマウスでは，単球/マクロファージの浸潤が主であった．
すなわち，単球/マクロファージの浸潤が主たる場合はECが重症化し，好中球の浸潤が主たる場合はDSS投与中止後回復できるような軽症であることが判った．

5. γδ型T細胞は直接的もしくは，上皮細胞などを介して間接的に炎症部位への好中球の遊走を正の方向に制御していることが明らかとなった．

謝辞

本研究を学位論文としてまとめるにあたり，終始暖かい御指導，御鞭撻を賜りました恩師， 大阪大学大学院薬学研究科教授，山元 弘先生に衷心より謝意を表します．

また，本研究を遂行するにあたり種々の御指導をいただきました， 大阪大学大学院薬学研究科助教授，小濱靖弘先生，同助手，辻川和丈先生に深謝いたします．

本研究を遂行するにあたり，TCR-$\beta^{-/-}$マウスを御供与頂き，また腸管の組織化学的手法をはじめ多大な御指導，御協力をいただきました， 慶應義塾大学医学部教授，石川博通先生，同助手，浜田裕公先生，IL-$4^{-/-}$マウス及びIFN-$\gamma R^{-/-}$マウスを御供与頂きました， 山形大学医学部教授，仙道富士郎先生，IL-$7R^{-/-}$マウスを御供与頂きました，京都大学医学部助教授，生田宏一先生に心から御礼申し上げます．

本研究を遂行するにあたり，多大なご協力をいただきました，福田純明修士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科細胞生理学分野の皆様に心より感謝いたします．

最後に，在学中の経済的援助を賜りました，日本育英会に感謝いたします．

参考文献

[1] Haas W, Pereira P, Tonegawa S. 1993. Gamma/delta cells. Ann. Rev. Immunol. 11：637-655

[2] Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB. 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. J. Exp. Med. 169：1277-1294

[3] Grand DG, Bensussan NC, Malissen B, Seris MM, Briottet C, Vassalli P. 1991. Two gut intraepithelial $CD8^+$ lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. J. Exp. Med. 173：471-481

[4] Havran WL, Grell S, Duwe G, Kimura J, Wilson A, Kruisbeek AM, O'Brien RL, Born W, Tigelaar RE, Allison JP. 1989. Limited diversity of T-cell receptor gamma-chain expression of murine Thy-1^+ dendritic epidermal cells revealed by V gamma 3-specific monoclonal antibody. PNAS 86：4185-4289

[5] Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. 1999. Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. Immunity 11：57-65

[6] Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR. 1995. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. Nature 375：155-158

[7] Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma delta T cells. Science 279：1737-1740

[8] Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SH. 1993. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. Nature 365：53-56

[9] Fu YX, Roark CE, Kelly K, Drevets D, Campbell P, O'Brien R, Born W. 1994. Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by gamma delta T cells. J. Immunol. 153：3101-3115

[10] Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. 1995. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. Nature 373：255-257

[11] Paul JE, Simon RC. 2000. Downmodulation of the Inflammatory Response to Bacterial. J. Exp. Med. 191：2145-2158

[12] D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. 1997. An

anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis. J. Immunol. 158 : 1217-1221

[13] Carding SR, Allan W, Kyes S, Hayday A, Bottomly K, Doherty PC. 1990. Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta$^+$ T cells. J. Exp. Med. 172 : 1225-1231

[14] Raziuddin S, Telmasani AW, Hag AM, Amari O, Janadi M. 1992. Gamma delta T cells and the immune response in visceral leishmaniasis. Eur. J. Immunol. 22 : 1143-1148

[15] Roberts SJ, Smith AL, West AB, Li W, Findly RC, Owen MJ, Hayday AC. 1996. T-cell alfa beta$^+$ and gamma delta$^+$ deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium. PNAS 93 : 11774-11779

[16] Rocha B, Vassalli P, Grand DG. 1991. The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8$^+$ intraepithelial T cell receptor alpha/beta$^+$ lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. J. Exp. Med. 173 : 483-486

[17] Ishikawa H, Li Y, Abeliovich A, Yamamoto S, Kaufmann SHE. 1993. Cytotoxic and Interferon gamma-Producing Activities of gamma delta T Cells in the Mouse Intestinal Epithelium are Strain Dependent. PNAS 90 : 8204-8208

[18] Yamamoto M, Fujihashi K, Kawabata K, McGhee JR, Kiyono H. 1998. A mucosal intranet: intestinal epithelial cells down-regulate intraepithelial, but not peripheral, T lymphocytes. J. Immunol. 160 : 2188-2196

[19] Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, Mombaerts P, Tonegawa S, Yamamoto H, Itohara S, Nanno M, Ishikawa H. 1995. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial γδ T cells. PNAS 92 : 6147-6151

