

博士論文（要約）

食物アレルギーの経皮免疫療法モデルの確立と機構解析

森永真実子

博士論文（要約）

食物アレルギーの経皮免疫療法モデルの確立と機構解析

東京大学大学院

農学生命科学研究科 応用生命化学専攻

食の安全研究センター 免疫制御研究室

平成 28 年度進学

森永 真実子

指導教員 八村 敏志

目次

略語一覧	3
緒言	5
第1章 食物アレルギーの経皮免疫療法モデルの確立	
序	15
材料と方法	17
結果	29
考察	33
図	36
第2章 局所的な免疫応答が全身の反応に影響する機構の解析 (1) 所属リンパ節における局所応答の重要性	
序	55
材料と方法	56
結果	58
考察	60
図	63
第3章 局所的な免疫応答が全身の反応に影響する機構の解析 (2) KikGR マウスを用いた細胞動態の解析	
序	80
材料と方法	81
結果	86
考察	90
図	93

総合討論	117
参考文献	123
要旨	133
謝辞	137

略語一覧

Ab	antibody; 抗体
APC	antigen presenting cell; 抗原提示細胞
BSA	bovine serum albumin; ウシ血清アルブミン
CCR	ケモカインレセプター
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA; 相補鎖 DNA
CFSE	5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CN	casein; カゼイン
cpm	count per minute
DC	dendritic cell ; 樹状細胞
dDC	dermal dendritic cell; 真皮樹状細胞
DLN	draining lymph node; 所属リンパ節
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay; 酵素免疫測定法
EPIT	epicutaneous immunotherapy; 経皮免疫療法
EW	egg white; 卵白
FACS	fluorescence activated cell sorting
FcR	Fc receptor
FCS	fatal calf serum; ウシ胎仔血清
Foxp3	forkhead box P3
HE	hematoxylin-eosin
HEV	high endothelial venules; 高内皮細静脈
IFN	interferon; インターフェロン
Ig	immunoglobulin; 免疫グロブリン
IL	interleukin; インターロイキン
KikGR	kikume Green-Red
LC	Langerhans cell; ランゲルハンス細胞
MHC	major histocompatibility complex; 主要組織適合遺伝子複合体
MLN	mesenteric lymph node; 腸間膜リンパ節
OIT	oral immunotherapy; 経口免疫療法
OVA	ovalbumin; 卵白アルブミン
PBS	phosphate-buffered saline; リン酸緩衝液
PCR	polymerase chain reaction; ポリメラーゼ連鎖反応

QOL	quality of life
mRNA	messenger ribonucleic acid
SCIT	subcutaneous immunotherapy; 皮下免疫療法
SLIT	sublingual immunotherapy; 舌下免疫療法
SPL	spleen; 脾臓
SPF	specific pathogen free
SSC	side scatter; 側方散乱光
TCR	T cell receptor; T細胞レセプター
T _{EM}	effector memory T cell; エフェクター・メモリーT細胞
T _{fh}	follicular helper T cell; 濾胞ヘルパーT細胞
TGF	transforming growth factor
Th	T-helper
TNF	tumor necrosis factor
Treg	regulatory T cell; 制御性T細胞
TSLP	thymic stromal lymphopoietin

緒言

免疫とは

免疫系は、生体内に入ってきた異物を排除し、生体の恒常性を維持するシステムである。免疫系の仕組みは大きく二つ、自然免疫と獲得免疫に分けられる。自然免疫は病原体（ウイルス、細菌など）の間で広く共通して存在する分子を、あらかじめ生体内に用意された免疫細胞が非特異的に認識し、異物の侵入にすぐに反応して排除する仕組みである。それに対し、獲得免疫の大きな特徴は「抗原特異性」を持つことである。獲得免疫系は、多種多様な病原体に対して一対一に対応し、個別に反応することができる。生体はあらかじめきわめて多様な免疫細胞を備えており、異物を特異的に認識すると抗原特異的細胞のみが増殖し、そのクローンによって異物が処理される。また、一度異物に対して増大したクローンは、同じ異物の二度目の侵入には速やかに反応することができる。これを免疫記憶と言う。生体での免疫応答は、自然免疫系と獲得免疫系が相互に関わりながら機能する。

経口免疫寛容

多様な獲得免疫系の細胞のうち、生体自身を抗原として認識する細胞の多くは分化の途中で除去される。この仕組みを自己寛容と言う。獲得免疫系に備えられたきわめて多様な免疫細胞レパートリーは、「生体自身でないもの」を広く「異物」として認識しうる。しかし、「異物」の中には無害なもの、生体の維持に不可欠な食物なども含まれる。そういった「異物」を排除しないよう、免疫反応を起こさない、もしくは抑制する、すなわち、自己抗原以外に対しても免疫寛容が誘導される仕組みが存在する。

特に、食物など経口的に摂取された抗原に対して、腸管免疫系を介して反応することで免疫反応が抑制される機構を経口免疫寛容という¹。この経口免疫寛容を誘導するメカニズムとして、抗原特異的な T 細胞抗原レセプターを持った T 細胞が低応答化するアナジー化²、抗原特異的な T 細胞抗原レセプターを持った T 細胞が選択的にアポトーシスを起こすクローナルデリーション³、制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) により免疫応答が抑制されるアクティブサプレッション⁴の 3 つが挙げられている (Fig. 1-1)。これらの機構はそれぞれ独立したものではなく、協調的に働いていると考えられている⁵。

食物アレルギー

免疫系は生体防御機構として重要であるが、本来無害である物質を認識し、過剰な免疫応答を起こして生体自身に害をもたらすことがある。生体自身を抗原として認識し攻撃す

る免疫反応は自己免疫性疾患として知られる。また、外界からの異物に対して過剰に（すなわち、不利益であるにもかかわらず）起こる免疫反応は広くアレルギーと呼ばれ、なかでも特に食物に対する過剰な免疫反応を食物アレルギーと呼ぶ。「AMED 研究班による食物アレルギー診療の手引き 2017」⁶によると、食物アレルギーは「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって不利益な症状が惹起される現象」として定義されている。

アレルギー反応はその発症機序によって I～IV 型アレルギーの 4 つのタイプへの分類法が知られている。食物アレルギーはこの中の I 型アレルギーに分類される。I 型アレルギーは免疫グロブリン (immunoglobulin; Ig) E を介する即時型の反応で、食物アレルギーのほか、花粉症や気管支喘息などが知られている。I 型アレルギーは以下のように発症すると考えられている (Fig. 1-2)。まず、主に皮膚や粘膜から侵入したアレルゲンを樹状細胞 (dendritic cell; DC) が取り込み、抗原特異的ヘルパー T 細胞に抗原提示が行われ、T 細胞は Th2 細胞に分化する。同時に、B 細胞はそのアレルゲンに結合できる IgM 型の B 細胞抗原レセプターを通してアレルゲンを結合し、細胞内に取り込む。この B 細胞による抗原提示および、T 細胞 (Th2 細胞または濾胞ヘルパー T 細胞) による IL-4 の産生が行われ、お互いに活性化し合うことで、B 細胞の IgE クラススイッチが起こり、形質細胞となって抗原特異的 IgE を産生する。こうして産生された IgE の定常領域は、組織に存在するマスト細胞や血中に存在する好塩基球の細胞表面に発現する FcεRI レセプターに結合する。細胞表面に結合した IgE 抗体が抗原によって架橋されることで、細胞内で活性化シグナルが伝達されると脱顆粒が起こり、細胞中の顆粒に含まれていたヒスタミンや種々のタンパク質分解酵素などの化学メディエーターが放出される。これらの化学メディエーターが粘液の分泌や浮腫を引き起こし、アレルギー症状が発症する。この反応を即時型反応と言う。即時型反応に続いて、数時間後に遅延型反応が起こることが知られている。即時型反応の際に産生されたサイトカインやケモカインによって好酸球や Th2 細胞が引き寄せられ、それらの細胞によって組織炎症が起こる。

