

感染様刺激によるアレルギー減弱化機構の解析 :
Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) 受容体の寄与

東北大学大学院薬学研究科

医療薬科学専攻

水野 夏実

目次

第1章	緒言	・・・1
第2章	感染様刺激によるアレルギー減弱モデルの作製	
2-1	序論	・・・5
2-2	結果	・・・7
2-3	考察	・・・13
第3章	感染様刺激によるアレルギー減弱機構の解析	
3-1	序論	・・・14
3-2	結果	・・・16
3-3	考察	・・・47
第4章	総括	・・・50
第5章	実験方法	
5-1	実験動物	・・・53
5-2	試薬	・・・53
5-3	抗体	・・・55
5-4	感染様刺激、及びアレルギー感作・惹起	・・・56
5-5	耳介浮腫の計測	・・・57
5-6	組織学的解析	・・・57
5-7	血清中抗体量測定	・・・57
5-8	細胞調製、培養及び刺激	・・・58

5-9	Flow Cytometry (FACS)	・ ・ ・ 61
5-10	定量的リアルタイム RT-PCR	・ ・ ・ 63
5-11	共培養	・ ・ ・ 66
5-12	免疫蛍光染色法	・ ・ ・ 69
5-13	BMDCs 移入実験	・ ・ ・ 71
5-14	統計処理	・ ・ ・ 73
	謝辞	・ ・ ・ 74
	引用文献	・ ・ ・ 75

略語表

本文中の略語は以下に示す一覧表に従って用いた。

APC	antigen-presenting cell
BM	bone marrow
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
BSA	bovine serum albumin
CCL	Chemokine C-C motif ligand
CCR	CC chemokine receptor
CD	Cluster of Differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
F-BSA	fluorescein isothiocyanate-conjugated BSA
FBS	Fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
Foxp3	forkhead box P3
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IL	interleukin
IgE	immunoglobulin E
IgG	immunoglobulin G
OVA	ovalbumin
PCR	polymerase chain reaction
PE	phycoerythrin
TGF	transforming growth factor

Th1	helper T cell type 1
Th2	helper T cell type 2
Treg	regulatory T cell
alum	aluminium hydroxide
i.p.	intraperitoneal injection
mRNA	messenger RNA
sec	second

第 1 章

緒言

近年、アレルギー患者数は世界的に年々増加の一途をたどっており¹、中でも、先進国において顕著である。その原因としては、アレルゲンの増加、環境汚染、腸内細菌環境、ストレス、そして幼少期の感染機会の低下（衛生仮説）などが挙げられている。例えば、アレルゲンの増加については、植林政策によるスギ花粉飛散量の増加や、住環境変化によるダニの増加が問題となっている。食生活においてもアレルゲンとなるタンパク質摂取量の増加が一つの原因として挙げられている。しかし、アレルギー患者数増加は、個々のアレルゲン増加によるということだけでは説明できない。

また、アレルギー患者数増加の原因の一つと言われる衛生仮説は、1989年にイギリスの Strachan により提唱された「幼少期の感染リスクの低下とアレルギー増加には関係がある」という仮説である²。Strachan は 1953 年に生まれたイギリスの 17,414 名を対象に、23 年間に渡りアレルギー疾患の保有率、家族数、及び兄弟姉妹数について追跡調査した。その結果、気管支喘息や湿疹保有率は兄弟姉妹数と反比例し、また、出生順が遅いほどアトピー有病率が低いことを報告した。これらの結果より、衛生環境の向上などによる幼少期の感染頻度の減少が、アレルギー疾患患者数の増加の原因であると解釈された。その後、衛生仮説を支持する疫学的研究が活発に行われており^{3, 4}、家畜のいる家庭⁵や細菌への感染症罹患経験^{6, 7}がアレルギーを抑えると報告されている。すなわち、幼少期におけるエンドトキシンへの暴露などのヘルパー T 細胞 1 (Th1) 免疫応答の活性が、その後のアレルギー発症を低下させると考えられている^{8, 9}。

通常免疫応答において、体外から侵入した抗原は樹状細胞 (dendritic

cells; DCs) などの抗原提示細胞 (antigen-presenting cells; APCs) に取り込まれる (Fig. 1)。次に、APCs はナイーブ T 細胞を主に Th1 及び Th2 に分化させる。それぞれ Th1 は主に細胞性免疫、Th2 は主に液性免疫を担っており、Th1 及び Th2 は互いに制御し合うことで免疫バランスを保持している。細菌感染、及びエンドトキシンの暴露は Th1 を活性化する¹⁰。一方、アレルギーでは Th1/Th2 バランスが崩壊し Th2 優位な状態である¹¹。新生児の T 細胞のほとんどがナイーブ T 細胞であり、成長過程において抗原と接触することで Th1 あるいは Th2 に分化していく。この過程において、細菌、ウイルス、あるいはエンドトキシンに暴露した場合には DCs の Toll 様受容体 (TLR) の刺激を介して Th1 が活性化され^{12, 13}、また、無菌的な環境で生育した場合には TLR が刺激されず、ナイーブ T 細胞は Th2 へと分化する^{14, 15}。幼少期を過ぎるとナイーブ T 細胞の比率が低下するため、Th1/Th2 バランスが大きく変化することはない。従って、免疫機構の発達に重要な幼少期における感染症やエンドトキシンへの暴露は、Th1 の活性化を誘導し正常な免疫バランスを成立させる。一方、近年の生活環境や抗生物質による無菌的環境で幼少期を過ごす事は、Th2 優位なまま成長するためにアレルギー発症率が増加すると考えられる。

Th1 活性化に重要な TLR は、エンドトキシンなどの病原体に共通する構成成分を認識する受容体である。TLR により認識されるリガンドは、TLR の種類によって決定される。エンドトキシンであるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) はグラム陰性菌外膜構成成分であり、TLR のサブタイプのうち TLR4 によって認識される¹⁶。興味深いことに、マウスを用いた実験によれば、アレルギー感作前における LPS への暴露はアレルギー症状を軽減すると報告されている¹⁷。しかし、衛生仮説に基づくアレルギー減弱の詳細なメカニズムは未解明のままである。また、大腸菌やヘリコバクター・ピロリなどに代表されるグラム陰性菌は、私たちの生活においても身近な感染症の原因となっていることから、本研究で

は LPS によるアレルギー減弱機構に着目した。

また、本研究では TSLP（胸腺間質性リンパ球増殖因子； thymic stromal lymphopoietin）受容体（TSLPR）にも着目している。TSLPR は主に TSLPR とインターロイキン 7（IL-7）受容体 α 鎖（IL7R α ）からなるヘテロダイマーとして機能しており、APCs、特に DCs において高発現している¹⁸。一方、IL7R α は共通 γ 鎖（ γc ）とヘテロダイマーを形成することで、IL-7 のシグナルを伝達する。また、TSLP は IL-7 様サイトカインであり、上皮細胞から産生される。TSLP は DCs 上の TSLPR を介して、アレルギー発症及び増悪化に重要な Th2 の分化、活性化を促進することから^{19, 20} アレルギー発症のマスタースイッチとして注目されている²¹。実際に、TSLP-TSLPR シグナルとアレルギー増悪化に関する報告が数多くなされてきた。例えば、TSLPR 欠損マウスにおいて、強い Th1 免疫応答の誘導²²、及び Th2 免疫応答の低下²³によるアレルギー反応の減弱が報告されている。さらに、TSLPR を発現している DCs は Th2 への分化を誘導できるが、TSLPR 欠損マウス由来の DCs は Th2 への分化誘導が減弱していることも報告されている²⁴。従って、TSLPR はアレルギー増悪化に寄与するだけでなく、その発現量の低下によりアレルギー軽減にも関与すると考えられる。

本研究では、衛生仮説に基づくアレルギー減弱機構の解明を目的とし、まず、LPS によるアレルギー減弱モデルの作製を試みた。次に、LPS によるアレルギー減弱機構の解明を目指し、DCs の TSLPR 発現量及び抗原提示細胞機能に着目して解析を行った。

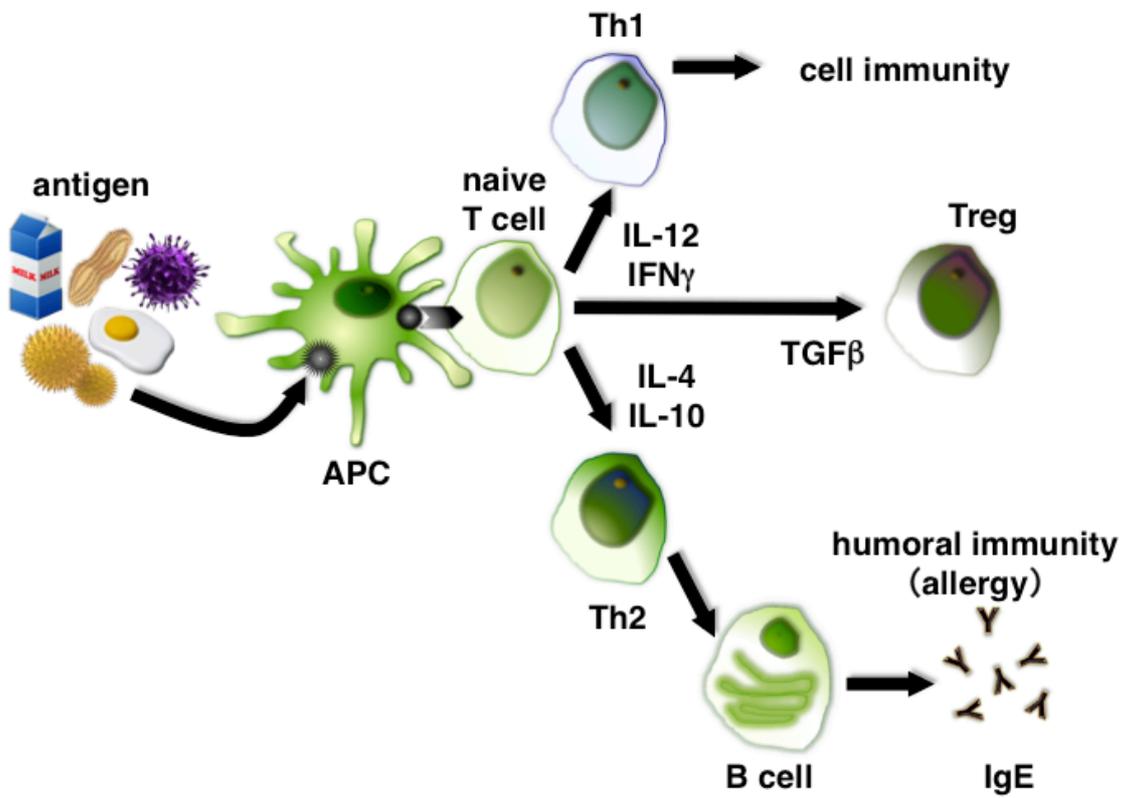


Fig. 1 Immune responses via APC

APC; antigen-presenting cell, Th1; helper T cell type 1, Th2; helper T cell type 2, Treg; regulatory T cell, IgE; immunoglobulin E

第 2 章

感染様刺激によるアレルギー減弱モデルの作製

2-1. 序論

実験動物モデルは複雑な生体内免疫応答を理解する上で欠かせない。衛生仮説に基づくアレルギー減弱機構の解明においても動物を用いた研究がなされてきた。例えば、Arnold らは、ヘリコバクター・ピロリ感染後にアレルゲンで感作、及び惹起した場合、感染していない群と比較して有意にアレルギー症状が軽減することを報告した²⁵。本モデルでは、成熟したマウスと比較して幼少期のマウスに感染させた場合に、アレルギー症状がより強く抑制される。また、Chang らは、インフルエンザ A ウイルスをアレルゲン感作前に感染させた場合、2 週齢のマウスでは感染に引き続くアレルギーが軽減するのに対して、8 週齢マウスを使用した場合では、有意なアレルギーの抑制効果は認められないことを示した²⁶。これらの報告は、衛生仮説に基づく「幼少期の感染症罹患経験がアレルギー軽減に重要である」という点を再現している。エンドトキシンである LPS とアレルギーに関する報告もある。ラットにおいて、感作前の LPS 投与は、引き続きアレルギーを軽減する。しかし、感作 6 日以降の LPS 投与は、むしろアレルギーを増悪化した¹⁷。マウスを用いた研究では、高濃度の LPS はアレルギーを軽減するのに対して、低濃度の LPS ではアレルギーを増悪化させることが報告されている²⁷。用いられた各 LPS 濃度は、実際の環境中エンドトキシン濃度を参考にしたものであり、実際にアレルギー発症率の低い環境ではアレルギー発症率の高い環境と比較して高濃度のエンドトキシンが検出されている⁹。

このように LPS とアレルギーに関する報告は数多くなされ、上述したように、LPS の濃度あるいは投与のタイミングによりアレルギーは増強も軽減もされる

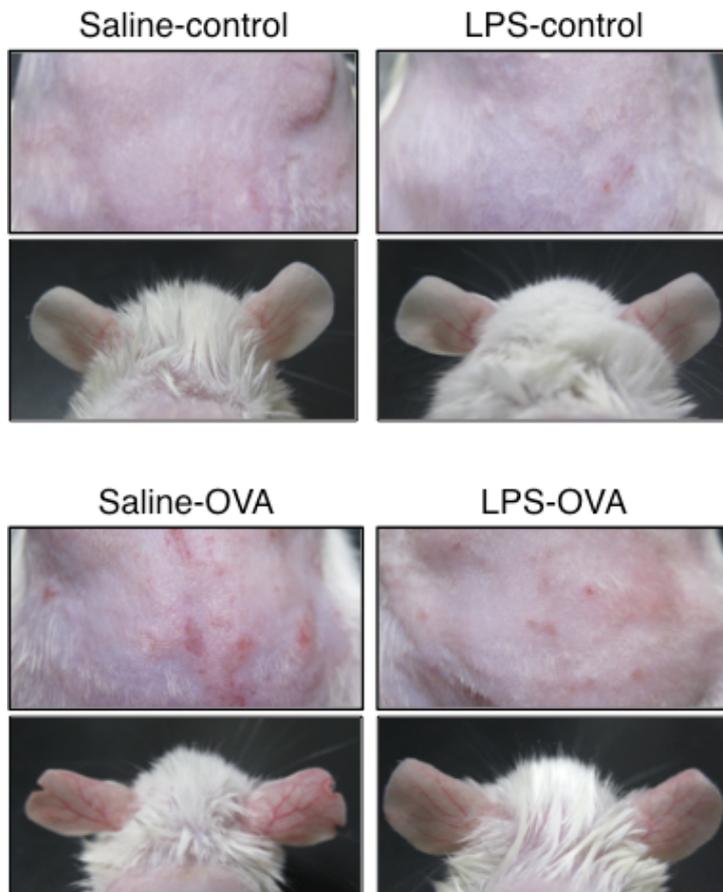
ことが明らかにされている。しかし、幼少期における LPS 刺激が将来のアレルギー軽減に関わる、という衛生仮説を再現し、解析できるモデルは報告されていない。そこで、本章では LPS 刺激を感染様刺激とし、感染様刺激によるアレルギー減弱モデルの作製を試みた。

2-2. 結果

2-2-1. 感染様刺激によるアレルギーの減弱

幼少期における感染様刺激として、4 週齢の雄マウスに LPS (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を腹腔内投与し、続いて、OVA を用いて感作及び惹起をした (第 5 章方法、Fig. 30 参照)。コントロールとして LPS の代わりに生理食塩水を投与した群では、アレルギー惹起開始から 28 日目 (Day 42) の皮膚において、搔爬痕や発赤など強いアレルギー性炎症症状が見られた (Fig. 2)。

Fig. 2 LPS-priming prevents OVA-induced allergic inflammation



Mice were treated with LPS (LPS) or saline (Saline) for 3 weeks, and then sensitized and challenged with OVA or saline (control) as described in Fig. 30. On day 42, back (upper panels) and ear (lower panels) were photographed (n = 6 per each group). Data are representative of two independent experiments.

