

博士論文(要約)

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

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
博士課程 平成 24 年度入学
平出 恵利華
指導教員 八村 敏志

目次

略語一覧	1
序論	3
第一章 T細胞エピトープペプチドを用いた食物アレルギーの抗原特異的な抑制法の検討	
I. 序	13
II. 材料と方法	15
III. 結果	22
IV. 考察	23
第二章 食物アレルギー性皮膚炎モデルの作製	
I. 序	26
第三章 食物アレルギー性皮膚炎モデルにおける免疫細胞の動態解析	
I. 序	27
総合討論	29
参考文献	30
謝辞	38

APCs	antigen presenting cells; 抗原提示細胞
BSA	bovine serum albumin; ウシ血清アルブミン
CCL	CC-chemokine ligand
CCR	CC-chemokine receptor; CC ケモカイン受容体
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA; 相補鎖 DNA
DC	dendritic cell; 樹状細胞
DC-SIGN	dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin
dDC	dermal dendritic cells; 真皮樹状細胞
ECM	extracellular matrix; 細胞外マトリックス
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid; エチレンジアミン四酢酸
E-lig	E selectin ligand
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay; 酵素免疫測定法
EW	egg white diet; 卵白食
FACS	fluorescence-activated cell sorter; 蛍光表示式細胞分取器
FcεR	immunoglobulin E Fc receptor; IgE Fc 受容体
FCS	fetal calf serum; ウシ胎仔血清
FITC	fluorescein isothiocyanate
Foxp3	forkhead box protein P3
GALT	gut-associated lymphoid tissue 腸管関連リンパ組織
HE	hematoxylin-eosin
HEV	high endothelial venule; 高内皮静脈
HPLC	high performance liquid chromatography; 高速液体クロマトグラフィー
HPR	horseradish peroxidase; 西洋ワサビペルオキシダーゼ
IFN- γ	interferon- γ ; インターフェロン γ
Ig	immunoglobulin; 免疫グロブリン
IL	interleukin; インターロイキン
iSALT	inducible skin associated lymphoid tissue; 誘導的皮膚関連リンパ組織

KC	keratinocyte; ケラチノサイト
KikGR	Kikume-ishi Green-Red
LC	Langerhans cell; ランゲルハンス細胞
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
OIT	oral immunotherapy; 経口免疫療法
OVA	ovalbumin; 卵白アルブミン
OVM	ovomuroid; オボムコイド
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
PP	payer's patch; パイエル板
PSGL1	p-selectin glycoprotein ligand-1
sDLN	skin draining lymph node; 皮膚所属リンパ節
SPL	spleen; 脾臓
TARC	thymus and activation and regulated chemokine
TCR	T cell antigen receptor; T 細胞抗原レセプター
TGF- β	transforming growth factor- β ; 形質転換成長因子- β
TNF	tumor necrosis factor; 腫瘍壊死因子
Tg	transgenic; トランスジェニック
Th	T-helper
TJ	tight junction; タイトジャンクション
Treg	regulatory T cell; 制御性 T 細胞
TSLP	thymic stromal lymphopoietin

序論

アレルギー

本来であれば無害であるはずのものが、生体にとって不利益な免疫応答を引き起こすことがあり、その一つにアレルギーがある。アレルギー反応は、I 型、II 型、III 型、IV 型の 4 つの型に分けられるが、最も頻度の高いものは免疫グロブリン (immunoglobulin; Ig) E 抗体を介した I 型アレルギーである。アレルギーを引き起こす抗原が体内に侵入すると、まず抗原提示細胞に捕捉され、分解酵素によりペプチドへと断片化される。その後、抗原提示細胞の主要組織適合複合体 (major histocompatibility complex; MHC) クラス II 分子上に提示され、それをナイーブ CD4⁺ T 細胞が認識すると活性化され、ヘルパー 2 型 T 細胞 (T-helper 2; Th2) に分化・増殖する。Th2 細胞から産生されるサイトカインインターロイキン (interleukin; IL) -4 は B 細胞にはたらきかけ、IgE 抗体を産生する形質細胞へと分化させる。また同じく Th2 サイトカインである IL-5 と IL-13 も B 細胞を活性化することが分かっており、特に IL-5 は好酸球の増殖や分化にも重要である。活性化された B 細胞から産生された IgE 抗体は高親和性 Fc レセプターである FcεRI を介して全身の至る所に存在するマスト細胞に結合する。抗原が再度侵入し、マスト細胞上の IgE に結合すると架橋がおこり、結果的にマスト細胞からヒスタミンなどの化学メディエーターが放出される。このメディエーターにより、各種アレルギー症状が発症する^{1, 2}。また好酸球はプロテアーゼなどの産生により、組織傷害を引き起こす。また、ケモカイン CCL (CC-chemokine ligand) 17 や CCL22 を産生することにより、Th2 細胞を誘導することなども明らかになっている³。

近年、花粉症、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、喘息などのアレルギー疾患の罹患率は増加の一途をたどっており、25%の人がなんらかのアレルギー疾患を患っていると言われている⁴。

食物アレルギー

我々が毎日とる食事が原因となるアレルギーが食物アレルギーである。食物アレルギーは「原因食物を摂取した後に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。我が国における食物アレルギーの有病率は、乳幼児が 10%、3 歳児が 5%、保育所児が 5.1%、学童以降が 1.3-2.6% 程度であり、全年齢を通すと 1-2% と推定される⁵。有病率から分か

るように、食物アレルギーは乳幼児に多く、また、加齢とともに寛容を獲得するという特徴を持つ疾患である。起こりうる症状としては、皮膚症状、呼吸器症状、粘膜症状、消化器症状、ショック症状があげられ、この中で最も多いとされる症状は皮膚炎症である。また、近年食物アレルギーの有病率も先進国を中心に増加傾向にあり、例えばイギリスでは、18歳以下における有病率がここ10年で約18%増加したと言われている⁶。

食物アレルギーの発症機構

腸管は食物を吸収する栄養器官であると同時に、常に外界に曝されている粘膜組織であるため、最大級の免疫器官としても機能する。腸管には、食物成分、無数の病原体、腸内細菌が存在しており、生体防御と栄養吸収を両立させるために免疫応答が厳密に制御されている。そのため、腸管では全身免疫系とは独立した独自の免疫組織である腸間関連リンパ組織 (gut associated lymphoreticular tissue; GALT) が存在する。さらに、腸管免疫系と全身免疫系を仲介する免疫器官として、腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph node; MLN) が存在する。この腸管免疫システムのはたらしにより、我々は外来抗原である食物を摂取しても、過剰な免疫応答が誘導されることはなく栄養源として吸収することができる。この経口的に摂取した、すなわち腸管から吸収された外来抗原に対して、全身の免疫系が低応答化することを経口免疫寛容と呼ぶ。経口免疫寛容は抗原特異的なCD4⁺ T細胞の活性化抑制に付随する免疫寛容である。このような経口免疫寛容を誘導、維持する機構として、①アクティブサプレッション、②クローン消失、③アナジーの3つの機構が知られている。①は経口抗原により、免疫抑制機能を持つ制御性T細胞 (regulatory T cell; Treg) が誘導されるというものである。Tregの特徴としては、転写因子Foxp3 (forkhead box protein P3) を発現し、トランスフォーミング増殖因子β (transforming growth factor-β; TGF) やIL-10を産生することが知られている。また②は経口抗原を認識したT細胞がサイトカイン分泌能、増殖能の低い状態へ移行することである。③は経口抗原により抗原特異的T細胞のアポトーシスが誘導される。これまでの研究により、抗原の投与量により誘導メカニズムが異なることが知られている。抗原量が少ない場合はTregが誘導され、能動的な免疫抑制が起こる。一方、抗原量が多い場合はアポトーシスや低応答化⁷が起こる。しかしながら、Treg自体がアナジー状態であることや、アポトーシス誘導活性をもつことから、3つの機構が協調してはたらく可能性がある⁸。食物アレルギーが発症する一因として、この経口免疫寛容の破綻もしくは誘導の不全が考えられている⁹。

経口免疫寛容の破綻や誘導不全の理由としては、腸管透過性の増加や抗原感作ルートの違い

が挙げられる。例えば、食物アレルギーの乳幼児では、健常な乳幼児よりも腸管透過性が増加しているという報告がある¹⁰。またマウスの実験で、高用量のピーナッツを経口摂取させることで経口免疫寛容が誘導されるモデルに、あらかじめピーナッツを皮膚に塗布しておくことで経口免疫寛容が誘導されなかったとの報告がある¹¹。このことから、感作が腸管ではなく、皮膚で起こることが経口免疫寛容の誘導を失敗させ、食物アレルギー発症のリスクを高めるという説がある¹²。

食物アレルギーの発症要因

またその他の因子も食物アレルギーの発症の要因となりうる。一般に、胃液や腸で消化酵素に分解されにくい食物は食物アレルギーを誘発しやすい^{13,14}。また遺伝子多型も要因の一つで、これまでに IL-10¹⁵、IL-13¹⁶、STAT6(signal transducer and activator of transcription 6)¹⁷における遺伝子多型が食物アレルギー患者で多いことが統計的に証明されている。また、食物アレルギーに限ってではないが、乳幼児期の腸内細菌叢の違いが将来のアレルギーの発症に関与するとされている。将来的にアレルギーを発症した人の乳幼児期における腸内細菌叢では、*Lactobacilli* 属と *Bifidobacterium* 属が少なかったことが報告されている^{18 19}。また、原因食物の特性も発症要因の一つである。例えば、重篤な症状を惹起しやすいピーナッツの主要糖タンパク質アレルゲンである Ara h 1 は DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin) に結合して樹状細胞 (dendritic cell; DC) を活性化し、Th2 優位な応答を誘導させる Th2 アジュバント効果をもつ²⁰。

