

博士論文（要約）

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

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 25 年度進学 芝原恭子  
指導教員 八村敏志

## 目次

略語一覧	1
緒言	3
第一章 抗原特異的 Th2 細胞を介した、経口摂取した抗原に対する IgE 抗体産生の解析	
序	15
材料と方法	16
結果	19
考察	21
図	25
第二章	26
第三章	27
総合討論	28
参考文献	29
謝辞	36

## 略語一覧

Ab	antibody ; 抗体
APC	allophycocyanin
APC	antigen presenting cell ; 抗原提示細胞
BSA	bovine serum albumin ; ウシ血清アルブミン
CCL	CC-chemokine ligand; CC-ケモカインリガンド
CCR	CC-chemokine receptor; CC-ケモカイン受容体
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid ; 相補鎖 DNA
CT	cholera toxin; コレラトキシン
CXCR	CXC-chemokine receptor; CXC-ケモカイン受容体
Cy	cyanine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DC	dendritic cell ; 樹状細胞
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay ; 酵素免疫測定法
EW	egg white
FACS	fluorescence-activated cell sorter ; 蛍光表示式細胞分取器
FCS	fatal calf serum ; ウシ胎仔血清
FITC	fluorescein isothiocyanate
Foxp3	forkhead box P3
GALT	gut-associated lymphoid tissue; 腸管関連リンパ組織
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GC	germinal center; 胚中心
GlyCAM	glycosylation dependent cell adhesion molecule 1
HBSS	Hank's balanced salt solution
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
IRF	interferon regulatory factor
MACS	magnetic cell sorting ; 磁気細胞分離システム
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
mRNA	messenger ribonucleic acid ; 伝令 RNA
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
PE	phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein
PI	propidium iodide; ヨウ化プロピジウム
PP	Peyer's patch; パイエル板
Rag	recombination-activating gene
RagD10	Rag2 <sup>-/-</sup> DO11.10
siLP	small intestinal lamina propria; 小腸粘膜固有層
TCR	T cell receptor ; T細胞抗原レセプター
Tfh	follicular helper T
TGF	transforming growth factor ; 形質転換成長因子
Th	T-helper
Tr1	T regulatory type 1

## 緒言

### 腸管免疫系

免疫とは、自己と非自己を区別して、体内に侵入した異物を排除する生体の防御システムである。体内にはリンパ節や骨髄をはじめとした免疫に関わる器官が点在しているが、その中でも最も大きな免疫器官が腸管である。腸管管腔中には食物だけではなく、口や鼻から入り込んだ様々な異物が存在する。この異物の中には、生態にとって有害な微生物なども含まれており、腸管免疫系はそれらを排除しなければならない。腸管免疫系の代表的な防御機構がイムノグロブリン (Immunoglobulin; Ig)A 抗体の産生である。IgA 抗体は、リンパ球の一種である B 細胞から分化した抗体産生細胞によって産生される、粘膜面に特有の抗体であり、腸管管腔中に輸送された IgA 抗体は微生物に結合して生体内への侵入を防ぐ[1]。このような機構を介して有害な微生物を排除する一方、腸管免疫系は生体にとって有益な共生微生物や食品タンパク質に対しては、過敏な免疫応答を起こさないように制御されている。特に食品タンパク質に対して免疫応答が抑制される現象は経口免疫寛容と呼ばれ、食物アレルギーの抑制機構の一つであると考えられている[2]。また近年、共生細菌は宿主免疫系に様々な影響を与えることが明らかになってきている。例えば、IgA 抗体の効率のよい産生に寄与したり、免疫抑制活性をもった制御性 T 細胞を腸管で誘導したりすることが報告されている[3], [4]。また、無菌マウスにおいては腸管免疫系の発達が不十分であることから、腸内共生菌と宿主免疫系の相互作用は腸管免疫系の恒常性の維持に必要なものであると考えられる[5]。以上のように、腸管免疫系は様々な異物に対して適切な反応を示すように複雑に制御されている (Fig. 1-1 上段)。

腸管免疫系は、複数の免疫組織によって構成される。腸管管腔と生体は一層の上皮細胞で仕切られているが、上皮細胞中には上皮間リンパ球が点在して感染初期の防御にはたらくと考えられている。小腸の中には一部絨毛が未発達な領域が点在しており、その下部には、T 細胞や B 細胞といったリンパ球が集積したパイエル板という組織が存在している。また、絨毛の内部の粘膜固有層にも免疫細胞が多数存在しており、さらにパイエル板とは起源を異にすると考えられる孤立リンパ小節が多数存在している[6]。これらの器官は腸管関連リンパ組織と総称される。腸管関連リンパ組織で活性化した免疫細胞は、リンパ管を通じて体内で最大のリンパ節である腸間膜リンパ節に移動して免疫応答を誘導する。腸間膜リンパ節からリンパ管を通じて流出した細胞は血管系に乗って全身を循環すると考えられる点からも、腸間膜リンパ節は腸管関連リンパ組織と全身免疫系の橋渡しとなる器官であるといえる。また、小腸で吸収された栄養素は門脈を通じて肝臓に輸送されるが、それに伴い一部の抗原も肝臓に流入することが考えられる。肝臓には特徴的な免疫細胞が多数存在し、流入した抗原に対する免疫応答を抑制する機能を有することが示唆されている[7]。なお、パイエル板や腸間膜リンパ節といったリンパ組織の内部は、リンパ球が多量に集積した構造になっており、さらに、B 細胞の領域、T 細胞の領域といった局所構造が認められ、免疫応答が効率的に起こるようになっている。以上のように、腸管免疫系は多くの器官によって構成され、これらが複合的にはたらいて異物の侵入から生体を守っていると考えられる (Fig. 1-1 下

段)。

### 経口免疫寛容

経口的に摂取した食品タンパク質が抗原性を保ったまま生体に取り込まれたとき、全身における免疫応答が抑制される現象を経口免疫寛容という。その誘導は、取り込まれた抗原に特異的なCD4<sup>+</sup>T 細胞の変化に依存していることがわかっており、そのメカニズムとして、抗原特異的 T 細胞における低応答化・クローン消失・制御性 T 細胞の誘導という三つの経路が知られている[8](Fig. 1-2)。低応答化とは、抗原刺激に対して T 細胞の増殖応答性やサイトカイン産生能が低下している状態を示す[9], [10]。当研究グループではこれまでに、そのメカニズムについて T 細胞抗原レセプター(T cell receptor; TCR)シグナル下流の Ca<sup>2+</sup>経路が障害されることにあることを示している[11]。クローン消失とは、抗原特異的 T 細胞にアポトーシスが誘導されて除去されることである[12], [13]。また、抗原特異的 T 細胞から誘導された、免疫抑制機能に特化した T 細胞サブセットである制御性 T 細胞が、免疫応答を能動的に抑制する[14]。これら三つのメカニズムは独立で機能しているわけではなく、それぞれが関連し合っていることが予想される。例えば、制御性 T 細胞自体が低応答化状態にあり、アポトーシスの誘導は制御性 T 細胞の機能の一つである[15]。経口免疫寛容状態においては、その抗原で免疫を行っても全身における抗体産生の誘導が抑制されることが示されており、このような現象は、T 細胞の上記の機構による応答低下によると考えられている[16]。

経口摂取したタンパク質が体内に取り込まれる場所は小腸であると予想されるため、タンパク質が初めて免疫系に認識される場所は腸管関連リンパ組織であると考えられる。これまでに、腸間膜リンパ節が経口免疫寛容の誘導に必要であるという報告があり、また腸管免疫系が十分発達していない無菌マウスでは経口免疫寛容が誘導されにくいとする報告がある[17], [18]。以上の報告からも、腸管免疫系が経口免疫寛容の誘導に重要であることが考えられる。

経口免疫寛容は抗原の経口摂取によって、抗原特異的に免疫応答が抑制されることから、免疫疾患の治療への応用が期待されている。治療法として応用した場合、その抗原特異性から、免疫抑制剤使用時のような感染リスクの拡大を伴わないと考えられる。また、抗原の経口摂取という簡便さから、注射などの投与方法のような苦痛がほとんどない点も利点である。したがって、経口免疫寛容の誘導メカニズムを詳細に理解することは重要である。しかしながら、なぜ経口摂取した抗原に対しては上記のような T 細胞応答が誘導されるのか、そのメカニズムの全容は十分明らかになっておらず、今後の解析が期待される。

### 食物アレルギー

食物アレルギーとは、原因食物を摂取したときに免疫系が過剰に反応して、かゆみなどの皮膚症状、呼吸困難などの呼吸器症状、口腔内の腫れなどの粘膜症状、腹痛や嘔吐などの消化器症状といった、多岐にわたる症状を示す疾患である。重篤な場合には、アナフィラキシーと呼ばれる全身性の急激な反応によって呼吸困難や血圧の低下を伴い、命に関わることがある。原因となる

食物は、国、文化によって多少異なるが、日本においては鶏卵、牛乳、小麦、甲殻類の順で多い[19]。食物アレルギーは、多くの調査より成人の約5%、小児の約8%が罹患していると推測される[20]。小児の場合、成長に伴って寛解する場合があることが食物アレルギーの特徴であるが、成長後の寛解は起こりにくいと考えられている。

食物アレルギーに対する現在の主な対処法は原因食物の除去と、症状を呈したときに抗ヒスタミン薬などを投与する薬物療法であるが、いずれも対症療法である。食物アレルギー患者は普段から原因食物を摂取しないように気をつけなければならないが、鶏卵や小麦など広く使われる食品が原因食物の場合には特に心理的負担が大きい。また、特に小児の場合には栄養学的障害も生じる。さらに、気がつかないまま原因食物を口にしまい、事故となる場合もある。このような現状から、近年開発が進められている治療法が経口免疫療法である。経口免疫療法とは、専門の医師の指導のもとで少量から原因食物を摂取し、徐々に摂取量を増やしていき、経口免疫寛容の誘導を試みる治療法である。この方法は、投与中にアレルギー症状を呈して治療を中断しなければならない場合があるという問題がある[21]。また、短期間に行う急速療法も試みられているが、主な方法は長期間にわたるため、患者にとって手間のかかるものである。以上のような現状から、食物アレルギーの根本的な治療法の早急な開発が望まれている。