このアレルギー性炎症症状は、あらかじめ感染様刺激を受けたマウスにおいては明らかに軽減した。アレルギー性浮腫を耳の肥厚により定量化したところ、OVA の塗布によるアレルギー性浮腫は、感染様刺激によって有意に減弱した (Fig. 3 左)。なお、感染様刺激ならびにアレルギー炎症の誘発により体重減少は認められなかった (Fig. 3 右)。

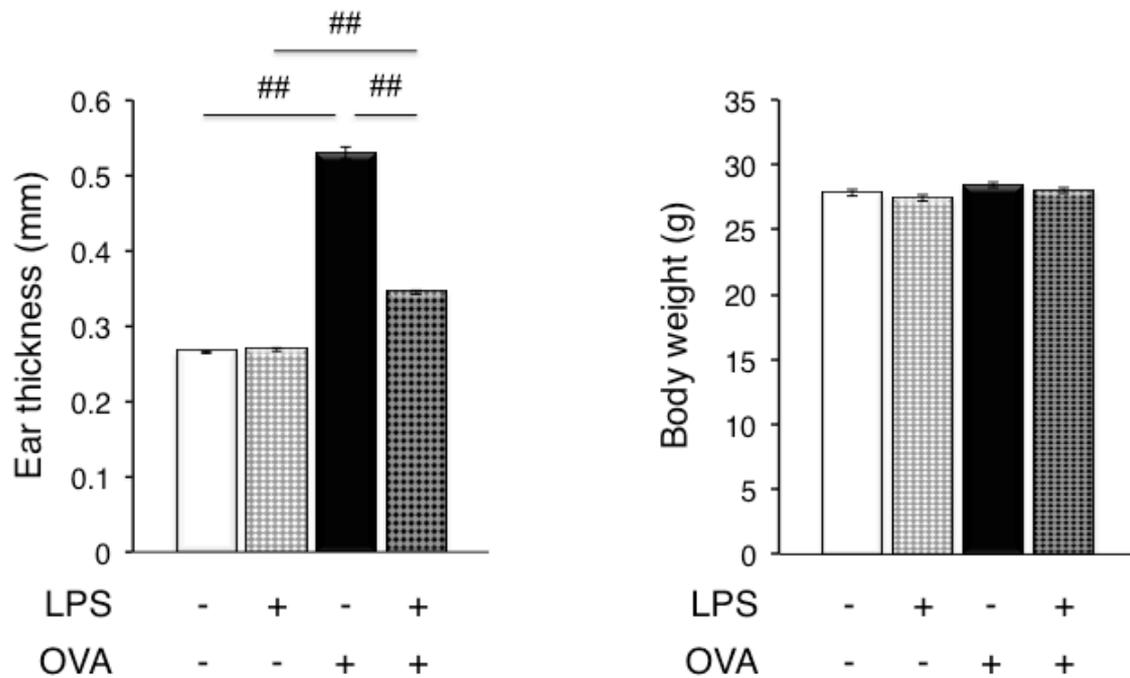


Fig. 3 LPS-priming prevents the OVA-induced inflammatory edema

The ear thickness and body weight on day 42 were determined. LPS (+) indicates LPS-primed mice, and OVA/alum (+), and OVA (+) indicate OVA sensitization and challenge, respectively (n = 6 per each group). Data are representative of two independent experiments. ## $p < 0.001$ (two-way ANOVA)

次に、アレルギー惹起 28 日目の耳をパラフィン包埋し、HE 染色を行ったところ、OVA によるアレルギー性炎症惹起群では表皮の肥厚及び細胞浸潤の増加が観察された。これらの病理変化も感染様刺激により顕著に抑制された (Fig. 4)。

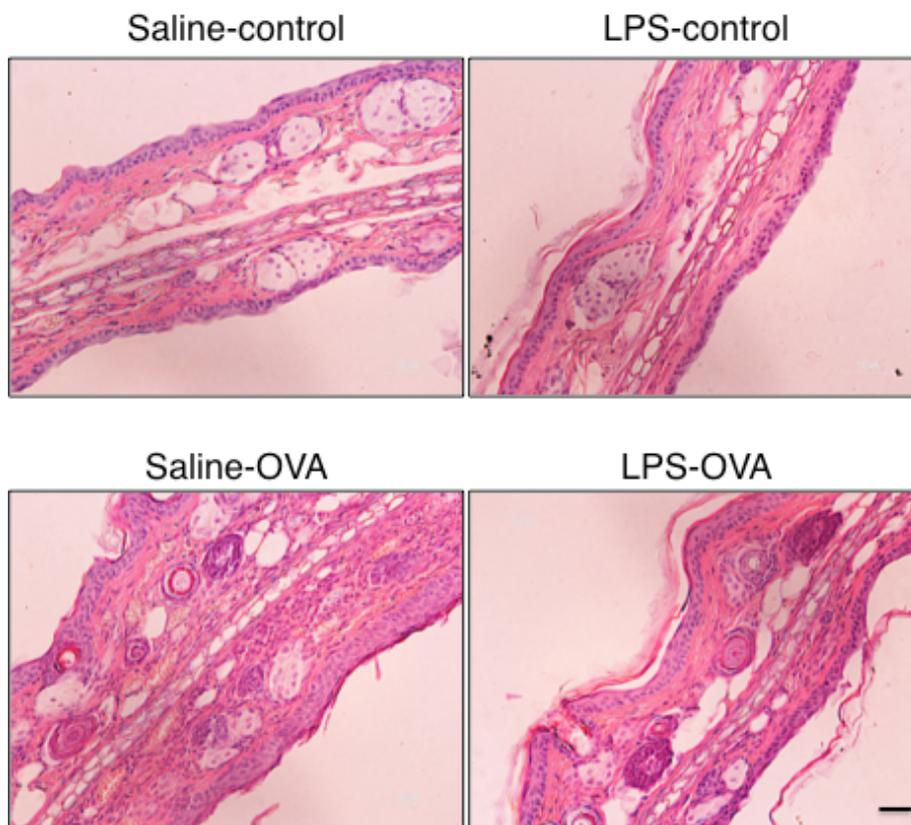


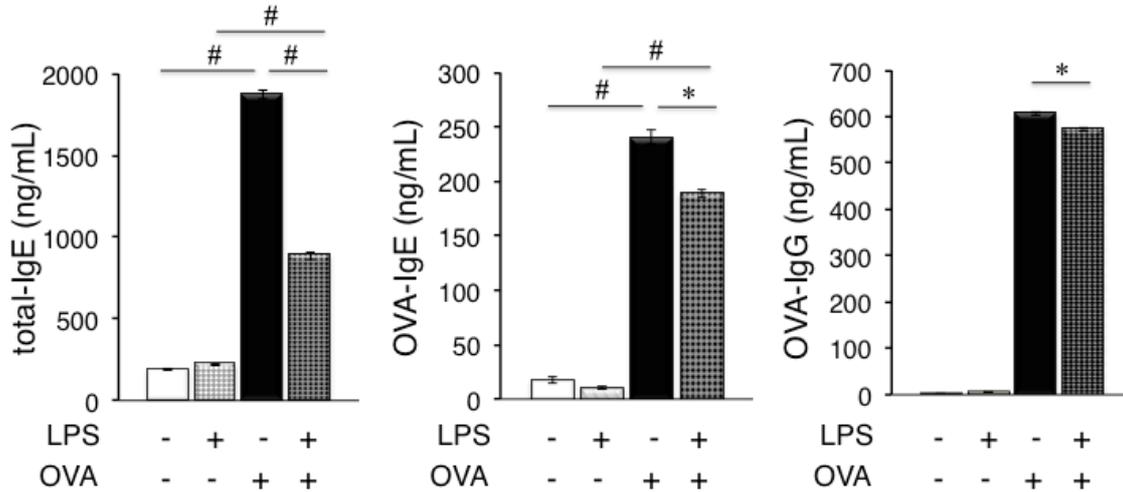
Fig. 4 LPS-priming suppresses the OVA-induced acanthosis and cell infiltration

On day 42, the ear was analyzed by HE staining. LPS-OVA and Saline-OVA indicate LPS-primed, or control mice were treated with OVA, and LPS-control and Saline-control were with saline (n = 6 per each group).

2-2-2. 感染様刺激による抗体産生の抑制

アレルギー反応誘発の指標として血清中抗体量を測定した。アレルギー惹起 28 日目 (Day 42) において、OVA による感作及び惹起は、血清中総 IgE (total-IgE)、OVA 特異的 IgE (OVA-IgE) 及び OVA 特異的 IgG (OVA-IgG) 抗体量を増加させた。これらの血清中抗体量は、感作終了時である Day 14 において既に増加がみられた。一方、感染様刺激群では、Day 42 における total-IgE、OVA-IgE 及び OVA-IgG のいずれもコントロール群と比較して有意に低い値を示した。また、Day 14 においても、感染様刺激は OVA による血清中 total-IgE の増加を有意に抑制した (Fig. 5)

Day 42



Day 14

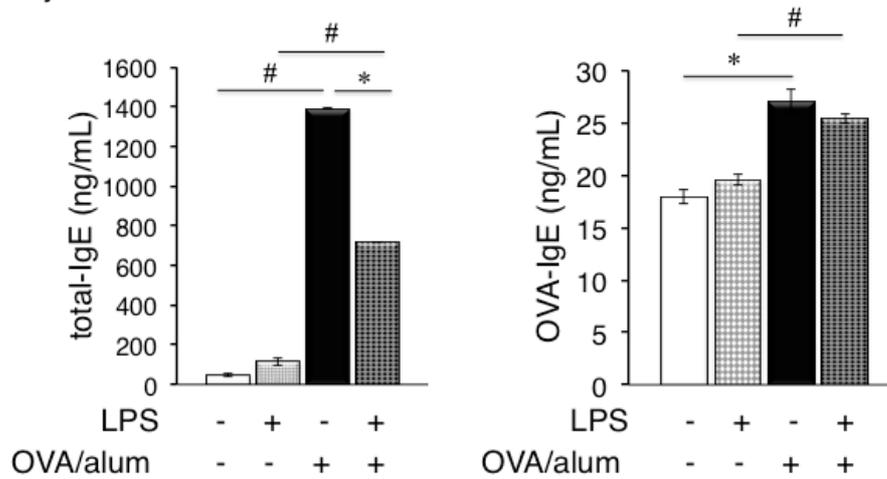


Fig. 5 LPS-priming reduces OVA-induced productions of IgE and IgG antibody in serum

Serum levels of total IgE, OVA-specific IgE and OVA-specific IgG on day 42 or on day 14 were determined. LPS (+) indicates LPS-primed mice, and OVA/alum (+), and OVA (+) indicate OVA sensitization and challenge, respectively. $n = 5$ per each group. Data are representative of two independent experiments.

* $p < 0.05$, # $p < 0.01$ (two-way ANOVA).

2-2-3. LPS 暴露時における週齢の影響

衛生仮説では幼少期におけるエンドトキシンへの暴露が重要となる。従って、LPS 暴露時のマウスの週齢がその後のアレルギー誘発に及ぼす影響について検討した。10 週齢雄マウスを用いて、同様にアレルギーの感作を行ったところ、血清中 total-IgE、OVA-IgE 及び OVA-IgG 量はいずれも上昇し、アレルギーの誘発が認められた。しかし、10 週齢雄マウスに、4 週齢マウスと同様に感染様刺激を加えた場合では、OVA によるこれらの血清中抗体量の増加は、抑制されなかった (Fig. 6)。

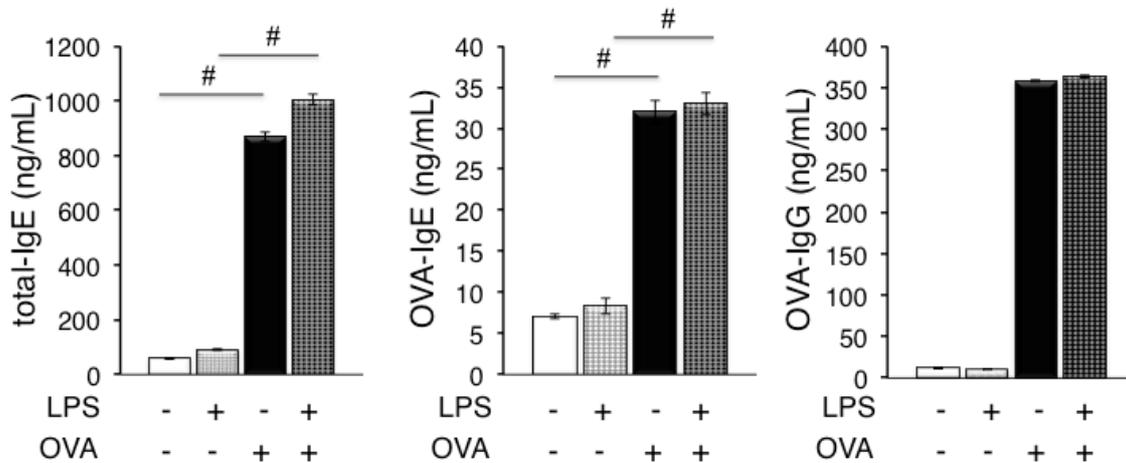


Fig. 6 LPS-priming in adult mice failed to reduce the increase in levels of serum antibodies by the OVA immunization.

10-weeks-old mice were used instead of 4-weeks-old mice and the serum levels of antibodies on day 14 were determined. Data are representative of two independent experiments. # $p < 0.01$ (two-way ANOVA).

2-3. 考察

幼少期における感染様刺激として、4週齢のマウスにLPSを投与したところ、引き続きアレルギー性炎症症状及び、浮腫を軽減した。また、LPSはアレルギーによる血清中抗体量増加も有意に抑制したことから、感作前におけるLPS刺激はアレルギー反応の減弱に有効であることが確認された。しかし、4週齢の代わりに10週齢のマウスを用いた同様の実験では、LPS刺激はアレルギー曝露による血清中抗体量増加に対して影響を与えなかった。すなわち、成熟したマウスにおける感染様刺激は、続くアレルギー反応を減弱させることができなかった。

インフルエンザAウイルスを用いた実験においても、アレルギー症状の軽減は感染させる週齢の影響を受けた²⁶。また、低濃度のLPSはTh2免疫応答を活性化し、アレルギー増悪化に必要であることがEisenbarthらによって報告されている²⁷。しかし、この実験におけるLPS刺激はアレルギー感作と同時に行っていること、6週齢から10週齢の成熟したマウスを使用している点で本研究と異なる。さらに、本研究で用いたLPSの濃度はEisenbarthらによる実験で用いられた低濃度のLPS刺激と同濃度であるが、アレルギー感作前、しかも4週齢マウスに長期的に投与することでアレルギー反応を減弱した。これらの結果から、LPS曝露によるアレルギー減弱化作用は、LPS濃度、曝露時のマウスの週齢、ならびにその持続期間が重要であると考えられる。本章で行った、低濃度のLPS(1 µg/kg)による長期的な感染様刺激は、続くアレルギー反応を減弱することが示され、本モデルは衛生仮説に基づくアレルギー減弱モデルとして有効である。そこで以下、本モデルを用いて、感染様刺激によるアレルギー減弱機構について解析した。

第 3 章

感染様刺激によるアレルギー減弱機構の解析

3-1. 序論

アレルギー患者数は年々増加する一方、アレルギーに対する治療方法は対症療法が中心であり、現在用いられている根本的治療法は減感作療法のみである。減感作療法とは、アレルゲンを徐々に与えることで、抵抗力をつけ、アレルゲンに対する過敏性を減弱化させる治療法である。しかし、減感作療法には、抗原を同定すること、長期間行う必要があること、アナフィラキシーを起こすリスクがあること等のデメリットがある。従って、アレルギーに対する新たな根本的治療法の開発が強く望まれている。アレルギー増悪化機構あるいはアレルギー減弱機構を解明することは、アレルギーに対する新たな治療法開発に繋がる。本研究では、その一環として、衛生仮説に基づくアレルギー減弱機構に着目した。

乳酸菌はアレルギー発症率の低い地域の子供の腸内において、高い割合で存在していると報告された²⁸。その後、動物実験のみならずヒトにおいても乳酸菌の摂取により、続くアレルギー症状の軽減が報告されてきた²⁹⁻³¹。さらに、乳酸菌によるアレルギー減弱機構には、Th1 の活性化及び Th2 の抑制による Th1/Th2 バランスの制御^{32, 33}、及び免疫寛容に関わる抑制性 T 細胞 (Treg) の関与^{30, 32}が示唆されている。また、ヘリコバクター・ピロリによるアレルギー減弱においても、メカニズムに関する報告がされている。マウスにおいて、乳児期におけるヘリコバクター・ピロリの感染が続くアレルギーを抑制し²⁵、ヘリコバクター・ピロリによる DCs の成熟化抑制の関与が示唆されている³⁴。し

かし、衛生仮説に基づくアレルギー減弱におけるメカニズムは未解明な部分が多く残されている。

TSLP はアレルギー発症のマスタースイッチとして注目され、DCs 上の TSLPR を介してアレルギーを増悪化させることが報告されている¹⁹⁻²¹。また、TSLPR の欠損マウスではアレルギーの減弱が報告されており^{23, 24}、TSLPR がアレルギー減弱化にも寄与するのではないかと考えた。

第 2 章で作製した感染様刺激によるアレルギー減弱モデルにおいて、感作終了時である Day 14 において、既に感染様刺激はアレルゲン暴露による血清中抗体量増加を抑制していたことから、APC の機能変化が考えられる。そこで、本研究では LPS によるアレルギー減弱機構の解明を目的とし、第 2 章で作製した感染様刺激によるアレルギー減弱モデルマウスにおいて、TSLPR の発現変動、及び免疫応答の惹起に重要な APCs の機能について検討した。

3-2. 結果

3-2-1. 抗原取り込み細胞は TSLPR を発現する

TSLPR は主に APCs に発現していることから、まず、腹腔細胞における抗原取り込み細胞の TSLPR 発現について確認した。免疫蛍光染色を行った結果、蛍光標識抗原 (F-BSA) 取り込み細胞は、TSLPR を発現していることが確認された (Fig. 7)。

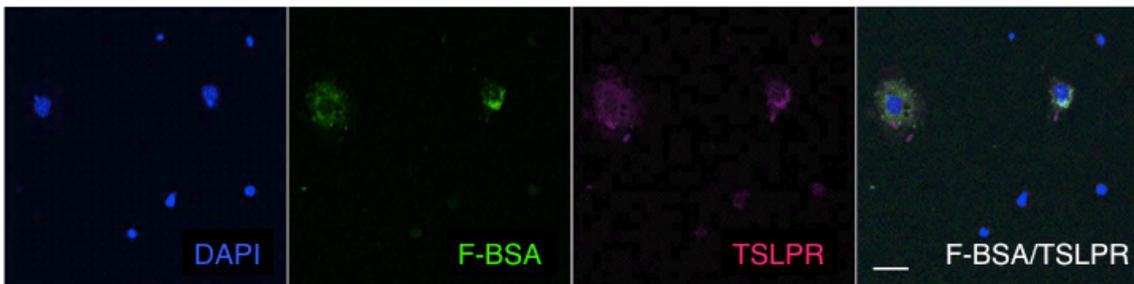


Fig. 7 The peritoneal cells uptaking F-BSA expressed the TSLPR

Mice peritoneal cells were treated with F-BSA for 3 h, and stained with anti-TSLPR antibodies. Cells were also stained with DAPI for nuclear localization. F-BSA in the cells and the TSLPR expression were detected by confocal microscopy. Images are representative from each group (n = 6). Scale bar, 20 μ m.

次に、感染様刺激が TSLPR 発現及び抗原取り込みに与える影響について FACS により解析した。両マウスより得られた腹腔細胞数は同程度であった (data not shown)。感染様刺激をしたマウス由来の腹腔細胞ではコントロールマウス由来の細胞と比較して、TSLPR 高発現細胞の割合が低下した。さらに、感染様刺激マウスでは F-BSA 取り込み細胞の割合も低下しており、TSLPR/F-BSA 両陽性細胞の割合が低下していた (Fig. 8)。

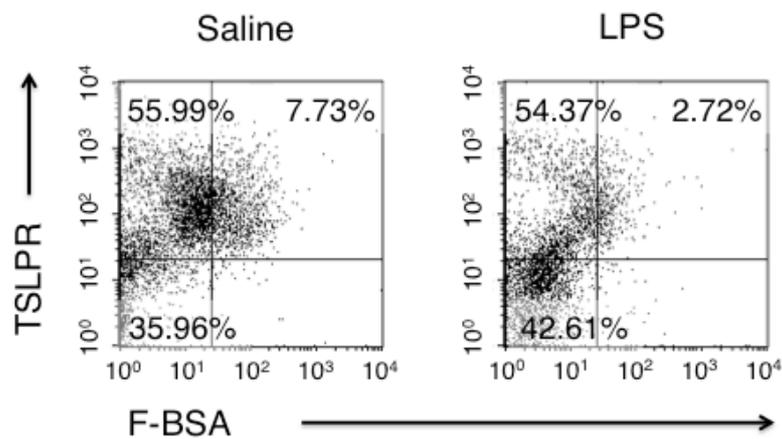


Fig. 8 LPS-priming decreased both the capability of the antigen uptake and the expression of TSLPR of peritoneal cells

Peritoneal cells from LPS-primed (LPS; right panel) and control mice (saline; left panel) were cultured with F-BSA for 3 h, and the uptake of F-BSA and the expression of TSLPR were measured by FACS analysis.