食物アレルギーと経皮感作

皮膚は我々の体を覆う構造物である。常に病原体や物理的・化学的な刺激などに曝されているため、強固なバリア機能が発達している。皮膚は、主に表皮と真皮からなる。表皮はケラチノサイト (keratinocyte; KC) により構成され、さらに角質層、顆粒層、有棘層、基底層の4つに分かれている。表皮には DC の一種であるランゲルハンス細胞 (Langerhans cell; LC) やメラノサイトが存在する。また真皮には血管、リンパ管、脂腺、汗腺などの構造物があり、真皮樹状細胞 (dermal dendritic cell; dDC)、好中球、好酸球、肥満細胞、T 細胞といった免疫細胞も存在する²¹。皮膚のバリア機能は表皮の角質層と、表皮の顆粒層に存在するタイトジャンクション (tight junction; TJ) である。

上述したように、食物アレルギーの感作は腸管だけではなく、皮膚でも成立すると考えられている。例えば本邦では、加水分解小麦を含む石鹸を使用した後に、小麦を経口摂取することで生じるアナフィラキシーの例が社会問題となっている²²。食物アレルギーの症状に皮膚炎が多いことから、こ

れまで皮膚は炎症が誘導される場であると考えられてきたが、近年はそれに加え感作の場としても注目を集めている。通常我々の皮膚は 500Da 以下の低分子しか通すことが出来ない。大きな分子である食物抗原は健康な皮膚から通過することはできないため、皮膚における食物抗原感作のメカニズムは不明であった。しかし近年バリア機能に傷害のある皮膚から LC が抗原を取り込む機序が明らかとなった。

皮膚に存在する DC は、表皮に存在する LC と真皮に存在する dDC の二つに大きく分けられる。dDC が真皮に侵入してきた抗原を取得すると考えられている一方で、表皮に存在する LC は活性化すると、樹状突起が TJ を突き抜け、TJ の外側の抗原を取得することが明らかになった^{23,24}。LC に炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF)- α と IL-1 を作用させ活性化させることで抗原を取得することが可能であることから、表皮から何らかの危険シグナルが LC に作用することが、食物抗原の取得に必要と考えられる。食物抗原を取得した LC はこの後真皮まで移動し、真皮に存在するリンパ管からリンパ節に移動し、ナイーブ T 細胞に抗原提示を行うと予想される。これにより食物抗原への感作が成立すると考えられる。

食物アレルギーの治療法

現在、食物アレルギーに根本的な治療法は存在しない。主に臨床現場で取られている治療法は、原因となる食物を摂取しない除去食が中心であり、それに加え、抗ヒスタミン薬や抗アレルギー薬などの薬剤療法が行われる。いずれも対症療法であり、患者やその家族に精神的なストレスや栄養学的障害を与え、QOL (Quality of life) の低下を招く。したがって、食物アレルギーの早急な根本的治療法の開発が求められている。

このような状況下で、食物アレルギーの根治療法開発のため様々な研究が行われており、中でも特に注目されている治療法が経口免疫療法 (oral immunotherapy; OIT) である。上述したように、食物アレルギーは経口免疫寛容の破綻もしくは誘導の不全により惹起される。OIT とは、原因食物を避けるのではなく、食べることで経口免疫寛容を獲得させ、食物アレルギーを根本的に治す治療法である。経口免疫寛容に関しては、抗原を経口摂取することで、全身性の免疫応答を抑制できることから、食物アレルギー以外のアレルギーにおいても治療法への応用が期待されている。

OIT には、大きく分けると、無修飾のアレルゲンを用いる場合と修飾アレルゲンを用いる場合がある。無修飾のアレルゲンを用いる場合は、アレルゲン性はそのまま維持されているため、経口摂取により、アレルギー反応が惹起される可能性がある。そこで治療の安全性や有効性を上げるため、

治療に用いるアレルゲンを修飾する試みがなされている。その修飾アレルゲンの一つにペプチドがある。特に、食物アレルギー症状を誘導する IgE 結合領域が含まれない、あるいは少なく、かつ経口免疫寛容誘導に必須な T 細胞のエピトープ領域のみのペプチドを投与することで、より安全で効果的に経口免疫寛容を誘導できると予想される。このような食物アレルゲン由来 T 細胞エピトープペプチドをマウスに投与して経口免疫寛容の獲得に成功した例が報告されている。卵白のアレルゲンであるオボムコイド (ovomucoid; OVM) の T 細胞エピトープである 157-171 のシングルペプチド (SP) とこの領域を 3 つ連結させた複合ペプチド (MP) を胃内に投与した後、OVM を経口チャレンジした²⁵。すると無修飾アレルゲンである全長 OVM を投与した群よりも SP や MP を投与した群で、血中の IgE 抗体量や脾臓 (Spleen; SPL) CD4⁺ T 細胞の IL-4 産生量が減少した。また、SP では SPL CD4⁺ T 細胞の IL-12 と IL-10 の産生量および CD4⁺ Foxp3⁺ T 細胞の割合が増加していた。このことから、T 細胞エピトープの経口免疫療法における有効性が示された。

食物アレルギーモデルマウス

食物アレルギーの診断が曖昧であったために、症状が改善されない例や、不必要な除去食を続け栄養学的障害が生じることが少なからずある。臨床においては、食物アレルギー発症機構の解明に限界がある。そのため、科学的根拠のない臨床の知見から治療方針が決定され、必ずしも適切な治療が進められるとは限らない。経口免疫療法においても、現在のところ、寛容が獲得されたかどうかを正確に判断する方法はなく、不十分な診断により、アレルギー症状がより重篤になる場合がある。以上のことから、臨床でより適切な診断や治療が行われるよう、モデル動物を用いて、食物アレルギー発症機構解明や治療法開発のための基礎研究を行う必要がある。

当研究室ではこれまでに、OVA23-3 マウスという代表的な卵アレルゲンである卵白アルブミン (ovalbumin; OVA) の 323-339 残基に特異的な T 細胞抗原レセプター (T cell antigen receptor; TCR) を発現するトランスジェニックマウスを用いて、OVA 含有飼料 (卵白食 egg white diet; EW) の摂取のみで食物アレルギー症状を発症するモデルマウスの開発に成功している²⁶(序論 図 1)。

T 細胞の TCR は、TCR 遺伝子の再構成により多様性を獲得している。そのため、通常のマウスでは単一抗原を認識する T 細胞の割合が非常に低く、抗原特異的な免疫応答を解析することは困難である。そこで、抗原特異的応答を解析するために、特定の抗原ペプチド (OVA323-339) に特異的な TCR を高発現するトランスジェニックマウスである OVA23-3 マウスが作製された。実際、全

CD4⁺T 細胞中の 85%程度が OVA 特異的な TCR を発現していることが分かっている²⁷。OVA23-3 マウスは卵白食の摂取のみで、投与 10 日目に向けて体重減少を伴う腸炎症が誘導される。28 日目に向けて体重減少から回復するとともに、炎症による組織損傷から組織の再生が認められる。この炎症は IL-4 および CD4⁺T 細胞依存的に発症する。EW が経口投与されると、腸管の DC により OVA が取り込まれるが、DC は主に MLN へと移動した後に、OVA ペプチドを MHC classII 分子上に載せて CD4⁺T 細胞へと提示する。OVA23-3 マウスでは OVA323-339 領域に特異的な CD4⁺T 細胞が高い割合で存在するため、OVA 特異的な DC から CD4⁺T 細胞の抗原提示が効率よく行われる。抗原提示により活性化された CD4⁺T 細胞は主に IL-4 を産生する Th2 細胞へと分化する。この CD4⁺T 細胞が組織の腸炎症の誘導に関わると考えられる。また、EW の摂取のみで血中特異的 IgE 抗体が産生されることも分かっている²⁸。

通常食物アレルギーモデルを用いた研究では、抗原と共にアジュバントや他の薬剤を投与する必要があり、免疫系への影響が問題となる。しかしながら OVA23-3 マウスでは、食餌投与のみで食物アレルギー性腸炎を発症するため、アジュバント等の影響なしに免疫応答の解析ができる。さらには、そのまま食餌投与を継続させることで経口免疫寛容が誘導され、アレルギー症状が改善するという、食物アレルギーの病態に近い症状を示す唯一の食物アレルギーモデルである。

食物アレルギーにおける CD4⁺T 細胞の動態

上述したように食物アレルギーでは原因食物を経口摂取することで、高い割合で皮膚症状が誘導される。しかし、これまでに食物アレルギー性皮膚炎を発症するモデルがほとんど存在しないことから、食物を食べて皮膚炎が発症するメカニズムはほとんど分かっていない。唯一報告されている食物アレルギー性皮膚炎の研究では、腸管ホーミングレセプターである $\alpha 4\beta 7$ を発現する MLN CD4⁺T 細胞が、皮膚ホーミングレセプターである CCR4 を発現するようにプログラムされることで皮膚に移動し、その結果皮膚炎が誘導されると示している²⁹。また、抗原を TSLP (thymic stromal lymphopoietin) と共に皮膚に塗布し、その後同抗原を経口摂取することで下痢やアナフィラキシー症状が誘導されるという経皮感作型の食物アレルギーモデルが報告されているが、誘導された下痢やアナフィラキシー症状が CD4⁺T 細胞依存的な応答であることが証明されている³⁰。以上のことから、食物アレルギーモデルにおいて皮膚と腸管間で誘導される免疫応答には CD4⁺T 細胞が重要な役割をしていること、すなわち CD4⁺T 細胞が生体内を移動することで経皮感作型食物アレルギーや食物アレルギー性皮膚炎が誘導されていることが予想される。

CD4⁺ T 細胞の生体内循環

抗原に未感作な T 細胞をナイーブ T 細胞と呼ぶ。ナイーブ T 細胞は抗原に出会うまではリンパ節、リンパ管、血流を循環し、末梢組織に移行することはない。T 細胞が末梢組織に移行して機能するには、ナイーブ T 細胞からエフェクター・メモリー T 細胞に分化することが必要である。T 細胞は TCR により抗原を認識しており、活性化されるためには効率よく抗原提示細胞に出会うことが必要である。そのための組織として二次リンパ器官が存在する。二次リンパ器官の一つであるリンパ節はリンパ管の集合点に位置し、組織で抗原を取得した DC が輸入リンパ管を通過してリンパ節に入り、T 細胞がリンパ節内の高内皮静脈 (high endothelial venules; HEV) から移動してくるため、ここで効率良く T 細胞がエフェクター・ナイーブ T 細胞に増殖・分化することができる。二次リンパ器官としてはこの他にも腸管のパイエル板 (Peyer's patch; PP) や SPL が存在するが、リンパ節同様効率よく抗原に出会うことのできる構造を持っている。