食物アレルギー治療法の現状

現在、食物アレルギーの治療として、除去法、薬物療法が主に行われている。除去法とは、アレルゲンを含む原因食物の摂取をさける食事制限を行う方法で、薬物療法は、抗ヒスタミン薬等を投与することですでに起こってしまった症状を抑制する治療である。ただし、これらはどちらも一時しのぎの対症療法に過ぎず、食物アレルギーを根本から治療できる方法ではない。

食物アレルギーの患者には、卵や牛乳、小麦など幅広く消費される食材に対するアレル

ギーを発症する者が多い。こういった食物の除去法を行うことは患者本人や周囲の大きな負担となり、QOL（quality of life；生活の質）の低下を招くことが予想される。また、誤食によるアナフィラキシー発症のリスクも避けられない。こういった背景から、食物アレルギー患者の抗原食物の摂取を可能にする根本的な治療法が強く望まれている。

アレルギー免疫療法の取り組み

アレルギーの根治療法の一つとして、アレルギー反応がおこらない程度に患者をアレルギーに曝露することで、アレルギー特異的な免疫応答を変化させ、アレルギー症状を寛解させる、アレルギー免疫療法（allergen immunotherapy; AIT）がある。生体にアレルギーを曝露する手法は、アレルギーの投与箇所、投与する量や頻度のプロトコル、アレルギーの構造を変化させ反応性を用いる等、様々な手法が考案され、臨床の場で試行錯誤がなされている。

アレルギーを投与するルートとして、花粉アレルギーに対する舌下免疫療法（sublingual immunotherapy; SLIT）⁷⁻⁹ や、ハチ毒アレルギーに対する皮下免疫療法（subcutaneous immunotherapy; SCIT）¹⁰、食物アレルギーに対する経口免疫療法¹¹⁻¹³（oral immunotherapy; OIT）などが報告されている。

また、OIT の中でも、少量ずつアレルギーを投与する方法^{14,15}、加熱などにより変性させたアレルギーを投与する方法¹⁶、アレルギータンパク質そのものでなくアレルギーペプチドを投与する方法^{17,18}、抗 IgE 抗体と併用する方法などが報告されている。

一方で、AIT 中の副反応が頻繁に報告されており¹⁹⁻²²、中にはアナフィラキシーのような重篤な副反応を起こす場合もある。さらに、治療効果は主に脱感作に依存し、アレルギー投与をやめると効果が維持されない場合も報告されている。これらの状況を考慮すると、より安全で確立された AIT の手法が必要である。

アレルギー免疫療法のメカニズム

AIT のメカニズムとして、脱感作²³⁻²⁵、抑制性の機能を持つ細胞の誘導²⁶⁻²⁹、抗体産生の変化^{27,29-32} 等が報告されている^{33,34}。

脱感作とは、マスト細胞や好塩基球の免疫応答が低下する現象で、炎症メディエーターであるヒスタミン産生量の低下²³や、IL-4、IL-13 を発現する好塩基球の減少²⁴、好塩基球上の IgE レセプター発現の低下²⁵が報告されている。抑制性の機能を持つ細胞は、抑制性のサイトカインである IL-10 を産生する T 細胞の誘導^{26,27}、アレルギー反応箇所での Foxp3⁺ Treg の増加²⁸、IL-10 を産生する制御性 B 細胞の誘導²⁹が報告されている。この B 細胞はアレルギー特異的ブロッキング抗体である IgG4 を産生する²⁹。また、IL-10⁺ Foxp3⁻ T 細

胞、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T 細胞が IgG4 産生を誘導する³⁰。この IgG4 は、アレルゲンと IgE の相互作用³¹ および IgE-アレルゲン複合体と B 細胞の結合³² を妨げ、抗原提示を妨げる効果があることも報告されている。

これらのメカニズムは、互いに独立ではなく相互に関連し合って機能しており、また他に関与するメカニズムが存在している可能性もある。また、投与されたアレルゲンが生体内でどのような反応を引き起こし、結果として現象を誘導しているのかは明らかになっておらず、安全で安定した治療法の確立のためには、さらなる検討が必要である。

経皮感作と経皮免疫療法

皮膚はヒトにおいては体重の 16 % を占める臓器で、外界と生体を隔て、物理的・免疫学的な防御機構として働く。皮膚にはランゲルハンス細胞 (Langerhans cell; LC) や DC といった抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) が存在し、物理的バリアをくぐり抜けてきた異物に対して免疫学的に排除を行う³⁵。

2008 年に Lack らによって、「経皮的に食物アレルゲンに曝露されると感作が成立し、適切な量とタイミングで経口摂取された食物はむしろ免疫寛容を誘導する」という二重抗原曝露仮説が提唱された³⁶。日本においても、2010 年小麦由来タンパク質を含む石けんの使用による運動誘発アナフィラキシー発症事例^{37,38}以降、感作ルートとして皮膚が注目を集めている。近年、この経皮感作の作用機序が研究され、明らかになりつつある³⁹。皮膚を介した抗原特異的 Th2 応答の誘導に、皮膚上皮細胞から産生される TSLP と好塩基球が重要であることが報告された⁴⁰。これと一致して、TSLP 依存的に好塩基球が皮膚およびリンパ節に集積し、IL-4 を産生する抗原提示細胞として機能する経皮感作-食物アレルギーモデルが報告された^{41,42}。IL-33 はアレルゲンと IgE で活性化されたマスト細胞に作用してヒスタミンを増強することが知られている⁴³。先の経皮感作-食物アレルギーモデルにおいて、経皮感作は IL-33 非依存的であるが、食物アレルギーの発症が IL-33 に依存する⁴²。

一方で、免疫応答が亢進される組織では、同時に過度の反応を抑制する働きが誘導されることが知られている。現に、皮膚からのアレルゲン導入によってアレルギーを寛解する経皮免疫療法 (epicutaneous immunotherapy; EPIT) モデルが近年報告され始めている^{44,45}。Viaskin を用いる研究グループの報告が最も多くなされている⁴⁶⁻⁵⁵。Viaskin を用いたアレルゲン投与では、自然に皮膚から失われた水が皮膚とパッチの間に蓄積し、アレルゲンを可溶化する。この「凝縮チャンバー」が、表皮を透過させ、アレルゲンの表皮への通過を可能にする。他の投与デバイスとして、マイクロニードル付き親水性ゲルパッチを用いる方法⁵⁶、界面活性剤を用いてアレルゲンを疎水性ミセルに包み角層への浸透性を高める solid-in-oil 技術を用いる方法^{57,58}などが検討されている。また、アジュバントを用い

た方法も検討され、Diphenylcyclopropenone⁵⁹ や、TLR7 リガンド⁶⁰ を用いる方法などが報告されている。

EPIT は、新しい免疫療法の方法として期待されている。その最大の利点は投与の簡便さにあり、侵襲性が小さく、患者の心身への負担が小さい。また、血管新生されない表皮へのアレルゲン投与では、アレルゲンが全身へ吸収されず、全身への副反応のリスクが小さいと考えられている^{61,62}。

CD4⁺ T 細胞の生体内での循環

外部からの異物の侵入に対処するため、免疫細胞は生体内を常に循環し監視している。免疫細胞は抗原情報の提示、抗原情報の伝達、抗体の産生など、それぞれ違った働きを持ち、相互作用をするため、適切な場所へと移動して働く。血流に乗って全身を受動的に移動するだけでなく、血管を出て組織内を能動的に移動することができ、その動態は時間的・空間的・数量的に緻密に制御されている。

リンパ管は、全身に張り巡らされた体液の排水路で、その節々にリンパ節を持つ。その起点は血管静脈と同様に、毛細リンパ管が全身の末梢の組織に存在し、それが集合して、鎖骨下で胸管または右リンパ本幹から静脈へと注ぐ。毛細リンパ管には弁が存在し逆流を防いでおり、またそれ自身が収縮することでポンプの役割を果たしている⁶³。