アレルギーはその発症メカニズムによってIからIV型に分類されるが、食物アレルギーにおいてはI型が最も主要な発症メカニズムである。その反応の大まかな流れとしては、まず腸管で十分に消化されず抗原性を保ったまま取り込まれた抗原が抗原提示細胞(Antigen presenting cells; APC)に貪食される。APCは取り込んだ抗原をCD4<sup>+</sup>T細胞に提示し、CD4<sup>+</sup>T細胞は2型ヘルパーT(Th2)細胞に分化する。Th2細胞は炎症性サイトカインの一種、インターロイキン(Interleukin; IL)-4を分泌する。IL-4はB細胞を、抗原に結合するIgE抗体を産生する抗体産生細胞に分化させる。分泌されたIgE抗体は全身に存在するマスト細胞上にあるIgE抗体受容体に結合する。ここまでの反応がすでに体内で起こっていることを、感作が成立しているという。再び抗原が体内に侵入すると、マスト細胞上のIgE抗体に結合して架橋する。それにより、マスト細胞から化学伝達物質であるヒスタミンが分泌され、症状が誘発される(Fig. 1-3)[22]。このような反応の根幹には、CD4<sup>+</sup>T細胞から分化したTh2細胞の過剰な応答がある。前項で説明した経口免疫寛容とはCD4<sup>+</sup>T細胞の反応が大きく異なるが、なぜこのような違いが起こるのかは十分明らかになっていない。そのため、食物アレルギーの治療法の開発のためにも、経口摂取した抗原に対するCD4<sup>+</sup>T細胞の応答を詳細に解析する必要があると考えられる。

### T細胞の抗原特異性

ここまでに、腸管免疫系では有害な異物を認識して排除するが、自己に有益な異物には過敏な応答はしないこと、特に食品タンパク質に対しては、通常経口免疫寛容が成立するが、過剰な免疫応答が起こると食物アレルギーを発症することを述べた。このような、特定の異物に対して過敏な応答をしない、もしくは排除するという決定を免疫系がするためには、異物を区別して認識する機構が必要となる。異物を区別して応答するときの起点となる細胞がCD4<sup>+</sup>T細胞である。一つの



T 細胞上には一種類の TCR が発現しているが、私たちの体の中には様々な抗原に特異的な TCR を持った T 細胞が存在し、抗原特異的に応答することで、外界に存在する無数の異物を区別することができる。CD4<sup>+</sup>T 細胞は、樹状細胞などの APC 上の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) クラス II 分子上に提示された抗原を TCR で認識することで応答する。様々な種類の異物に対応した TCR を作り出せるのは、T 細胞の発生段階で TCR 遺伝子の組み換えが起こるからである。T 細胞の前駆細胞である造血幹細胞は、骨髄で分化した後、T 細胞の「教育の場」と称される胸腺に移動する。T 細胞は成熟する過程で TCR 遺伝子上の可変領域、すなわち V(D)J 領域から遺伝子断片をランダムに切り出して結合する。この過程によってさまざまな TCR を持った T 細胞が生み出されることになる。TCR 遺伝子が組み換えられた T 細胞のうち、自己抗原に強く応答する細胞は除去され、弱く応答する細胞は抑制活性を有する内在性制御性 T 細胞に分化することがこれまでに示唆されており、これにより自己免疫疾患の発症が防がれると考えられている[23]。なお、この遺伝子再編成の過程により、ヒト TCR のレパートリーは約  $10^7$  に上ると報告されている[24]。以上のような仕組みによって生み出された多彩な TCR のレパートリーが、抗原特異的な応答を可能にする。

### TCR トランスジェニックマウス

一個体の T 細胞は、様々な抗原に特異的な TCR を持った T 細胞の集団である。よって、通常のマウスにおいてはひとつの抗原に結合する TCR を持った T 細胞の頻度は非常に低いため、抗原特異的 T 細胞の応答を詳細に解析することは難しい。そこで、本研究では TCR トランスジェニックマウスを用いた。DO11.10 マウスは卵白アルブミン(OVA)の 323-339 残基に特異的に結合する TCR の遺伝子が挿入されたマウスであり、CD4<sup>+</sup>T 細胞の約半分が OVA 特異的 T 細胞となる[25]。DO11.10 マウスに挿入された遺伝子による TCR に、特異的に結合する抗体を用いることで、抗原特異的 T 細胞の詳細な解析が可能である。さらに、実験によっては遺伝子再編成に必要な *Rag2* 遺伝子をノックアウトした *Rag2*<sup>-/-</sup> DO11.10 マウス(RagD10 マウス)を用いた。RagD10 マウスでは遺伝子再編成が起こらないため、T 細胞および B 細胞の分化が阻害され、すべての CD4<sup>+</sup>T 細胞が OVA 特異的となると考えられる(Fig. 1-4)。DO11.10 マウスおよび RagD10 マウスは、OVA を経口投与することで抗原特異的 T 細胞の応答が低下することが示されており、経口免疫寛容のモデルマウスとして用いることができることを、当研究グループにおいてもすでに報告している[26], [27]。本研究では、これらの DO11.10 マウスおよび RagD10 マウスを用いて抗原特異的 T 細胞の応答を詳細に解析した。

### CD4<sup>+</sup>T 細胞のはたらき

胸腺で成熟した CD4<sup>+</sup>T 細胞は、血管系に乗って全身を循環しリンパ節に流入する。このような細胞は、まだ抗原と出会っていない未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞と呼ばれる。APC から MHC クラス II 分子を介して抗原を提示され、刺激を受けとった抗原特異的 T 細胞は、周囲のサイトカイン環境に依存して様々なサブセットに分化することが知られている。Th1 細胞、Th2 細胞、制御性 T 細胞な

どのサブセットが知られているが、各サブセットによって主に産生するサイトカインが異なることで、免疫応答の性質が異なってくる[28]。すなわち、未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞がどのような性質を持ったサブセットに分化するのかが、免疫応答の方向性を決定する重要な要因となる。なお、未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞と抗原を認識してサブセットに分化した細胞は、CD62L と CD44 という感作マーカーである細胞表面分子で区別することができる。未感作 T 細胞は CD62L<sup>high</sup>CD44<sup>low</sup> の表現型を示すが、感作を受けると CD62L の発現を低下させ、CD44 の発現を増加させることが知られている[29], [30]。

#### ・主な CD4<sup>+</sup>T 細胞のサブセット

##### ① Th1 細胞

IL-12 が豊富な環境下のときに分化する T 細胞である。インターフェロン(Interferon; IFN)- $\gamma$  などのサイトカインを産生し、マクロファージや細胞傷害性 T 細胞を活性化することで、ウイルスや病原菌に感染した細胞の除去にはたらくサブセットである。

##### ② Th2 細胞

抗原刺激とともに IL-4 刺激を受けたときに分化する T 細胞である。産生するサイトカインは IL-4、IL-5 や IL-13 であり、その反応が過剰なときはアレルギー反応を亢進させてしまうが、通常は B 細胞を活性化することで抗体産生を促し、ウイルスや寄生虫などの細胞外の異物を除去することにはたらく。IL-5 や IL-13 は好酸球や好塩基球を活性化することで炎症を誘導する。Th1 細胞と Th2 細胞はそのサイトカイン産生によってお互いにはたらきを抑制し合い、拮抗することが知られている。

##### ③ Th17 細胞

形質転換成長因子(Transforming growth factor; TGF)- $\beta$  と IL-6 によって誘導されるサブセットであり、IL-17 を高産生することから Th17 細胞と呼ばれる。定常状態においても腸管に多く存在する細胞である。また、真菌などの感染防御にはたらく一方で、自己免疫疾患の誘導に関与することが知られている。

##### ④ 制御性 T 細胞

ここまで説明した Th1、Th2、Th17 細胞はそれぞれ免疫応答を亢進するサブセットであるが、制御性 T 細胞はこれらとは反対に、免疫応答を負の方向に制御する。過剰な免疫応答を抑制し、生体の恒常性を維持するために重要なサブセットである。抑制機能としては、APC の成熟の阻害、T 細胞の増殖因子である IL-2 の消費、アポトーシスの誘導、TGF- $\beta$  や IL-10 といった抑制性サイトカインの産生と多岐に渡ることがわかっている[31]。制御性 T 細胞は未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞から分化するほか、胸腺で自己抗原に反応する T 細胞の一部から分化することが知られている。胸腺で分化した細胞を内在性制御性 T 細胞と呼ぶ。対して、未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞の一部が抗原刺激と共に TGF- $\beta$  を受容して分化した場合には、誘導性制御性 T 細胞と呼ばれる。内在性制御性 T 細胞は Neuropilin-1 という細胞表面分子を発現する細胞として、誘導性制御性 T 細胞と区別できることが明らかになっている[32]。

制御性 T 細胞に高発現する転写因子として、Forkhead box P3 (Foxp3)が知られている。T 細胞に Foxp3 を強制発現すると抑制活性を持つようになること、また Foxp3 遺伝子を欠損させると自己免疫疾患の発症を抑制する能力が失われることが報告され、制御性 T 細胞の誘導に必要な転写因子であるとされている[33], [34]。しかしながら、その一方で一部の抑制活性を持った細胞は Foxp3 の発現を必要としないことが報告されている。IL-10を高産生する T regulatory type 1 (Tr1)細胞、IL-35 を高産生する T 細胞、膜結合型 TGF- $\beta$ である Latency-associated peptide を発現する細胞についてこれまでに報告がある[35]–[38]。また、Foxp3<sup>+</sup>細胞の中でも、環境によっては Th1 細胞に発現する T-bet を発現して Th1 応答を特に抑制するという報告や、Th2 細胞に発現する Interferon regulatory factor (IRF)4 を発現して Th2 応答を抑制するという報告がある[39], [40]。以上のように、制御性 T 細胞の中にも様々な性質を持つ集団が存在すると考えられ、これらの誘導は周囲の環境に依存するのか、それぞれの集団が異なる機構によって免疫応答の抑制に寄与するのかなど、不明な点もいまだに多い。

経口免疫寛容における制御性 T 細胞の重要性は先に述べた通りであるが、これまでに内在性制御性 T 細胞は経口免疫寛容の誘導に必要ではないことが報告されている[41]。よって、抗原特異的な誘導性制御性 T 細胞が経口免疫寛容の誘導に重要であると考えられる。また、これまでに経口免疫寛容において Foxp3<sup>+</sup>細胞の重要性について報告されている一方で、Foxp3 を必要としない TGF- $\beta$ を産生する Th3 細胞が誘導されるという報告や、IL-10を産生する Tr1 細胞が誘導されるという報告がある[14], [38], [42], [43]。このように、経口免疫寛容においても複数の制御性 T 細胞の集団がはたらくことが示唆されるが、これらが同時に誘導されているのか、それぞれがどのように経口免疫寛容の誘導に寄与するのかはわからない。したがって、制御性 T 細胞についての詳細な解析は経口免疫寛容の誘導メカニズムをさらに詳しく明らかにするために必要であると考えられる。