リンパ球の生体内循環

多くの免疫細胞が生体内を循環することで免疫系が維持されている。全身にはリンパ管と血管がはりめぐらされており、リンパ球が循環している。血液の循環は心臓を出発点と考えると、心臓から出て、組織の毛細血管、静脈を通り、再び心臓に戻る。一方、リンパ管は血管のようにつながった回路ではなく、管の先端が末梢組織に存在する。先端は閉じた状態であり、弁が存在し、流れは中枢方向へと向かっている。リンパ管には所々にリンパ節が存在する。そしてリンパ球がこのリンパ節・リンパ管・血管の間を循環するには主に二つの経路が存在する³¹。一つ目は、血管から組織に浸出した後、組織の輸入リンパ管を通り、リンパ節に移動し、リンパ節から輸出リンパ管を通り、下流に他のリンパ節がある場合はそのリンパ節を通り、ない場合は直接胸管を経て、血中に戻るルートである。二つ目はリンパ節内の HEV からリンパ節に入り、輸出リンパ管と胸管を経て再び血液に戻るルートである。

T 細胞の組織指向性の獲得

体内を循環していたナイーブ T 細胞が DC から抗原提示を受けることでエフェクター・メモリー T 細胞に分化・増殖すると、組織に移行し、その機能を発揮することができる。ナイーブ T 細胞は L-セレクチン (CD62L) を高発現しているが、抗原提示を受けると、その発現を消失させ、CD44 を発現

するようになる。CD62L はリンパ球の組織への移動に重要な細胞接着分子であり、リガンドは GlyCAM-1 と CD34 といった糖タンパク質である³²。また CD44 はヒアルロン酸などの細胞外マトリックス(extracellular matrix; ECM)と結合する接着分子であるため、組織に存在する ECM を介して、組織に移動することが出来る³³。また、T 細胞は抗原提示を受けたリンパ節が所属する組織に移動する傾向が強い(組織指向性)ことが知られている。例えば、腸管組織のリンパ節で抗原提示を受けた場合、エフェクター・メモリーT細胞は腸管指向性を、皮膚組織の所属リンパ節で抗原提示を受けた場合は、皮膚指向性を獲得する。この指向性の獲得は抗原が侵入してきた組織に、抗原特異的な T 細胞を効率よく移動させる仕組みであると考えられる。腸管関連リンパ組織である PP や MLN で抗原提示を受けた T 細胞はインテグリン $\alpha 4\beta 7$ とケモカイン受容体である CCR9 を発現することで、腸管にホーミングすることが出来る。 $\alpha 4\beta 7$ のリガンドは血管内皮細胞に発現する mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) であり、CCR9 のリガンドは小腸で産生される CCL25 である³⁴。一方皮膚にホーミングする CD4⁺ T 細胞は、ケモカイン受容体である CCR4、CCR6、CCR8 および CCR10 などを発現すると言われている^{35,36,37}。CCR4 のリガンドは CCL17/CCL22、CCR8 は CCL8、CCR6 は CCL20、CCR10 は CCL27 である^{38,39,40}。これらのリガンドは表皮細胞などに発現している。また、皮膚の血管内皮細胞との接着には E-セレクチンリガンドと P-セレクチンリガンドが重要である。血管内皮細胞に発現する P-セレクチンは主にムチン様糖タンパク質 PSGL-1 (p-selectin glycoprotein ligand-1) を、E-セレクチンは主に糖タンパク質や糖脂質糖鎖のシアリルルイス X 構造を認識すると考えられている^{41,42}。

このようにリンパ節において組織指向性を獲得した T 細胞が血管から組織に移出する機序は、血流中の T 細胞がセレクチンを介することで血管内皮細胞上をローリングしながら減速する。そこにケモカインによる刺激が加わることで、細胞間接着分子が T 細胞上のインテグリンと結合し強固な接着が生まれる。T 細胞は血管内皮細胞上で停止し、さらにケモカインにより誘引され、血管外へと遊走する。^{43,44}

本研究の目的

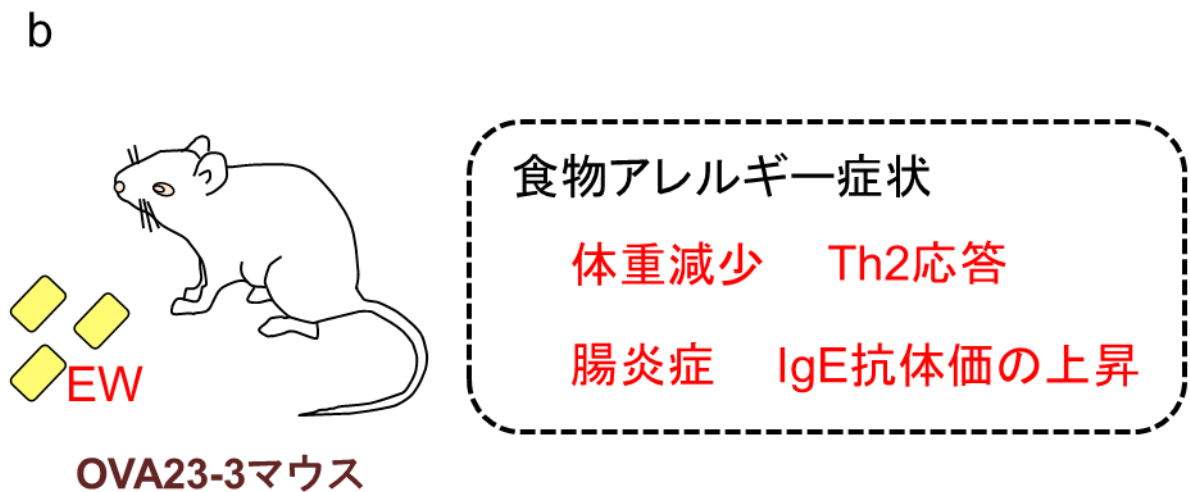
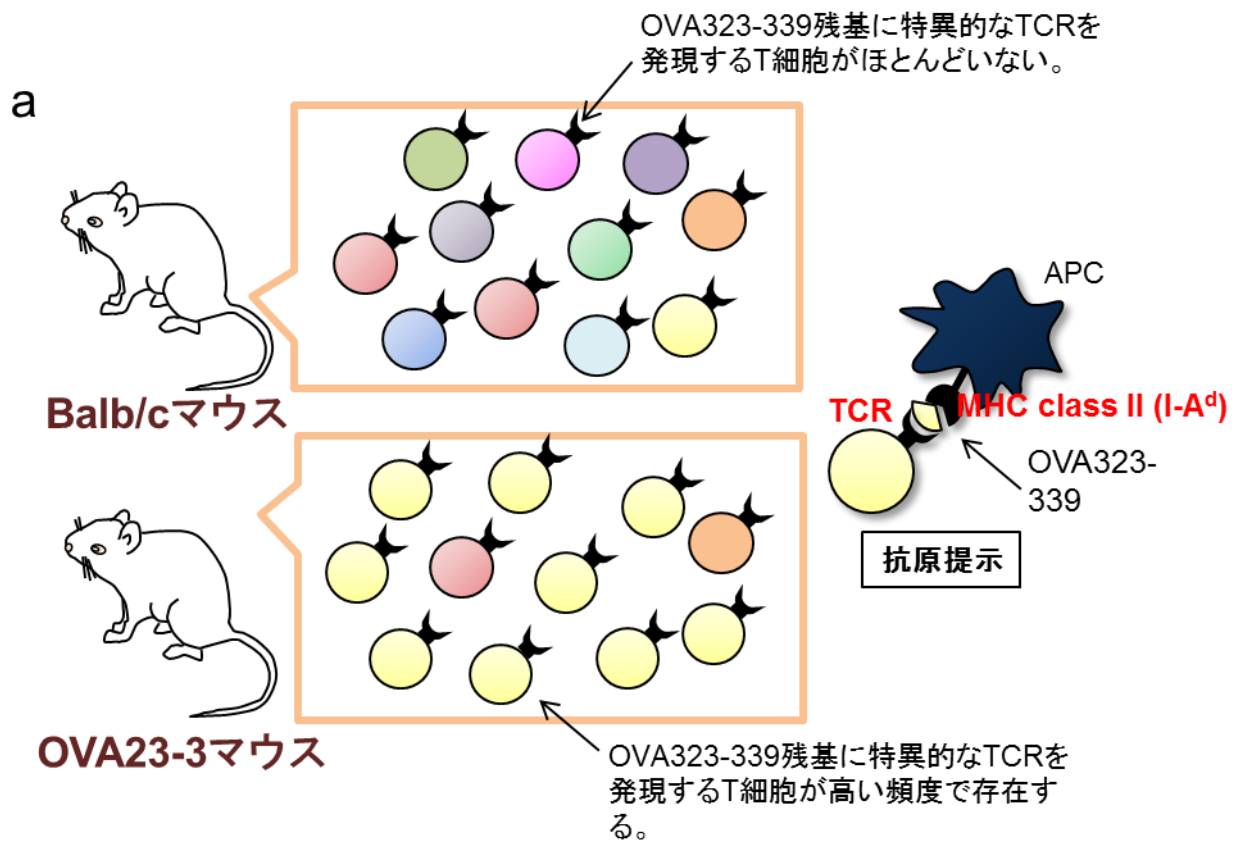
前述のように、近年、食物アレルギーの根治療法として多くの成功例が報告され^{45,46}、期待されているのが、OIT である。OIT は原因食物を除去するのではなく、あえて経口摂取することで経口免疫寛容を獲得させ、食物アレルギーを根治する方法である。しかしながら問題点として、原因食物を摂取するために、治療中にアレルギー反応が惹起され、治療の中断が余儀なくされることが挙げ