ナイーブ T 細胞は、血液から二次リンパ器官へ遊走し、リンパ管や下流のリンパ節を通り、胸管から血液に戻って循環する⁶⁴。ナイーブ T 細胞は、CCR7 および L-セレクトリン CD62L を発現する。これを介して、リンパ節内の高内皮細静脈 (high endothelial venule; HEV) の内皮細胞に特異的に接着、相互作用して HEV 壁を通過し、末梢リンパ節へとホーミングする。ナイーブ T 細胞は、こうしてリンパ節内で抗原提示を待つ。

抗原提示を受けた T 細胞はナイーブ T 細胞とは異なる循環パターンをとるようになる。血流に乗り、定常状態においては組織を通過して循環しているが、炎症を起こした局所部位へは優先的にホーミングする。組織に遊走した T 細胞は輸入リンパ管から組織の所属リンパ節 (draining lymph node; DLN) を経由して血流へ戻る⁶⁵⁻⁶⁶。抗原提示を受けた T 細胞上では CCR7 および CD62L の発現がダウンレギュレーションされ、血液から HEV を通りリンパ節へと直接入る経路が制限される。代わりに、T 細胞表面上で P-セレクトリンリガンドや E-セレクトリンリガンド、インテグリンがアップレギュレーションされ、毛細血管から末梢組織への効率的な遊走が (特に局所的な炎症・感染の状況において) 可能となる⁶⁷⁻⁶⁹。

二次リンパ組織内で抗原提示を受けたリンパ球は、エフェクター機能を獲得すると同時に、標的組織の刷り込みを受けることが知られている^{70,71}。血液循環に戻った感作リンパ球は、標的組織の活性化血管内皮細胞と選択的に相互作用し、標的組織へと選択的に遊走す

る。一方で、メモリーT細胞の組織指向性は可塑性を持ち、メモリーT細胞が、一次感染とは異なる解剖学的部位に局在する二次感染に対して効率的に応答するように再プログラミングされることも知られている⁷²。このように、T細胞が抗原提示を受けた場所(感作部位)と遊走して機能する部位(標的組織)へのT細胞動員の関係は免疫応答の制御において重要である。

alum アジュバントによる Th2 応答誘導

抗原とともに生体に感作することで、その抗原に対する免疫応答を増強させる効果をもつ物質をアジュバントと呼ぶ。alum はアルミニウム塩によるアジュバントで、主に水酸化アルミニウムによって構成される。alum と抗原タンパク質を同時に生体に導入することで、抗原特異的 Th2 応答が誘導されることが知られているが、そのメカニズムは未だに解明されていない部分が多い⁷³。

古くから考えられている alum アジュバントのメカニズムとして、「徐放効果」がある。alum が抗原を吸着し、それを徐々に放出することで継続的に抗原提示細胞に抗原が与えられ、結果的に強い免疫応答が引き起こされるという理論で、1935年に Harrison らによって検証された⁷⁴。また、alum による抗体応答誘導は、自然免疫に関わるパターン認識レセプターである TLR (Toll-like receptor ; Toll 様受容体) シグナル経路の下流にある MyD88 経路には依存しないことが報告されている^{75,76}。IL-4 産生細胞の誘導⁷⁷⁻⁸⁰や、炎症シグナル複合体である NALP3 インフラマソームの活性化⁸¹⁻⁸⁵が、IgE 産生の誘導に関与する可能性があるとして報告されている。さらに、alum によってダメージを受けた細胞から放出された尿酸⁸⁶⁻⁸⁸や核酸^{89,90}が遊離 DAMPs (damage-associated molecular patterns ; ダメージ関連パターン分子) として働くことが、Th2 応答の誘導に関わっていると報告もなされている。また、alum 自体が DC の細胞膜脂質によって特異的に認識され、相互作用するという報告もある⁹¹。

このように、alum のアジュバント効果は alum それ自体による直接的作用に加え、alum による細胞傷害による間接的作用もあり、細胞内-細胞間レベルで複雑に作用している。

IgE 抗体の産生制御と機能

IgE はアレルギーの原因物質として同定された、抗体アイソタイプの一つである。IgE は血中に低濃度で存在する。血中 IgE は半減期が短く、IgG が 20 日程度であるのに対し、IgE は 2 日程度 (マウスでは半日程度) であると言われている⁹²。

IgE の産生は、次のように制御される⁹³。IgE 産生は、B 細胞のクラススイッチにより開始する。IgE クラススイッチは、Th2 細胞による IL-4 産生には強く依存せず、B 細胞濾胞内

に存在する濾胞ヘルパーT細胞 (follicular helper T cell; Tfh 細胞) によって産生される IL-4 を必要とする^{94,95}。逆に、IL-21R シグナリングは、IL-4 に依存する IgE 産生を抑制する⁹⁶。さらに近年、Tfh 細胞を IL-4 と IL-21 の産生型によって 3 つの集団に分画した解析がなされ、それぞれが異なるアイソタイプの抗体産生を誘導することが報告された⁹⁷。IgE 産生はクラススイッチ後にも制御され、B 細胞上に発現する CD23 (FcεRII) を介したフィードバック制御⁹⁸や、膜型 IgE を介してアポトーシスやプラズマ細胞分化が誘導される⁹⁹。産生された IgE は、好塩基球やマスト細胞の細胞表面に存在する Fcε レセプターに結合して、細胞に抗原認識能を付与する。細胞表面に保持された IgE-FcεR 複合体が抗原によって架橋されることで脱顆粒によるヒスタミンや脂質メディエーターの放出や炎症性サイトカインの産生を誘導し、アレルギー症状が発症する。一方で、FcεRI と FcγRII の架橋によってマスト細胞の脱顆粒が阻害されたり¹⁰⁰、マスト細胞上の IgE が IgG 依存的にダウンレギュレーション¹⁰¹されたりする働きが報告され、一度細胞表面に結合した IgE もその機能が制御されることが知られている。

マウスを用いた食物アレルギーモデル

当研究グループでは、食物アレルギーに対する免疫応答を解析する手段として卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) 特異的 T 細胞抗原レセプター (T cell receptor; TCR) トランスジェニックマウスの OVA23-3 マウスおよび DO11.10 マウスを用いた研究を行ってきた^{16,17,102-105}。これらの TCR トランスジェニックマウスは、T 細胞の多くが OVA 特異的な細胞であるため、OVA に対する応答性が強く、また反応するエピトープが単一のエピトープに限られる。そのため、野生型のマウスによる食物アレルギーモデルが AIT の研究により適していると考えた。

当研究室の足立と Burggraf、戸田らの共同研究によって野生型の TCR レポートリーを持つ BALB/c マウスを用いた食物アレルギーモデルの系が樹立された¹⁰⁶。この BALB/c マウスの系は、様々なアレルギーを対象に汎用できる可能性があるが、当研究室では主要な食物アレルギーの一つである OVA を用いている。OVA を alum アジュバントとともに BALB/c マウスに 2 回腹腔投与して抗原感作し、その後 20 %卵白食を摂食させると、卵白食摂食時に腸炎を伴う体重減少と血中 IgE 抗体レベルの上昇、免疫組織の抗原特異的 Th2 応答の増強 (増殖応答、IL-4 の産生) が見られる。本研究では、この食物アレルギーモデルに対して、抗原感作後の OVA 経皮投与によって、卵白食摂食時のアレルギー反応の抑制する EPIT モデルの確立を行うことにした。