#### ⑤ 濾胞ヘルパー T 細胞(Follicular helper T cell; Tfh cell)

Tfh 細胞は比較的新しく発見された T 細胞サブセットであり、リンパ組織の中でも B 細胞領域および胚中心に局在することで B 細胞の抗体産生を補助する細胞である[44]。CXC-ケモカイン受容体 (CXCR)5 や Programmed death (PD)-1 を高発現することが知られている。Inducible T-cell co-stimulator (ICOS)や CD40L を介して B 細胞と相互作用し、IL-4 や IL-21 といったサイトカインを産生して B 細胞を活性化する。また転写因子 B-cell lymphoma (Bcl)6 がその機能に重要であると考えられており、Bcl6<sup>-/-</sup>マウスでは Tfh 細胞の誘導が見られないことが報告されている[45]。Tfh 細胞と相互作用することにより、B 細胞は高親和性抗体を産生することができる。これまでは B 細胞の抗体産生には Th2 細胞が主に関与すると考えられてきたが、近年 Tfh 細胞が大きく関与することが明らかになってきた。しかしながら、アレルギー反応における抗体産生における Tfh 細胞の機能解析は不十分であり、今後の解析が期待される。

#### ・ケモカインによる CD4<sup>+</sup>T 細胞の遊走

ケモカインによる情報伝達は、リンパ球の局所への移動を制御する機構として重要である[46]。

様々な細胞から分泌されたケモカインは、T細胞表面に発現するケモカインレセプターに受容されて、T細胞はその方向に誘引される。これまでにケモカインは約50種類、ケモカインレセプターは約20種類が関わる事が明らかになっており、これらが複雑に制御され、T細胞を含むリンパ球が適切な部位に遊走する。Th1細胞には主にCXCR3やCC-ケモカイン受容体(CCR)5が、Th17細胞にはCCR6が主に発現して炎症部位に集積することが示されている。また、Tfh細胞の胚中心への遊走はCXCR5に依存する。また、組織特異的なケモカインレセプターも報告されており、代表的なものとして腸管ホーミングレセプターとしてCCR9が、皮膚や肺へのホーミングレセプターとしてCCR4が知られている。

#### ・メモリーT細胞

未感作CD4<sup>+</sup>T細胞はTh1、Th2およびTh17細胞といったサブセットに分化して免疫応答を亢進し異物を除去した後、その多くが死滅する。しかしながら、抗原が除去された後も一部のCD4<sup>+</sup>T細胞が長期間にわたって体内に生存することが知られており、そのような細胞をメモリーT細胞という。メモリーT細胞の存在によって、同じ抗原が再び侵入したときに初回よりも速やかに応答することができる。メモリーT細胞はセントラルメモリーT細胞とエフェクターメモリーT細胞に大別される[47]。これら二つの細胞は機能が異なることがこれまでにわかっており、セントラルメモリーT細胞は抗原の再刺激を受けると増殖した後にエフェクター細胞に分化する一方、エフェクターメモリーT細胞は抗原の再刺激の後速やかにサイトカインを産生して再感染を防ぐことがわかっている。また、セントラルメモリーT細胞はCD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>細胞であり、エフェクターメモリーT細胞はCD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>細胞として規定される。近年、エフェクターメモリーT細胞中には、特定の組織に局在する組織常在型メモリーT細胞が含まれることがわかり、CD103を発現して組織に局在し、その組織における免疫記憶をもたらすと考えられている[48]。

以上のように、CD4<sup>+</sup>T細胞の応答は綿密に制御されている。CD4<sup>+</sup>T細胞の応答が適切に制御されることは、生体の恒常性を維持する上で欠かせないことである。

#### B細胞による抗体産生

B細胞は抗体産生細胞に分化する細胞であり、骨髄内部における分化過程でB細胞抗原レセプターの組み換えが起こることで、多様な抗体を作ることができるB細胞が作られる。成熟B細胞は全身を循環するとともに末梢のリンパ組織に集積している。なお、成熟したB細胞は細胞表面にIgDおよびIgM抗体を表出している。B細胞が抗体を産生する経路として、T細胞依存的経路とT細胞非依存的経路が明らかになっている[49]。一部の特殊な抗原を受容したB細胞はT細胞による補助を受けることなく抗体を産生することができるが、この経路によって産生される抗体のほとんどはIgM抗体であると考えられている。高親和性の抗体を十分に産生するためにはT細胞による補助が必要であると考えられている。抗原を捕捉して活性化したB細胞は、さらにT細胞とB細胞領域の辺縁部にて相互作用して増殖をし、胚中心と呼ばれるB細胞が密集した一

時的な構造を形成する[50]。なお、パイエル板や腸間膜リンパ節を含む粘膜関連リンパ組織の一部では、常に胚中心が観察される。胚中心はさらに明領域と暗領域に区別される。明領域には濾胞樹状細胞やTfh細胞が存在し、B細胞に生存刺激を与える。これらの刺激を受け取れなかったB細胞にはアポトーシスが誘導されるが、一方で生存刺激を受け取った細胞は暗領域へ移動する。暗領域においてB細胞は増殖および、Ig遺伝子の可変領域において高頻度の突然変異を起こし、再び明領域へ移動する。この機構により、高親和性抗体を作ることができるB細胞が選別される。このサイクルを繰り返すうち、一部の細胞が抗体産生細胞として抗体を産生するかもしくはメモリーB細胞へと分化して機能することとなる。腸管におけるIgA抗体の産生では、パイエル板や腸間膜リンパ節などでIgAへのクラススイッチと胚中心反応が誘導され、次いで抗体産生細胞に分化して粘膜固有層に移動してIgA抗体を分泌することが知られている。粘膜固有層で分泌されたIgA抗体は、腸管上皮細胞に発現するレセプターに結合して取り込まれ、管腔へと輸送される。

B細胞が作ることのできる抗体にはクラスがあり、IgM、IgD、IgG、IgA、IgEの5種類に分けることができる。IgDおよびIgM抗体は成熟B細胞の表面に結合している抗体のクラスであり、IgM抗体は感染初期の応答として素早く産生される。IgG抗体は体内に広く分布し、異物の排除に機能する抗体である。IgA抗体は腸管をはじめとした粘膜面で産生される抗体であり、抗原の侵入を防ぐために重要である。IgE抗体はアレルギー反応に関わるほか、寄生虫感染時にも産生されることがわかっている。これらの抗体へのクラススイッチの種類は、主にT細胞によるサイトカインの産生によって決定される。IgG1へのクラススイッチはIL-21やIL-4の、IgG2aへはIFN- $\gamma$ 、IgAへはTGF- $\beta$ およびIL-21、IgEへはIL-4の刺激が重要であると考えられている[51]–[53]。