3-2-2. 感染様刺激は BMDCs における TSLPR 発現及び抗原取り込み能を低下させる

TSLPR は特に DCs において高発現していることから、BMDCs における感染様刺激が抗原取り込み能、及び TSLPR 発現に及ぼす影響について同様に解析した。感染様刺激を受けたマウスから調製した BMDCs においても F-BSA 取り込み能の低下が認められた (Fig. 9)。

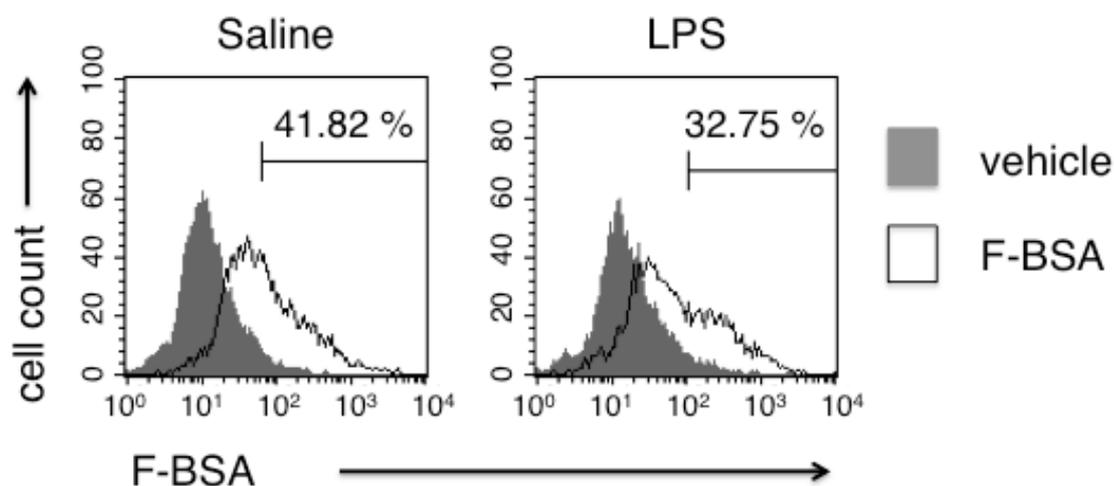


Fig. 9 The uptake of F-BSA was decreased in BMDCs from LPS-primed mice

BMDCs from LPS-primed (LPS) and control (saline) mice were treated with F-BSA or vehicle for 3 h. The uptake of F-BSA was measured by FACS analysis. Data are representative of three independent experiments.

TSLPR 発現については、TSLP mRNA ならびに TSLPR とヘテロダイマーを形成する IL-7R α mRNA の発現量を解析した。その結果、感染様刺激マウスから調製した BMDCs において、TSLPR mRNA ならびに IL-7R α mRNA はともに低下していた (Fig. 10, Day 8)。さらに、TSLPR 及び IL-7R α 両 mRNA 発現レベルは、BMDCs 分化増殖誘導前である BM Day 0 においても既に低下していることを確認した。(Fig. 10, Day 0)

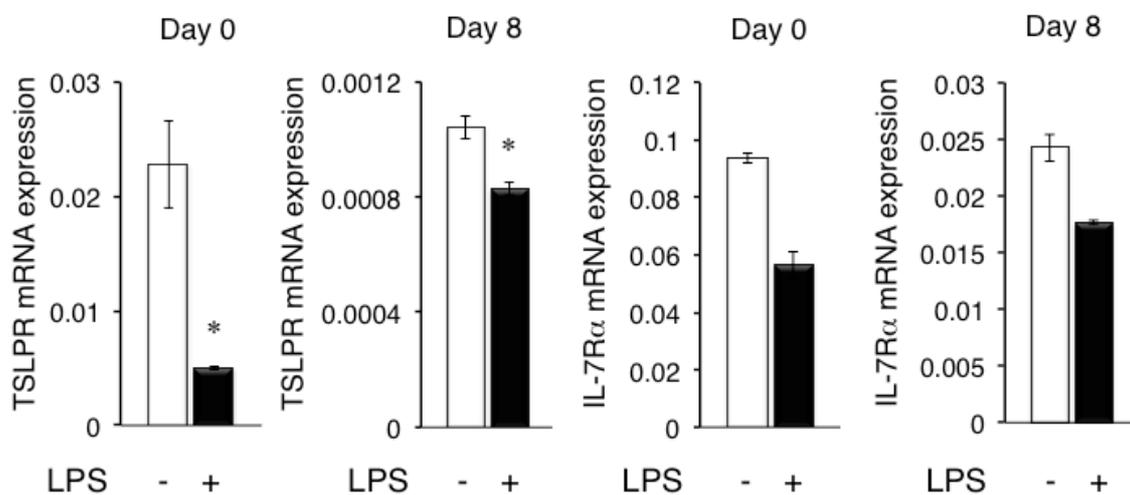


Fig. 10 LPS-priming decreases the TSLPR mRNA expression in BMs and BMDCs

The levels of mRNA for the TSLPR and the IL-7 α in BM cells (Day 0; BM Day 0 in Fig. 31) and BMDCs (Day 8; BM Day 8 in Fig. 31) were determined by real-time quantitative PCR. The cells were isolated from LPS-primed (LPS+) and control (LPS-) mice (n = 3 per each group). Gapdh was used to normalize gene expression. Data are representative from two independent experiments. * $p < 0.05$ (unpaired t -test).

さらに、TSLPR 及び IL-7R α の発現についてタンパクレベルで FACS により解析した。その結果、感染様刺激は TSLPR 低発現細胞 (TSLPR^{low}) の割合を有意に増加させた。同様に、感染様刺激は IL-7R α 低発現細胞も増加させることを見いだした (Fig. 11)。

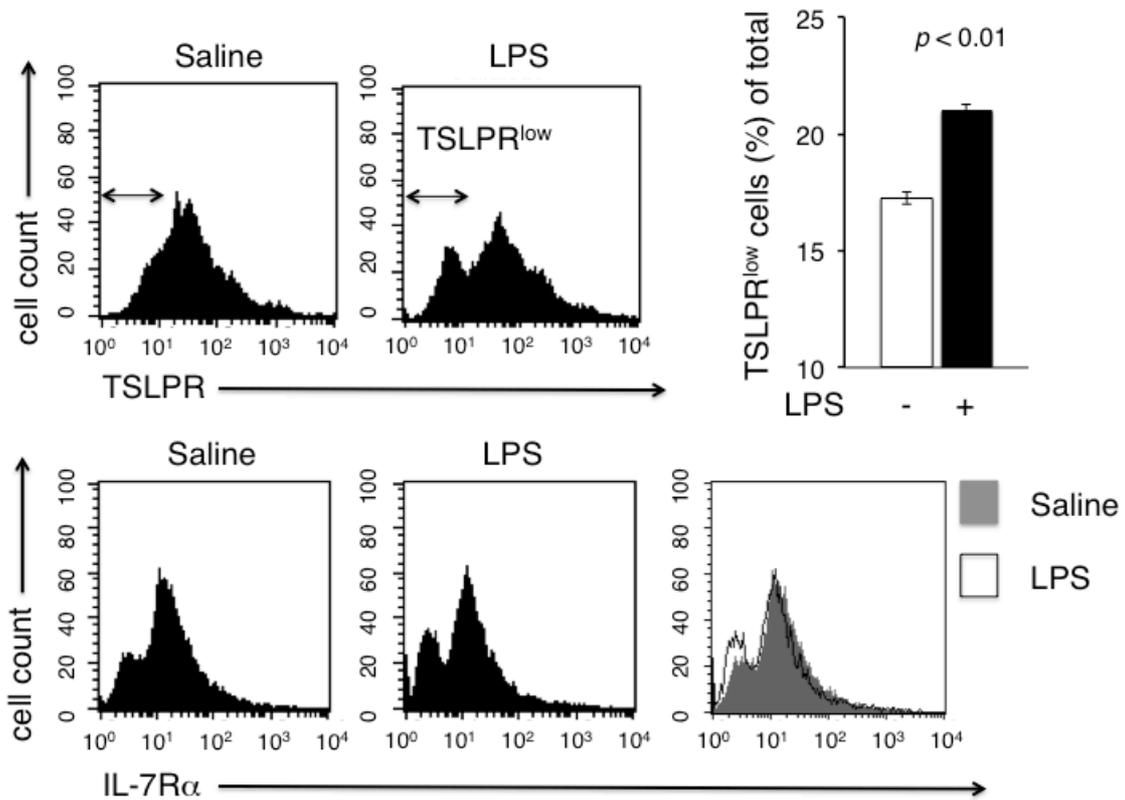


Fig. 11 LPS-priming decreased the TSLPR and IL-7R α expression in BMDCs

BMDCs from LPS-primed (LPS or LPS+) and control (saline or LPS-) mice were stained using the specific antibodies to the TSLPR or the IL-7R α , and their expressions were measured by FACS analysis. The percent of TSLPR-low expressing (TSLPR^{low}) cells is quantified (right graph, n=3). Data are representative from two independent experiments. (unpaired *t*-test)

BMDCs における TSLPR 発現と抗原取り込み能の相関について検討したところ、感染様刺激は TSLPR/F-BSA 両陽性細胞の割合を低下させていることを見いだした (Fig. 12)。

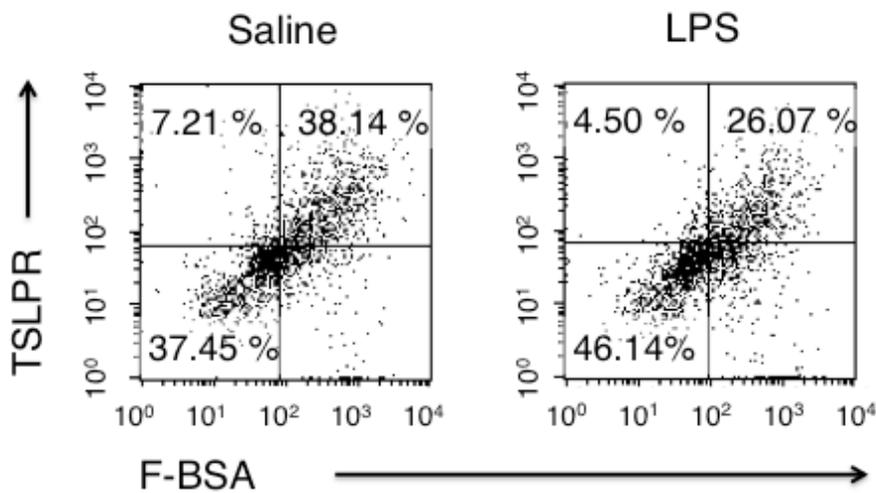


Fig. 12 LPS-priming reduced the number of TSLPR^{high} F-BSA⁺ cells in BMDCs

BMDCs prepared from LPS-primed (LPS) and control mice (Saline) were cultured with F-BSA for 3 h, and the cells were stained with the specific antibody to the TSLPR. The uptake of F-BSA and the TSLPR expression were measured by FACS analysis.

感染様刺激の効果が持続的であるかを検討するため、感染様刺激後、6 週間無処置で飼育したマウスの骨髄細胞より BMDCs を調製し、抗原取り込み能について FACS を用いて解析した (Fig. 13)

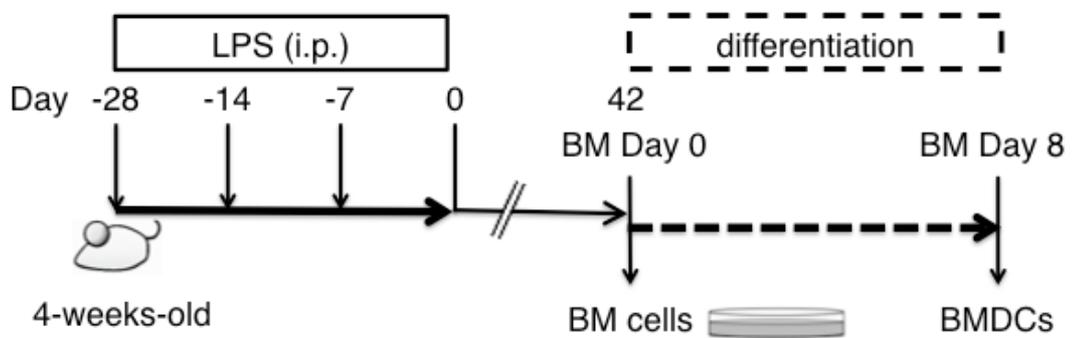


Fig. 13 Schema showing the second protocol for the preparation of BMDCs from LPS-primed mice

Mice were intraperitoneal injected with LPS (LPS) or control (saline) three times at 1-week intervals, and on day 42, BM cells were isolated from mice, and differentiated into BMDCs.

その結果、感染様刺激マウス由来 BMDCs では、コントロールマウス由来の細胞と比較して F-BSA 取り込み細胞の割合が低下し (Fig. 14)、感染様刺激の効果が少なくとも 6 週間持続することが示唆された。

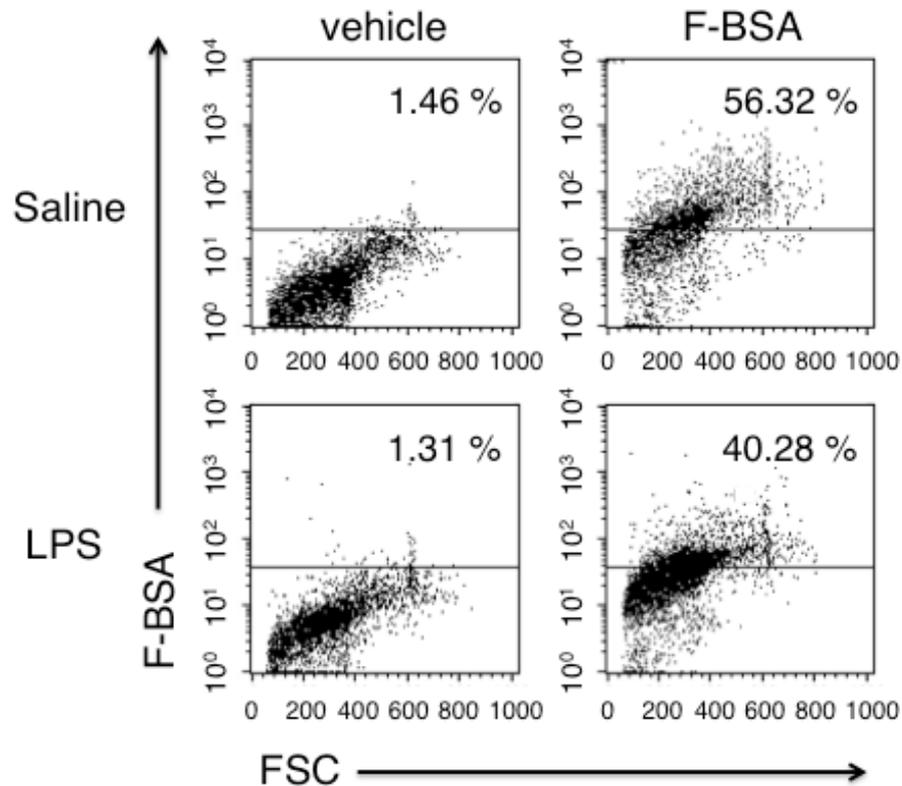


Fig. 14 The uptake of F-BSA by BMDCs prepared from the mice 42 days after LPS-priming

BMDCs prepared from the mice LPS-primed (LPS) and control mice (Saline) on Day 42 in Fig. 13 were cultured with F-BSA for 3 h, and the cells were stained with the specific antibody to the TSLPR. The uptake of F-BSA and the TSLPR expression were measured by FACS analysis.

3-2-3. 感染様刺激条件が BMDCs 機能に与える影響

短期 LPS 刺激が BMDCs に与える影響について検討した。6 週齢のマウスに LPS を腹腔内投与し、12 時間後に骨髓細胞を採取、続いて BMDCs を調製した (Fig. 15)。

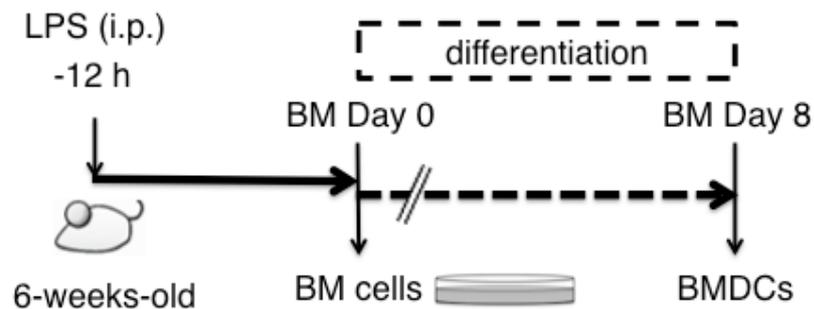


Fig. 15 Schema showing the protocol for brief LPS-priming

Mice were injected i.p. with LPS or control (saline). Twelve hours later, BM cells were isolated from mice (BM Day 0), and the cells were differentiated to BMDCs (BM Day 8).