本研究の目的

AIT は、先に述べたように、様々な手法が考案され、臨床の場で試行錯誤が繰り返されている。臨床研究は、有効性の評価ができて、そのメカニズムの解析が難しく、治療を一般的な方法として確立する科学的根拠が不明確になることが多い。そこで、より詳しい解析のため、実験動物を用いた AIT モデルが必要となる。本研究では、前述の BALB/c マウスと alum アジュバントによる食物アレルギーモデルを用いて、EPIT モデルの検討を行う。

現在報告されている EPIT モデルは、ほとんどが特殊なアレルゲン投与装置を用いている。その使用のためには皮膚に除毛や剃毛を行う必要があり、それらの影響を排除できない。EPIT をより安全な方法として確立するためには、その効果とメカニズムをより多面的に調べることが必要である。そこで本研究では、アレルゲン投与装置を用いない EPIT モデルの確立を目的とした。皮膚の剃毛や除毛、テープストリッピングによるバリア機能の破壊などを行わない、健全な皮膚にアレルゲンを投与することで、アレルギー症状を抑制するモデルを確立する。

さらに、確立した EPIT モデルを用いて、AIT におけるアレルゲン投与部位と炎症誘導時のアレルギー応答発症部位が異なる場合に、どのように免疫応答が制御されるか解明することを目指す。特に、CD4⁺ T 細胞に注目し、アレルゲン投与箇所局所における免疫応答と機能、食物アレルギー症状誘導時の動態と表現型を解析する。