#### 本研究の目的

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

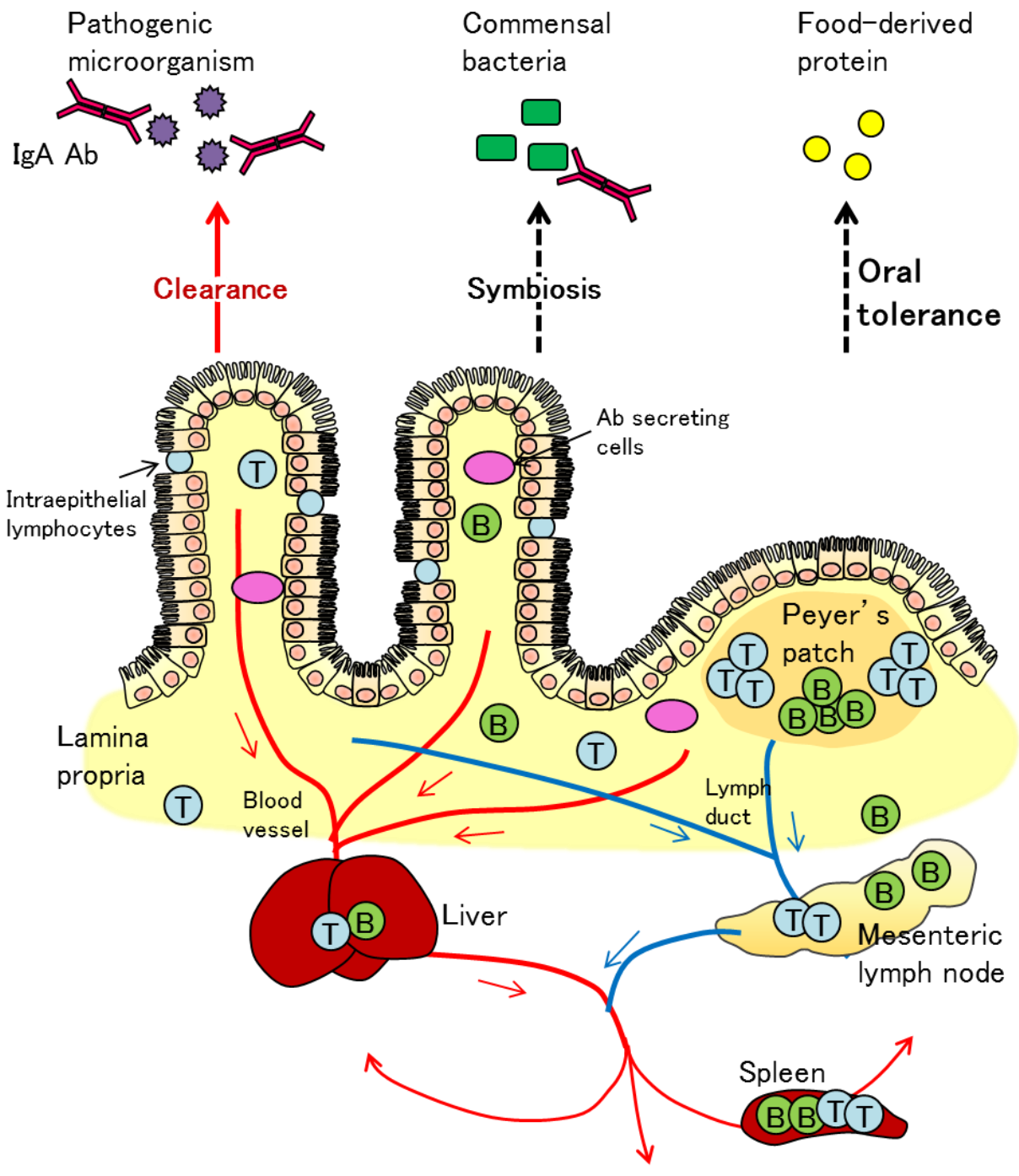


Fig. 1-1 腸管免疫系の構造  
 T; T細胞、B; B細胞、Ab; Antibody。

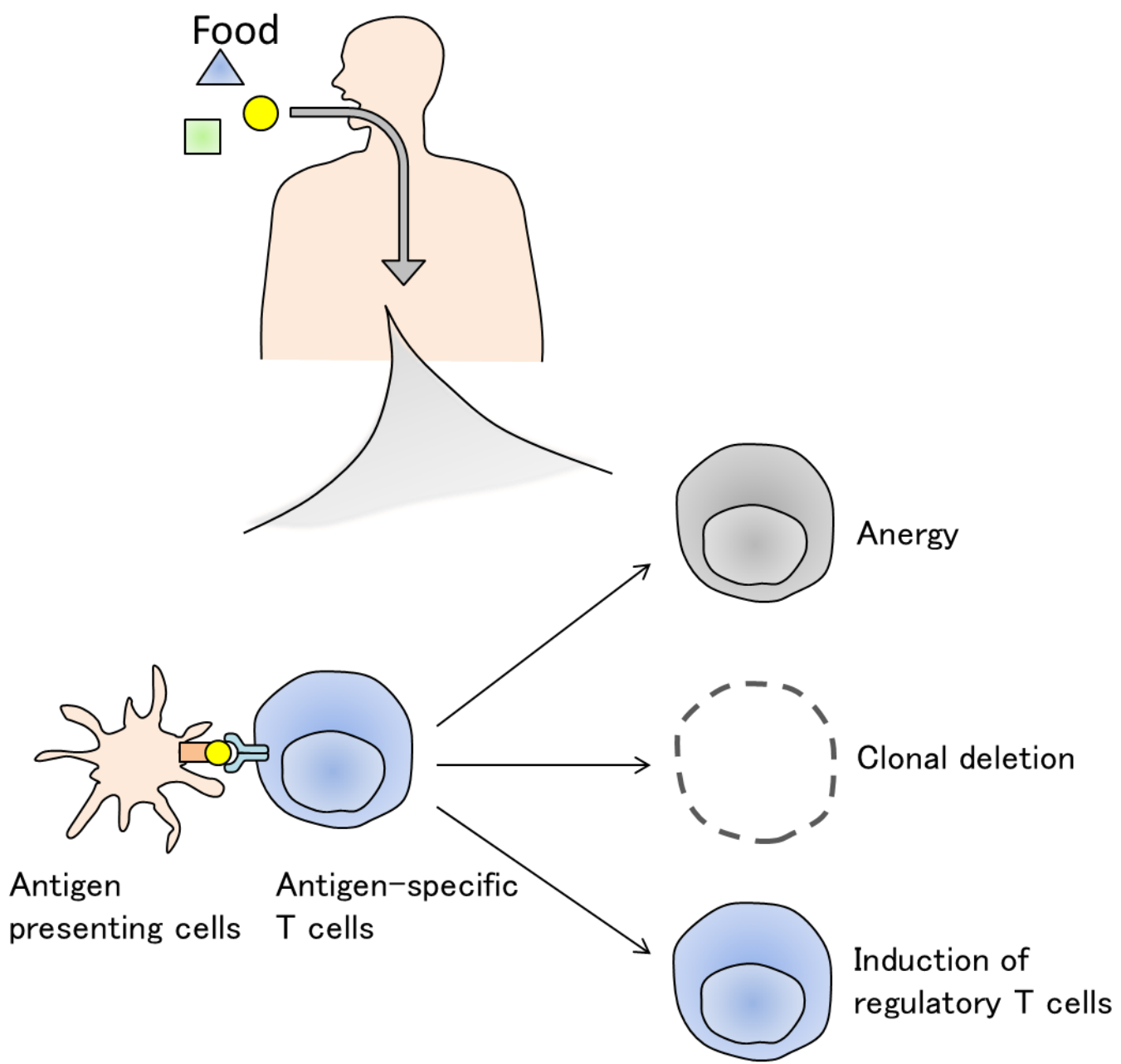


Fig. 1-2 経口免疫寛容の誘導機構

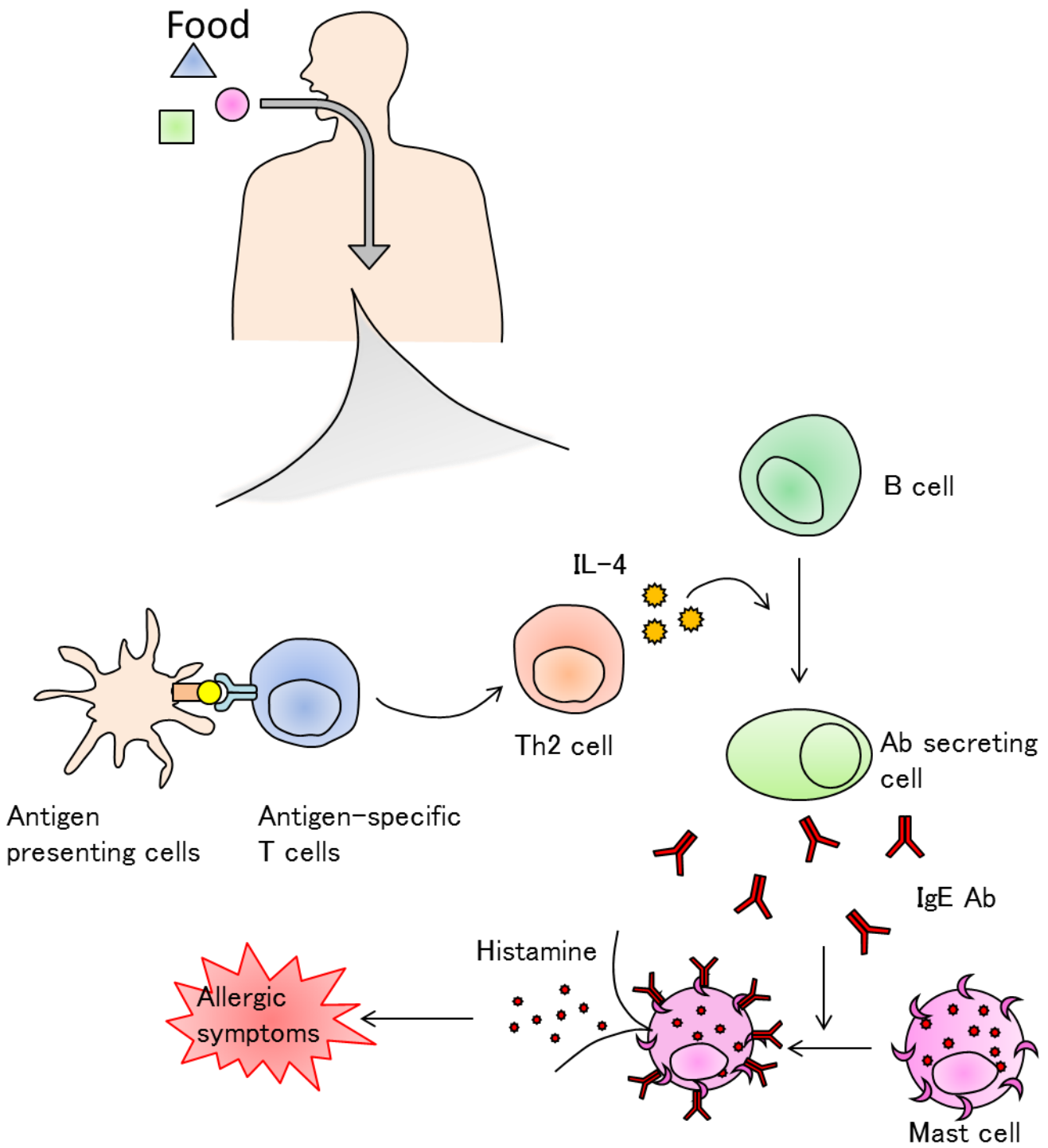


Fig. 1-3 食物アレルギーの誘導機構



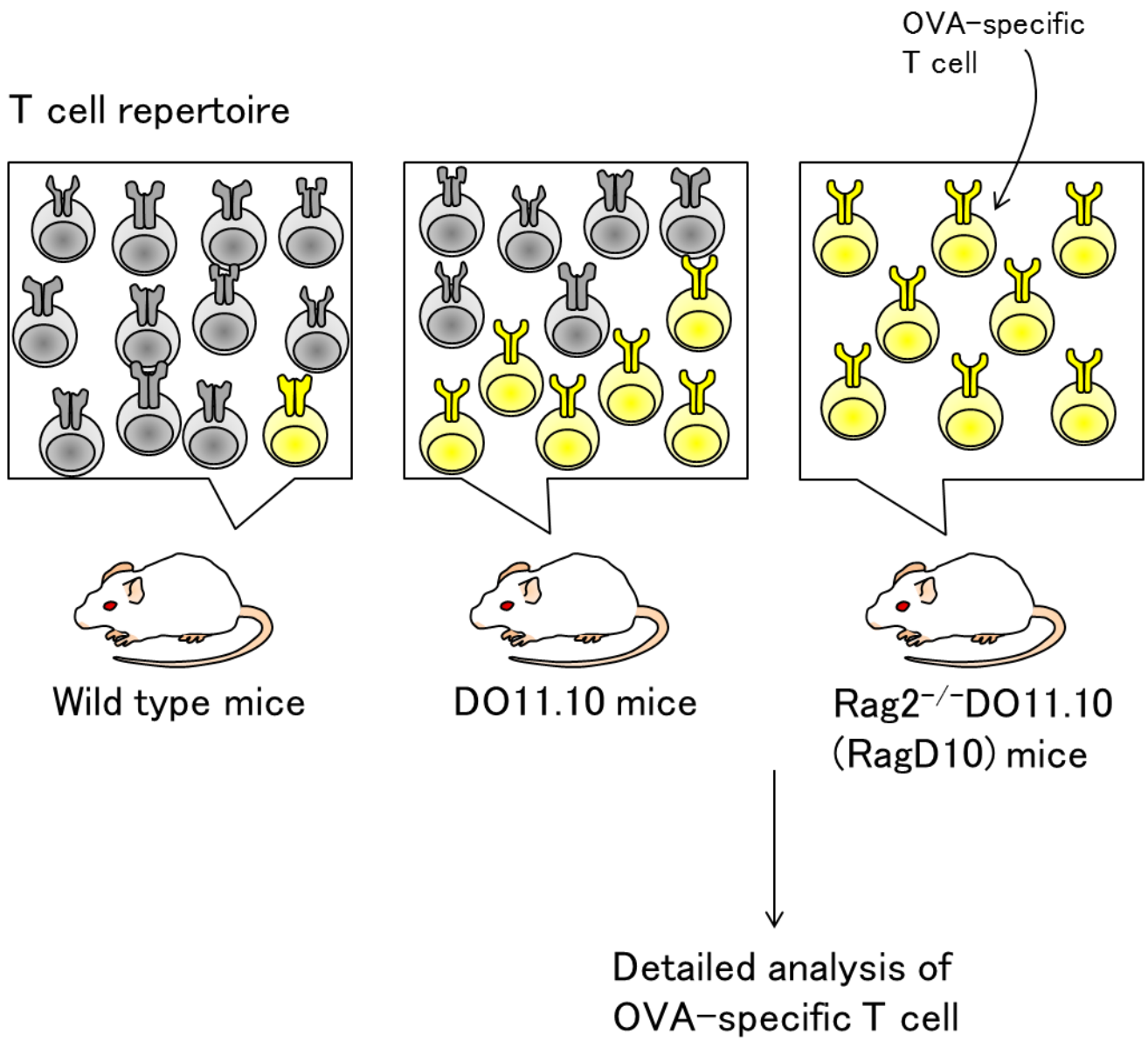


Fig. 1-4 TCRトランスジェニックマウス

## 第一章 抗原特異的 Th2 細胞を介した、経口摂取した抗原に対する IgE 抗体産生の解析

### 序

IgE 抗体は、食物アレルギー反応の中でも中心的な役割を持つ因子の一つである。その産生は、抗原特異的 T 細胞が Th2 細胞に分化し、Th2 サイトカインによって B 細胞を活性化することによって誘導されると考えられている[22]。しかしながら、抗原の経口摂取による IgE 抗体産生において、Th2 細胞の詳細な役割についてはいまだに明らかになっていない。例えば、Th2 細胞の活性化の機序や、Th2 細胞による B 細胞の IgE へのクラススイッチがどの免疫組織で起こるのかはいまだ明らかでない。

経口抗原特異的 Th2 細胞による IgE 抗体産生機構の解析は、これまで用いられてきた食物アレルギーモデルマウスでは、抗原特異的な T 細胞の検出が難いため、困難が伴う。また、多くのモデルでは抗原の経口摂取の前にアジュバントと抗原を投与してマウスを抗原に感作させているが、アジュバントの効果については完全には明らかになっていない[54]–[57]。さらに、ヒトにおける食物アレルギーの発症において、アジュバントに対応する物質があるか明らかでない。そのため、これらのモデルではヒトでの発症経路を正確に模しているのか疑問が残る。

そこで本章では、経口摂取した抗原に対して、抗原特異的 Th2 細胞を介して IgE 抗体産生が誘導されるモデルを開発することを目指した。Th2 細胞を *in vitro* で作製し、野生型マウスに移入した後抗原を経口投与して、IgE 抗体産生が誘導されるかどうか検討を行った。

## 材料と方法

### 実験動物

RagD10 マウスは若槻芳雄博士（京都大学）より御供与いただき、三協ラボサービス(東京)に繁殖を委託した。Balb/c マウスは日本クレア（東京）より購入した。マウスは東京大学農学部キャンパス 3 号館地下一階動物室において飼育され、 $\gamma$ 線照射飼料 CE-2（日本クレア）および滅菌水によって維持した。雌の 7 週齢以上のマウスを実験に使用した。実験動物の取り扱いには東京大学規則に則り行った。

### RPMI 培地

RPMI1640(日水製薬、東京)を、121°Cで 20 分間滅菌処理を行った。その後 100 U/ml ペニシリン(Meiji Seika ファルマ、東京)、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン(Meiji Seika ファルマ)、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール(東京化成工業、東京)、0.2%炭酸ナトリウム(和光純薬工業)、0.03% L(+)-グルタミン(和光純薬工業)を加えて RPMI 培地とした。さらにウシ胎児血清(Fetal calf serum; FCS、Biowest、France)を 5%になるように加えたものを 5%FCS-RPMI 培地とした。

### CD4<sup>+</sup> T 細胞の調製

マウスより摘出した脾臓を RPMI 培地中ですりつぶし、メッシュに通して単細胞懸濁液を調製した。CD4<sup>+</sup>T 細胞は磁気細胞分離システム(MACS; Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach, Germany)を用いて精製した。リン酸緩衝液(Phosphate-buffered saline; PBS、日水製薬)に 0.5 %ウシ血清由来アルブミン(和光純薬工業)と 2.0 mM エチレンジアミン四酢酸(Ethylendiaminetetraacetic acid; EDTA、和光純薬工業)を添加して MACS 緩衝液とした。細胞は MACS 緩衝液中に  $2 \times 10^8$  cells/ml となるように懸濁し、抗マウス CD4 マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)を 10 倍希釈で添加して 4°Cで 15 分間静置した。MACS 緩衝液で洗浄後、MACS 分離 LS カラム(Miltenyi Biotec)に細胞懸濁液を加え、磁気フィールド内でポジティブセレクションした。回収した細胞を RPMI 培地で洗浄し、CD4<sup>+</sup>T 細胞画分とした。

### APC の調製

Balb/c マウスより調製した脾臓細胞を  $1 \times 10^8$  cells/ml となるように 5%FCS-RPMI 培地中に懸濁し、50  $\mu$ g/ml マイトマイシン C (Sigma-aldrich)を添加して 37°Cで 30 分静置した。その後 RPMI 培地で 2 回洗浄して APC とした。