られる。一方、食物アレルギーの臨床症状としては皮膚炎症がもっとも多いとされている。また、これまで食物アレルギーは、食物を食べること、すなわち経腸管型の感作で発症すると考えられてきたが、近年、経皮的に食物アレルギーに暴露されることで食物アレルギーが発症するという、経皮感作型の食物アレルギーも注目されるようになった⁴⁷。このような状況下で食物アレルギーにおける皮膚と腸管の免疫応答のクロストークが注目を集めている。特に、最近の研究報告により、皮膚と腸管のクロストークには CD4⁺T 細胞の全身の移動が重要であると考えられる。

そこで本研究の第一章では、OIT の基礎研究として、食物アレルギーモデルマウスである OVA23-3 マウスにアレルギー反応誘発の可能性が低い食物アレルギー由来ペプチドを経口投与することで、食物アレルギーが抑制出来るか否かを調べた。

第二章では、OVA23-3 マウスを用いて食物アレルギー性皮膚炎を発症するモデルマウスの開発を試みた。抗原を経口的に摂取することで、皮膚炎が発症するメカニズムの解明を目指した。

第三章では、細胞の動態解析に適した光変換蛍光タンパク質 KikGR を発現するマウスを用いて食物アレルギー性皮膚炎発症時の免疫細胞の動態解析を行った。特に、MLN または皮膚から免疫細胞がどのように移動しているのか、その動態解析を行った。



序論 図 1 OVA23-3マウス

OVA23-3マウスはOVAの323-339残基に特異的なTCRを発現するトランスジェニックマウスである(a)。EWの経口投与により、食物アレルギー症状を発症する(b)。

第一章

T細胞エピトープペプチドを用いた食物アレルギーの 抗原特異的な抑制法の検討

本章の内容の一部は *Bioscience of Microbiota, Food and Health* Vol. 33, No. 1, pp.47-51 「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」に掲載済みであり、契約内容により、インターネット公表に不適切なカ所があるため、公表できないカ所がある。また、今後学術誌として出版予定の内容も含むため、一部公開できないカ所がある。5 年以内に出版予定である。

I. 序

食物アレルギーの有病率は先進国を中心に増加傾向にある。現在の治療法は原因となる食物を食べない(除去食)という一時しのぎの対処療法が基本であり、根本的な治療法が確立されていない。このような状況下で近年、臨床を中心に注目を集めているのが、経口免疫療法(OIT)と呼ばれる治療法である。原因となる食物を避けるのではなくあえて食べることで経口免疫寛容を獲得し、食物アレルギーの治癒を目指す治療法である。この治療法の問題点としては、原因食物を食べることが必要であるため、それに伴い食物アレルギー症状も誘発されてしまうことである。現在の所、OIT の成功例は国内外で多く報告されているが、原因食物をどの程度の量で、どのような日程で摂取するべきかという明確な基準が存在せず、様々な病院で独自の方法が存在する現状である。そこで本研究では、より安全で効果的な経口免疫療法を行うために、原因食物そのままではなく、修飾を施した食物アレルゲンを用いてOITを使用することを考えた。その修飾食物アレルゲンとして、経口免疫寛容の誘導に必須である T 細胞が抗原を認識するために必要な領域(エピトープ)部分のみを

含むペプチドを検討した。T細胞エピトープペプチドとしては、10～20アミノ酸残基の低分子ペプチドを用いることで、経口免疫寛容の誘導に必須なT細胞エピトープとしての機能は保持され、アレルギー症状を誘導するIgEの架橋は避けることができると予想できる。

具体的には、代表的な卵アレルギーであるOVAの323-339残基に相当する合成ペプチド(17残基)と、OVAの323-339残基に特異的なTCRを持つトランスジェニックマウスであるOVA23-3マウスを用いて抗原特異的な経口免疫療法開発のための基盤研究を行った。OVA23-3マウスは、EWの自由摂取のみで7日から10日目に向けてIL-4を中心とするTh2サイトカインの産生、血中IgE抗体価の上昇、および体重減少を伴う腸炎症などの食物アレルギー症状を引き起こす有用な食物アレルギーモデルである²⁶。このOVA23-3マウスにT細胞エピトープであるOVA323-339ペプチドをEW摂取の前もしくは後に胃内投与した。T細胞エピトープペプチドの経口投与が抗原特異的にTh2応答を抑制し、さらに食物アレルギー症状を抑制できるかどうかを調べた。

II. 材料と方法

1. 実験動物

Balb/cA (H-2^d) マウスは日本クレア(東京)より購入した。OVA23-3 マウスは東海大学医学部免疫学教室の垣生園子教授より供与された。なお、繁殖は三協ラボサービス(東京)に委託した。OVA23-3 マウスは Balb/cA マウスと同一の遺伝的背景を有し、OVA の 323-339 残基を I-A^d 拘束特異的に認識するマウス CD4⁺ T 細胞クローン 7-3-7 の $\alpha\beta$ TCR 遺伝子が導入されたマウスである。両マウスは東京大学農学部 2 号館地下動物室において飼育した。飲水として滅菌水(脱イオン水をオートクレーブにより 121°C で 20 分間滅菌)を、餌として Balb/cA マウスには MF(オリエンタル酵母、東京)を、OVA23-3 マウスには γ 線照射飼料 CE-2(日本クレア)を与えた。なお実験には 6 週齢以上の雄または雌のマウスを用いた。実験ごとに雄雌を揃えた。なお動物実験は、東京大学農学生命科学研究科動物実験委員会の承認を得て、東京大学動物実験実施規則を遵守し行った。

2. 卵白食および OVA ペプチド

OVA 含有飼料(卵白食)として、飼料中のタンパク質成分 20%全てが卵白タンパク質からなる飼料を使用した。なお、卵白タンパク質のうち 54%が OVA である。卵白食の作製は船橋ファーム(千葉)に委託した。

OVA ペプチドとして、OVA の 323-339 残基に相当する合成ペプチドを使用した。323-339 残基のアミノ酸残基は ISQAVHAAHAEINEAGR である。なお、全てのペプチドは HPLC により精製されている。合成ペプチドの作製は株式会社バイオロジカ(愛知)または東京大学医科学研究所蛋白質解析室に委託した。

3. OVA323-339 ペプチドの胃内投与

OVA323-339 ペプチドを 2.5 mM になるように生理食塩水に溶解した。マウス 1 匹の 1 回の投与につき、2.5 mM の合成ペプチドを 200 μ l 胃内投与した。胃内投与には、0.9 ϕ \times 38 mm 長のディスプレイダブル・フィーディングニードル(フチガミ器械、京都)と 1 ml シリンジ(テルモ、東京)を用いた。

4. 試薬調製

(1) 培地

RPMI1640 (日水製薬、東京)を超純水に終濃度 10.2 g/L になるように溶解した後、オートクレーブにより 121°C で 20 分間滅菌した。その後、100 U/ml ペニシリン (Meiji Seika ファルマ、東京)、ストレプトマイシン (Meiji Seika ファルマ)、50 μM 2-メルカプトエタノール (東京化成工業、東京)、0.2% 炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業) および 0.03% L (+) - グルタミン (和光純薬工業) を加え、無血清 RPMI 培地とした。無血清 RPMI 培地にウシ胎仔血清 (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、10% になるように加えたものを 10% FCS-RPMI 培地とした。

(2) MACS 緩衝液

0.5% ウシ血清由来アルブミン (BSA) と 2.0 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を MACS 緩衝液とした。

(3) PBS-Tween

PBS 溶液 5 L に 655 g のリン酸水素二ナトリウム・十二水和物 (和光純薬工業)、125 g のリン酸二水素カリウム (和光純薬工業)、58.8 g の塩化ナトリウム (和光純薬工業)、5.0 g のアジ化ナトリウム (和光純薬工業) および 12.5 ml の Tween 20 (Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate) (和光純薬工業) を溶解し、この溶液を 5×PBS-Tween 溶液とした。

(4) BSA/PBS

1% BSA (和光純薬工業)、0.02% アジ化ナトリウム (和光純薬工業) を含む PBS 溶液を 1%BSA/PBA とした。3% BSA を含むようにしたものを 3% BSA/PBS とした。

(5) 1%BSA/PBA-Tween

1%BSA/PBA に Tween 20 を 250 μl 加えたものを 1%BSA/PBA-Tween とした。

(6) ジエタノールアミン塩酸塩緩衝液

超純水に 97 ml の 2,2'-イミノジエタノール (和光純薬工業)、100 mg の塩化マグネシウム・六水和物 (和光純薬工業) を溶解した。塩酸を用いて pH 9.8 に調整し、超純粋を加えて全量を 1 L とした。

(7) FACS 緩衝液

1% FCS (Bio West)、0.1% アジ化ナトリウム (和光純薬工業) を含む PBS 溶液を FACS 緩衝液とした。

5. 脾臓または腸間膜リンパ節細胞の調製

マウスより脾臓または腸間膜リンパ節 (MLN) を摘出し、シリンジプラグを用いて 5% FCS-RPMI 培地中ですり潰した。得られた細胞懸濁液をメッシュに通し、これを脾臓 whole 細胞または MLN whole 細胞とした。なお各群 $n = 2$ 以上で実験しており、培養は群ごとにすり潰した細胞を混ぜ、培養実験に用いた。

6. CD4⁺ T 細胞の調製

磁気細胞分離システム (MACS; Miltenyi Biotec, Germany) を用いて CD4⁺ T 細胞を調製した。上記の方法で調製した脾臓 whole 細胞と MLN whole 細胞の細胞数を数え、細胞 1×10^7 個に対し、抗マウス CD4 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を 5 μ l、MACS 緩衝液を 45 μ l 加えてよく混ぜ合わせた。15 分間氷上で静置した後、MACS 緩衝液を用いて 2 回洗浄した。この細胞懸濁液を MACS LS 分離カラム (Miltenyi Biotec) に添加し、磁気フィールド内で CD4 陽性細胞を選択的に回収した。得られた CD4⁺ 細胞画分を脾臓 CD4⁺ T 細胞または MLN CD4⁺ T 細胞とした。