短期 LPS 刺激は、骨髄細胞における TSLPR mRNA 発現レベルを低下させなかった (Fig. 16)。さらに、BMDCs においても TSLPR 発現及び F-BSA 取り込み細胞の割合は短期 LPS 刺激により低下せず、むしろ増加した (Fig. 17)。また、この時 TSLPR/F-BSA 両陽性細胞の割合も増加していることが確認された。

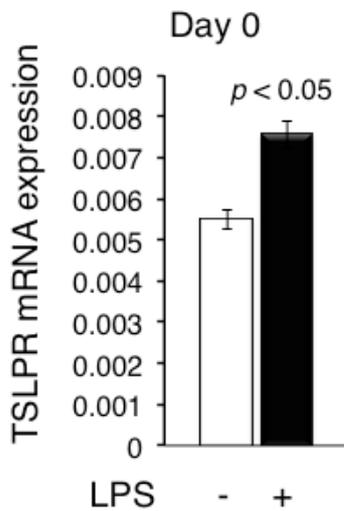


Fig. 16 Brief LPS-priming does not reduce the TSLPR mRNA expression

The expression of mRNA for the TSLPR was determined by real-time quantitative PCR in BM cells from LPS-primed (LPS+) and control (LPS-) mice (n = 3 per each group). GAPDH was used to normalize gene expression. Data are representative from two independent experiments. (unpaired *t*-test)

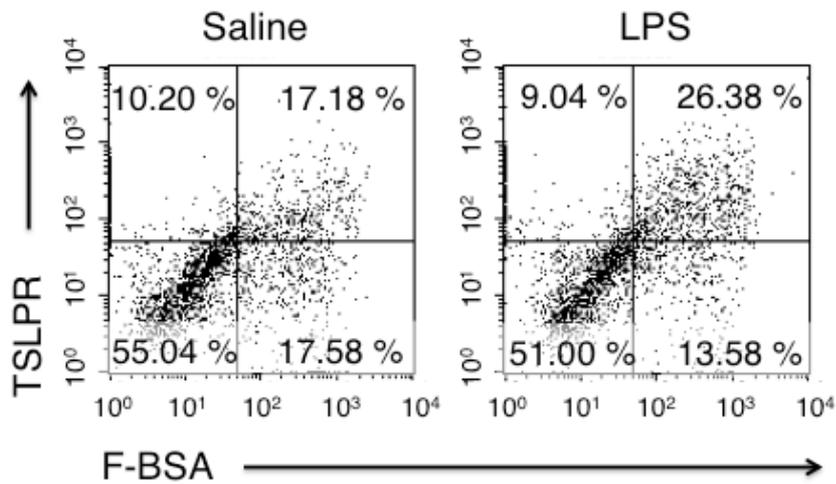


Fig. 17 Brief LPS-priming does not affect the TSLPR expression and F-BSA uptake

BMDCs from brief LPS-primed (LPS) and control (Saline) mice (n = 6 per each group) were cultured with F-BSA for 3 h, and the uptake of F-BSA and the levels of the TSLPR expression were measured by FACS analysis. Data are representative of each group from two independent experiments.

次に、直接的 LPS 刺激が BMDCs における抗原取り込み能に与える影響について検討した。BMDCs は、無処置マウス由来骨髄細胞より調製し、LPS と F-BSA により同時刺激した。その結果、抗原と同時に刺激した LPS は、BMDCs における抗原取り込み能を増強させた (Fig. 18)。

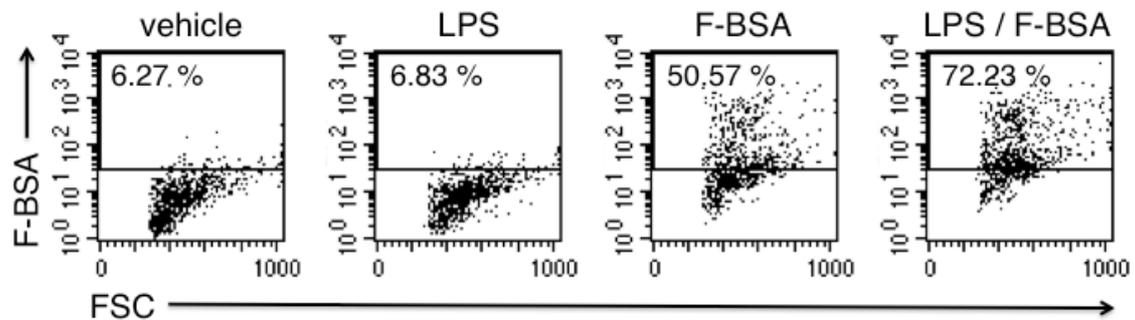


Fig. 18 LPS increases F-BSA uptake in BMDCs from normal mice

BMDCs prepared from untreated mice (7-weeks-old) were stimulated with LPS in the presence of F-BSA for 3 h. The uptake of F-BSA was measured by FACS analysis. Data are representative from two independent experiments.

3-2-4. TSLP が BMDCs における抗原取り込み能に与える影響

TSLP 刺激が BMDCs における抗原取り込み能に与える影響について FACS により検討した。TSLP は F-BSA と同時刺激することによって、BMDCs における F-BSA 取り込み細胞の割合を有意に増加させた。さらに、TSLP 刺激による F-BSA⁺ 細胞の増加は、抗 TSLP 抗体の前処理により阻害された。一方、感染様刺激マウス由来 BMDCs においては、TSLP 刺激は F-BSA 取り込み細胞の割合に影響を及ぼさなかった (Fig. 19)。

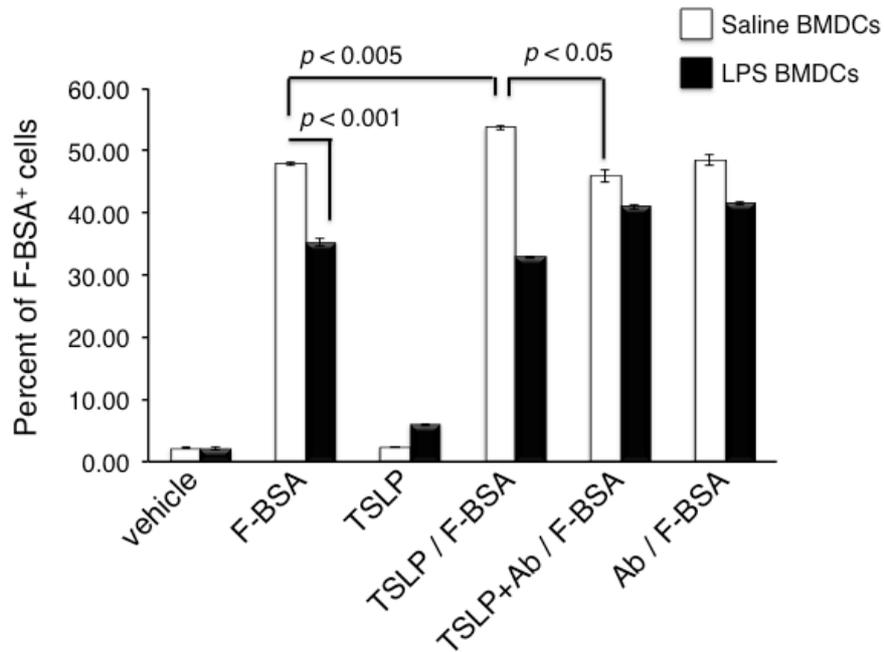


Fig. 19 TSLP increases F-BSA uptake in BMDCs from normal mice

BMDCs from LPS-primed (LPS BMDCs) and control (saline BMDCs) mice were treated with TSLP in the presence of F-BSA for 3 h. The neutralizing antibody (Ab) was pre-incubated with TSLP. The uptake of F-BSA was measured as F-BSA positive (F-BSA⁺) cells using FACS analysis, and quantified (n = 3). Data are representative from two independent experiments respectively. (unpaired *t*-test)

3-2-5. 感染様刺激による抗原取り込み細胞のリンパ節移行抑制

抗原提示細胞は抗原を取り込んだ後、リンパ節へ移行しナイーブ T 細胞を活性化させるため、抗原取り込み細胞のリンパ節移行は続く免疫応答に影響を与える。そこで、感染様刺激が抗原取り込み細胞のリンパ節移行に与える影響について検討した。F-BSA を腹腔内に注射し、一定時間後、リンパ節細胞中の F-BSA⁺ 細胞数を評価した。コントロールマウスでは、リンパ節へ移行した F-BSA⁺ 細胞数は、抗原の腹腔内投与から 12 時間後及び 24 時間後をピークに増加した。感染様刺激マウスにおいても同様に、リンパ節中の抗原取り込み細胞の割合が増加した。しかし、感染刺激マウスではコントロールマウスと比較して、抗原投与から 2 時間及び 4 時間後の初期段階、及び二つのピーク直後において有意に抗原取り込み細胞の割合が低下した。(Fig. 20)

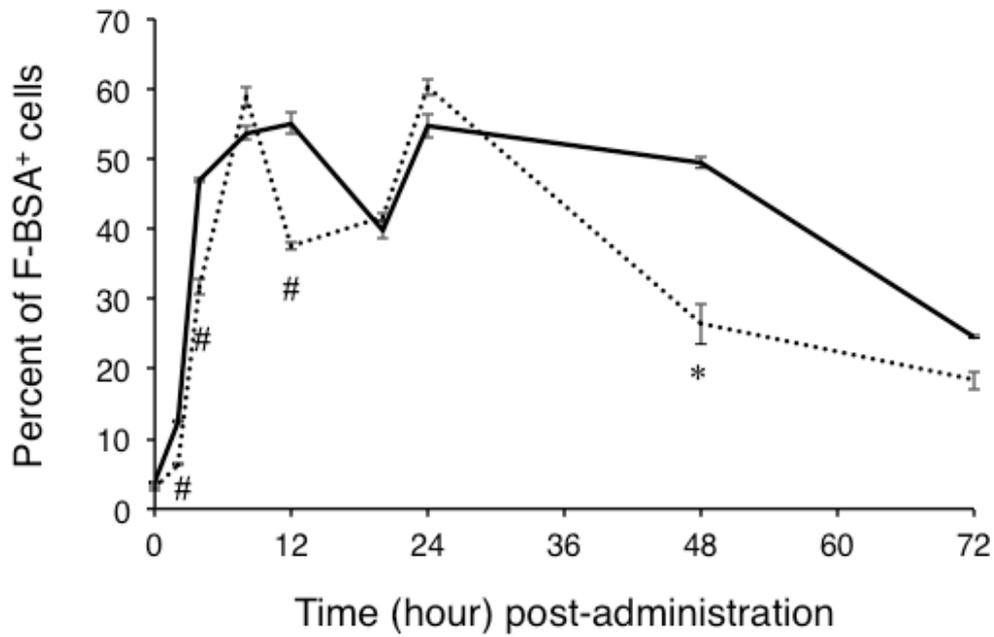


Fig. 20 LPS-priming reduces trafficking of cells uptaking F-BSA to lymph nodes

LPS-primed (dotted line) and control (solid line) mice were injected i.p. with F-BSA (n = 3 per each group). Percent of the cells uptaking F-BSA (F-BSA⁺) in lymph node cells collected at the indicated time was measured by FACS analysis. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, vs. saline of each time point, unpaired t -test.

3-2-6. 感染様刺激は BMDCs によるリンパ球増殖能を抑制する

感染様刺激が APCs における抗原提示能に与える影響について検討するため、抗原刺激した BMDCs と感作マウス由来の胸腺細胞の共培養を行い、細胞増殖を比較した。胸腺は T 細胞の分化、成熟に関与し、胸腺細胞は主にヘルパー T 細胞のマーカーである CD4 陽性細胞から成る (data not shown)。BMDCs に抗原として OVA で刺激した場合 (OVA-BMDC)、抗原刺激していない BMDCs を用いた場合 (BMDC) と比較して、共培養した胸腺細胞は顕著に増加した (Fig. 21a)。抗原刺激した BMDCs との共培養において、コントロールマウス由来 BMDCs と比較して (saline OVA-BMDC)、感染様刺激マウス由来の BMDCs では (LPS OVA-BMDC) 胸腺細胞の増殖が明らかに低下した。さらに、MTT assay により定量化したところ、感染様刺激は抗原刺激された BMDCs (OVA-BMDC (LPS)) による胸腺細胞増殖増大を有意に抑制した (Fig. 21b)。

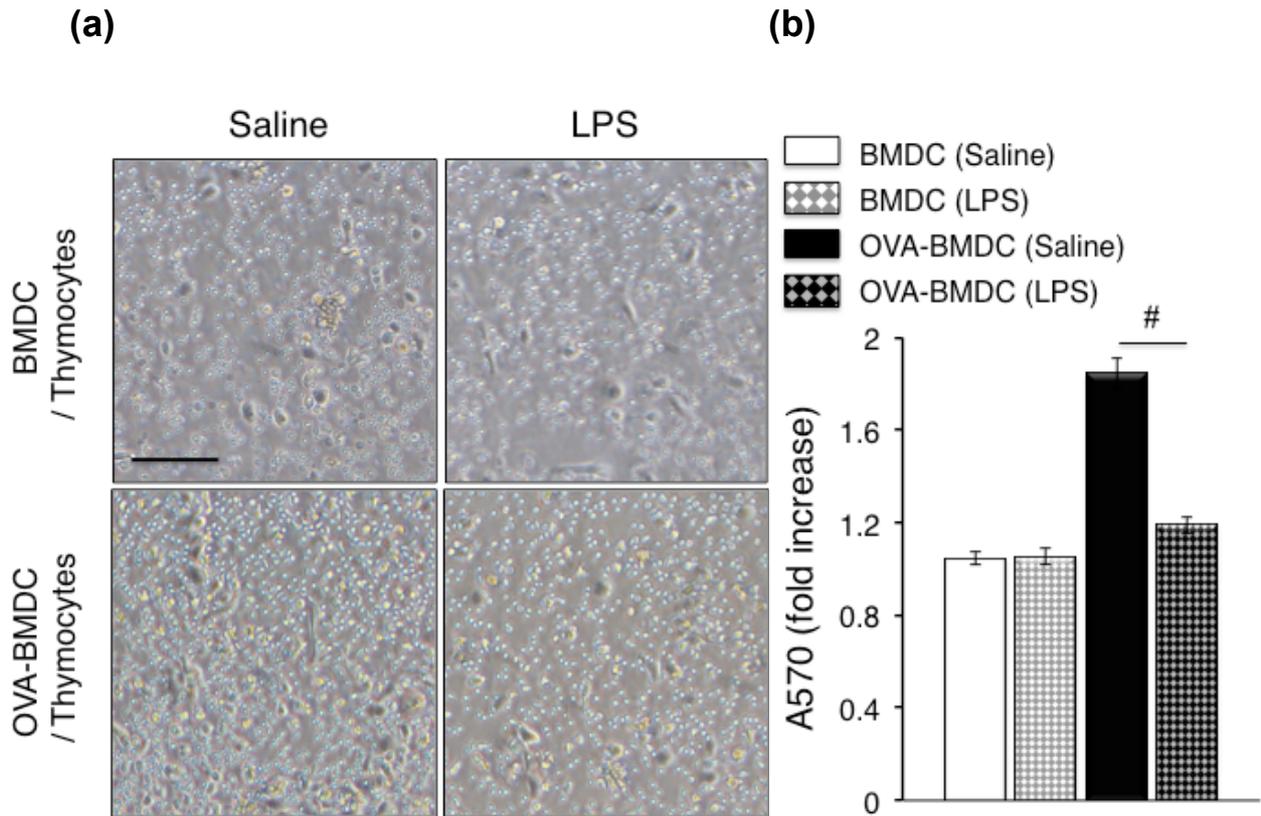


Fig. 21 LPS-priming defects BMDCs-dependent proliferation of thymocytes

(a) The cells were photographed. Scale bar, 50 μm . Data are representative of two independent experiments. (b) The cell viability was analyzed by MTT assay. The value at time 0 of each group was set to 1, and the cell proliferations are represented as fold increase. Data are representative of two independent experiments. # $p < 0.01$, vs. Saline OVA-BMDC, unpaired t -test.

3-2-7. 感染様刺激は BMDCs の成熟及び抗原提示能を抑制する

抗原提示に重要な分子の発現について FACS により解析した。APCs が抗原を T 細胞に提示する際、APCs 上の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) II と抗原ペプチドの複合体を発現し、T 細胞受容体 (T cell receptor; TCR) を介して T 細胞に提示する。しかし、T 細胞の活性化にはさらに二次的なシグナルが必要である。最も重要な二次的シグナルは、APCs 上の CD80/CD86 による T 細胞上の CD28 への刺激である。TCR を介するシグナル及び CD28 を介するシグナルを同時に受けた T 細胞は活性化し、エフェクター細胞へと分化増殖していく。すなわち MHC II、CD80 及び CD86 は成熟 DCs のマーカーである。そこで、BMDCs を OVA で刺激し、MHC II、CD80 及び CD86、さらに DCs マーカーである CD11c の発現について解析した。その結果、コントロールマウス由来 BMDCs (Saline) ではいずれの分子においても発現が確認できた。これらと比較して、感染様刺激マウス由来 BMDCs (LPS) では、CD11c 発現には大きな差が見られなかったが、CD80、CD86 及び MHC II の発現は低下していた (Fig. 22)。

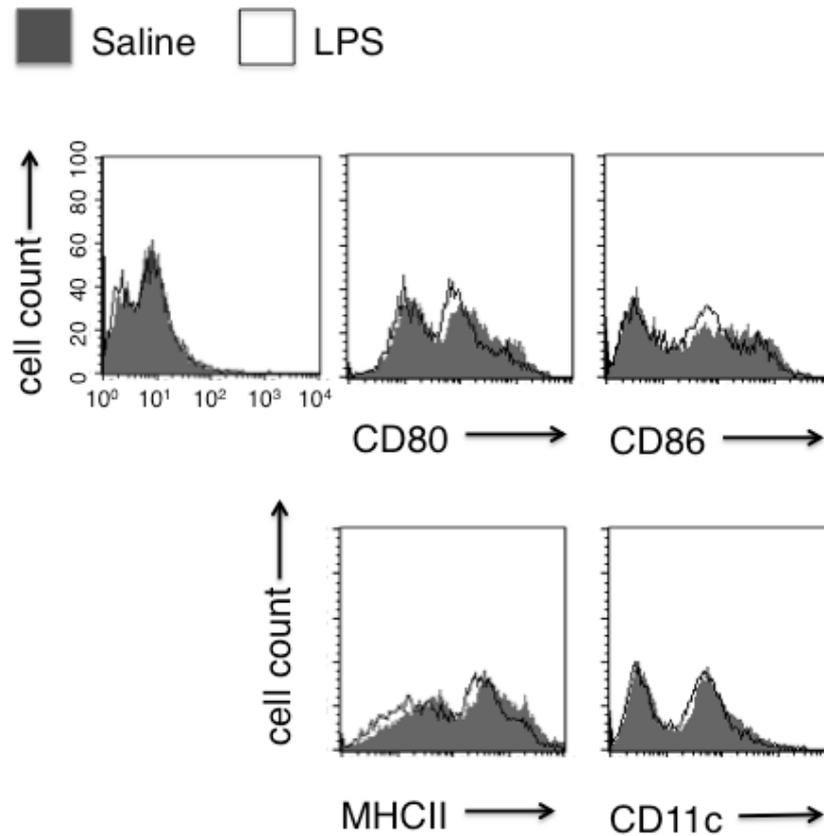


Fig. 22 LPS-priming reduced the expressions of co-stimulatory molecules on BMDCs

BMDCs from LPS-primed (LPS) or control (Saline) mice were treated with OVA for 24 h, and the expressions of the indicated molecules were determined by FACSCalibur analysis for a negative control, cells were non-stained (upper left panel).