### Th2 培養細胞の作製

RagD10 マウス脾臓より調製した CD4<sup>+</sup>T 細胞( $1 \times 10^5$  cells/well)を、APC( $4 \times 10^5$  cells/well)、10 mg/ml OVA(Sigma-aldrich)、5 ng/ml リコンビナント(r)IL-4 (Peprotech、Rockey hill、NJ、USA)、5  $\mu$ g/ml 抗 IL-12 抗体(C17.20.8)と共に、5%FCS-RPMI 培地を用いて 96 穴丸底プレート

ト中に培養した。3日目に細胞を回収して洗浄し、48穴プレート中で $1 \times 10^6$  cells/wellとして再び培養した。OVA (10 mg/ml)、APC ( $4 \times 10^6$  cells/well)および rIL-4 (5 ng/ml)の添加について、①～⑥の6つの条件下で細胞を培養した(Fig. 2-1)。5日後に細胞を回収、洗浄し、条件④～⑥の細胞については、再び48穴プレート中で $1 \times 10^6$  cells/wellとして、Fig. 2-1の条件下で培養し、7日後に回収した。

各条件で培養された細胞は、96well 平底プレート中に $1 \times 10^5$  cells/well 添加し、APC( $4 \times 10^5$  cells/well)および OVA(1 mg/ml)と48時間培養し、上清を回収した。

### ELISA 法

すでに報告されている方法に則って行った[58]。以下に簡便に方法を記す。

#### ①サイトカインの定量

イムノプレート (NUNC、Roskilde、Denmark)をラット抗マウス IL-4 抗体 (11B11、BD pharmlingen、San Jose、CA、USA)もしくはラット抗マウス IFN- $\gamma$ 抗体 (R4-6A2、BD pharmlingen)を用いてコーティングした。BSA (和光純薬工業)によってブロッキングを行った後、適切に希釈した培養上清および標準溶液を添加した。標準溶液として rIL-4 (Peprotech)、rIFN- $\gamma$  (Peprotech)を用いた。捕捉されたサイトカインはビオチン化ラット抗マウス IL-4 抗体 (BVD6-24G2、BD pharmlingen)もしくはビオチン化ラット抗マウス IFN- $\gamma$ 抗体 (XMG1.2、BD pharmlingen)によって検出し、次いでアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (BD pharmlingen)および p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム(東京化成工業)を用いて発色させた。マイクロプレートリーダー Model 680 (Bio-Rad、Hercules、CA、USA)を用いて 405 nm の吸光値を測定した。

#### ②血清中抗体価の定量

総 IgE 抗体価の検出のために、一次抗体としてラット抗マウス IgE 抗体 (R35-92、BD pharmlingen)を、二次抗体としてビオチン化抗マウス IgE 抗体 (LO-ME2、Serotec)を用いた。OVA 特異的抗体を検出するために、OVA (Sigma aldrich)によってイムノプレートをコーティングし、ビオチン化抗マウス IgE 抗体 (LO-ME2、Serotec)、アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG1 抗体 (Zymed、Carlsbad、CA、USA)もしくはアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG2a 抗体 (Zymed)を用いてそれぞれ検出した。標準溶液として、総 IgE 抗体測定に対してはマウス IgE 抗体 (BD pharmlingen)を用い、OVA 特異的抗体測定に際しては、当研究グループで作製したマウスの血清を用いた。その他の方法については、①サイトカインの定量と同様の方法に則って測定した。

### Th2 応答の惹起

培養から回収した細胞を洗浄して PBS 中に懸濁し、1 個体あたり  $2 \times 10^7$  cells ずつ尾静脈より移入した。翌日より 2 週間、飼料中のタンパク質成分がすべて卵白タンパク質からなる飼料(卵白

食、船橋ファーム、千葉)を自由摂取させた。その組成を Table 1 に示す。なお、卵白タンパク質のうち、約 54%が OVA である。

#### 血清の採取

マウスの尾より採血を行い、検体を 4°C で 4 時間以上静置した。10000 rpm、4°C、10 分遠心し、血清を回収した。

#### 統計解析

2 群間の統計解析については Student の t 検定を用いた。多群間検定については、統計解析ソフト R を用い、Tukey の HSD 検定を行った。p<0.05 について有意差ありとし、Student の t 検定においては\*、Tukey の HSD 検定においては異なるアルファベットによって示した。