7. 抗原提示細胞の調製

Balb/cA マウスより脾臓を摘出し、シリンジプラグを用いて 5% FCS-RPMI 培地中ですり潰した。メッシュに通した後、細胞数を数え、 1×10^7 個の細胞に対して 5% FCS-RPMI 培地を 90 μ l、マイトマイシン C (Sigma) 溶液を 10 μ l (終濃度 50 μ g/ml) 加えて良く混ぜ合わせた。37°C で 30 分間静置させた後、5% FCS-RPMI 培地を用いて 2 回洗浄した。これを抗原提示細胞とした。

8. 細胞培養

96 ウェル平底プレート (BD Falcon) を用いて、200 μ l の 5% FCS-RPMI 中に CD4⁺ T 細胞を 1×10^5 個、抗原提示細胞を 4×10^5 個、さらに抗原として OVA (2 \times cryst. ; 生化学工業) または OVA323-339 ペプチドを適切な終濃度になるように添加した。37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間培養した後、培養上清を回収した。

9. サイトカイン産生試験

培養上清中に含まれるサイトカイン量をサンドイッチ ELISA (Enzyme-linked immunoSorbent

assay) により測定した。方法は以下の通りである。

(1) IL-2、IL-4 および IFN- γ 測定方法

一次抗体を 0.1 M リン酸水素二ナトリウム溶液を用いて適切な濃度になるように希釈した。これを 96 ウェル ポリスチレン製マイクロタイタープレート (Nunc、Denmark) に 1 ウェルあたり 50 μ l 添加し、4°C で一晩静置した。Skan WASHER (SKATRON) を用いて PBS-Tween で 5 回洗浄し、1% BSA/PBS を 1 ウェルあたり 100 μ l 添加して室温で 30 分間以上 2 時間未満静置した。同様に洗浄した後、培養上清または標準溶液を適切な濃度になるように 1% PBS/BSA-Tween で希釈し、1 ウェルあたり 50 μ l 添加して、常温で 2 時間静置または 4 °C で一晩静置した。洗浄後、1% PBS/BSA-Tween で適切な濃度に希釈した二次抗体を 1 ウェルに 50 μ l 添加して、室温で 1 時間静置した。洗浄後、1% PBS/BSA-Tween でstreptavidin結合アルカリフォスファターゼ (ZYMED、USA) を適切な濃度に希釈し、1 ウェルあたり 50 μ l 添加して、室温で 30 分間静置した。洗浄後、4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム・六水和物 (東京化成工業) をジエタノールアミンバッファーで 1 mg/ml になるように溶解し、1 ウェルあたり 50 μ l 添加した。室温で静置して、発色させ、マイクロプレートリーダー Model 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) により 405 nm (reference 490 nm) で吸光値を測定した。

用いた一次抗体および二次抗体は、ラット抗マウス IL-2 モノクローナル抗体 JES6-1A12 および JES6-5H4 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)、ラット抗 IL-4 モノクローナル抗体 BVD4-1D11 および BVD6-24G2 (BD Pharmingen)、ラット抗マウス IFN- γ モノクローナル抗体 XMG1.2 および R4-6A2 (BD Pharmingen) である。また標準溶液は、IL-2 と IFN- γ に関しては当研究室で精製したものを、IL-4 に関してはリコンビナント マウス IL-4 (PeproTech) を使用した。

IL-2、IL-4 および IFN- γ は第一章と同様に ELISA 法を用いて測定した。IL-10 は以下に示す方法で測定した。

(2) IL-10 測定方法

ラット抗マウス IL-10 抗体 (JES5-2A5, BD Pharmingen) を一次抗体とし、0.2 M リン酸ナトリウム溶液で適切な濃度に希釈した。これを 96 ウェル ポリスチレン製マイクロタイタープレート (Nunc) に 1 ウェルあたり 50 μ l 添加し、4°C で一晩静置した。PBS-0.05% Tween で 3 回洗浄した後、10% FCS/PBS を 1 ウェルあたり 100 μ l 添加し、室温で 1 時間静置した。同様に洗浄した後、10% FCS/PBS で適切な濃度になるように希釈した培養上清と標準溶液 (当研究室で精製したもの) を 1 ウェルに 50 μ l 添加し、4 °C で一晩または室温で 2 時間静置した。PBS-0.05% Tween で 5 回洗浄

後、10% FCS/PBS で適切な濃度になるように希釈した二次抗体であるビオチン化ラット抗マウス IL-10 抗体 (JES5-16E3, BD Pharmingen) と HRP 標識ストレプトアビジンを 1 ウェルに 50 μ l 添加し、室温で 2 時間静置した。PBS-0.05% Tween で 7 回洗浄後 (1 回の洗浄ごとに 30 秒静置した)、TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIA™) の Substrate Reagent A と Substrate Reagent B を等量混合した溶液を 1 ウェルに 50 μ l 添加し、室温・暗所で 30 分間静置した。2 N H₂SO₄ を 1 ウェルに 20 μ l 添加して酵素反応を停止させ、マイクロプレートリーダー Model 680 (Bio-Rad) により 450 nm (reference 570 nm) で吸光値を測定した。

10. 血中総 IgE 抗体価および OVA 特異的 IgE 抗体価の測定

(1) 血清の採取

カミソリでマウスの尾に切り込みを入れ、採血をした。得られた血液を 4°C で 3 時間以上静置した。10,000 rpm、4°C の条件で 10 分間遠心し、血清を採取した。

(2) サンドイッチ ELISA 法による血清中の抗体価の測定

一次抗体である抗マウス IgE 抗体 R35-92 (BD Pharmingen) を 0.05 M 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH 9.6) で適切な濃度になるように希釈した。これを 96 ウェル ポリスチレン製マイクロタイタープレート (Nunc) に 1 ウェルあたり 50 μ l 添加し、4°C で一晩静置した。PBS-Tween で洗浄し、3%BSA/PBS を 1 ウェルあたり 100 μ l 添加し、2 時間静置した。同様に洗浄後、試料血清および標準溶液を 1% PBS/BSA-Tween で適切な濃度になるように希釈して、1 ウェルあたり 50 μ l 添加し、常温で 2 時間静置または 4°C で一晩静置した。なお、標準溶液は、血中総 IgE 抗体価の測定にはマウス IgE 抗体 (BD Pharmingen) を、OVA 特異的 IgE 抗体価の測定には OVA を過剰免疫して得られた血清を使用した。洗浄後、総 IgE 抗体価測定にはビオチン標識抗マウス IgE 抗体 (LO-ME-2, Serotec) を、OVA 特異的 IgE 抗体価の測定にはビオチン標識 OVA を、適切な濃度になるように 1%BSA/PBA-Tween で希釈して、1 ウェルあたり 50 μ l 添加し、1 時間静置した。洗浄後、ストレプトアビジン結合アルカリフォスファターゼ (ZYMED) を 1%BSA/PBA-Tween で適切な濃度になるように希釈して、1 ウェルあたり 50 μ l 添加し、1 時間静置した。洗浄後、4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム・六水和物 (東京化成工業) をジエタノールアミンバッファーで 1 mg/ml になるように溶解し、1 ウェルあたり 50 μ l 添加した。室温で静置して発色させ、マイクロプレートリーダー Model 680 (Bio-Rad) により 405 nm (reference 490 nm) で吸光値を測定した。

11. 増殖応答の測定

培養開始から 24 時間後の培養上清中に $[^3\text{H}]$ -メチルチミジン (Moravek Biochemicals, USA) を 18.5 kBq (0.5 μCi) となるように添加した。その 18 時間後にセルハーベスター (SKATRON Instrumental, Lier, Norway) により細胞をグラスファイバーフィルター (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) に回収した。細胞中の $[^3\text{H}]$ -メチルチミジンを β カウンター (PerkinElmer Life Sciences) により測定した。

12. 空腸組織切片の作製および染色

マウスの空腸を摘出し、10%中性ホルマリン (和光純薬工業) を用いて固定した。腸管を一晩流水にて洗浄し、脱水処理の後、パラフィンに包埋した。包埋には自動包埋装置 (SAKURA Tissue-Tek VIP 5 Jr) を用いた。パラフィンブロック作製の際には、切片が薄切面に垂直になるようにした。パラフィンブロックはリトラーム REM-710 (大和光機工業、埼玉) を用いて薄切した。腸管組織の炎症評価はパラフィン切片をヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) することにより行った。

13. フローサイトメリーによる $\text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+ \text{T}$ 細胞の解析

Foxp3 の染色は PE anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set (eBioscience) 付属のプロトコールに従って行った。MACS 法もしくは溶血により得られた $2\text{-}10 \times 10^5$ 個の細胞を FACS 緩衝液で洗浄した。その後、FACS 緩衝液で希釈したラット抗マウス CD16/CD32 抗体 (93, BioLegend) を添加し、遮光して 4°C で 5 分間静置した。さらに適切な濃度に希釈した APC 標識抗 CD4 抗体 (RM4-5, eBioscience) を $50 \mu\text{l}$ 添加し、遮光して 4°C で 20 分間静置した。FACS 緩衝液で洗浄した後、 $300 \mu\text{l}$ の Fix/Perm working solution に懸濁し、遮光して 4°C で 2-18 時間静置した。FACS 緩衝液で洗浄した後、 $500 \mu\text{l}$ の Permeabilization Buffer で二回洗浄した。Permeabilization buffer で希釈したラット抗マウス CD16/CD32 抗体 (93, BioLegend) を $50 \mu\text{l}$ 添加し、遮光して 4°C で 15 分間静置した。さらに Permeabilization buffer で希釈した PE 標識抗 Foxp3 抗体 (FJK-16s, eBioscience) を $50 \mu\text{l}$ 添加し、遮光して 4°C で 30 分間静置した。Permeabilization buffer で 2 回洗浄し、FACS 緩衝液で懸濁した懸濁液を検体とした。検体はフローサイトメーター FACS LSR (BD Bioscience) を用いて蛍光染色した細胞の頻度を解析した。得られたデータは FlowJo ソフトウェア (Tree Star) を用いて解析を行った。

14. 有意差検定

2 群間の有意差検定には Student の t 検定を用いた。他群間の有意差検定には Tukey の HDS 法を用いた。

III. 結果

1. OVA323-339 ペプチド事後投与におけるサイトカイン産生量の抑制効果

OVA23-3 マウスに EW を経口投与することで食物アレルギー症状を誘導させた(炎症誘導期間)。その後、OVA323-339 ペプチドを胃内投与した(寛容誘導期間)。一度誘導された食物アレルギー症状が抑制されるかどうか、すなわち治療効果が期待できるかどうかを調べた。この系を以降「OVA323-339 ペプチドの事後投与」として扱う。