[20] Boismenu R, Havran WL. 1994. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. Science 266 : 1253-1255

[21] Giacomelli R, Parzanese I, Frieri G, Passacantando A, Pizzuto F, Pimpo T, Cipriani P, Viscido A, Caprilli R, Tonietti G. 1994. Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease. Clin. Exp. Immunol. 98 : 83-88

[22] Soderstrom K, Bucht A, Halapi E, Gronberg A, Magnusson I, Kiessling R. 1996. Increased frequency of abnormal gamma delta T cells in blood of patients with inflammatory bowel diseases. J. Immunol. 156 : 2331-2339

[23] McVay LD, Li B, Biancaniello R, Creighton MA, Bachwich D, Lichtenstein G, Rombeau JL, Carding SR. 1997. Changes in human mucosal gamma delta T cell repertoire and function associated with the disease process in inflammatory bowel disease. Mol. Med. 3 : 183-203

[24] Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. 1990. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology 98 : 694-702

[25] Yamada M, Ohkusa T, Okayasu I. 1992. Occurrence of dysplasia and adenocarcinoma after experimental chronic ulcerative colitis in hamsters induced by dextran sulphate sodium. Gut 33 : 1521-1527

[26] Tamaru T, Kobayashi H, Kishimoto S, Kajiyama G, Shimamoto F, Brown WR. 1993. Histochemical study of colonic cancer in experimental colitis of rats. Dig. Dis. Sci. 38 : 529-537

[27] Iwanaga T, Hoshi O, Han H, Fujita T. 1994. Morphological analysis of acute ulcerative colitis experimentally induced by dextran sulfate sodium in the guinea pig: some possible mechanisms of cecal ulceration. J. Gastroenterol. 29 : 430-438

[28] Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M. 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science 259 : 1742-1745

[29] Kuhn R, Rajewsky K, Muller W. 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. Science 254 : 707-710

[30] Maki K, Sunaga S, Komagata Y, Kodaira Y, Mabuchi A, Karasuyama H, Yokomuro K, Miyazaki J, Ikuta K. 1996. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gamma delta T cells. PNAS 93 : 7172-7177

[31] Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, Iacomini J, Itohara S, Lafaille JJ, Wang L, Ichikawa Y, Jaenisch R, Hooper ML, Tonegawa S. 1992. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. Nature 360 : 225-231

[32] Itohara S, Mombaerts P, Lafaille J, Iacomini J, Nelson A, Clarke AR, Hooper ML, Farr A, Tonegawa S. 1993. T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. Cell 72 : 337-348

[33] Mahler M, Bristol IJ, Leiter EH, Workman AE, Birkenmeier EH, Elson CO, Sundberg JP. 1998. Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. Am. J. Physiol. 274 : G544-G551

[34] Song F, Ito K, Denning TL, Kuninger D, Papaconstantinou J, Gourley W, Klimpel G, Balish E, Hokanson J, Ernst PB. 1999. Expression of the neutrophil chemokine KC in the colon of mice with enterocolitis and by intestinal epithelial cell lines: effects of flora and proinflammatory cytokines. J. Immunol. 162 : 2275-2280

[35] Jong YP, Abadia-Molona AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Sahli MA, Hove TT, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C. 2001. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. Nature Immunol. 2 : 1061-1066

[36] Axelsson L, Landstrom E, Goldschmidt TJ, Gronberg A, Bylund Fellenius AC. 1996. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in $CD4^+$ -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. Inflamm. Res. 45 : 181-191

[37] Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO. 1994. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. Gastroenterology 107 : 1643-52

[38] Yoshida H, Honda K, Shinkura R, Adachi S, Nishikawa S, Maki K, Ikuta K, Nishikawa S. 1999. IL-7 receptor alpha$^+$ $CD3^-$ cells in the embryonic intestine induces the organizing center of Peyer's patches. Int. Immunol. 11 : 643-655

[39] Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, Iwao Y, Ishii H, Habu S, Uehira M, Nishimoto H, Ishikawa H, Hata J, Hibi T. 1998. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. J. Exp. Med. 187 : 389-402

[40] Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H. 1995. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. J. Clin. Invest. 95 : 2945-2953

[41] Imada A, Ina K, Shimada M, Yokoyama T, Yokoyama Y, Nishio Y, Yamaguchi T, Ando T, Kusugami K. 2001. Coordinate upregulation of interleukin-8 and growth-related gene product-alpha is present in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease. Scand. J. Gastroenterol. 36 : 854-864

[42] King DP, Hyde DM, Jackson KA, Novosad DM, Ellis TN, Putney L, Stovall MY, Van-Winkle LS, Beaman BL, Ferrick DA. 1999. Protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. J. Immunol. 162 : 5033-5036