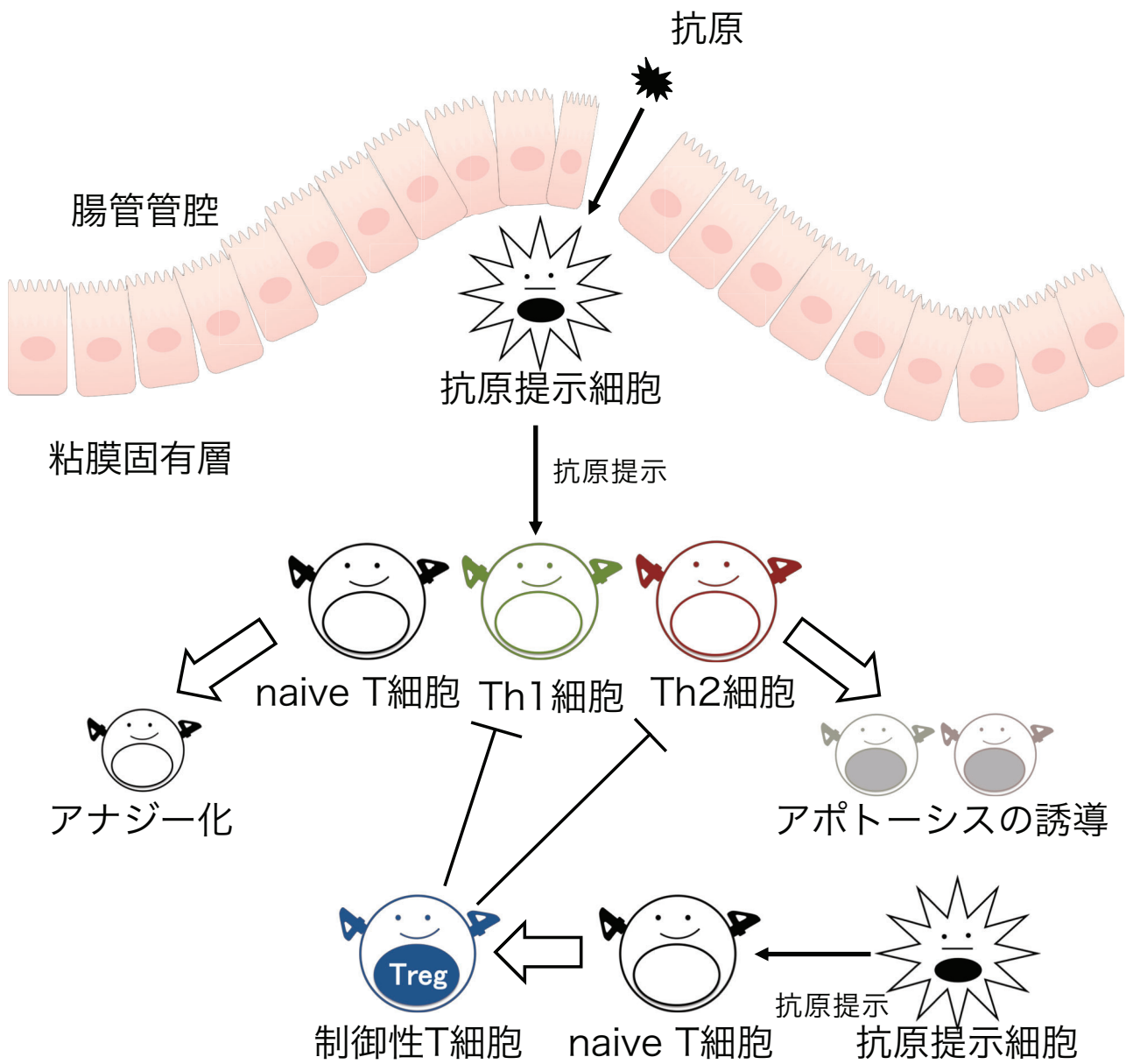


Fig. 1-1 経口免疫寛容誘導メカニズムの概念図

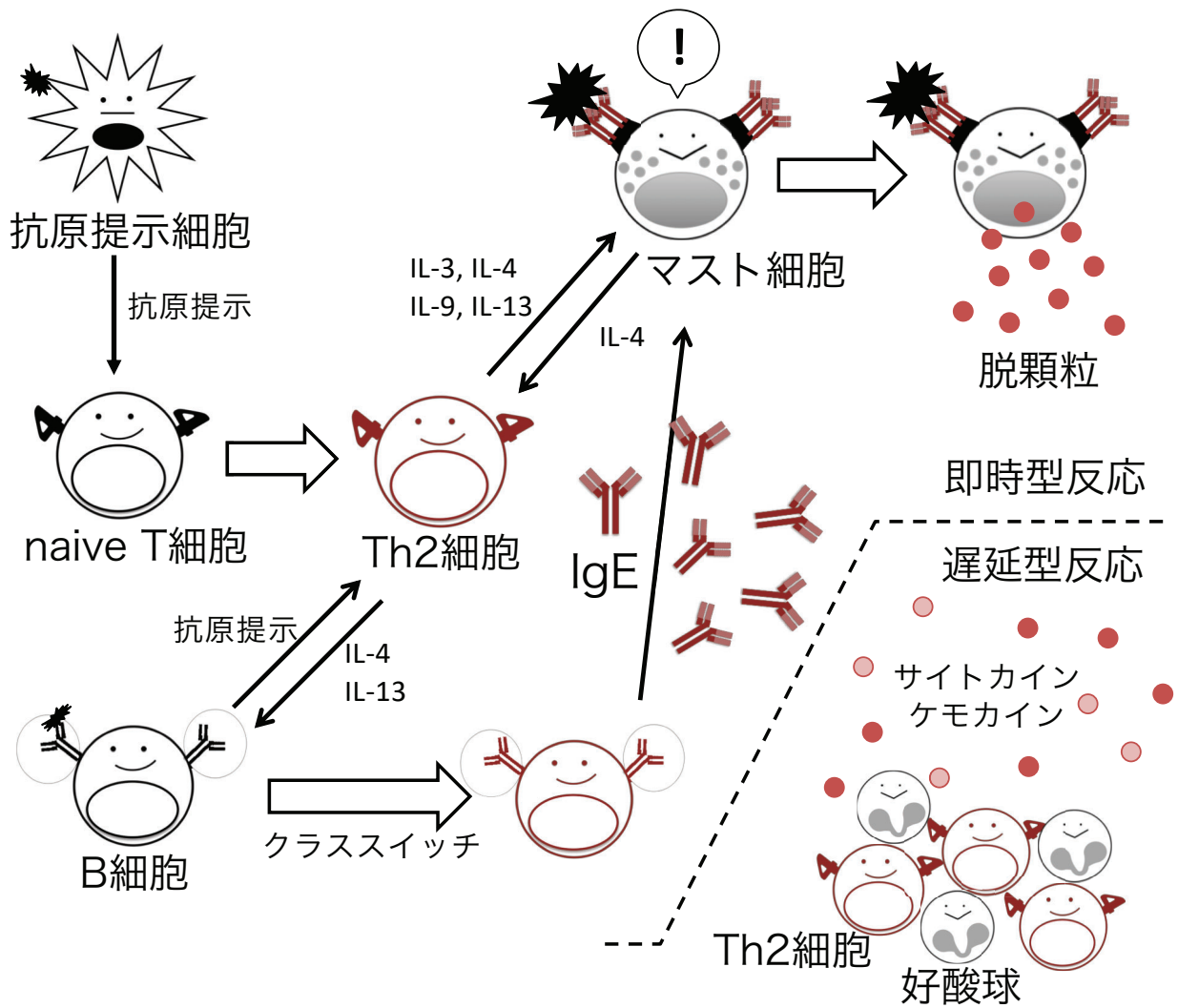


Fig. 1-2 I型アレルギーの発症機序

参考文献

1. Weiner HL, et al. Oral tolerance *Immunol Rev* 2011;**241**:241-59.
2. Egan RM, et al. In Vivo Behavior of Peptide-Specific T Cells During Mucosal Tolerance Induction: Antigen Introduced Through the Mucosa of the Conjunctiva Elicits Prolonged Antigen-Specific T Cell Priming Followed by Anergy. *J Immunol* 2000;**164**:4543-50.
3. Chen Y, et al. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 1995;**376**:177-80.
4. Tsuji NM, et al. Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* 2001;**103**:458-64.
5. Burks AW, et al. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**121**:1344-50.
6. 海老澤 元宏ら. AMED 研究班による食物アレルギー診療の手引き 2017 (2017)
7. Bufe A, et al. Safety and efficacy in children of an SQ-standardized grass allergen tablet for sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;**123**:167-73.
8. Didier A, et al. Optimal dose, efficacy, and safety of once-daily sublingual immunotherapy with a 5-grass pollen tablet for seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**120**:1338-45.
9. Calderón MA, et al. Guideline recommendations on the use of allergen immunotherapy in house dust mite allergy: Time for a change? *J Allergy Clin Immunol* 2017;**140**:41-52.
10. Sturm GJ, et al. EAACI guidelines on allergen immunotherapy: Hymenoptera venom allergy. *Allergy* 2018;**73**:744-64.
11. Buchanan AD, et al. Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**119**:199-205.
12. Skripak JM et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of milk oral immunotherapy for cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:1154-60.
13. Nurmatov U, et al. Allergen immunotherapy for IgE-mediated food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2017;**72**:1133-47.
14. Meglio P, et al. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy* 2004;**59**:980-87.

15. Patriarca G, et al. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;**17**:459-65.
16. Watanabe H, et al. Heat treatment of egg white controls allergic symptoms and induces oral tolerance to ovalbumin in a murine model of food allergy. *Mol Nutr Food Res*. 2014;**58**:394-404.
17. Hiraide E, et al. Oral Administration of T Cell Epitope Peptide Inhibits the Systemic IL-4 Response Elicited by an Egg-White Diet in a TCR Transgenic Mouse Model. *Biosci Microbiota Food Health* 2014;**33**:47-51.
18. Curin M, et al. Single recombinant and purified major allergens and peptides: How they are made and how they change allergy diagnosis and treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2017;**119**:201-9.
19. Lanier B, et al. Omalizumab for the treatment of exacerbations in children with inadequately controlled allergic (IgE-mediated) asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**124**:1351-2.
20. Blumchen K, et al. Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**126**:83-91.
21. Lucendo AJ, et al. Relation between eosinophilic esophagitis and oral immunotherapy for food allergy: a systematic review with meta-analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014;**113**:624-9.
22. Virkud YV, et al. Novel baseline predictors of adverse events during oral immunotherapy in children with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2017;**139**:882-8.
23. Eberlein-König B, et al. Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization. *Clin. and Exp. Allergy* 1995;**25**:704-12.
24. Plewako H, et al. Basophil Interleukin 4 and Interleukin 13 Production Is Suppressed during the Early Phase of Rush Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;**141**:346-53.
25. Celensnic N, et al. Short-term venom immunotherapy induces desensitization of FcεRI-mediated basophil response. *Allergy* 2012;**67**:1594-1600.
26. James NF, et al. Induction of IL-10⁺CD4⁺CD25⁺ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;**111**:1255-61.

27. Jutel M, et al. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;**33**:1205-14.
28. Radulovic S, et al. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;**121**:1467-72.
29. van de Veen W, et al. IgG₄ production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**131**:1204-12.
30. Meiler F, et al. Distinct regulation of IgE, IgG₄ and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008;**63**:1455-63.
31. Möbs C, et al. Birch pollen immunotherapy results in long-term loss of Bet v 1-specific T_H2 responses, transient T_R1 activation, and synthesis of IgE-blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**130**:1108-16.
32. Kayhan T, et al. Grass Pollen Immunotherapy Induces Mucosal and Peripheral IL-10 Responses and Blocking IgG Activity. *J Immunol* 2004;**172**:3252-59.
33. 中尾篤人. アレルゲン免疫療法の作用機序の基礎 *アレルギー・免疫* 2014;**21**:1044-49.
34. Mübeccel A et al. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**133**:621-31.
35. 大塚篤司. バリア総論 *アレルギー・免疫* 2017;**24**:716-22.
36. Lack G, et al. Epidemiologic risks for food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;**121**:1331-36.
37. Kobayashi T, et al. Eighteen cases of wheat allergy and wheat-dependent exercise-induced urticaria/anaphylaxis sensitized by hydrolyzed wheat protein in soap. *Int J Dermatol* 2015;**54**:e302-5.
38. Fukutomi Y, et al. Epidemiological link between wheat allergy and exposure to hydrolyzed wheat protein in facial soap. *Allergy* 2014;**69**:1405-11.
39. 善本知広. 経皮感作食物アレルギーの分子メカニズム : 二重抗原曝露仮説の実験的エビデンス *アレルギー* 2017;**66**:1224-29.
40. Basophils are required for the induction of Th2 immunity to haptens and peptide antigens. *Nat Commun* 2013;**4**:1738.

41. Yoshimoto T, et al. Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2009;**10**:706-12.
42. Muto T, et al. The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy. *Int Immunol* 2014;**26**:539-49.
43. Haenuki Y, et al. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**130**:184-94.e11
44. Senti G, et al. Determinants of efficacy and safety in epicutaneous allergen immunotherapy: summary of three clinical trials. *Allergy* 2015;**70**:707-10.
45. Sampson HA, et al. Effect of Varying Doses of Epicutaneous Immunotherapy vs Placebo on Reaction to Peanut Protein Exposure Among Patients With Peanut Sensitivity: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2017;**318**:1798-1809.
46. Mondoulet L, et al. Epicutaneous immunotherapy on intact skin using a new delivery system in a murine model of allergy. *Clin Exp Allergy* 2010;**40**:659-67.
47. Mondoulet L, et al. Epicutaneous immunotherapy using a new epicutaneous delivery system in mice sensitized to peanuts. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;**154**:299-309.
48. Dioszeghy V, et al. Epicutaneous immunotherapy results in rapid allergen uptake by dendritic cells through intact skin and downregulates the allergen-specific response in sensitized mice. *J Immunol* 2011;**186**:5629-37.
49. Mondoulet L, et al. Epicutaneous immunotherapy (EPIT) blocks the allergic esophago-gastro-enteropathy induced by sustained oral exposure to peanuts in sensitized mice. *PLoS One* 2012;**7**:e31967.
50. Mondoulet L, et al. Intact skin and not stripped skin is crucial for the safety and efficacy of peanut epicutaneous immunotherapy (EPIT) in mice. *Clin Transl Allergy* 2012;**2**:22.
51. Dioszeghy V, et al. The regulatory T cells induction by epicutaneous immunotherapy is sustained and mediates long-term protection from eosinophilic disorders in peanut-sensitized mice. *Clin Exp Allergy* 2014;**44**:867-81.
52. Mondoulet L, et al. Specific epicutaneous immunotherapy prevents sensitization to new allergens in a murine model. *J Allergy Clin Immunol* 2015;**135**:1546-57.e4.
53. Dioszeghy V, et al. Differences in phenotype, homing properties and suppressive activities of regulatory T cells induced by epicutaneous, oral or sublingual