3-2-8. 皮膚における TSLPR 発現細胞浸潤に対する感染様刺激が及ぼす影響

皮膚における TSLPR を介した応答は、免疫活性化において重要であり、皮膚 DCs の TSLPR 欠損はアレルギーを減弱する^{23, 35, 36}。本アレルギー減弱モデルにおいても、腹腔浸潤細胞ならびに BMDCs における TSLPR の発現量が低下していることを明らかにした。そこで次に、本モデルマウスの皮膚における TSLPR 発現量も低下しているかどうか定量的リアルタイム RT-PCR により解析した。感染様刺激後である Day 0 において、TSLPR mRNA 発現レベルは、コントロールマウスと比較して感染様刺激マウスで有意に低下していた。同様に、IL7 α mRNA 発現レベルは感染様刺激により有意に低下していた。一方、IL7 α とヘテロダイマーを形成する γ c mRNA はコントロールマウスと感染様刺激マウスの間に有意な差は認められなかった。(Fig. 23a)

さらに、アレルギー惹起後の Day 42 における皮膚でも同様に解析を行った結果、TSLPR mRNA 及び IL7 α mRNA 発現レベルはアレルギー惹起により上昇したが、感染様刺激はこの TSLPR mRNA 発現レベルの上昇を抑制する傾向を、IL7 α mRNA 発現に対しては有意な抑制を示した。また、アレルギー感作及び惹起を行っていない群 (OVA(-)) においても感染様刺激は TSLPR mRNA 発現レベルを有意に低下させ、IL7 α mRNA 発現は低下する傾向を示した (Fig. 23b)。

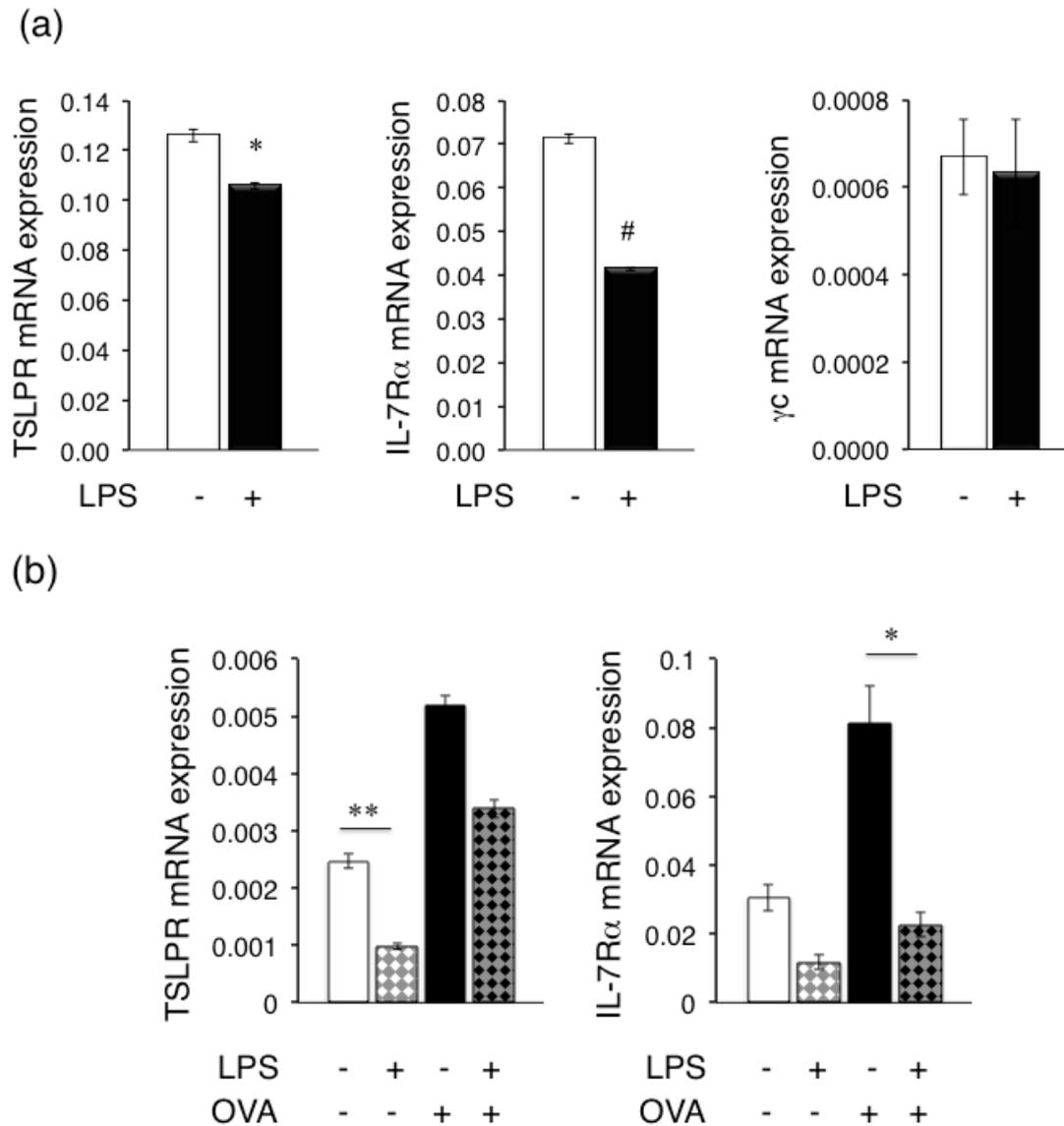


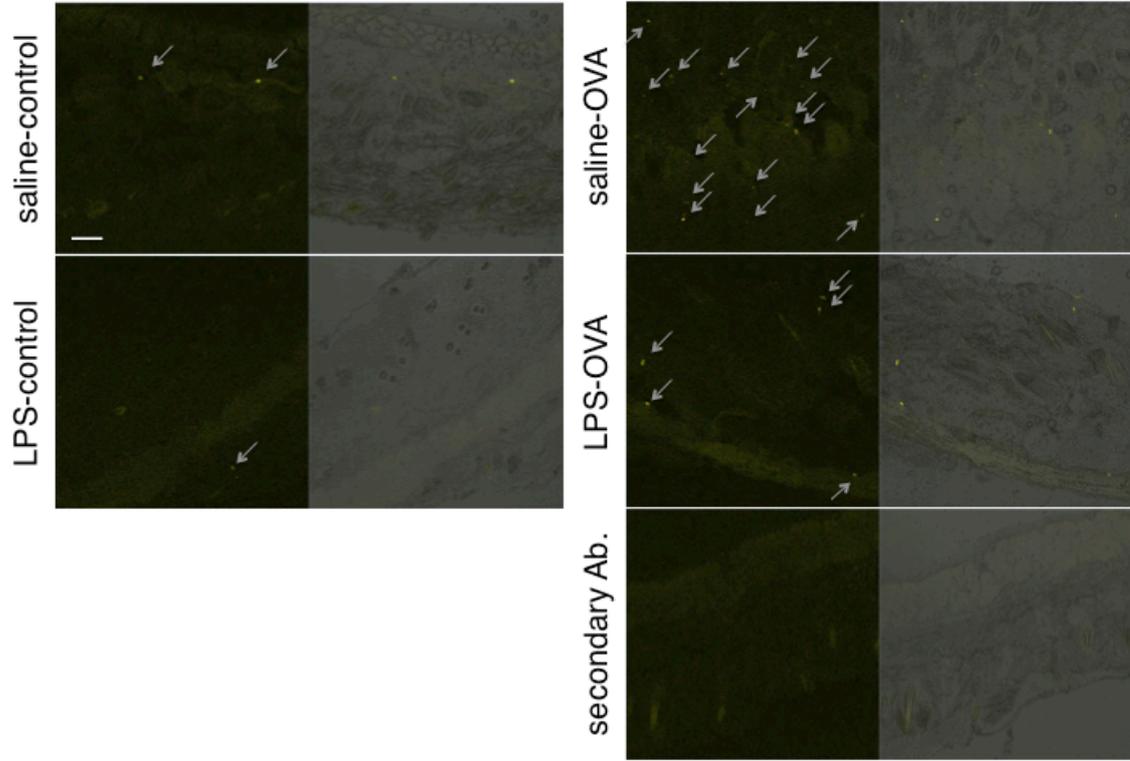
Fig. 23 LPS-priming suppresses the TSLPR expression in skin

LPS-primed (LPS+) and control (LPS-) mice (n = 6 per each group) were sacrificed on day 0 (a) or day 42 (b), and skin were excised (n = 6 per each group). The levels of mRNA for the TSLPR, the IL-7 α and the γ c were determined. GAPDH was used to normalize gene expression. Data are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, # $p < 0.01$ (two-way ANOVA).

次にタンパクレベルでの TSLPR 発現を確認するため、Day 42 における皮膚より新鮮凍結切片を作製し、免疫蛍光染色法を用いて観察した。背部皮膚では、アレルギー感作及び惹起をしていない群 (saline-control 及び LPS-control) と比較して、OVA 塗布により TSLPR 発現細胞浸潤が増加した (saline-OVA 及び LPS-OVA) (Fig. 24a)。

さらに、OVA 塗布群で比較すると、感染様刺激マウス (LPS-OVA) では TSLPR 発現細胞浸潤が顕著に低下していた。耳介組織においても同様であり、OVA の塗布は TSLPR 発現細胞の浸潤を増加させたが (saline-OVA 及び LPS-OVA)、感染様刺激 (LPS-OVA) では明らかな減少が観察された (Fig. 24b)。

(a)



(b)

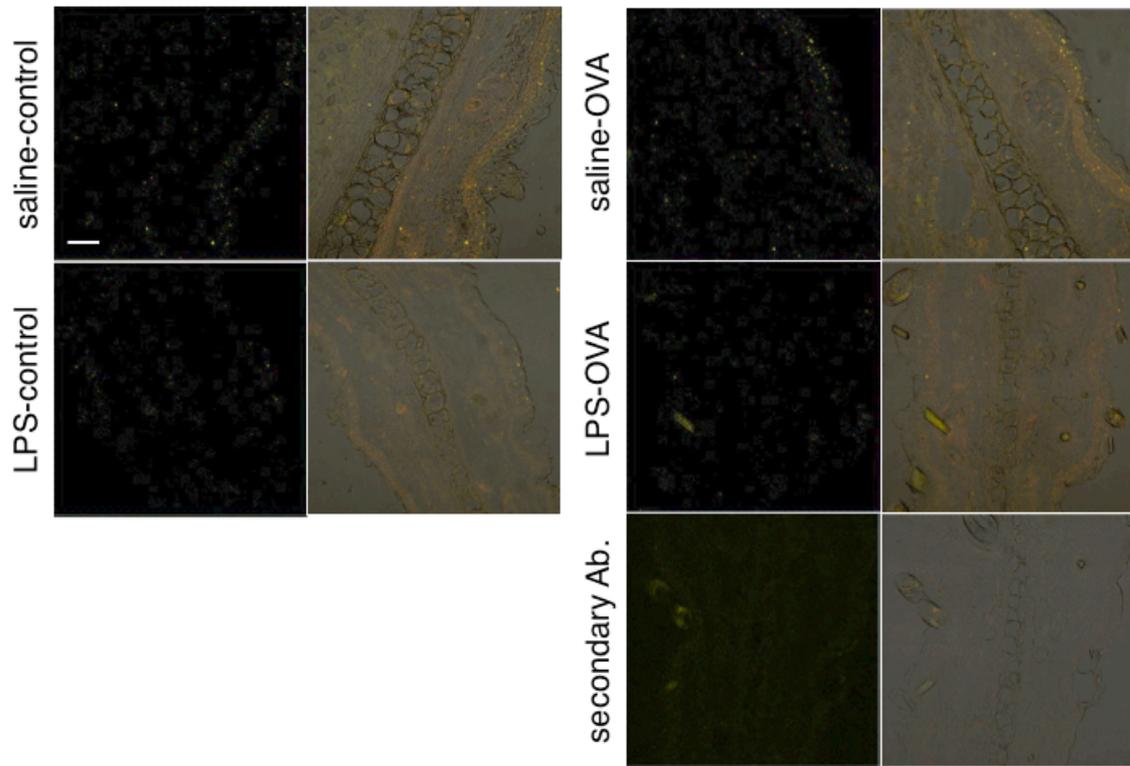


Fig. 24 LPS-priming suppresses the TSLPR expression in skin

The expressions of the TSLPR in back (a) and ear (b) on day 42 were analyzed by immunofluorescence staining. LPS-OVA, saline-OVA, LPS-control and saline-control are defined in fig. 30. For a negative control, the sections were stained with only secondary antibodies (secondary Ab.). The right images of each panel represent merges of the left images with the differential interference contrast images. Arrows; the TSLPR-expressing cells, Scale bar; 200 μ m.

3-2-9. 感染様刺激マウス由来 BMDCs はアレルギーを減弱する

感染様刺激による BMDCs の機能変化、すなわち TSLPR 発現低下、及び抗原取り込み能低下に続く抗原提示能の低下がアレルギー減弱に関与するかについて検討するため、BMDCs 移入実験を行った。レシピエントマウスにおける APCs による影響を排除するため、OVA 刺激した BMDCs (OVA-BMDCs) をレシピエントマウスに移入した。移入開始から 27 日後の血清中抗体量を ELISA により測定し、アレルギー誘導の評価とした。OVA-BMDCs の移入により、total-IgE、OVA-IgE 及び OVA-IgG いずれも増加した。これと比較して、感染様刺激マウス由来 BMDCs を移入した場合、レシピエントマウスの感染様刺激の有無に関わらず血清中 total-IgE 及び OVA-IgG の増加は有意に抑制され、OVA-IgE 量は減少傾向を示した。レシピエントが感染様刺激マウスにコントロールマウス由来 BMDCs の移入した場合でも、血清中 total-IgE 量はコントロール群と比較して有意に低い値を示した (Fig. 25)。

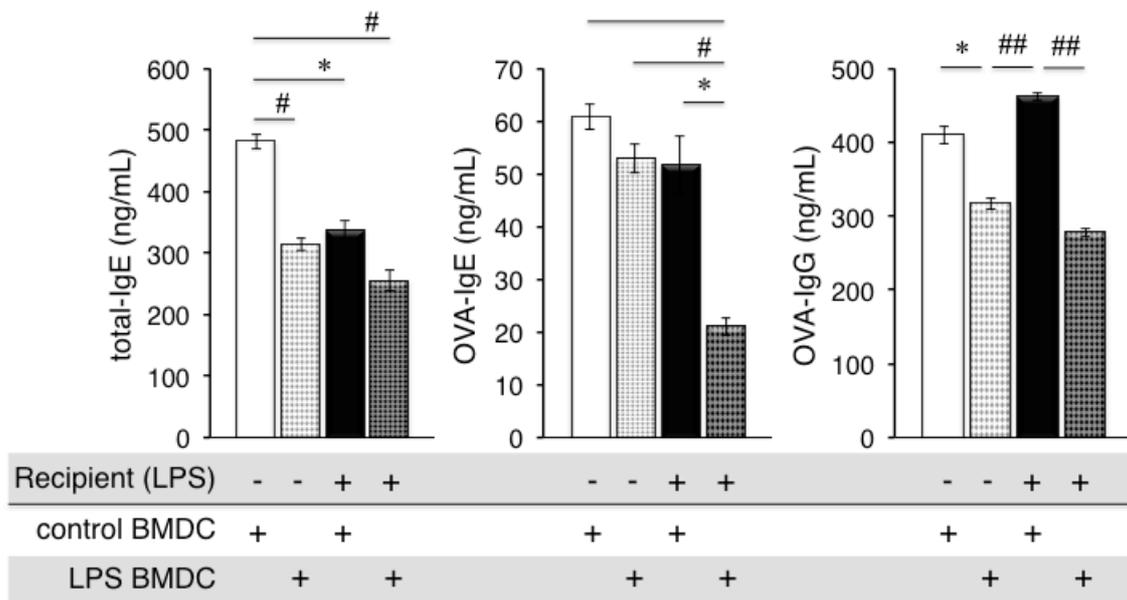


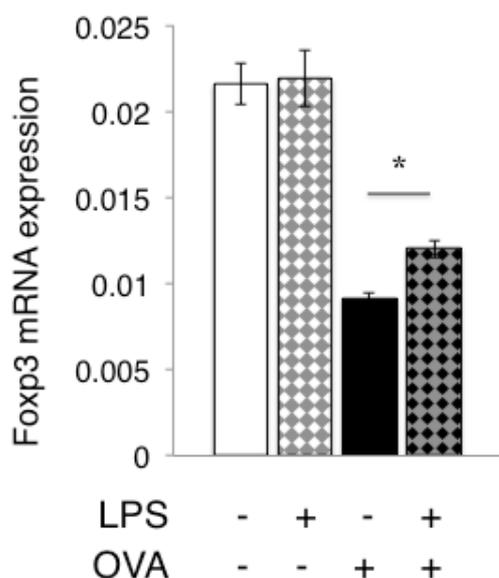
Fig. 25 Antigen-pulsed BMDCs from LPS-primed mice induces antibody production less potently than those from control mice

OVA-BMDCs were prepared from LPS-primed (LPS BMDC) and control mice (control BMDC), and transferred into LPS-priming (Recipient (LPS (+)) and control recipient mice (Recipient (LPS (-))). (n = 6 per each group). On day 27, recipient mice were sacrificed, and serum levels of total IgE, OVA-specific IgE and OVA-specific IgG were determined. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ (two-way ANOVA)

3-2-10. 感染様刺激マウスにおける制御性 T 細胞誘導

衛生仮説によるアレルギー減弱機構には、Th1 の活性化及び Th2 の抑制による Th1/Th2 バランスの制御の他、免疫寛容に関わる Treg の関与が示唆されている^{30, 32, 34}。従って、感染様刺激によるアレルギー減弱における Treg の関与の可能性を検討した。OVA による惹起 28 日目 (Day 42) のマウスより鼠径リンパ節を採取し、mRNA を抽出、定量的リアルタイム RT-PCR により Treg マーカーである Foxp3 の発現を解析した。アレルギー炎症を誘発していない群では、コントロール群と感染様刺激群の間に有意な差はなかった。一方、OVA によるアレルギー炎症を誘発した場合には、Foxp3 mRNA 発現レベルが低下し、この低下は感染様刺激により有意に抑制された。(Fig. 26)

Fig. 26 LPS-priming inhibits the allergen-induced decrease in Foxp3 mRNA expression



LPS-primed (LPS (+)) and control (LPS (-)) mice (n = 6 per each group) were sacrificed on day 42, and lymph nodes were excised (n = 6 per each group). The levels of mRNA for the Foxp3 were determined. GAPDH was used to normalize gene expression. Data are representative of two independent experiments. * $p < 0.05$, (two-way ANOVA).