具体的には、OVA23-3 マウスに EW を 7 日間自由摂取させた後、7 日間のうちに 3 回 2.5 mM の OVA323-339 ペプチドを 200 μ l 胃内投与した(EW/Peptide 群)。対照群として、OVA323-339 ペプチドの代わりに生理食塩水を等量胃内投与した群(EW/Saline 群)と通常食である CE-2 で同期間通常に飼育した群(CE-2 群)を設けた。なお、EW/Peptide 群も EW/Saline 群も胃内投与期間は通常の CE-2 食と滅菌水で飼育した(図 1-1a)。

EW 投与開始から 7 日目とペプチド投与期間終了後の 14 日目に解剖を行った。SPL から CD4⁺T 細胞を分離し、抗原提示細胞および OVA323-339 ペプチドと共に培養し、サイトカインの産生量を測定した(図 1-1b)。その結果、7 日間 EW を自由摂取させると、CE2 摂取群と比較して、IL-2 の産生量が低下し、IL-4 および IFN- γ の産生量が増加した(図 1-2a)。その後 OVA323-339 ペプチドを胃内投与すると(EW/Peptide 群)、生理食塩水を胃内投与した群(EW/Saline 群)よりも、IL-4 産生量が有意に低下した(図 1-2b)。IFN- γ の産生量は EW/Peptide 群が EW/Saline 群よりもわずかに低下した。IL-2 の産生量は両群で差はなかった。以上の結果より、EW 経口投与により食物アレルギー状態の OVA23-3 マウスに、OVA323-339 ペプチドを胃内投与すると、Th2 応答が抑制されることが明らかになった。なお、この Th2 応答抑制効果は修士論文で明らかになったことである。

この項の図は Bioscience of Microbiota, Food and Health Vol. 33, No. 1, pp.47-51「Oral Administration of T Cell Tpitope Peptide Inhibits the Systemic IL-4 Response Elicited by an Egg-White Diet in a TCR Transgenic Mouse Model」に掲載済みであり、契約内容により、インターネット公表できない。

2. OVA323-339 ペプチド事後投与における体重減少と腸炎症の抑制評価

OVA23-3 マウスは EW 経口摂取にともない食物アレルギー症状として体重減少と腸炎症が誘導

されるモデルである。OVA323-339 ペプチドの事後投与に Th2 応答抑制効果が認められたため、食物アレルギー症状の抑制も可能であるか調べた。

投与期間中は 2、3 日おきに体重を測定し、投与開始日からの体重変化率を求めた。またペプチド投与期間終了後(14 日目)に腸炎症を解析した。その結果、EW/Peptide 群、EW/Saline 群共に EW 投与期間は体重が減少し、OVA323-339 ペプチドまたは生理食塩水投与期間に共に回復した(図 1-3)。両群の間に差は見られなかった。また 14 日目の腸炎症においても両群で差が見られなかった(データ未掲載)。以上の結果から、両群ともに寛容誘導期間には EW ではなく CE-2 を摂取していたために、体重減少または腸炎症から回復し、OVA323-339 ペプチドのアレルギー症状抑制効果を評価することが困難と予想された。

3. OVA323-339 ペプチドの事前投与における体重減少と腸炎症の抑制効果

この項の内容は今後学術雑誌論文として出版予定であり、公表することができない。5 年以内に出版予定である。

4. OVA323-339 ペプチドの事前投与におけるサイトカイン産生量抑制効果

この項の内容は今後学術雑誌論文として出版予定であり、公表することができない。5 年以内に出版予定である。

5. OVA323-339 ペプチドの事前投与における IgE 抗体価抑制効果の検討

この項の内容は今後学術雑誌論文として出版予定であり、公表することができない。5 年以内に出版予定である。

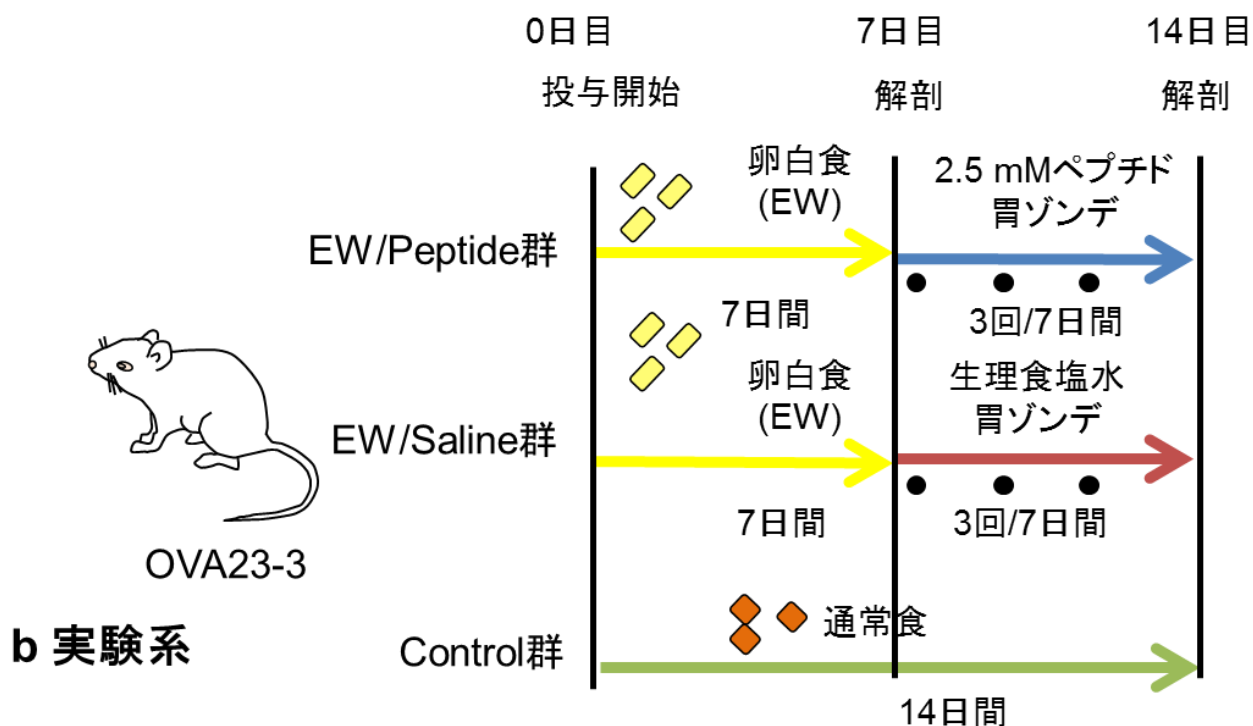
6. OVA323-339 ペプチドの事前投与における Foxp3⁺T 細胞の発現割合の測定

この項の内容は今後学術雑誌論文として出版予定であり、公表することができない。5 年以内に出版予定である。

VI. 考察

この項の内容は今後学術雑誌論文として出版予定であり、公表することができない。5 年以内に出版予定である。

a 投与スケジュール



b 実験系

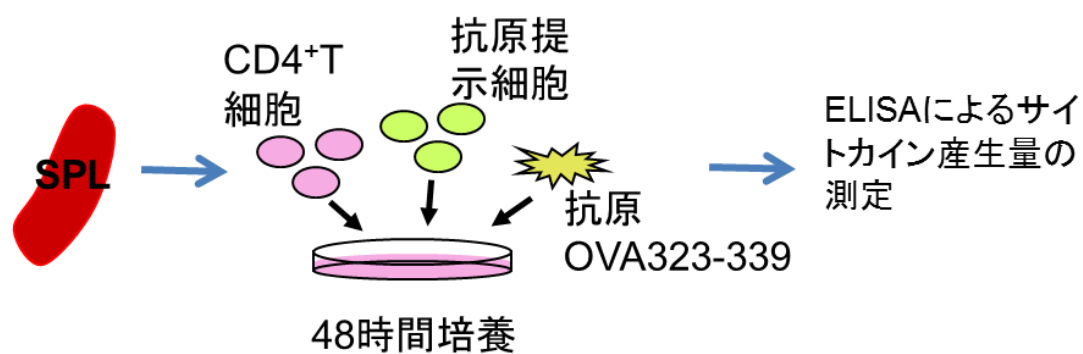


図 1-1 OVA323-339ペプチドの事後投与スケジュールと方法

OVA23-3マウスに7日間EWを自由摂取させた。その後7日間のうちに3回OVA323-339ペプチドを胃内投与した。7日目と14日目にマウスのSPLを摘出した。CD4⁺T細胞を分離し、抗原提示細胞およびOVA323-339ペプチドと共に培養した。48時間後に培養上清を回収し、サイトカイン産生量を測定した。