- immunotherapy in mice sensitized to peanut. *Cell Mol Immunol* 2017;**14**:770-82.
54. Tordesillas L, et al. Epicutaneous immunotherapy induces gastrointestinal LAP+ regulatory T cells and prevents food-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 2017;**139**:189-201.e4.
 55. Mondoulet L, et al. Gata3 hypermethylation and Foxp3 hypomethylation are associated with sustained protection and bystander effect following epicutaneous immunotherapy in peanut-sensitized mice. *Allergy* 2018 May 19. doi: 10.1111/all.13479. [Epub ahead of print]
 56. Matsuo K, et al. Analysis of transcutaneous antigenic protein delivery by a hydrogel patch formulation. *J Pharm Sci* 2013;**102**:1936-47
 57. Kitaoka M, et al. Transcutaneous Peptide Immunotherapy of Japanese Cedar Pollinosis Using Solid-in-Oil Nanodispersion Technology. *AAPS PharmSciTech* 2015;**16**:1418-24.
 58. Kitaoka M, et al. Solid-in-oil nanodispersions for transdermal drug delivery systems. *Biotechnol J* 2016;**11**:1375-85.
 59. von Moos S, et al. The contact sensitizer diphenylcyclopropenone has adjuvant properties in mice and potential application in epicutaneous immunotherapy. *Allergy* 2012;**67**:638-46.
 60. Scheurer S, et al. Epicutaneous immunotherapy. *Allergol Immunopathol* 2017;**45S1**:25-9.
 61. Senti G, et al. Epicutaneous allergen administration as a novel method of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**124**:997-1002.
 62. Wang J, et al. Safety and efficacy of epicutaneous immunotherapy for food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 2018;**29**:341-49.
 63. Teijeira A, et al. T Cell Migration from Inflamed Skin to Draining Lymph Nodes Requires Intralymphatic Crawling Supported by ICAM-1/LFA-1 Interactions. *Cell Rep* 2017;**18**:857-65.
 64. Lämmermann T, et al. The microanatomy of T-cell responses. *Immunol Rev* 2008;**221**:26-43.
 65. Reinhardt RL, et al. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 2001;**410**:101-5.
 66. Masopust D, et al. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001;**291**:2413-7.

67. Austrup F, et al. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 1997;**385**:81-3.
68. Reinhardt RL, et al. Preferential Accumulation of Antigen-specific Effector CD4 T Cells at an Antigen Injection Site Involves CD62E-dependent Migration but Not Local Proliferation. *J Exp Med* 2003;**197**:751-62.
69. Mueller DL, et al. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2010;**11**:21-7.
70. Mora JR, et al. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol* 2006;**27**:235-43.,
71. Sigmundsdottir H, et al. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 2008;**9**:981-7.
72. Woodland DL, et al. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 2009;**9**:153-61.
73. Lindblad EB, et al. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol* 2004;**82**:497-505.
74. Harrison WT, et al. Some observations on the use of alum precipitated diphtheria toxoid. *Am J Public Health Nations Health* 1935;**25**:298.
75. Schnare M, et al. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2001;**2**:947-50.
76. Gavin AL, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 2006;**314**:1936-38.
77. Brewer JM, et al. Aluminium Hydroxide Adjuvant Initiates Strong Antigen-Specific Th2 Responses in the Absence of IL-4 or IL-13-Mediated Signaling. *J Immunol* 1999;**163**:6448-54.
78. Jordan MB, et al. Promotion of B Cell Immune Responses via an Alum-Induced Myeloid Cell Population. *Science* 2004;**304**:1808-10.
79. Wang HB, et al. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. *J Leukoc Biol* 2008;**83**:817-21.
80. McKee AS, et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J Immunol* 2009;**183**:4403-14.
81. Hornung V, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008;**9**:847-56.

82. Eisenbarth SC, et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008;**453**:1122-6.
83. Li H, et al. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J Immunol* 2008;**181**:17-21.
84. Franchi L, et al. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 2008;**38**:2085-9.
85. Kool M, et al. Alum Adjuvant Stimulates Inflammatory Dendritic Cells through Activation of the NALP3 Inflammasome. *J Immunol* 2008;**181**:3755-9.
86. Shi Y, et al. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;**425**:516-21.
87. Kool M, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008;**205**:869-82.
88. Kool M, et al. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. *Immunity* 2011;**34**:527-40.
89. Marichal T, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* 2011;**17**:996-1002.
90. McKee AS, et al. Host DNA released in response to aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;**110**:E1122-31.
91. Flach TL, et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med* 2011;**17**:479-87.
92. Wu LC, et al. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**:247-59.
93. 羽生田圭 ほか. IgE産生の制御機構 *臨床免疫・アレルギー科* 2017;**67**:506-12.
94. Vijayanand P, et al. Interleukin-4 production by follicular helper T cells requires the conserved Il4 enhancer hypersensitivity site V. *Immunity* 2012;**36**:175-87.
95. Harada Y, et al. The 3' enhancer CNS2 is a critical regulator of interleukin-4-mediated humoral immunity in follicular helper T cells. *Immunity* 2012;**36**:188-200.
96. Ozaki K, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 2002;**298**:1630-34.

97. Weinstein JS, et al. TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response. *Nat Immunol* 2016;**17**:1197-1205.
98. Martin RK, et al. Antigen transfer from exosomes to dendritic cells as an explanation for the immune enhancement seen by IgE immune complexes. *PLoS One* 2014;**9**:e110609.
99. Haniuda K, et al. Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. *Nat Immunol* 2016;**17**:1109-17.
100. Daëron M, et al. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest* 1995;**95**:577-85.
101. Uermösi C, et al. IgG-mediated down-regulation of IgE bound to mast cells: a potential novel mechanism of allergen-specific desensitization. *Allergy* 2014;**69**:338-47.
102. Nakajima-Adachi H, et al. Peyer's patches and mesenteric lymph nodes cooperatively promote enteropathy in a mouse model of food allergy. *PLoS One* 2014;**9**:e107492.
103. Nakajima-Adachi H, et al. Critical role of intestinal interleukin-4 modulating regulatory T cells for desensitization, tolerance, and inflammation of food allergy. *PLoS One* 2017;**12**:e0172795.
104. Aoki-Yoshida A, et al. Enhancement of Oral Tolerance Induction in DO11.10 Mice by *Lactobacillus gasseri* OLL2809 via Increase of Effector Regulatory T Cells. *PLoS One* 2016;**11**:e0158643.
105. Shibahara K, et al. Food Allergen-induced IgE Response Mouse Model Created by Injection of in vitro Differentiated Th2 Cell Culture and Oral Antigen Intake. *Biosci Microbiota Food Health* 2014;**33**:41-6.
106. Burggraf M, et al. Oral tolerance induction does not resolve gastrointestinal inflammation in a mouse model of food allergy. *Mol Nutr Food Res* 2011;**55**:1475-83.
107. Hiraide E, et al. Oral administration of ovalbumin after sensitization attenuates symptoms in a mouse model of food allergic enteropathy. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;**81**:1967-72.
108. Ito T, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005;**202**:1213-23.