次に、OVA による惹起 28 日目 (Day 42) のマウス耳介皮膚における Foxp3 陽性細胞について、免疫蛍光染色法により観察した。その結果、アレルギー惹起部位である皮膚において、感染様刺激マウスでは Foxp3 陽性細胞の浸潤が観察された (Fig. 27)。

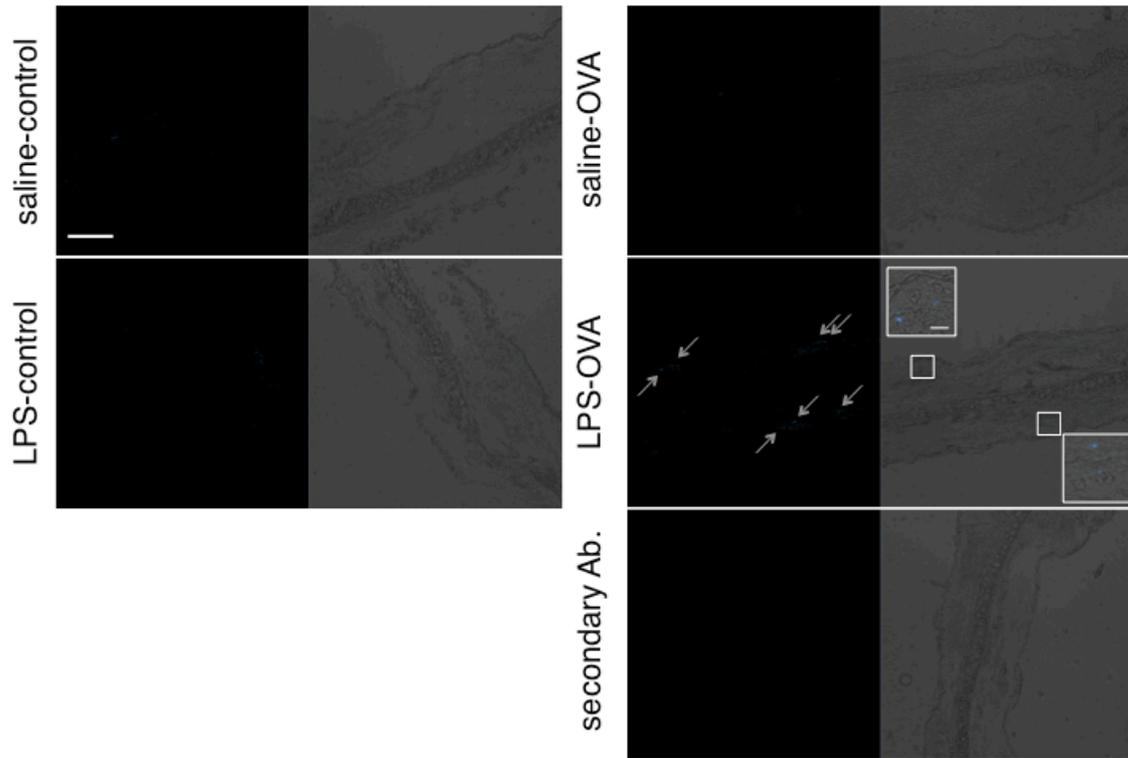


Fig. 27 LPS-priming recruits the Foxp3 expressing cells into the lesion

The expressions of the TSLPR in ear (b) on day 42 were analyzed by immunofluorescence staining. LPS-OVA, saline-OVA, LPS-control and saline-control are defined in fig. 30. For a negative control, the sections were stained with only secondary antibodies (secondary Ab.). The right images of each panel represent merges of the left images with the differential interference contrast images. Arrows; the Foxp3-expressing cells, Scale bar; 200 μ m.

3-2-11. 感染様刺激マウス由来 BMDCs による Treg 誘導

感染様刺激により BMDCs の機能が変化していることを示してきたが、この BMDCs の Treg 誘導能について、移入実験により検討した。OVA 刺激した BMDCs を上述のようにマウスに移入し、移入開始から 27 日後のリンパ節における mRNA 発現を解析した。Foxp3 mRNA 発現レベルは、コントロールマウス由来 OVA-BMDCs を移入した場合、レシピエントマウスにおける感染様刺激の有無による有意な差は見られなかった。感染様刺激マウス由来 OVA-BMDCs をコントロールマウスに移入した場合には、コントロールマウス由来 OVA-BMDCs を移入した場合に比べて Foxp3 mRNA 発現レベルは有意に上昇し、しかもこれらの上昇は、レシピエントマウスにおける感染様刺激の有無に影響を受けなかった。

また、Treg の分化誘導には DCs からの IL-10 及び TGF- β 1 産生が重要である^{37, 38}。OVA-BMDCs 移入 27 日目のリンパ節において、感染様刺激マウス由来 OVA-BMDCs は IL-10 mRNA 発現レベルに大きな影響を与えなかった。一方、TGF- β 1 mRNA 発現レベルは、感染様刺激マウス由来 OVA-BMDCs の移入によって有意に上昇した。この TGF- β 1 mRNA 発現レベルの上昇は、コントロールマウス由来及び感染様刺激マウス由来いずれの OVA-BMDCs を移入した場合においても、レシピエントマウスにおける感染様刺激の有無による影響は見られなかった (Fig. 28)。

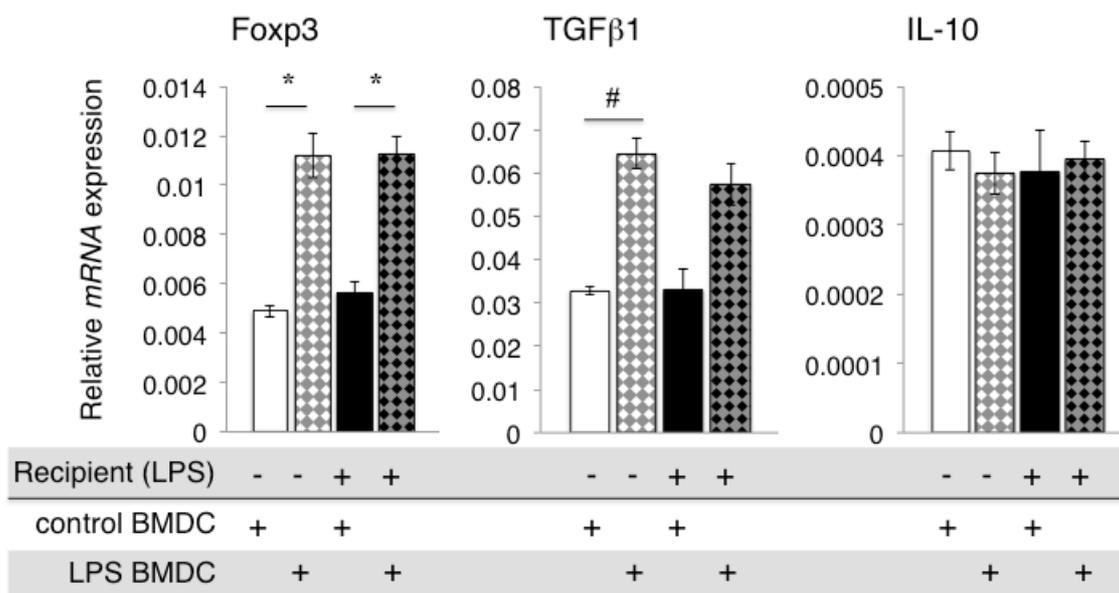


Fig. 28 Antigen-pulsed BMDCs from LPS-primed mice has the higher potency of induction of Treg than those from control mice

OVA-BMDCs were prepared from LPS-primed (LPS BMDC) and control mice (control BMDC), and transferred into LPS-priming (Recipient (LPS) +) and control recipient mice (Recipient (LPS) -). (n = 6 per each group). On day 27, recipient mice were sacrificed, and lymph nodes were excised. The levels of mRNA for the Foxp3, TGFβ1 and IL-10 were determined. GAPDH was used to normalize gene expression. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, (two-way ANOVA)

3-3. 考察

本章では、感染様刺激によるアレルギー減弱作用機構について解析し、腹腔内抗原取り込み細胞、DCs の TSLPR 発現低下、及び抗原提示機能に変化が生じていることを明らかにした。

APCs、特に DCs は TSLPR を介したシグナルにより活性化し、アレルギーの増悪化に参与する¹⁹⁻²¹。第 2 章で確立した実験モデルでは抗原である OVA を腹腔内に投与していることから、腹腔細胞の抗原取り込みと TSLPR 発現を解析したところ、感染様刺激によって抗原取り込み量と TSLPR 発現がいずれも低下することが明らかになった。そこで本研究では、特に DCs における TSLPR 発現量変化ならびに機能変化について解析した。

感染様刺激は、BMDCs においても腹腔細胞と同様に抗原取り込み能を低下させた。さらに、感染様刺激後 6 週間無処置で飼育したマウスより調製した BMDCs においても、抗原取り込み能の低下が見られたことから、4 週齢における持続的な感染様刺激は、長期にわたって DCs の抗原取り込み能を低下させることを示唆した。興味あることに、感染様刺激は BMDCs の TSLPR mRNA レベルを低下させ、TSLPR 低発現 BMDCs (TSLPR^{low}) の割合を有意に増加させた。これらの結果より、感染様刺激は TSLPR^{low} で示される新たな DCs サブタイプを誘導する可能性が考えられる。一方、LPS の短時間刺激 (12 h) では BMDCs における TSLPR 発現、及び抗原取り込み能の低下は見られず、また、BMDCs を直接 LPS で刺激するとむしろ抗原取り込み量が増加した。従って、DCs の TSLPR 発現量の低下を伴う機能変化には長期間の LPS 暴露が必要であると考えられる。また、TSLP は、*in vitro* において抗原の BMDCs による取り込みを増強させたが、感染様刺激したマウスからの BMDCs では効果が見られなかった。これは、TSLPR 欠損マウスにおいて見られる、DCs マーカーである CD11c 陽性細胞による抗原

取り込み低下、及び続くアレルギーが軽減すること²³と矛盾しない。これらの結果から、長期間の感染様刺激により TSLPR の発現量の低下が誘導され、その結果 TSLP シグナルが低下し、抗原取り込み能が低下したと考えられる。さらに感染様刺激は BMDCs における抗原提示能すなわちリンパ球増殖能も低下させた。その機序として、抗原取り込み能の低下に加えて、感染様刺激は抗原刺激した BMDCs における CD80、CD86 及び MHC II の発現が低下していることを見いだした。TSLP は DCs 上の CD80、CD86 及び MHC II の発現を誘導することから、これらの作用も TSLP シグナルの低下に基づく可能性が高い。

さらに、感染様刺激マウスでは抗原取り込み細胞のリンパ節への移行が低下していた。TSLP は、ケモカイン受容体の一つである CCR7 を介した DCs のリンパ節への遊走を増強するが、TSLPR 欠損マウスにおいてはこの遊走の増強は見られない³⁹。従って、感染様刺激を受けたマウスにおける抗原取り込み細胞のリンパ節移行の低下は、抗原取り込み低下とともに、リンパ節への移行も減弱していると考えられ、この作用にも TSLPR 発現低下が関連している可能性がある。

次に、炎症惹起部位での変化を解析した。アレルギー塗布により背部皮膚における TSLPR 発現細胞は顕著に増加した一方、感染様刺激マウスでは TSLPR 発現の明らかな減少が観察され、APCs 遊走減少あるいは細胞あたりの TSLPR 発現の低下が示唆された。耳においては、アレルギー無塗布群においても感染様刺激による TSLPR 発現が顕著に減少していたことから、一細胞あたりの TSLPR 発現減少が考えられる。皮膚 DCs における TSLPR 欠損はアレルギー性炎症を抑制することから³⁵、感染様刺激により誘導された TSLPR^{low} BMDCs がアレルギー減弱に関与する可能性は十分にある。

CD80、CD86 低発現な未成熟 DCs (immature DCs; iDCs) は効率良く Treg を誘導し⁴⁰、アレルギーを抑制する⁴¹。感染様刺激マウスではアレルギー暴露部位

において Foxp3 陽性細胞が増加していたこと、感染様刺激マウス由来 BMDCs 移入マウスにおけるリンパ節でも Foxp3 mRNA 発現レベルが有意に上昇したことから、感染様刺激により増加する TSLPR^{low} DCs によるアレルギー減弱作用に Treg の寄与が一部関与している可能性が示唆された。

最後に、DCs の機能変化がアレルギー減弱に関与していることについては、DCs の移入実験により確認した。すなわち、感染様刺激マウス由来抗原刺激 BMDCs の移入は、IgE 抗体産生の減弱化を示した。一方、レシピエントに対して感染様刺激を行った場合、コントロールマウス由来 BMDCs を移入した群においても total-IgE 産生は抑制されたことから、移入した BMDCs のみならず、他の細胞における機能も感染様刺激により影響を受けていると考えられる。本移入実験は、レシピエントマウスの DCs の寄与を少なくするために抗原刺激 DCs を用いたが、完全に否定することはできず、DCs を欠損したマウスを用いた移入実験が必要であると考えている。

以上の結果をまとめると、感染様刺激により、DCs の抗原取り込み能、リンパ球増殖誘導能が低下すること、細胞レベル、動物レベルで TSLPR の発現量の低下が認められ、TSLP シグナルの低下に基づくものであることが示唆された。さらに、TSLPR^{low} DCs は Treg 誘導能が高いことも示唆された。このように感染様刺激によるアレルギー減弱には、DCs の機能変化に関与していること、その一つの原因として TSLPR の発現低下が示唆された。TSLPR 発現が低下する生化学的機構については今後の課題である。

第 4 章 総括

近年、特に先進国において深刻な問題となっているアレルギー患者数の増加の要因の一つとして、幼少期における感染症罹患経験の低下（衛生仮説）が、考えられている。近年、実験動物を用いた衛生仮説に基づくアレルギー減弱メカニズムに迫る研究がなされており、このようなアレルギー減弱メカニズムの解明は、新規治療薬において重要な鍵となる。本研究では衛生仮説のメカニズムを明らかにするために、新規実験モデルを開発し、その機序として DCs における TSLPR 受容体発現低下と機能変化が誘導されていることを明らかにした。すなわち、幼少期に長期間感染様刺激を加えると、DCs において TSLPR が低下し、抗原取り込み能、リンパ節への移行、抗原提示能が低下すること、さらに Treg の誘導が増大することを見いだした (Fig. 29)。

第 2 章では、LPS を用いた感染様刺激によるアレルギー減弱モデルマウスを作製し、低濃度の LPS による長期的かつ幼少期に刺激することがアレルギー減弱に重要であることを示した。本研究で用いた低濃度 LPS は、アレルゲンと同時に単回刺激することで、アレルギーを増悪化することが報告されており、同濃度の LPS を用いたアレルギー減弱モデルは、アレルギー減弱メカニズム解明において重要な知見である。また、LPS を用いた衛生仮説に基づくアレルギー減弱モデルについては報告がなく、アレルギー減弱メカニズム解明のみならず、アレルギーに対するエンドトキシンが示す二相性のメカニズム解明においても有効であると考えられる。感染様刺激によるアレルギー減弱モデルでは、幼少期のマウスを用いており、10 週齢のマウスにおいては LPS によるアレルギー減弱効果が見られなかった。この結果は、衛生仮説を支持する結果であるが、週齢による差が何に基づくのかは今後追求すべき重要な課題である。

第 3 章では、前章で作製したモデルマウスを用いた、アレルギー減弱メカニズムの解明を行い、感染様刺激は、BMDCs の機能を低下させることを見いだした。すなわち、BMDCs の抗原取り込み、リンパ節への移行、及び抗原提示機能が感染様刺激により低下することを明らかにした。さらに、移入実験の結果から、感染様刺激により誘導された BMDCs は、アレルギー減弱に寄与することを確認した。一方で、感染様刺激に誘導された BMDCs では、TSLPR の発現が減少していることも見いだした。DCs 上の TSLPR 活性化を介したシグナルは、アレルギー増悪化を引き起こす。また、TSLPR の欠損は DCs の抗原取り込み、リンパ節への移行を低下させることでアレルギーを減弱すると報告されている。これらの結果は、感染様刺激による BMDCs における TSLPR 発現減少と、BMDCs 機能変化との関連性を示唆するものであり、また、TSLPR 発現レベルが低機能 BMDCs の新規マーカーとなる可能性を示唆する。

また、近年ではアレルギー患者数の増加と共に、Th1 優位で発症するとされる自己免疫疾患などについても増加しており、Th1/Th2 バランスのみでの説明が困難となっている。また、感染様刺激による変化が長期間持続することからも、何らかのメモリー機構の存在が考えられた。そのような機能を担うものとして Treg があり、本研究でも Treg の関与を示唆する結果を得た。従って、感染様刺激は、Treg を高効率で誘導する新たな BMDCs サブセットを誘導している可能性が考えられる。Treg 高誘導型 DCs サブセットについては近年、議論がなされているが、TSLPR と Treg 高誘導型 DCs に関する報告は無い。T 細胞及び DCs は移入による治療の発展が期待されている。抗原特異的 Treg あるいは、Treg 高誘導型 DCs は、アレルギーのみならず、自己免疫疾患の新規治療法にもつながることが予想され、本研究で見いだした感染様刺激による Treg 高誘導型 DCs の可能性については今後注目していきたい。