## 結果

### Th2 培養細胞の作製

IgE 抗体産生を解析するモデルマウスを作製するために、まずマウスに移入する Th2 細胞を作製した。RagD10 マウス脾臓細胞より調製した CD4<sup>+</sup>T 細胞を、APC および rIL-4 の存在下で培養した。3 日目に細胞を回収後、より反応性の高い Th2 細胞を得るため、Fig. 2-1 のような複数の刺激条件で細胞を培養した。培養後の細胞は OVA および APC と 48 時間共培養し、培養上清を回収した。上清中に含まれる IL-4 および IFN- $\gamma$  を ELISA 法によって定量し、作製した細胞の反応性の強さを評価した。IL-4 産生量について、培養条件④および⑤が最も高い産生量を示す一方で、IFN- $\gamma$  について培養条件④および⑤が最も低い産生量を示した(Fig. 2-2)。培養条件④および⑤の条件の違いは、3 回目の刺激時に rIL-4 を添加したかのみであるため、以後培養条件④を用いて細胞を作製することとした。

培養条件④によって作製された Th2 培養細胞が確かに Th2 細胞となっていることを確認するため、未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞と IL-4 および IFN- $\gamma$  の産生量を比較した。培養条件④によって作製された Th2 培養細胞と RagD10 マウス脾臓由来未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞を、APC および OVA の存在下で 48 時間培養し、培養上清中のサイトカイン量を測定した。その結果、Th2 培養細胞による IL-4 産生量は未感作 CD4<sup>+</sup>T 細胞と比較して有意に高く、IFN- $\gamma$  産生量は有意に低かった(Fig. 2-3)。以上のことから、培養条件④によって確かに Th2 細胞が作製されていることが確認された。

### 抗原の経口摂取によって IgE 抗体が産生される

作製した Th2 培養細胞の移入により、マウスモデルの作製を試みた。Th2 培養細胞を野生型マウスの尾静脈より移入し、翌日から 2 週間卵白食を用いて飼育した(Th2/EW 群、Fig. 2-4)。コントロール群として、PBS を移入し卵白食を投与した群(PBS/EW 群)と Th2 培養細胞を移入して通常食で飼育した群(Th2/CE-2 群)を設けた。実験期間終了時に、血清中に含まれる総 IgE 抗体量および OVA 特異的 IgE 抗体量を ELISA 法によって測定した。

総 IgE 抗体量を測定した結果、Th2/EW 群における産生量は PBS/EW 群と Th2/CE-2 群に対して有意に高かった(Fig. 2-5A)。一方、OVA 特異的 IgE 抗体量については、Th2/EW 群における産生量は PBS/EW 群に対して有意に高かったが、Th2/CE-2 群との有意差は確認されなかった。なお、Th2/CE-2 群でも PBS/EW 群に対して抗体価が上昇する傾向がみられるが、有意差は認められなかった(Fig. 2-5B)。以上の結果から、本モデルは Th2 培養細胞の移入と抗原の経口摂取によって IgE 抗体の産生量が上昇することが明らかになった。その一方で、卵白食の投与に伴う体重減少や軟便といった臨床症状は認められなかった(Fig.2-6 およびデータ不掲載)。

### 抗原の経口摂取によって Th2 応答が惹起される

抗原の経口摂取によって誘導された IgE 抗体の産生が、Th2 応答を伴っていることを確認するために、血清中の OVA 特異的 IgG1 および IgG2a 抗体量を測定することとした。IgG1 抗体は

Th2 応答に伴って誘導される抗体である一方、IgG2a 抗体は Th1 応答に伴って誘導される抗体である。測定の結果、Th2/EW 群において OVA 特異的 IgG1 抗体量は他の 2 つの群に対して有意に上昇していた一方、OVA 特異的 IgG2a 抗体量については有意な上昇は確認されなかった (Fig. 2-5C)。以上の結果から、本マウスモデルでは抗原の経口摂取に伴って Th2 応答が誘導されていることが明らかとなった。

## 考察

本章では、抗原の経口摂取によって抗原特異的 Th2 細胞を介して IgE 抗体産生が誘導されるマウスモデルの開発を目的として実験を行った。まず、Th2 細胞を *in vitro* で作製するための条件検討を行い、最も強く Th2 細胞が誘導できる条件を決定した。次いで、作製した Th2 培養細胞を野生型マウスに移入して抗原を経口摂取させたところ、血清中の総 IgE 抗体量および OVA 特異的 IgE 抗体量が上昇することが確認された。このことから、このモデルは抗原の経口摂取による IgE 抗体産生機構における、Th2 細胞の役割を解析可能なモデルとして用いることができると考えられる。

### このモデルの独自性

本章で開発したモデルと従来用いられてきた食物アレルギーモデルマウスとの大きな違いは、アジュバントを使用しない点である。アジュバントが免疫を賦活化する機構についてはいまだ不明な点も多く、またヒトが食物アレルギーを発症する場合にアジュバントに対応する物質による刺激を受けているのか明らかでないことから、アジュバントを用いたモデルで食物アレルギーの発症機構を解析することには限界があると考えられる。また、これまでのモデルの一部はアジュバントと抗原を経口ではなく腹腔内や皮下に投与している[54]。食物アレルギーにおける抗原の感作経路については近年様々な考察がなされており、皮膚からの抗原の侵入が重要であるとする報告もある[59]。しかしながら、腹腔内への投与や、皮下であってもモデルで使われるような用量の抗原が実際にヒトで侵入しているのか明らかでない。このようなモデルと比較して、抗原の投与方法が経口のみであるこのモデルは、「食べて誘導される」経路の解析に特化している点が特徴である。

このモデルでは、*in vitro* で誘導された Th2 細胞によって IgE 抗体の産生が誘導されている。これまでのモデルでは、アジュバントによる刺激の解明が不完全なことや、抗原特異的 T 細胞の検出が難しいことから、どのような T 細胞が IgE 抗体の産生を誘導しているのか十分明らかではなかった。*in vitro* で細胞を作製することで、どのような刺激によって誘導された細胞なのか、どのような性質を持つ細胞なのか理解した上で実験できることは、IgE 抗体産生のメカニズム解析を進めるうえで有利であると考えられる。Th2 細胞の作製条件を変更して異なる性質の細胞を用いることで、どのような性質を持つ細胞が IgE 抗体を強く誘導するのか明らかにすることができる。

このモデルでは OVA を抗原として用いている。OVA はモデル抗原として免疫学分野において広く使われている抗原であり、当研究室でも OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウスを用いて、IgE 抗体産生誘導や腸管炎症を伴う食物アレルギーモデルマウスの作製に成功している[60]。その一方で、食物アレルギー反応を誘導する抗原には様々な食品由来の物質が存在し、抗原の違いによって食物アレルギー反応の性質が異なる可能性がある。今回作製したモデルは、異なる抗原特異性を持つ細胞を移入することで別の抗原を用いたモデルに応用することが可能であると考えられる。



### Th2/CE-2 群で OVA 特異的 IgE 抗体量が上昇傾向にあることについて

PBS/EW、Th2/EW、Th2/CE-2 群の 3 群で OVA 特異的 IgE 抗体量を測定した結果、Th2/EW 群で PBS/EW 群に対して有意に抗体量の増加が認められた。その一方で、Th2/EW 群と Th2/CE-2 群に有意差は認められず、Th2/CE-2 群では PBS/EW 群に対して有意ではないものの、抗体量の上昇傾向が見られた。抗原を経口投与していないにもかかわらず Th2/CE-2 群で抗体量が上昇した要因として、Th2 培養細胞中に抗原を保持した APC が混入していた可能性が考えられる。移入細胞中に、主な APC である CD11c<sup>+</sup>樹状細胞の割合は 1%に満たないものの（データ不掲載）、わずかに混入した細胞が Th2 細胞の応答を惹起した可能性が考えられる。樹状細胞はいくつかのサブセットに分類することが知られており、Th2 細胞を誘導する樹状細胞についても報告されている[61]。Th2 細胞を誘導する培養系の中で、樹状細胞が Th2 応答を誘導する性質を得た可能性も考えられる。

今回の系では、Th2/EW 群と Th2/CE-2 群で OVA 特異的 IgE 抗体の産生量に有意な差は認められなかった。今後、この 2 群で有意な差が認められる Th2 培養細胞の条件を検討することで、抗原特異的 IgE 応答における経口抗原特異的 Th2 細胞の役割をより明確に解析できる。例えば、さらに刺激回数を増やしてより強い Th2 細胞を誘導したり、また、細胞を移入する前に CD11c<sup>+</sup>樹状細胞を分離して除いたり、CD69 や CD25 といった活性化マーカーを用いてポジティブセレクションを行うことで機能の高い Th2 のみを用いたりする手法が考えられる。その一方で、現在の特徴を活かして APC の役割を解析することも可能である。

### 抗原の経口摂取により誘導された IgE 抗体産生応答における Th2 細胞の役割

OVA 特異的 IgE 抗体量については、Th2/EW 群と Th2/CE-2 群で有意な差が認められなかった一方、総 IgE 抗体量については Th2/EW 群で Th2/CE-2 群と比較して有意に抗体量が大きかった。このことは、Th2/EW 群において OVA 特異的ではない IgE 抗体量が増加していることを示唆している。したがって、抗原特異的 Th2 細胞の経口摂取した抗原に対する応答が、OVA 特異的以外の IgE 抗体産生に寄与していると考えられる。その機構としては、移入した Th2 培養細胞が経口摂取した抗原に反応して IL-4 を産生し、サイトカイン環境を変えた結果、他の抗原に対する抗体のクラススイッチが IgE に切り替わったことが考えられる。このような現象は、ある抗原に対する食物アレルギー応答が、別の抗原に対する食物アレルギーを発症するリスクになりうることを示唆している。例えば、ピーナッツアレルギーの患者では、ピーナッツ抗原による Th2 応答に伴って牛乳抗原に対する IgE 抗体量が上昇し、牛乳に対する食物アレルギーも発症しやすいと考えられる。乳幼児のころにアトピー性皮膚炎や食物アレルギーを患っていた患者が、成長すると別のアレルギー疾患である気管支喘息やアレルギー性鼻炎に罹患することがよく見られ、この様子を「アレルギーマーチ」と呼ぶ。このアレルギーマーチにも、今回見られた様な Th2 応答が別の抗原に対する IgE 抗体を誘導する現象が関わっている可能性がある。

### このモデルで臨床症状が確認されなかったことについて

このモデルでは抗原の経口投与によって Th2 応答が惹起され IgE 抗体産生誘導が誘導されていることが確認されたものの、体重の減少や軟便は確認されなかった。このことから、今回の条件は食物アレルギーを「発症」させるのには不十分であることが示唆される。その理由については以下の 3 点が考えられる。