109. Ebner S, et al. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**119**:982-90.
110. Hussain M, et al. Basophil-derived IL-4 promotes epicutaneous antigen sensitization concomitant with the development of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2018;**141**:223-34.e5
111. Nakahashi-Oda C, et al. Apoptotic epithelial cells control the abundance of Treg cells at barrier surfaces. *Nat Immunol* 2016;**17**:441-50.
112. Suárez-Fariñas M, et al. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. *J Allergy Clin Immunol* 2011;**127**:954-64.
113. Gittler JK, et al. Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**130**:1344-54.
114. Rochman Y, et al. TSLP signaling in CD4+ T cells programs a pathogenic T helper 2 cell state. *Sci Signal* 2018;**11**:eaam8858.
115. Tomura M, et al. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci Rep* 2014;**4**:6030.
116. Komatsu N, et al. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;**106**:1903-8.
117. Nakanishi Y, et al. Regulatory T cells with superior immunosuppressive capacity emigrate from the inflamed colon to draining lymph nodes. *Mucosal Immunol* 2018;**11**:437-448.
118. Nakajima-Adachi H, et al. Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**117**:1125-32.
119. 芝原恭子. 抗原の経口摂取によって誘導されるT細胞応答に関する研究 東京大学 博士論文 2016
120. Miller MJ, et al. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 2002;**296**:1869-73.
121. Katakai T, et al. Dendritic cells regulate high-speed interstitial T cell migration in the lymph node via LFA-1/ICAM-1. *J Immunol* 2013;**191**:1188-99.

122. Katakai T, et al. Autotaxin produced by stromal cells promotes LFA-1-independent and Rho-dependent interstitial T cell motility in the lymph node paracortex. *J Immunol* 2014;**193**:617-26.
123. Rosenblum MD, et al. Regulatory T cell memory. *Nat Rev Immunol* 2016;**16**:90-101.
124. Chalermarp N, et al. Identification of three distinct subsets of migrating dendritic cells from oral mucosa within the regional lymph nodes. *Immunology* 2009;**127**:558-66.
125. Zhang C, et al. Repeated antigen painting and sublingual immunotherapy in mice convert sublingual dendritic cell subsets. *Vaccine* 2014;**32**:5669-76
126. Mascarell L, et al. Oral macrophage-like cells play a key role in tolerance induction following sublingual immunotherapy of asthmatic mice. *Mucosal Immunol* 2011;**4**:638-47.
127. Natsuaki Y, et al. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol* 2014;**15**:1064-9.
128. Tordesillas L, et al. Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. *J Clin Invest* 2014;**124**:4965-75.
129. Tu E, et al. T Cell Receptor-Regulated TGF- β Type I Receptor Expression Determines T Cell Quiescence and Activation. *Immunity* 2018;**48**:745-759.
130. 森永真実子. 免疫療法に向けたアレルゲン経口・経皮投与の食物アレルギーモデルへの影響の解析 東京大学 修士論文 2016
131. Liu XY, et al. Forkhead box protein-3 (Foxp3)-producing dendritic cells suppress allergic response. *Allergy* 2017;**72**:908-917.
132. 平出恵利華. 食物アレルギー反応の制御を目的としたモデルマウスにおける免疫細胞の動態解析 東京大学 博士論文 2015

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 28 年度博士課程進学
氏名 森永真実子
指導教員 八村敏志

論文題目

食物アレルギーの経皮免疫療法モデルの
確立と機構解析

研究の背景と目的

食物アレルギーとは、本来は生体の維持に必要である食物に対し、不利益な免疫応答が引き起こされる免疫性疾患である。食物アレルギーへの治療として、原因食物の摂取を避ける除去法、既に起きてしまった症状を抑制する薬物療法が主に行われているが、これらは対症療法にすぎず、根本的な治療にはならない。そこで現在、アレルゲンを生体に曝露することで、アレルゲンへの免疫応答を変化させ、アレルギー症状を寛解させる、アレルゲン免疫療法（**allergen immunotherapy; AIT**）の研究が進んでいる。

皮膚は、抗原感作の場として近年注目を集めている。「経皮的に食物アレルゲンに曝露されると感作が成立し、適切な量とタイミングで経口摂取された食物抗原はむしろ免疫寛容を誘導する」という二重抗原曝露仮説が 2008 年に提唱された。また、2010 年には小麦由来タンパク質を含む石けんの使用による小麦アレルギーの発症事例が社会問題となった。一方、免疫応答を亢進する組織においては、同時に過剰な反応を抑える働きも誘導されることが知られている。現に、皮膚からの抗原投与によって、感作ではなくむしろアレルギー症状を緩和する、経皮免疫療法（**epicutaneous immunotherapy; EPIT**）が報告され始めた。本研究においては、新規 EPIT モデルの確立とその作用機序の解析を行い、経皮および経口のアレルゲン曝露に対する免疫応答を制御する仕組みの解明および臨床治療への応用に有用な科学的知見を提供することを目的とした。

第1章 食物アレルギーの経皮免疫療法モデルの確立

野生型の BALB/c マウスに、卵白アルブミン (OVA) を alum アジュバントとともに腹腔注射して抗原感作し、続いて卵白含有飼料 (卵白食) を自由摂食させると、全身性の食物アレルギー様症状が誘導される。この食物アレルギーモデルに対して、抗原感作後に継続的に OVA を経皮投与することで、卵白食摂食時のアレルギー症状を抑制する EPIT モデルを確立した。

まず、剃毛、除毛、ストリッピングなどの前処理を行わない、健全な皮膚からのアレルギー投与法を検討した。マウスを OVA に感作した後、耳皮膚に蛍光標識 OVA 溶液を塗布した。一定時間後、皮膚所属リンパ節 (DLN) から細胞を得て、抗原提示能を持つ CD11c⁺ 細胞への蛍光標識 OVA の取り込みを解析した。蛍光標識 OVA は健全な皮膚において CD11c⁺ 細胞へと取り込まれ、所属リンパ節へと輸送されることが示唆された。

続いて、EPIT によるアレルギー症状への効果を検討した。BALB/c マウスを同様に抗原に感作し、続いて、EPIT として、マウスの耳皮膚に OVA 溶液を繰り返し経皮投与した。EPIT 期間終了後、卵白食を自由摂食させて食物アレルギー症状を誘導した。OVA 溶液で EPIT を行なった群では、溶媒のみを塗布した control 群に比べ、卵白食摂食時の体重減少および直腸温の降下が有意に緩和された。また、T 細胞媒介性腸炎において、絨毛長の短縮が有意に緩和された。このように、抗原感作後に適切な量と頻度でアレルギーを経皮投与することで、抗原食物摂食時のアレルギー症状を抑制する EPIT モデルの確立に成功した。

アレルギー反応には IgE 抗体が関与することが知られている。OVA 特異的 IgE 抗体レベルを実験期間を通して追跡した。EPIT 期間の OVA 投与の影響による OVA 特異的 IgE レベルの有意な上昇は認められなかった一方で、卵白食摂食による OVA 特異的 IgE の産生は EPIT によって有意に抑制された。また、免疫反応の抑制には Foxp3 分子を発現する制御性 T 細胞 (Treg) が機能することが知られている。EPIT 群では、脾臓 (SPL)、腸間膜リンパ節 (MLN) において CD4⁺T 細胞の Foxp3 発現頻度が有意に上昇した。

EPIT 期間直後の免疫組織から CD4⁺T 細胞を得て、OVA 刺激下で培養することで、EPIT による免疫系への影響を解析した。DLN 由来 CD4⁺T 細胞を OVA 刺激下で培養すると、インターロイキン-4 の産生が抗原濃度依存的に誘導された。このとき同時に、OVA 特異的な Treg が誘導されることが示唆された。SPL、MLN ではこのような影響は安定して見られず、EPIT の明らかな作用は局所にとどまっていた。