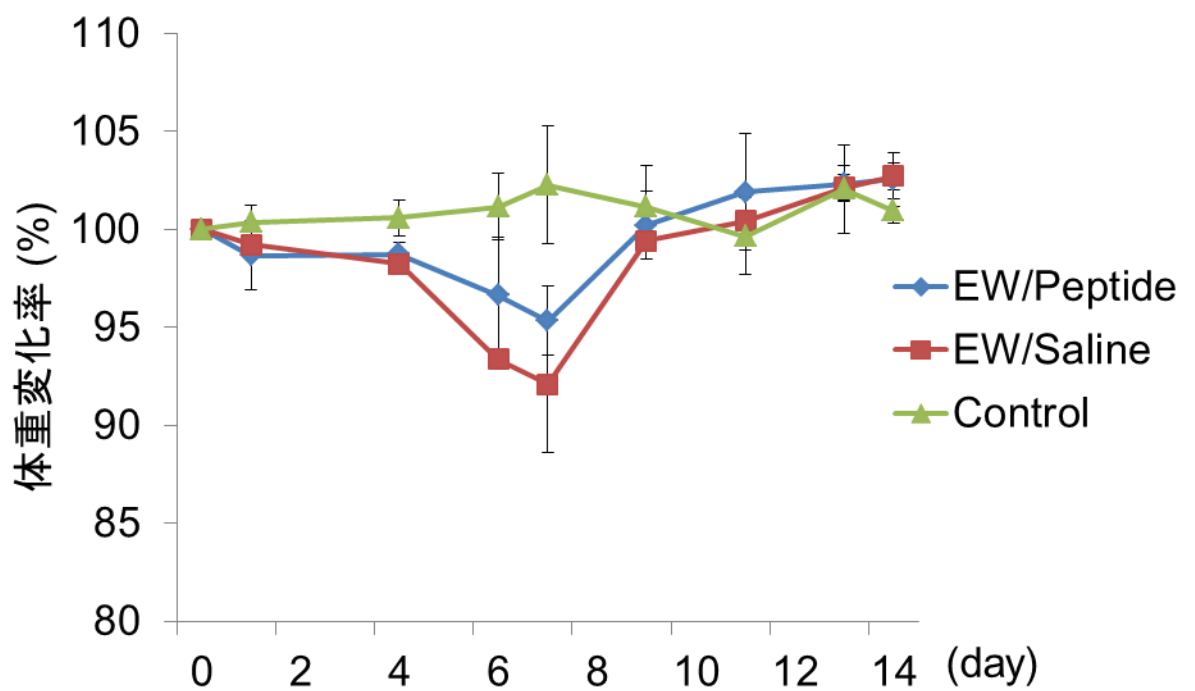


図 1-3 OVA323-339ペプチドの事後投与における体重変化率

2、3日に1回体重を測定し、投与開始時に対する変化率を求めた。結果を平均±SDで示した。

第二章

食物アレルギー性皮膚炎モデルの作製

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年以内に出版予定である。

I. 序

食物アレルギーの有効な治療法の開発には、臨床研究だけでなく、より優れた疾患モデルを用いて、その発症機構を詳細に解析することが重要であると考えられる。食物アレルギーの臨床症状は、皮膚症状、粘膜症状、呼吸器症状、消化器症状、ショック症状など多岐にわたる。中でも最も多いとされるのが皮膚症状であり、80%以上の患者が発症していると考えられる⁵。実際、アトピー性皮膚炎の患者の30~40%が食物アレルギーを併発しているとの報告もある⁵³。しかし、原因食物を食べて皮膚炎が発症・悪化する詳細なメカニズムは分かっておらず、その解明が重要な課題となっている。この問題を解決するためには、食物アレルギー性の皮膚炎を発症する有用な動物モデルが必要であるが、ほとんど報告がない。第一章で使用した OVA23-3 マウスは、アジュバントや他の薬剤なしに卵白食の自由摂取のみで IgE 抗体価の上昇、IL-4 などの Th2 サイトカイン産生量の上昇、体重減少を伴う腸炎症の発症などが認められる有用な食物アレルギーモデルである²⁶。しかしながら、皮膚炎症が惹起されるか否かは調べられていなかった。OVA23-3 マウスが皮膚炎も発症するモデルであれば、よりヒトの臨床症状に類似したモデルとなり、臨床応用に向けてより有用な知見を提供できる可能性が高い。そして、患者数が多いにもかかわらずこれまで研究が進めてこられなかった食物アレルギー性皮膚炎のメカニズム解析が可能となる。よって本研究の目的は、OVA23-3 マウスを用いて有用な食物アレルギー性皮膚炎モデルを開発し、そのメカニズムを解明することである。

第三章

食物アレルギー性皮膚炎モデルにおける 免疫細胞の動態解析

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年以内に出版予定である。

I. 序

免疫系は多くの細胞や分子が時間・空間・数量的に複雑に制御された機構である。免疫細胞が全身の血管およびリンパ管を通り、個体全体を移動することで免疫系が成立している。アレルギーなどの免疫疾患の発症機構を解明するためには、従来のような組織や細胞レベルの解析にとどまらず、個体レベルでどのように免疫システムが制御されているのかを含めて解明する必要があると考える。

本研究の第二章では食物抗原の経口投与に伴い食物アレルギー様の症状を呈する OVA23-3 マウスを用いて、食物アレルギー性皮膚炎モデルを作製した。またそれを用いて食物アレルギー性皮膚炎発症時に MLN と SPL で $CD4^+$ T 細胞が皮膚ホーミングレセプターと考えられる CCR4 や E-lig を発現し、皮膚に移動する可能性を示した。しかしながら、細胞や組織レベルの解析であり、実際に $CD4^+$ T 細胞が SPL や MLN からどのように移動することで、皮膚炎が誘導されるのかは分からない。そこで本章では、細胞動態の解析に適した OVA-KikGR マウスを用いて EW 経口摂取後の OVA 皮膚接触時における免疫細胞の動態を解析することで、食物アレルギー性皮膚炎の発症メカニズムの解明を目指した。

KikGR マウスは光変換型蛍光タンパク質 Kikume-ishi green-red (KikGR) を発現するマウスである⁷⁰。KikGR タンパク質は紫外線または紫色の光を照射することで緑色 (KikGR-Green) から赤色 (KikGR-Red) に光変換する。ROSA26-CAG-loxP-stop-loxP-KikGR ノックインマウスと CAG-Cre マウスの掛け合わせにより作成されたマウスであり、全身の細胞が KikGR タンパク質を発現する⁶⁶。そ

のため、KikGR マウスの特定の部位に紫外線または紫色光を照射すると、その部分の細胞が緑色から赤色に光変換し、細胞をマークすることができる。すなわち、紫色光照射後マウスを生かしておき、一定時間後に解析することで、一つの個体の中で細胞がどこからどこに移動するかを追跡することが可能である⁶⁶。

本研究ではこの KikGR マウスと OVA23-3 マウスを交配させ OVA-KikGR マウスを作製することで、抗原特異的な T 細胞の動態解析が可能なツールを得た。KikGR や他の光変換蛍光タンパク質「カエデ」などを発現するマウスを用いて免疫細胞の動態を解析した研究はいくつか存在するが、抗原特異的な解析はなされてこなかった。本研究では OVA-KikGR マウスに、第二章と同様に EW 経口投与後に OVA を皮膚接触することにより食物アレルギー性皮膚炎を誘導した。その際に、MLN または皮膚から抗原特異的に移動する免疫細胞の動態を解析した。

総合討論

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年以内に出版予定である。

参考文献

1. Larché, M., Akdis, C. a & Valenta, R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 761–71 (2006).
2. Wang, J. & Sampson, H. A. Food allergy. **121**, 827–835 (2011).
3. Jacobsen, E. a *et al.* Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J. Exp. Med.* **205**, 699–710 (2008).
4. Flöistrup, H. *et al.* Allergic disease and sensitization in Steiner school children. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 59–66 (2006).
5. 海老澤元宏. 厚生労働科学研究班による食物アレルギーの診断の手引 2011.
6. Branum, A. M. & Lukacs, S. L. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* **124**, 1549–55 (2009).
7. Friedman, a & Weiner, H. L. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6688–92 (1994).
8. Burks, a W., Laubach, S. & Jones, S. M. Oral tolerance, food allergy, and immunotherapy: implications for future treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 1344–50 (2008).
9. Michael H Land, A. W. B. Future of immunotherapy for food allergy E ditorial. *Immunotherapy* **4**, 13–15 (2012).
10. Ventura, M. T. *et al.* Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Dig. Liver Dis.* **38**, 732–6 (2006).
11. Strid, J., Hourihane, J., Kimber, I., Callard, R. & Strobel, S. Epicutaneous exposure to peanut protein prevents oral tolerance and enhances allergic sensitization. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 757–66 (2005).
12. Lack, G. Epidemiologic risks for food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 1331–6 (2008).

13. Kopper, R. a *et al.* Peanut protein allergens: the effect of roasting on solubility and allergenicity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **136**, 16–22 (2005).
14. Untersmayr, E. & Jensen-Jarolim, E. The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 1301–8; quiz 1309–10 (2008).
15. Campos Alberto, E. J. *et al.* IL-10 gene polymorphism, but not TGF-beta1 gene polymorphisms, is associated with food allergy in a Japanese population. *Pediatr. Allergy Immunol.* **19**, 716–21 (2008).
16. Liu, X. *et al.* Associations between specific serum IgE response and 6 variants within the genes IL4, IL13, and IL4RA in German children: the German Multicenter Atopy Study. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 489–95 (2004).
17. Amoli, M. M. *et al.* Polymorphism in the STAT6 gene encodes risk for nut allergy. *Genes Immun.* **3**, 220–4 (2002).
18. Sjögren, Y. M., Jenmalm, M. C., Böttcher, M. F., Björkstén, B. & Sverremark-Ekström, E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 518–26 (2009).
19. Björkstén, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T. & Mikelsaar, M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 516–20 (2001).
20. Shreffler, W. G. *et al.* The Major Glycoprotein Allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, Is a Ligand of Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Nonintegrin and Acts as a Th2 Adjuvant In Vitro. *J. Immunol.* **177**, 3677–3685 (2006).
21. 久保亮治・天谷雅行. 皮膚バリア機能異常と抗原感作. *アレルギー・免疫* **19**, 32–39 (2012).
22. Fukutomi, Y. *et al.* Rhinoconjunctival sensitization to hydrolyzed wheat protein in facial soap can induce wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 531–533.e1–3 (2011).
23. Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H. & Amagai, M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.* **206**, 2937–46 (2009).