以上、衛生仮説の免疫学的・細胞生化学な機序として、DCs の TSLPR 発現変動

と機能変化を見いだした。これらの発見は今後アレルギー減弱化機構を解明する鍵になると考えられる。

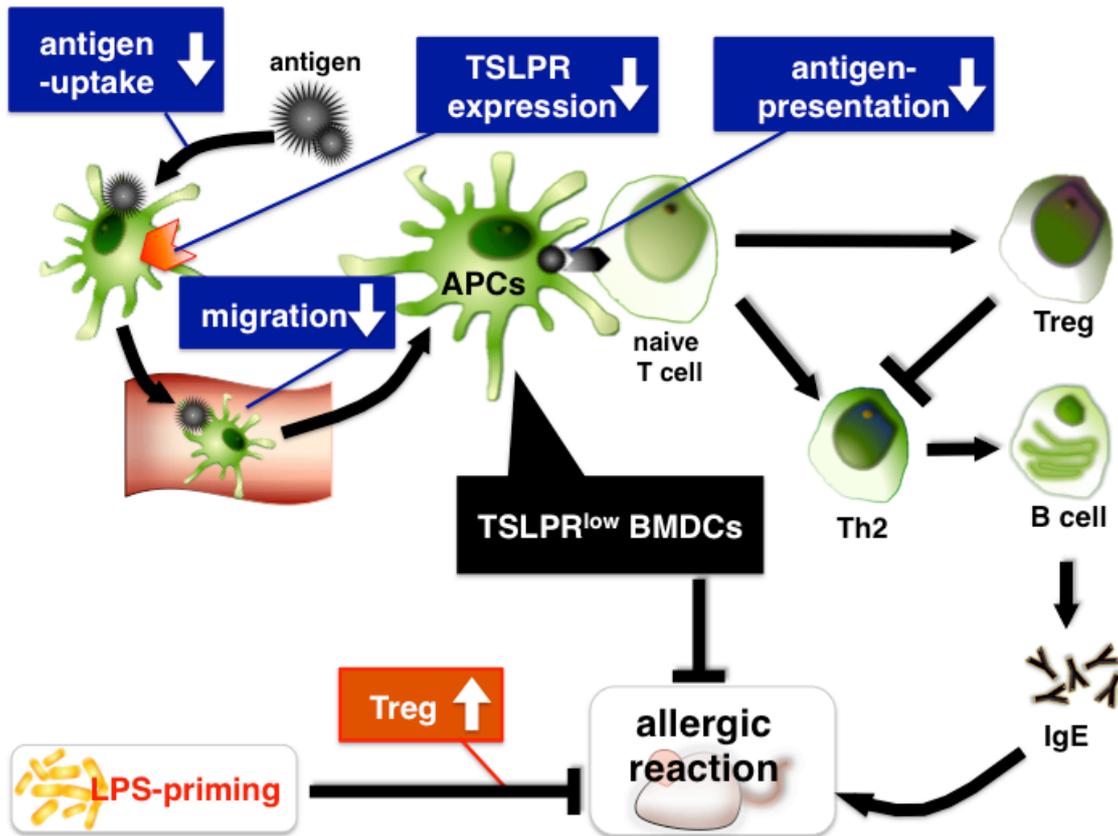


Fig. 29 LPS-priming drives TSLPR^{low} BMDCs and mitigation of allergy through the altering of BMDc functions

APCs; antigen-presenting cells, BMDCs; bone marrow-derived dendritic cells, TSLPR^{low}; thymic stromal lymphopoietin receptor–low expressing, Th2; helper T cell type 2, Treg; regulatory T cell, IgE; immunoglobulin E

第 5 章 実験方法

5-1. 実験動物

BALB/c マウス (SPF, male) は日本エスエルシーより購入し、取り扱いについては、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づいて行った。

5-2. 試薬

本章で用いた試薬は以下から購入した。

生理食塩水	: 大塚製薬
リポポリサッカライド (LPS)	: 和光純薬工業
卵白アルブミン	: sigma chemical
ウシ血清アルブミン	: Sigma-Aldrich
水酸化アルミニウム (Alum)	: 和光純薬工業
エオシン	: MERCK JAPAN
ヘマトキシリン	: MERCK JAPAN
パラフィン (m. p. 52~54°C)	: 純正化学
Mouse Serum Anti-OVAIgE Antibody Assay Kit	: Chondrex
Mouse Serum Anti-OVAIgG Antibody Assay Kit	: Chondrex
Mouse Serum Anti-totalIgE Antibody Assay Kit	: Chondrex
RPMI1640 培地 (RPMI1640)	: 日水製薬
ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)	: 日水製薬
ペニシリンG カリウム	: 明治製菓
硫酸ストレプトマイシン	: 明治製菓
ウシ胎児血清 (FBS)	: Biowest
2-メルカプトエタノール (2-ME) パラホルムアルデヒド	: 和光純薬工業
ホルムアルデヒド	: 和光純薬工業

その他の試薬は、市販の特級試薬あるいはこれに相当するものを用いた。

5-3. 抗体

PE-conjugated anti-mouse CD11c 抗体	: Miltenyl Biotec
anti-mouse TSLPR 抗体 (goat)	: R&D system
anti-mouse TSLPR 抗体 (goat)	: SANTA CRUZE
anti-mouse TSLP 抗体	: SANTA CRUZE
anti-mouse IL-7R α 抗体 (rat)	: AbD serotec
anti-mouse CD80-FITC 抗体	: TONBO biosciences
anti-mouse CD86-FITC 抗体	: TONBO biosciences
anti-mouse CD11c-FITC 抗体	: TONBO biosciences
anti-mouse MHC II-FITC 抗体	: TONBO biosciences
anti-human/mouse Foxp3 抗体 (rabbit)	: SANTA CRUZE
Alexa Fluor [®] 594-labeled anti-goat IgG 抗体	: Life technologies
Alexa Fluor [®] 488-labeled anti-rabbit IgG 抗体	: Life technologies
PE-conjugated anti-goat IgG 抗体	: SANTA CRUZE
FITC-conjugated anti-rat IgG 抗体	: SANTA CRUZE

5-4. 感染様刺激、及びアレルギー感作・惹起

感染様刺激は、LPS (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、生理食塩水溶液) を 1 週間おきに 3 回腹腔内に注射した。コントロールには生理食塩水を投与した。その最後の LPS・生理食塩水注射の 1 週間後から感作した。感作は、OVA (10 μg) 及び Alum (4 mg) を 200 μL の生理食塩水に溶解し、マウス腹腔内に 2 回 1 週間おきに注射した。2 回目の感作から 1 週間後、OVA 溶液 (25 mg OVA/100 μL 生理食塩水/4.9 mL グリセロール) を 2 日おきに 28 日間、剃毛したマウス背部皮膚及び耳介皮膚に塗布することにより惹起した。コントロールには、全て生理食塩水を用いた。

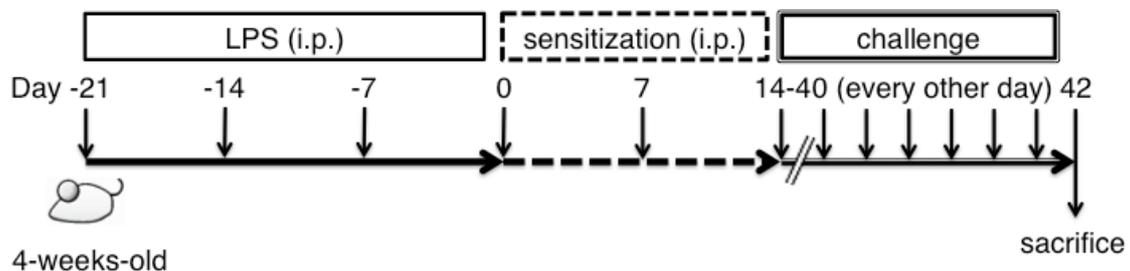


Fig. 30 Schema showing the protocol for a mouse experimental model for analysis of the hygiene hypothesis

Mice were injected with LPS i.p. as an infectious stimulation (LPS (i.p.)) at day -21, -14 and -7. On day 0 and 7, mice were sensitized, and subsequently, challenged by OVA on skin every 2 days from day 14 to day 40.

5-5. 耳介浮腫の計測

Day 42 (Fig. 30) における耳の厚みを gauge (DIAL THICKNESS GAUGE G, PEACOCK) を用いて計測した。

5-6. 組織学的解析

ジエチルエーテル麻酔下において頸動脈を切断し、脱血死させた。その後、採取した耳介組織を 10 % リン酸緩衝ホルマリン溶液に浸漬し 4 °C で固定した。固定後、パラフィンにより包埋し、薄切り切片を作製した。脱パラフィン後の薄切り切片は、ヘマトキシリン染色液に 1 分間浸した後、水道水で 10 分間浸すことにより色出しを行った。その後、エオシン染色液に 2 分間浸し、軽く水洗後、脱水透徹を行い、封入した。観察は光学顕微鏡を用いた。

5-7. 血清中抗体量測定

ジエチルエーテル麻酔下において頸動脈を切断し、採血した。採取した血液は 4 °C で 16 時間静置した後、1200 x g 4°C で 30 分間遠心した。遠心後の上清を血清として ELISA に用いた。総 IgE (total-IgE) 、OVA 特異的 IgE (OVA-IgE) 及び OVA 特異的 IgG (OVA-IgG) の ELISA は、各々 Mouse Serum Anti-OVA IgE Antibody Assay Kit、Mouse Serum Anti-OVA IgG Antibody Assay Kit 及び Mouse Serum Anti-total IgE Antibody Assay Kit を用いて付属のプロトコルに従って行った。吸光度については、microplate reader iMark™ (Bio-Rad) を用いて 450 nm における吸光度を測定し、血清中抗体量を定量した。

5-8. 細胞調製、培養及び刺激

GM-CSF-expressing NIH 3T3

GM-CSF-expressing NIH 3T3 細胞は、MFG-mGM-CSF (Dr. Hamada (札幌医科大学) より供与) を NIH-3T3 細胞にトランスフェクションして作製した。GM-CSF-expressing NIH 3T3 細胞は、10 % FBS、18 mg/ml ペニシリン G カリウム、50 mg/mL 硫酸ストレプトマイシンを添加した DMEM 中で、5 % CO₂、37°C で培養した。3.5 x 10⁵ cells/mL で播種してから 48 時間後の上清を 3T3-GM-CSF conditioned medium とした。

マウス腹腔細胞

マウスをジエチルエーテル麻酔下において頸動脈を切断し、脱血死させた後、マウス腹腔内に 3 mL PBS を注入し、よく揉むことで腹腔内細胞を懸濁させた。さらに 2 mL の PBS を追加注入し、そのままシリンジ内に細胞懸濁液を回収した。回収した細胞は遠心 (210 x g、4 °C、3 分間) 後、上清を除去し、10 % FBS、18 mg/ml ペニシリン G カリウム、50 mg/ml 硫酸ストレプトマイシンを添加した RPMI1640 中で培養した。

抗原取り込み実験では、FITC 標識 BSA (F-BSA, 1 mg/mL) 存在下で 3 時間インキュベートした。

マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDCs)

マウスをジエチルエーテル麻酔下において頸動脈を切断し、脱血死させた後、大腿骨及び頸骨を採取した。表面を滅菌した骨の両端を切り落とし、RPMI1640 で骨髄を洗浄、回収した。回収した骨髄細胞は遠心 (210 x g、4 °C、3 分間) 後、2.0 x 10⁶ cells/10 cm dish となるようにバクテリア用ディッシュに播種した。

細胞は、R10 (10 % FBS、18 mg/ml ペニシリン G カリウム、50 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン、50 mM 2-ME、20 % (v/v) 3T3-GM-CSF conditioned medium 含有 RPMI1640) を培地として 5 % CO₂、37°C のインキュベーター内で培養した。培養開始から 3 日後、新たな R10 を加えた。さらに培養 6 日目に、各ディッシュ中の培地を 10 mL 回収し、遠心 (210 x g、4 °C、3 分間) 後、沈殿した細胞を新たな R10 で懸濁し、元のディッシュに戻した。培養 8 日目の細胞を BMDCs として用いた。なお、培養 8 日目の細胞は FACS により、約 80 % の細胞が DCs マーカーである CD11c 陽性であることを確認している (data not shown)。

感染様刺激マウス由来 BMDCs の調製については、感染様刺激後の Day 0 にマウスより骨髓細胞を採取、上記方法で BMDCs を作製した (Fig. 31)。

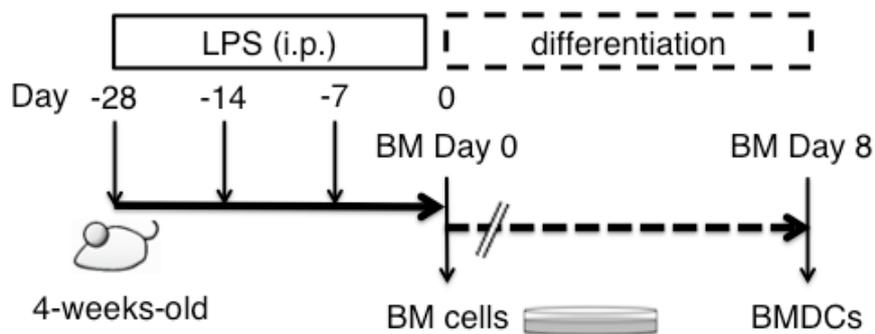


Fig. 31 Schema showing the protocol for the preparation of BMDCs from LPS-primed mice

抗原取り込み実験では、FITC 標識 BSA (F-BSA, 1 mg/mL) を添加した culture medium (RPMI1640 containing 10 % FBS) 中で 3 時間インキュベートした。

LPS または TSLP と抗原の共刺激については、F-BSA (1 mg/mL) とともに LPS (1 μ g/mL) あるいはリコンビナント TSLP (15 ng/mL, R&D system) を添加し、3 時間インキュベートした。TSLP の中和実験では、anti-mouse TSLP 抗体 (1 μ g/mL) をあらかじめ TSLP と 15 分間室温でインキュベートさせたのち、培養系に添加した。

5-9. Flow Cytometry (FACS)

抗原取り込み能解析

F-BSA 刺激した腹腔細胞及び BMDCs はスクレーパーで回収後、FACS buffer (0.25 % BSA/PBS) で懸濁し、遠心 (500 x g、4 °C、3 分間) した。遠心後の上清を除去し、同様の操作を 3 回繰り返すことにより細胞を洗浄した。1 x 10⁶ cells/mL となるように、FACS buffer で再懸濁し、FACS で解析した。

受容体及び表面分子発現解析

BMDCs はスクレーパーで回収後、FACS buffer (0.25 % BSA/PBS) で懸濁し遠心 (500 x g、4°C、3 分間) した。遠心後の上清を除去し、同様の操作を 3 回繰り返すことにより細胞を洗浄した。1 x 10⁶ cells/mL となるように FACS buffer で再懸濁し、染色操作を行った。各特異的抗体は付属のデータシートに記載されている濃度に従い FACS buffer 用いて希釈し、抗体溶液とした。

TSLPR 及び IL-7R α については、anti-mouse TSLPR 抗体 (R&D system) 及び anti-mouse IL7R α 抗体溶液を細胞に添加し、氷上で 60 分間インキュベートした。洗浄後、2 次抗体として各々 PE-conjugated anti-goat IgG 抗体及び FITC-conjugated anti-rat IgG 抗体を細胞に添加し、氷上で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、同様に洗浄操作を行い、FACS buffer 1 mL で再懸濁したものを FACS 用サンプルとした。F-BSA 取り込み細胞については、F-BSA 刺激後に同様の染色操作を行い、サンプル調製した。

CD11c、CD80、CD86 及び MHC II については、anti-mouse CD80-FITC 抗体、anti-mouse CD86-FITC 抗体、anti-mouse CD11c-FITC 抗体、anti-mouse MHC II-FITC 抗体及び PE-conjugated anti-mouse CD11c 抗体を細胞に添加し、

氷上で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、同様に洗浄操作を行い、FACS buffer 1 mL で再懸濁したものを FACS で解析した。

抗原取り込み細胞のリンパ節移行解析

F-BSA を 20 mg/200 μ L となるように生理食塩水に懸濁し、マウス腹腔内に 200 μ L/mouse で投与した。投与から 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 及び 72 時間後にマウスをジエチルエーテル麻酔下において頸動脈を切断し、脱血死させ、鼠径リンパ節を採取した。コントロールには生理食塩水のみを投与したマウスにおけるリンパ節を用いた。採取したリンパ節は氷上、1 % BSA 含有 PBS 中でスライドグラスを用いてすり潰し、メッシュを通すことで細胞を単離した。単離した細胞を回収後、遠心 (500 x g、4 $^{\circ}$ C、3 分間) し、さらに FACS buffer を用いて同様に洗浄した。沈殿した細胞に約 1×10^6 cells/mL となるように FACS buffer に再懸濁し、FACS で解析した。

FACS 解析

測定については FACSCalibur (Becton Dickinson)、解析ソフトについては CellQuest (Becton Dickinson)を用いて行った。

5-10. 定量的リアルタイム RT-PCR

組織における total RNA 抽出

マウスより採取した各組織約 30 mg を Micro Smash™ サンプルチューブ (TOMY, TM-625S) に入れ、500 μ L の RNAiso Plus (Takara Bio) を添加した。破砕は破砕用ジルコニアビーズを用いて 5000 rpm、30 秒間で 2 回振とうした。得られた組織懸濁液に CHCl_3 100 μ L を添加し、よく混合した後、遠心 (12,000 x g、15 分間、4 $^{\circ}$ C) し、水相を新しい 1.5 mL チューブに移した。2-プロパノール 250 μ L で懸濁し、室温で 10 分間静置した後、遠心 (12,000 x g、15 分間、4 $^{\circ}$ C) により RNA を含む沈殿を得た。沈殿は 75% エタノールで 2 回洗浄した後、室温で乾燥させた。乾燥後、DEPC 水で溶解した。抽出した total RNA は ND-2000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) により定量した。

細胞における total RNA 抽出

骨髄細胞及び BMDCs 2×10^6 cells に 500 μ L の RNAiso Plus を添加し、室温で 15 分間静置した。静置後、細胞溶解液に CHCl_3 100 μ L を添加し、よく混合した後、遠心 (12,000 x g、15 分間、4 $^{\circ}$ C) し、水相を新しい 1.5 mL チューブに移した。以下、上記、組織における total RNA 抽出と同様の操作により、抽出及び濃度測定操作を行った。

Reverse transcription (RT)

本操作は抽出した RNA (0.5 μ g) を PrimeScript® RT Master Mix (Takara Bio) を用いて、付属のプロトコルに従って行った。得られた反応液は DNase free H_2O で 10 倍希釈し、cDNA 溶液とした。

リアルタイム RT-PCR

本操作は SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara Bio) を用いて付属のプロトコルに従って行った。各反応条件は以下の通りである。

<PCR 反応液>

cDNA	10 ng
primer (10 mM)	0.5 μ L each
SYBR® Premix Ex Taq™ II	6.25 μ L
DNase free H ₂ O	X μ L
<hr/>	
Total	12.5 μ L

<PCR 反応条件>

2 step PCR

95°C	30 sec	
95°C	5 sec	↕ 40 cycles
60°C	60 sec	

Dissociation

95°C	15 sec
60°C	30 sec
95°C	15 sec

使用したプライマーは以下の通りである。

TSLPR ; (forward) 5'-TGAGCCTGGAGTTCCGTTAT-3'
(reverse) 5'-CGCTGCCTAGCCTTAAACAC-3'

IL-7R α ; (forward) 5'-GGATCCTGTCTTGCCAAGTG-3'
(reverse) 5'-TCGGGATTGAAACTCACATTC-3'

γ_c ; (forward) 5'-AGGCGAGCTGTACAGAAGCTA-3'
(reverse) 5'-CTGGGATTCACTCAGATTGCT-3'