本章では、健全な皮膚への OVA 投与によって、卵白食摂食時のアレルギー症状が改善する、新しい EPIT モデルを確立することに成功した。本 EPIT モデルでは、OVA に感作したマウスへの OVA 経皮投与により、DLN において局所的に OVA 特異的 Th2 細胞応答が誘導され、それに伴って、OVA 特異的 Treg が誘導された。続いて、卵白食を自由摂食させて食物アレルギー症状を誘導すると、SPL および MLN において Treg の割合が増加し、腸炎症を含む全身のアレルギー

症状が EPIT により緩和することが示された。

第2章 局所的な免疫応答が全身の反応に影響する機構の解析 (1)

所属リンパ節における局所応答の重要性

皮膚所属リンパ節局所における免疫応答が全身性のアレルギー症状の緩和に必要であるか解析するため、EPIT 期間後に、EPIT によって OVA 特異的 T 細胞応答が誘導された DLN (EPIT-DLN) を切除し、続いて卵白食を摂食させてアレルギー症状を誘導した。

DLN を切除しても、体重減少の緩和、卵白食摂食時の OVA 特異的 IgE レベルの低下は維持された。一方で、EPIT-DLN を切除すると、EPIT モデルにおいて見られた、T 細胞媒介性腸炎の改善、SPL、MLN における Foxp3 発現頻度の上昇が失われた。このことから、T 細胞による症状の抑制には、EPIT-DLN 由来の T 細胞の寄与が大きいことが示唆された。

次に、EPIT-DLN の T 細胞にアレルギー症状を緩和する効果があるか解析するため、OVA 感作したマウスに EPIT-DLN から得た CD4⁺T 細胞を移入した後、卵白食を摂食させてアレルギー症状を誘導した。

EPIT-DLN の CD4⁺T 細胞を移入しても、卵白食を摂食させたときのアレルギー症状は緩和しなかった。SPL、MLN における CD4⁺T 細胞の Foxp3 発現頻度の上昇、卵白食摂食時の OVA 特異的 IgE 産生の抑制も認められず、EPIT-DLN の CD4⁺T 細胞のみによっては、EPIT の効果は再現されなかった。

第3章 局所的な免疫応答が全身の反応に影響する機構の解析 (2)

KikGR マウスを用いた細胞動態の解析

EPIT により DLN 局所に誘導された免疫応答が全身のアレルギー症状に影響する仕組みを細胞動態から解明するため、KikGR マウスを用いた。KikGR マウスは、紫色光を照射することで波長が変化し、kik-Green から kik-Red となる蛍光タンパク質 Kikume Green-Red (KikGR) を全身の細胞で発現しており、生体内における細胞の移動を追跡することができる。この KikGR マウスと BALB/c マウスを交配し作製した BALB-Kik マウスにおいて、本 EPIT モデルが再現されることを確認できた。

この BALB-Kik マウスを OVA に感作し、3 週間の EPIT を行なった。続いて、DLN に紫色光を照射して EPIT-DLN 細胞を標識した後、卵白食を摂食させて、EPIT-DLN 細胞の動態と表現型を解析した。OVA 経皮投与と卵白食摂食、それぞれの影響を解析するため、実験群として、control-EW 群 (control 経皮投与-卵白食摂食)、EPIT-EW 群 (OVA 経皮投与-卵白食摂食)、EPIT-CN 群 (OVA 経皮投与-control 食摂食) の 3 群を設定した。

SPL、MLN の T 細胞のうち、DLN から移動した Kik-Red⁺ 細胞の割合には、各群間で有意な

差は見られなかった。DLN から移動せず残留した細胞の割合も、各群間に有意な差は認められなかった。すなわち、卵白食由来の OVA 刺激による、EPIT-DLN 由来 T 細胞の移動や細胞増殖への影響は観察されなかった。

次に、CD4⁺ 細胞中の Foxp3⁺ 細胞の割合を解析した。CD4⁺ 細胞全体における Foxp3 発現細胞の割合は、control-EW 群、EPIT-EW 群ともに、EPIT-CN 群より高く、卵白食摂食によって上昇する傾向が見られた。DLN 由来の Kik-Red⁺ CD4⁺ 細胞中においても同様に、卵白食摂食によって Foxp3 発現が上昇する傾向が見られた。

経口免疫寛容において誘導された Foxp3 発現細胞のうち、CD62L^{low} 細胞は特に抑制活性が強いことが報告されている。そこで、CD4⁺ 細胞中の Foxp3⁺ CD62L^{low} 細胞の割合を解析した。CD4⁺ 細胞全体における Foxp3⁺ CD62L^{low} 細胞の割合は、Foxp3⁺ 細胞の割合と同様に MLN において卵白食摂食群で上昇する傾向が見られたが、SPL、DLN においては他群との有意な差は認められなかった。一方で、興味深いことに、Kik-Red⁺ CD4⁺ 細胞中における Foxp3⁺ CD62L^{low} 細胞の割合は、control-EW 群 < EPIT-EW 群 < EPIT-CN 群となる傾向が MLN においてのみ観察された。このことは、EPIT により DLN 局所で誘導された Foxp3⁺ CD62L^{low} 細胞が、卵白食摂食時に炎症を起こした MLN、腸管組織へと移動し、過剰応答を抑制する Treg として機能する可能性を示唆している。

総括

本研究では、食物アレルギーを抑制する EPIT モデルを作製した。このモデルでは、アレルゲン経皮投与によって DLN 局所に特異的応答が誘導され、抗原食摂食時に全身のアレルギー症状が抑制された。さらに、この局所応答-全身症状の関係に着目して機構を解析し、アレルゲン経皮投与により局所応答を誘導された T 細胞が食物アレルギー発症時に MLN へと移動し、症状の抑制に寄与している可能性を示唆した。本研究で得られた知見は、AIT におけるアレルゲン投与部位の免疫応答とアレルギー発症部位の免疫応答をつなぐシステムの解明に寄与し、より安全で効果的な治療法の確立に貢献しうる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、学生の意見に常に耳を傾けてくださり、多くのディスカッションを通して丁寧なご指導をいただきました、東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター免疫制御研究室、八村敏志准教授に心より感謝いたします。

実験手技をご教授くださり、臨床の見地からのご意見をくださるとともに、時には暖かく励ましてくださった、東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター免疫制御研究室、足立はるよ特任助教に心より感謝いたします。

組織解析に関する実験手技をご教授くださるとともに、実験設備を快く提供してくださいました、東京都医学総合研究所花粉症プロジェクトの廣井隆親プロジェクトリーダー、北村紀子研究員、山梨大学大学院総合研究部医学域総合分析実験センター資源開発分野の神沼修准教授に深く感謝いたします。

KikGR マウスをご供与くださいました、大阪大谷大学薬学部免疫学講座の戸村道夫教授に深く感謝いたします。

OVA23-3 マウスをご供与くださいました、順天堂大学医学部免疫学講座の垣生園子客員教授に深く感謝いたします。

RT-PCR を行う際に実験装置をお貸し下さいました、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食糧化学研究室、内田浩二教授に深く感謝いたします。

合同ゼミなどを通し的確な御意見をくださいました、日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品機能化学教室、戸塚護教授に深く感謝いたします。

ディスカッションなどを通し本研究の発展をご支援くださいました、鳥居薬品株式会社研究所、土井雅津代博士に深く感謝いたします。

実験の手技をはじめとして、研究生活に関する多くのことを親切に教えてくださった、免疫制御研究室の先輩方に心より感謝いたします。

研究生活をともに過ごし、時には実験の手助けをしてくれた、免疫制御研究室の同期と後輩達に心より感謝いたします。

最後に、私を様々な面でサポートし、見守ってくれた家族に感謝いたします。

平成 30 年 12 月 森永真実子