24. Kubo, A., Nagao, K. & Amagai, M. Review series Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *J. Clin. Invest.* **122**, 440–7 (2012).
25. Rupa, P. & Mine, Y. Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitope peptides alleviates allergic reactions in a Balb/c mouse model of egg allergy. *Allergy* **67**, 74–82 (2012).
26. 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.* **117**, 1125–32 (2006).
27. Tamauchi, H. *et al.* Oral antigen induces antigen-specific activation of intraepithelial CD4+ lymphocytes but suppresses their activation in spleen. *Immunobiology* **210**, 709–721 (2005).
28. Shida, K. *et al.* Serum IgE response to orally ingested antigen: a novel IgE response model with allergen-specific T-cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 788–95 (2000).
29. Oyoshi, M. & Elkhail, A. Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin. *J. Clin. Invest.* **121**, (2011).
30. Han, H. & Thelen, T. Thymic stromal lymphopoietin-mediated epicutaneous inflammation promotes acute diarrhea and anaphylaxis. *J. Clin. ...* **124**, (2014).
31. Tomura, M. Understanding of immune system by visualization of spatiotemporal regulation of immune cells in the entire body. *YAKUGAKU ZASSHI* 427–433 (2013).
32. Madri, J. a. & Graesser, D. Cell Migration in the Immune System: the Evolving Inter-Related Roles of Adhesion Molecules and Proteinases. *Dev. Immunol.* **7**, 103–116 (2000).
33. Galandrini, R., Galluzzo, E., Albi, N., Grossi, C. E. & Velardi, A. Hyaluronate is costimulatory for Human t cell effector functions and binds to CD44. *J. Immunol. Methods* **153**, 21–31 (1994).
34. Johansson-Lindbom, B. & Agace, W. W. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol. Rev.* **215**, 226–42 (2007).
35. Campbell JJ, Haraldsen G, P. J. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory Tcells. **400**, 776–780 (1999).
36. Islam, S. a *et al.* Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* **12**, 167–77 (2011).

37. Homey, B. *et al.* CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat. Med.* **8**, 157–65 (2002).
38. Shin, H. & Iwasaki, A. Tissue-resident memory T cells. *Immunol. Rev.* 165–181 (2013).
39. Egawa, G. & Kabashima, K. Skin as a peripheral lymphoid organ: revisiting the concept of skin-associated lymphoid tissues. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 2178–85 (2011).
40. Kunkel, E. J. & Butcher, E. C. Chemokines and the Tissue-Specific Migration of Lymphocytes. *Immunity* **16**, 1–4 (2002).
41. 内村健治. ”ホーミングレセプター”L-セレクチンが認識する細胞表面硫酸化糖鎖. *生化学* **85**, 244–252 (2013).
42. Luster, A. D., Alon, R. & von Andrian, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat. Immunol.* **6**, 1182–90 (2005).
43. Weninger, W., Biro, M. & Jain, R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 232–46 (2014).
44. Nourshargh, S., Hordijk, P. L. & Sixt, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 366–78 (2010).
45. Martorell, a. *et al.* Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow’s milk allergy. *Clin. Exp. Allergy* **41**, 1297–1304 (2011).
46. Meglio, P. *et al.* Oral food desensitization in children with IgE-mediated hen’s egg allergy: a new protocol with raw hen's egg. *Pediatr. Allergy Immunol.* **24**, 75–83 (2013).
47. Oyoshi, M. K., Oettgen, H. C., Chatila, T. a, Geha, R. S. & Bryce, P. J. Food allergy: Insights into etiology, prevention, and treatment provided by murine models. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 309–17 (2014).
48. Maggi, E., Vultaggio, A. & Matucci, A. T-cell responses during allergen-specific immunotherapy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **12**, 1–6 (2012).
49. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–64 (2012).

50. Zheng, Y. *et al.* Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T H 2 responses. *Nature* **458**, 351–356 (2009).
51. Burks, a W. *et al.* Oral immunotherapy for treatment of egg allergy in children. *N. Engl. J. Med.* **367**, 233–43 (2012).
52. Akdis, M. & Akdis, C. a. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 621–31 (2014).
53. Werfel, T. *et al.* Eczematous reactions to food in atopic eczema: position paper of the EAACI and GA2LEN. *Allergy* **62**, 723–8 (2007).
54. Jin, H., He, R., Oyoshi, M. & Geha, R. S. Animal models of atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 31–40 (2009).
55. Soumelis, V. *et al.* Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* **3**, 673–80 (2002).
56. Wang, Y.-H. *et al.* IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J. Exp. Med.* **204**, 1837–47 (2007).
57. Imai, Y. *et al.* Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13921–6 (2013).
58. Oyoshi, M. K. *et al.* Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin. **121**, (2011).
59. Iwata, M. *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **21**, 527–38 (2004).
60. Overstreet, M. G. *et al.* Inflammation-induced interstitial migration of effector CD4⁺ T cells is dependent on integrin α V. *Nat. Immunol.* **14**, 949–58 (2013).
61. Nagao, K. *et al.* Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3312–3317 (2009).
62. Anjuere, F. *et al.* In Vivo Adjuvant-Induced Mobilization and Maturation of Gut Dendritic Cells after Oral Administration of Cholera Toxin. *J. Immunol.* **173**, 5103–5111 (2004).

63. Natsuaki, Y. *et al.* Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat. Immunol.* 1–8 (2014). doi:10.1038/ni.2992
64. Lack, Gideon Gideon Lack, M.B., B.Ch., Deborah Fox, B.A., Kate Northstone, M.Sc., and Jean Golding, P. D. Factors Associated with the Development of Peanut Allergy in Childhood. *N. Engl. J. Med.* **348**, 977–985 (2003).
65. Tomura, M. *et al.* Monitoring cellular movement in vivo with photoconvertible fluorescence protein “Kaede” transgenic mice. **105**, 10871–10876 (2008).
66. Tomura, M., Hata, A. & Matsuoka, S. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci. Rep.* 1–11 (2014). doi:10.1038/srep06030
67. Inaba, K. *et al.* Efficient Presentation of Phagocytosed Cellular Fragments on the Major Histocompatibility Complex Class II Products of Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* **188**, 2163–2173 (1998).
68. Guilliams, M. *et al.* Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* **115**, 1958–68 (2010).
69. Henri, S. *et al.* CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* **207**, 189–206 (2010).
70. Tsutsui, H., Karasawa, S., Shimizu, H., Nukina, N. & Miyawaki, A. Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO Rep.* **6**, 3–8 (2005).
71. Tomura, M. & Kabashima, K. Analysis of Cell Movement Between Skin and Other Anatomical Sites In Vivo Using Photoconvertible Fluorescent Protein “Kaede”-Transgenic Mice. *Mol. Dermatology Methods Protoc.* **961**, 279–286 (2013).
72. Nakajima-Adachi, H. *et al.* Peyer’s patches and mesenteric lymph nodes cooperatively promote enteropathy in a mouse model of food allergy. *PLoS One* **9**, e107492 (2014).
73. Tomura, M., Itoh, K. & Kanagawa, O. Naive CD4+ T lymphocytes circulate through lymphoid organs to interact with endogenous antigens and upregulate their function. *J. Immunol.* **184**, 4646–53 (2010).

74. Egawa, G. *et al.* In vivo imaging of T-cell motility in the elicitation phase of contact hypersensitivity using two-photon microscopy. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 977–9 (2011).
75. Casale, T. B. & Stokes, J. R. Immunotherapy: what lies beyond. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 612–9: quiz 620 (2014).
76. Janssen, E. M. *et al.* Opposite effects of immunotherapy with ovalbumin and the immunodominant T-cell epitope on airway eosinophilia and hyperresponsiveness in a murine model of allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 21–9 (1999).
77. Barbey, C., Donatelli-Dufour, N., Batard, P., Corradin, G. & Spertini, F. Intranasal treatment with ovalbumin but not the major T cell epitope ovalbumin 323-339 generates interleukin-10 secreting T cells and results in the induction of allergen systemic tolerance. *Clin. Exp. Allergy* **34**, 654–62 (2004).
78. Creticos, P. & Schroeder, J. Immunotherapy with a ragweed–Toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *New Engl. J. Med.* 1445–1455 (2006). at <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa052916>
79. Jeongmin Lee, Jieun Bang, and H.-J. W. Effect of Orally Administered *Lactobacillus brevis* HY7401 in a Food Allergy Mouse Model. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1636–1640 (2013).
80. Kanzato, H. *et al.* *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 induces apoptosis of antigen-stimulated T cells by modulating dendritic cell function. *Immunobiology* **213**, 399–408 (2008).
81. Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y. & Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 321–35 (2013).
82. Brough, H. a *et al.* Distribution of peanut protein in the home environment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 623–9 (2013).
83. Boussault, P. *et al.* Oat sensitization in children with atopic dermatitis: prevalence, risks and associated factors. *Allergy* **62**, 1251–6 (2007).
84. Flohr, C. *et al.* Atopic dermatitis and disease severity are the main risk factors for food sensitization in exclusively breastfed infants. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 345–50 (2014).
85. Irvine, A. D., McLean, W. H. I. & Leung, D. Y. M. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1315–27 (2011).

86. 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.* **186**, 5629–37 (2011).
87. Dupont, C. *et al.* Cow's milk epicutaneous immunotherapy in children: a pilot trial of safety, acceptability, and impact on allergic reactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, 1165–7 (2010).
88. Li, W., Zhang, Z., Saxon, a & Zhang, K. Prevention of oral food allergy sensitization via skin application of food allergen in a mouse model. *Allergy* **67**, 622–9 (2012).
89. 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* **2**, 22 (2012).
90. 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.* **186**, 5629–37 (2011).

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親切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。

多くの実験手技を教えていただき、鋭いご指摘やアドバイスをいただくとともに、いつも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、足立はるよ特任研究員に心より感謝いたします。

KikGR マウスを御供与くださり、また KikGR マウスを使用した実験の基礎を大変丁寧にご指導くださいました京都大学次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点創薬研究グループの戸村道夫准教授に深く感謝いたします。

皮膚炎モデルに関する実験手法をご教授くださるとともに、様々な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、神沼修主任研究員、北村紀子研究員、佐伯真弓研究員、西村友枝研究員に深く感謝いたします。

的確な御意見をいただき、本研究の発展にご協力くださいました、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、戸塚護准教授に深く感謝いたします。

OVA23-3 マウスを御供与していただきました東海大学医学部免疫学教室（現順天堂大学医学部）の垣生園子教授に感謝いたします。

実験の手技だけでなく研究室での生活における多くのことを丁寧に教えてくださいました、免疫制御研究室の先輩方に心より感謝いたします。

マウス室掃除などの雑務や、ときには実験も手伝ってくれた、免疫制御研究室の後輩たちに深く感謝いたします。

最後に、長い学生生活をいつも暖かく励ましてくれた家族に心より感謝いたします。

平成 27 年 3 月 平出恵利華