Foxp3 ; (forward) 5'-AAAAGGAGAAGCTGGGAGCTA-3'
(reverse) 5'-TGAGTACTGGTGGCTACGATG-3'

TGF β 1 ; (forward) 5'-GCAACATGTGGA ACTCTACCAGAA-3'
(reverse) 5'-GACGTCAAAAGACAGCCACTCA-3'

IL-10 ; (forward) 5'-AGCCGGGAAGACAATAACTG-3'
(reverse) 5'-CATTTCCATAAGGCTTGG-3'

GAPDH ; (forward) 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
(reverse) 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

5-11. 共培養

共培養

BMDCs を OVA (1 mg/mL) で 16 時間 5 % CO₂、37°C でインキュベートした後、culture medium で 3 回洗浄することで、取り込まれなかった OVA を除去した。洗浄後の細胞を計数し、共培養に用いた。

Thymocytes は、5-4 に従って OVA で免疫したマウスの胸腺より調製した。マウスをジエチルエーテル麻酔下において頸動脈を切断し、脱血死させ、無菌下で胸腺を採取した。胸腺は氷上、1 % FBS 含有 PBS 中でスライドグラスを用いてすり潰した後、メッシュを通すことで thymocytes を単離させた。単離した thymocyte は culture medium で 3 回洗浄後、共培養に用いた。

共培養については、BMDCs : thymocytes = 1 : 5 の割合で混合し、5 % CO₂、37 °C で 48 時間培養した (Fig. 32)。

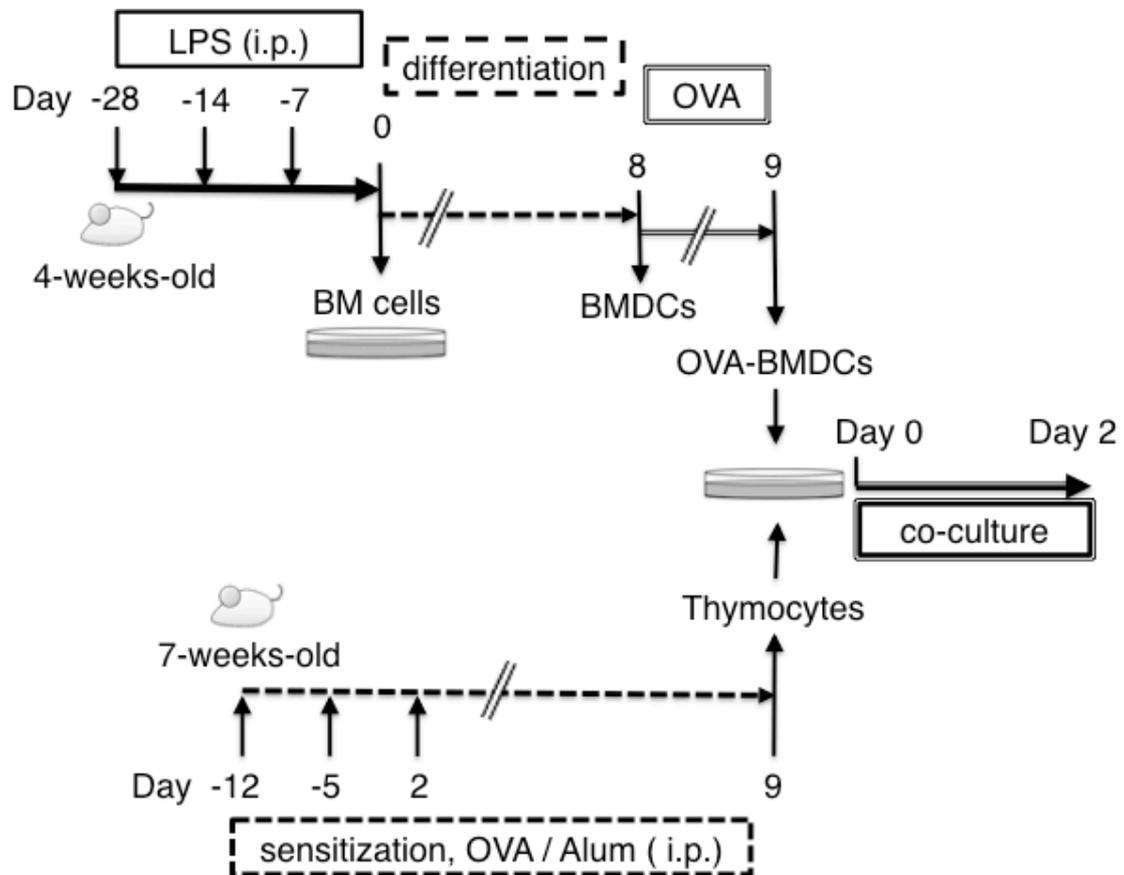


Fig. 32 Schema showing the protocol for the co-culture of BMDCs from LPS-primed mice with thymocytes

BMDCs were prepared from LPS-primed mice, and treated OVA for 24 hours. OVA-primed BMDCs (OVA-BMDCs) were co-cultured with thymocytes, prepared from OVA-sensitized mice.

MTT assay

培養 0 及び 2 日目の細胞をスクレーパーで回収し、10 % FBS 及び 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) を添加した RPMI1640 中で 4 時間インキュベートした。その後、上清を除去し、等量の DMSO を添加することで細胞内 formazan を溶解した。吸光度は、microplate reader iMarkTM (Bio-Rad) を用いて 570 nm における吸光度を測定し、細胞増殖を算出した。

5-12. 免疫蛍光染色法

細胞免疫蛍光染色法

細胞は 0.1 % gelatin でコートしたカバーガラスを入れた 12-well plate に 1×10^5 cells/well となるように播種し、16 時間培養した。続いて 5-8 に従い F-BSA で刺激した。刺激した細胞は PBS で 2 回洗浄し、4 % パラホルムアルデヒド含有 PBS 中で室温にて 30 分間固定させた。固定後、PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング処理として blocking buffer (5 % BSA 含有 PBS) に置換し、37 °Cにて 2 時間浸漬した。続いて、anti-mouse TSLPR (SANTA CRUZE) 抗体 (x 400/blocking buffer) 中に室温で 1 時間浸漬した。Blocking buffer で 2 回洗浄後、Alexa Fluor® 594-labeled anti-goat IgG 抗体 (x 500/blocking buffer) 中に室温で 30 分間浸漬した。さらに blocking buffer で 3 回洗浄後、DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride; DONJINDO) により室温で 15 分間核染色を行った。PBS で 3 回洗浄後、カバーガラスを PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium (Thermo Scientific) を用いてスライドグラスに封入し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss) で観察した。

組織免疫蛍光染色法

マウス背部皮膚、及び耳介皮膚を O.C.T. Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (Sakura Finetek) を用いて新鮮凍結ブロックを作製した。ブロックは、Cryostat (Leica) を用いて組織切片にした後、1 時間風乾させ APS コートスライドグラスに貼付けた。乾燥後、PBS で軽く洗浄し、室温にて 4 % パラホルムアルデヒド含有 PBS 中に 30 分間浸漬し、固定させた。固定後、PBS で 3 回洗浄し、blocking buffer 中に、37 °Cにて 2 時間浸漬した。ブロッキング後、

anti-mouse TSLPR (SANTA CRUZE) 抗体 (x 400/blocking buffer)あるいは anti-human/mouse Foxp3 抗体 (x 400/blocking buffer) に 4°C で 16 時間浸漬した。Blocking buffer で 3 回洗浄後、Alexa Fluor® 594-labeled anti-goat IgG 抗体 (x 500/blocking buffer) あるいは Alexa Fluor® 488-labeled anti-rabbit IgG 抗体 (x 500/blocking buffer) 中に 37 °C で 30 分間浸漬した。PBS で 3 回洗浄後、カバーガラスを PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium (Thermo Scientific) を用いてスライドガラスに封入し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss) で観察した。

5-13. BMDCs 移入実験

BMDCs 移入

感染様刺激マウス及びコントロールマウスより調製した BMDCs は OVA (1 mg/mL) で 24 時間 5 % CO₂、37 °C のインキュベーター内で前処理した。OVA 刺激した BMDCs は スクレーパーを用いて剥離、回収し、遠心 (500 x g、4 °C、3 分間) 後の上清を除去した。さらに ice cold PBS で 2 回洗浄することで、取り込まれなかった OVA を除去し、得られた細胞を抗原取り込み BMDCs (OVA-BMDCs) とした。OVA-BMDCs はレシピエントマウスの腹腔内に 5 x 10⁶ cells/200 µL PBS となるように調製し、OVA-BMDCs 懸濁液 200 µL を 3 日おきに 27 日間移入した。レシピエントマウスには感染様刺激及びコントロールマウスを用いた。(Fig. 33)。

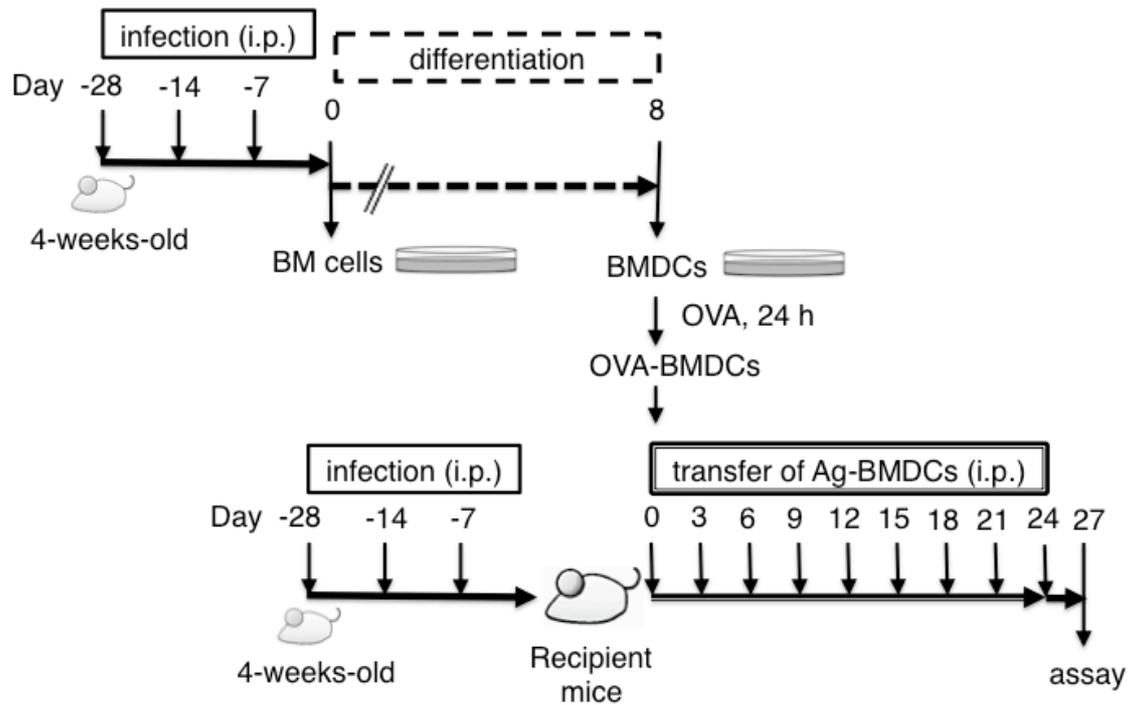


Fig. 33 Schema showing the protocol for the transfer of BMDCs into LPS-primed and control mice

BMDCs prepared from LPS-primed mice were pre-treated with OVA (OVA-BMDCs) and transferred into the recipient mice every 3 days from day 0 to day 27.

リンパ節における mRNA 発現レベル解析

移入開始から 27 日目 (Day 27) に、マウスをジエチルエーテル麻酔下において頸動脈を切断し、脱血死させた。続いて鼠径リンパ節を採取し、5-10 定量的リアルタイム RT-PCR 法の手順に従い、mRNA 発現レベルを解析した。

5-14. 統計処理

実験結果については、平均値 (mean) \pm 標準誤差 (S.E.) で示し、検定は 2 群間の比較には unpaired two-tailed Student's *t* test、それ以上の群間における比較は ANOVA によって行い、 $p < 0.05$ で有意差有りとした。

謝辞

本研究にあたり、終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 平澤典保 教授に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究に、終始多大なるご理解とご鞭撻を賜り、ご指導とご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 平塚真弘 准教授に厚く御礼申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、細部に至る御助言とご激励を賜りました東北大学大学院薬学研究科生命機能解析学分野 倉田祥一郎 教授 及び 東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野 守屋孝洋 准教授に厚く御礼申し上げます。

終始、多大なるご指導、ご検討を賜りました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 瀬川良佑 助手に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、実験機器を使用させていただきました東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野 青木淳賢 教授 に深く感謝申し上げます。

最後に多大なるご協力、ご激励を賜りました東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野の諸氏に深く感謝致します。

1. **Beasley, R., Crane, J., Lai, C.K. & Pearce, N. Prevalence and etiology of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 105, S466-472 (2000).**
2. **Strachan, D.P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259-1260 (1989).**
3. **Williams, L.K., Peterson, E.L., Ownby, D.R. & Johnson, C.C. The relationship between early fever and allergic sensitization at age 6 to 7 years. *The Journal of allergy and clinical immunology* 113, 291-296 (2004).**
4. **Illi, S. *et al.* Early childhood infectious diseases and the development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 322, 390-395 (2001).**
5. **Matricardi, P.M. *et al.* Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ* 320, 412-417 (2000).**
6. **Matricardi, P.M. *et al.* Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* 314, 999-1003 (1997).**
7. **Von Ehrenstein, O.S. *et al.* Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 30, 187-193 (2000).**
8. **Gehring, U., Bischof, W., Fahlbusch, B., Wichmann, H.E. & Heinrich, J. House dust endotoxin and allergic sensitization in children. *American journal of respiratory and critical care medicine* 166, 939-944 (2002).**
9. **Braun-Fahrlander, C. *et al.* Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *The New England journal of medicine* 347, 869-877 (2002).**

10. Gereda, J.E. *et al.* Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* **355**, 1680-1683 (2000).
11. Romagnani, S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunology today* **13**, 379-381 (1992).
12. Bach, J.F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine* **347**, 911-920 (2002).
13. Heinzl, F.P., Rerko, R.M., Ling, P., Hakimi, J. & Schoenhaut, D.S. Interleukin 12 is produced in vivo during endotoxemia and stimulates synthesis of gamma interferon. *Infection and immunity* **62**, 4244-4249 (1994).
14. Adkins, B., Bu, Y. & Guevara, P. The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J Immunol* **166**, 918-925 (2001).
15. Vigano, A. *et al.* Differential development of type 1 and type 2 cytokines and beta-chemokines in the ontogeny of healthy newborns. *Biology of the neonate* **75**, 1-8 (1999).
16. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
17. Tulic, M.K., Wale, J.L., Holt, P.G. & Sly, P.D. Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **22**, 604-612 (2000).
18. Park, L.S. *et al.* Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor. *The Journal of experimental medicine* **192**, 659-670 (2000).
19. Zhou, B. *et al.* Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway

- inflammation in mice. *Nature immunology* **6**, 1047-1053 (2005).
20. Liu, Y.J. *et al.* TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annual review of immunology* **25**, 193-219 (2007).
 21. Liu, Y.J. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *The Journal of experimental medicine* **203**, 269-273 (2006).
 22. Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Keane-Myers, A. & Leonard, W.J. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *The Journal of experimental medicine* **202**, 829-839 (2005).
 23. Larson, R.P. *et al.* Dibutyl phthalate-induced thymic stromal lymphopoietin is required for Th2 contact hypersensitivity responses. *J Immunol* **184**, 2974-2984 (2010).
 24. Kitajima, M. & Ziegler, S.F. Cutting Edge: Identification of the Thymic Stromal Lymphopoietin-Responsive Dendritic Cell Subset Critical for Initiation of Type 2 Contact Hypersensitivity. *J Immunol* (2013).
 25. Arnold, I.C. *et al.* Helicobacter pylori infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation* **121**, 3088-3093 (2011).
 26. Chang, Y.J. *et al.* Influenza infection in suckling mice expands an NKT cell subset that protects against airway hyperreactivity. *The Journal of clinical investigation* **121**, 57-69 (2011).
 27. Eisenbarth, S.C. *et al.* Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *The Journal of experimental medicine* **196**, 1645-1651 (2002).
 28. Bjorksten, B., Naaber, P., Sepp, E. & Mikelsaar, M. The intestinal microflora in

- allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **29**, 342-346 (1999).
29. Kalliomaki, M. *et al.* Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **357**, 1076-1079 (2001).
30. Pessi, T., Sutas, Y., Hurme, M. & Isolauri, E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **30**, 1804-1808 (2000).
31. Sawada, J. *et al.* Ingestion of heat-treated *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **37**, 296-303 (2007).
32. Kim, H.J. *et al.* A novel mouse model of atopic dermatitis with epicutaneous allergen sensitization and the effect of *Lactobacillus rhamnosus*. *Experimental dermatology* **21**, 672-675 (2012).
33. Torii, A. *et al.* *Lactobacillus Acidophilus* strain L-92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* **56**, 293-301 (2007).
34. Oertli, M. *et al.* DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine *Helicobacter pylori*-specific immune tolerance, and asthma protection. *The Journal of clinical investigation* **122**, 1082-1096 (2012).
35. Nakajima, S. *et al.* Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *The Journal of allergy and clinical immunology* **129**, 1048-1055 e1046 (2012).

36. Yoo, J. *et al.* Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *The Journal of experimental medicine* **202**, 541-549 (2005).
37. Peng, Y., Laouar, Y., Li, M.O., Green, E.A. & Flavell, R.A. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4572-4577 (2004).
38. Gleissner, C.A. *et al.* IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. *European journal of immunology* **37**, 177-192 (2007).
39. Kitajima, M. & Ziegler, S.F. Cutting edge: identification of the thymic stromal lymphopoietin-responsive dendritic cell subset critical for initiation of type 2 contact hypersensitivity. *J Immunol* **191**, 4903-4907 (2013).
40. Sato, K., Yamashita, N., Yamashita, N., Baba, M. & Matsuyama, T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity* **18**, 367-379 (2003).
41. Fujita, S. *et al.* Regulatory dendritic cells protect against allergic airway inflammation in a murine asthmatic model. *The Journal of allergy and clinical immunology* **121**, 95-104 e107 (2008).

発表論文リスト

1. Hetero-oligomerization between adenosine A₁ and thromboxane A₂ receptors and cellular signal transduction on stimulation with high and low concentrations of agonists for both receptors.

Mizuno N, Suzuki T, Hirasawa N, Nakahata N.

European Journal of Pharmacology, 2012, 677: 5-14