#### ① 移入した細胞の機能が不十分

今回 Th2 細胞の反応性を示す指標として IL-4 産生量を用いたが、他の炎症誘導性因子の産生が、今回用いた Th2 細胞では不十分であった可能性が考えられる。Th2 細胞は IL-4 の他にも IL-5 や IL-13 といったサイトカインを産生し、好酸球や好塩基球、マスト細胞を活性化し炎症を誘導する[62]。これらの産生が不十分であった結果、IgE 抗体が産生されたにもかかわらず、炎症が起こらなかった可能性がある。また、発症の炎症誘導性因子のソースとして、Th2 細胞の産生するサイトカインのみでは不十分である可能性が考えられる。近年、上皮細胞から thymic stromal lymphopoietin (TSLP)や IL-25、IL33 といったサイトカインが放出され、感染への応答ではその刺激によって 2 型自然リンパ球(Innate lymphoid cells; ILC)が IL-5 や IL-13 を産生して炎症に寄与すると報告されている[63], [64]。また、ILC2 による IL-13 の産生はアレルギー性気道炎症の亢進にかかわるとい報告がある[65]。同様の経路が食物アレルギー反応においてもはたしている可能性があるのではないか。特に腸管は管腔中に多くの微生物が存在していることで、上皮細胞は常に刺激を受け取っていると考えられる。何らかの要因によって ILC2 の活性化が亢進され、アレルギー性炎症が誘導される可能性が考えられる。このモデルでも、ILC2 を活性化させることで症状を発症させることができるかもしれない。

#### ② 移入した Th2 細胞が適切な位置に移動していない

食物アレルギー反応が生体内のどこで誘導されるかはいまだ明確に示されてはいないが、当研究グループにより、その初期誘導にはパイエル板が重要であること、腸間膜リンパ節の切除によって食物アレルギー症状が誘導されなくなることが示されている[66]。このことから、本章で移入した Th2 培養細胞はパイエル板や腸間膜リンパ節への遊走能が低い可能性も考えられる。その一方で、このモデルで T 細胞がホーミングしている組織は、IgE 抗体産生が誘導される組織であると考えることができる。

リンパ球の組織への遊走には、組織特異的なホーミングレセプターの発現が重要である[46]。このモデルで使用している Th2 細胞のケモカインレセプターの発現解析は検討しておらず、今後の課題である。腸管への T 細胞のホーミングレセプターとして CCR9 や $\alpha 4\beta 7$  インテグリンが報告されているため、CCR9 や $\alpha 4\beta 7$  を発現する Th2 細胞を作製することができれば食物アレルギーの発症を誘導できるかもしれない。これらの因子はビタミン A の誘導體であるレチノイン酸によって誘導されることが明らかになっていることから[67]、Th2 細胞の培養系にレチノイン酸を添加することで効果がある可能性がある。

#### ③ 内在する OVA 特異的 T 細胞による反応の抑制

レシピエントの T 細胞中には、わずかながら OVA 特異的 T 細胞が存在していると考えられる。この T 細胞が抑制活性を持った制御性 T 細胞に分化し、移入した Th2 細胞の反応を抑制してい

る可能性がある。がん免疫の分野においては抗 PD-1 抗体を用いて制御性 T 細胞を抑制することで、がん細胞への免疫応答を促進させることに成功している[68]。今回作製したモデルでも、抗体を用いて制御性 T 細胞を除去することで、その Th2 細胞応答の抑制における役割を解析できると考えられる。

以上のような観点からこのモデルを解析することで、抗原の経口摂取による抗原特異的 Th2 細胞を介した IgE 抗体産生反応について、さらなる知見が得られることが期待される(Fig. 2-7)。

Table 1 および Fig.2-1 から 2-7

本項の内容は、共著論文として学術雑誌に掲載されており、インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないために公表できない。また、本項の内容は、学術雑誌に掲載されており、出版社との契約条件によって公表できない。

本項の内容は、Bioscience of Microbiota, Food and Health、33 巻、1 号、41-46 ページに掲載されている。

## 第二章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

### 第三章

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5 年以内に出版予定。

## 総合討論

本項の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出版予定。

## 参考文献

- [1] O. Pabst, “New concepts in the generation and functions of IgA.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 12, pp. 821–32, Dec. 2012.
- [2] O. Pabst and A. M. Mowat, “Oral tolerance to food protein.,” *Mucosal Immunol.*, vol. 5, no. 3, pp. 232–9, May 2012.
- [3] Y. Furusawa, Y. Obata, S. Fukuda, T. A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N. N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase, and H. Ohno, “Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells.,” *Nature*, vol. 504, no. 7480, pp. 446–50, Dec. 2013.
- [4] S. Kawamoto, M. Maruya, L. M. Kato, W. Suda, K. Atarashi, Y. Doi, Y. Tsutsui, H. Qin, K. Honda, T. Okada, M. Hattori, and S. Fagarasan, “Foxp3+ T Cells Regulate Immunoglobulin A Selection and Facilitate Diversification of Bacterial Species Responsible for Immune Homeostasis,” *Immunity*, vol. 41, no. 1, pp. 152–65, Jul. 2014.
- [5] J. L. Round and S. K. Mazmanian, “The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 5, pp. 313–23, May 2009.
- [6] G. Eberl and M. Lochner, “The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota.,” *Mucosal Immunol.*, vol. 2, no. 6, pp. 478–85, Nov. 2009.
- [7] I. N. Crispe, M. Giannandrea, I. Klein, B. John, B. Sampson, and S. Wuensch, “Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance.,” *Immunol. Rev.*, vol. 213, pp. 101–18, Oct. 2006.
- [8] H. L. Weiner, A. P. da Cunha, F. Quintana, and H. Wu, “Oral tolerance.,” *Immunol. Rev.*, vol. 241, no. 1, pp. 241–59, May 2011.
- [9] K. Migita and A. Ochi, “Induction of clonal anergy by oral administration of staphylococcal enterotoxin B.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 24, no. 9, pp. 2081–6, Sep. 1994.
- [10] D. Melamed and A. Friedman, “Direct evidence for anergy in T lymphocytes tolerized



- by oral administration of ovalbumin.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, no. 4, pp. 935–42, Apr. 1993.
- [11] K. Asai, S. Hachimura, M. Kimura, T. Toraya, M. Yamashita, T. Nakayama, and S. Kaminogawa, "T cell hyporesponsiveness induced by oral administration of ovalbumin is associated with impaired NFAT nuclear translocation and p27kip1 degradation.," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 9, pp. 4723–31, Nov. 2002.
- [12] T. Marth, W. Strober, and B. L. Kelsall, "High dose oral tolerance in ovalbumin TCR-transgenic mice: systemic neutralization of IL-12 augments TGF-beta secretion and T cell apoptosis.," *J. Immunol.*, vol. 157, no. 6, pp. 2348–57, Sep. 1996.
- [13] Y. Chen, J. Inobe, R. Marks, P. Gonnella, V. K. Kuchroo, and H. L. Weiner, "Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance.," *Nature*, vol. 376, no. 6536, pp. 177–80, Jul. 1995.
- [14] T. Fukaya, H. Takagi, Y. Sato, K. Sato, K. Eizumi, H. Taya, T. Shin, L. Chen, C. Dong, M. Azuma, H. Yagita, B. Malissen, and K. Sato, "Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4+Foxp3+ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance.," *Blood*, vol. 116, no. 13, pp. 2266–76, Sep. 2010.
- [15] A. Corthay, "How do regulatory T cells work?," *Scand. J. Immunol.*, vol. 70, no. 4, pp. 326–36, Oct. 2009.
- [16] C. O. Elson and W. Ealding, "Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen.," *J. Immunol.*, vol. 133, no. 6, pp. 2892–7, Dec. 1984.
- [17] N. Sudo, S. Sawamura, K. Tanaka, Y. Aiba, C. Kubo, and Y. Koga, "The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction.," *J. Immunol.*, vol. 159, no. 4, pp. 1739–45, Aug. 1997.
- [18] T. W. Spahn, H. L. Weiner, P. D. Rennert, N. Lügering, A. Fontana, W. Domschke, and T. Kucharzik, "Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 32, no. 4, pp. 1109–13, Apr. 2002.
- [19] A. Urisu, M. Ebisawa, K. Ito, Y. Aihara, S. Ito, M. Mayumi, Y. Kohno, and N. Kondo, "Japanese Guideline for Food Allergy 2014.," *Allergol. Int.*, vol. 63, no. 3, pp. 399–419, Sep. 2014.

- [20] S. H. Sicherer and H. A. Sampson, "Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 133, no. 2, pp. 291–307; quiz 308, Feb. 2014.
- [21] K. Blumchen, H. Ulbricht, U. Staden, K. Dobberstein, J. Beschorner, L. C. L. de Oliveira, W. G. Shreffler, H. A. Sampson, B. Niggemann, U. Wahn, and K. Beyer, "Oral peanut immunotherapy in children with peanut anaphylaxis.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 126, no. 1, pp. 83–91.e1, Jul. 2010.
- [22] S. Kumar, A. K. Verma, M. Das, and P. D. Dwivedi, "Molecular mechanisms of IgE mediated food allergy.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 13, no. 4, pp. 432–9, Aug. 2012.
- [23] L. Klein, B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist, "Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see).," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 6, pp. 377–91, Jun. 2014.
- [24] T. P. Arstila, A. Casrouge, V. Baron, J. Even, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky, "A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity.," *Science*, vol. 286, no. 5441, pp. 958–61, Oct. 1999.
- [25] K. M. Murphy, A. B. Heimberger, and D. Y. Loh, "Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo.," *Science*, vol. 250, no. 4988, pp. 1720–3, Dec. 1990.
- [26] W. Ise, K. Nakamura, N. Shimizu, H. Goto, K. Fujimoto, S. Kaminogawa, and S. Hachimura, "Orally tolerized T cells can form conjugates with APCs but are defective in immunological synapse formation.," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 2, pp. 829–38, Jul. 2005.
- [27] 田邊康祐, 東京大学 修士論文. 2008.
- [28] J. Zhu, H. Yamane, and W. E. Paul, "Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*).," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 28, pp. 445–89, Jan. 2010.
- [29] S. Wedepohl, F. Beceren-Braun, S. Riese, K. Buscher, S. Enders, G. Bernhard, K. Kilian, V. Blanchard, J. Dervedde, and R. Tauber, "L-selectin--a dynamic regulator of leukocyte migration.," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 91, no. 4, pp. 257–64, Apr. 2012.
- [30] H. C. DeGrendele, P. Estess, and M. H. Siegelman, "Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site.," *Science (80- )*, vol. 278, no. 5338, pp. 672–5, Oct. 1997.
- [31] D. A. A. Vignali, L. W. Collison, and C. J. Workman, "How regulatory T cells work.,"

*Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 7, pp. 523–32, Jul. 2008.

- [32] M. Yadav, C. Louvet, D. Davini, J. M. Gardner, M. Martinez-Llordella, S. Bailey-Bucktrout, B. A. Anthony, F. M. Sverdrup, R. Head, D. J. Kuster, P. Ruminiski, D. Weiss, D. Von Schack, and J. A. Bluestone, “Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo.,” *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 10, pp. 1713–22, S1–19, Sep. 2012.
- [33] L. M. Williams and A. Y. Rudensky, “Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3,” *Nat. Immunol.*, vol. 8, no. 3, pp. 277–84, Mar. 2007.
- [34] S. Hori, T. Nomura, and S. Sakaguchi, “Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3,” *Science (80-. )*, vol. 299, no. 5609, pp. 1057–61, Feb. 2003.
- [35] P. L. Vieira, J. R. Christensen, S. Minaee, E. J. O’Neill, F. J. Barrat, A. Boonstra, T. Barthlott, B. Stockinger, D. C. Wraith, and A. O’Garra, “IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells.,” *J. Immunol.*, vol. 172, no. 10, pp. 5986–93, May 2004.
- [36] L. W. Collison, V. Chaturvedi, A. L. Henderson, P. R. Giacomin, C. Guy, J. Bankoti, D. Finkelstein, K. Forbes, C. J. Workman, S. A. Brown, J. E. Rehg, M. L. Jones, H.-T. Ni, D. Artis, M. J. Turk, and D. A. A. Vignali, “IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population.,” *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 12, pp. 1093–101, Dec. 2010.
- [37] W. Duan, T. So, A. K. Mehta, H. Choi, and M. Croft, “Inducible CD4+LAP+Foxp3-regulatory T cells suppress allergic inflammation.,” *J. Immunol.*, vol. 187, no. 12, pp. 6499–507, Dec. 2011.
- [38] N. M. Tsuji, K. Mizumachi, and J. Kurisaki, “Interleukin-10-secreting Peyer’s patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance.,” *Immunology*, vol. 103, no. 4, pp. 458–64, Aug. 2001.
- [39] M. A. Koch, G. Tucker-Heard, N. R. Perdue, J. R. Killebrew, K. B. Urdahl, and D. J. Campbell, “The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation.,” *Nat. Immunol.*, vol. 10, no. 6, pp. 595–602, Jun. 2009.
- [40] Y. Zheng, A. Chaudhry, A. Kas, P. deRoos, J. M. Kim, T.-T. Chu, L. Corcoran, P.

- Treuting, U. Klein, and A. Y. Rudensky, "Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses.," *Nature*, vol. 458, no. 7236, pp. 351–6, Mar. 2009.
- [41] D. Mucida, N. Kutchukhidze, A. Erazo, M. Russo, J. J. Lafaille, and M. A. Curotto de Lafaille, "Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs.," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 7, pp. 1923–33, Jul. 2005.
- [42] Y. Chen, V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner, "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis.," *Science*, vol. 265, no. 5176, pp. 1237–40, Aug. 1994.
- [43] U. Hadis, B. Wahl, O. Schulz, M. Hardtke-Wolenski, A. Schippers, N. Wagner, W. Müller, T. Sparwasser, R. Förster, and O. Pabst, "Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria.," *Immunity*, vol. 34, no. 2, pp. 237–46, Feb. 2011.
- [44] S. Crotty, "Follicular helper CD4 T cells (TFH).," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 29, pp. 621–63, Jan. 2011.
- [45] R. J. Johnston, A. C. Poholek, D. DiToro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A. L. Dent, J. Craft, and S. Crotty, "Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation.," *Science*, vol. 325, no. 5943, pp. 1006–10, Aug. 2009.
- [46] J. W. Griffith, C. L. Sokol, and A. D. Luster, "Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 32, pp. 659–702, Jan. 2014.
- [47] M. Pepper and M. K. Jenkins, "Origins of CD4(+) effector and central memory T cells.," *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 6, pp. 467–71, Jun. 2011.
- [48] S. N. Mueller, T. Gebhardt, F. R. Carbone, and W. R. Heath, "Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 31, pp. 137–61, Jan. 2013.
- [49] K. Pieper, B. Grimbacher, and H. Eibel, "B-cell biology and development.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 131, no. 4, pp. 959–71, Apr. 2013.
- [50] N. S. De Silva and U. Klein, "Dynamics of B cells in germinal centres.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 15, no. 3, pp. 137–48, Feb. 2015.
- [51] J. Stavnezer, J. E. J. Guikema, and C. E. Schrader, "Mechanism and regulation of

- class switch recombination.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 26, pp. 261–92, Jan. 2008.
- [52] G.-Y. Seo, J. Youn, and P.-H. Kim, "IL-21 ensures TGF-beta 1-induced IgA isotype expression in mouse Peyer's patches.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 85, no. 5, pp. 744–50, May 2009.
- [53] K. Ozaki, R. Spolski, C. G. Feng, C.-F. Qi, J. Cheng, A. Sher, H. C. Morse, C. Liu, P. L. Schwartzberg, and W. J. Leonard, "A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production.," *Science*, vol. 298, no. 5598, pp. 1630–4, Nov. 2002.
- [54] N. Corazza and T. Kaufmann, "Novel insights into mechanisms of food allergy and allergic airway inflammation using experimental mouse models.," *Allergy*, vol. 67, no. 12, pp. 1483–90, Dec. 2012.
- [55] M. C. Berin and L. Mayer, "Immunophysiology of experimental food allergy.," *Mucosal Immunol.*, vol. 2, no. 1, pp. 24–32, Jan. 2009.
- [56] K. Takeda and E. W. Gelfand, "Mouse models of allergic diseases.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 21, no. 6, pp. 660–5, Dec. 2009.
- [57] H. Aldemir, R. Bars, and C. Herouet-Guicheney, "Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods.," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 54, no. 3 Suppl, pp. S52–7, Aug. 2009.
- [58] A. Sato, M. Hashiguchi, E. Toda, A. Iwasaki, S. Hachimura, and S. Kaminogawa, "CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells.," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 7, pp. 3684–90, Oct. 2003.
- [59] L. Tordesillas, R. Goswami, S. Benedé, G. Grishina, D. Dunkin, K. M. Järvinen, S. J. Maleki, H. A. Sampson, and M. C. Berin, "Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens.," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 11, pp. 4965–75, Nov. 2014.
- [60] H. Nakajima-Adachi, A. Ebihara, A. Kikuchi, T. Ishida, K. Sasaki, K. Hirano, H. Watanabe, K. Asai, Y. Takahashi, Y. Kanamori, N. Shimojo, H. Matsuda, Y. Kohno, S. Hachimura, and S. Kaminogawa, "Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 117, no. 5, pp. 1125–32, May 2006.
- [61] A. B. Blázquez and M. C. Berin, "Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L.," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 7, pp. 4441–50, Apr. 2008.
- [62] S. H. Sicherer and H. A. Sampson, "Food allergy.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 125,

no. 2 Suppl 2, pp. S116–25, Feb. 2010.

- [63] L. A. Monticelli, G. F. Sonnenberg, M. C. Abt, T. Alenghat, C. G. K. Ziegler, T. A. Doering, J. M. Angelosanto, B. J. Laidlaw, C. Y. Yang, T. Sathaliyawala, M. Kubota, D. Turner, J. M. Diamond, A. W. Goldrath, D. L. Farber, R. G. Collman, E. J. Wherry, and D. Artis, “Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus.,” *Nat. Immunol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1045–54, Nov. 2011.
- [64] K. Moro, T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J.-I. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii, and S. Koyasu, “Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells.,” *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 540–4, Jan. 2010.
- [65] J. L. Barlow, A. Bellosi, C. S. Hardman, L. F. Drynan, S. H. Wong, J. P. Cruickshank, and A. N. J. McKenzie, “Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity.,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 129, no. 1, pp. 191–8.e1–4, Jan. 2012.
- [66] H. Nakajima-Adachi, A. Kikuchi, Y. Fujimura, K. Shibahara, T. Makino, M. Goseki-Sone, M. Kihara-Fujioka, T. Nochi, Y. Kurashima, O. Igarashi, M. Yamamoto, J. Kunisawa, M. Toda, S. Kaminogawa, R. Sato, H. Kiyono, and S. Hachimura, “Peyer’s patches and mesenteric lymph nodes cooperatively promote enteropathy in a mouse model of food allergy.,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e107492, Jan. 2014.
- [67] M. Iwata, A. Hirakiyama, Y. Eshima, H. Kagechika, C. Kato, and S.-Y. Song, “Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells.,” *Immunity*, vol. 21, no. 4, pp. 527–38, Oct. 2004.
- [68] C. Zhang, S. Wu, X. Xue, M. Li, X. Qin, W. Li, W. Han, and Y. Zhang, “Anti-tumor immunotherapy by blockade of the PD-1/PD-L1 pathway with recombinant human PD-1-IgV.,” *Cytotherapy*, vol. 10, no. 7, pp. 711–9, Jan. 2008.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、いつも温かくかつ熱心にご指導下さり、困難にぶつかった時も常に励まして下さい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の八村敏志准教授に心より感謝いたします。

実験手法をはじめ、様々なことをいつも優しく教えていただきました、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の足立はるよ特任助教に深く感謝いたします。

本研究で使用した RagD10 マウスを御供与いただきました京都大学医学部の若月芳雄博士に深く感謝いたします。

実験手法に貴重なご意見をいただきました、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、神沼修主任研究員に深く感謝いたします。

実験手法につきまして、快く教えていただきました、相模原病院臨床研究センターの森晶夫博士に深く感謝いたします。

網羅的遺伝子解析を行うにあたり、多くのお力添えをいただきました、九州大学農学研究院の片倉喜範准教授に深く感謝いたします。

実験を進めるにあたり貴重なご意見をいただき、快く機器を使用させて下さりました、国立感染症研究所免疫部の高橋宜聖室長、泉山絵里子先生に深く感謝いたします。

研究を進めるにあたり、いつも鋭いご意見を頂き研究の発展にご協力いただきました、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の戸塚護准教授に深く感謝いたします。

いつも温かく接して下さいました免疫制御研究室の皆様に感謝いたします。

最後に、いつも陰から支えて下さいました、家族に感謝いたします。

2015年12月

芝原 恭子