

# 論文審査の結果の要旨

氏名 高山 尚子

本論文は二章からなり、第一章は食物アレルギーにおける腸管免疫の要であるパイエル板 (PP) とそこに存在する制御性 T 細胞の役割について明らかにし、第二章はその成果を基盤として新たに同定したアレルギー性免疫応答を抑制する粘膜系 DX5<sup>+</sup> T 細胞について免疫生物学的役割とその意義について論じている。

第一章では、ニワトリ卵白アルブミン (OVA) を経口接種抗原とした食物アレルギー発症モデルマウスにおいて PP がアレルギー誘導制御に重要な役割を果たしていることを明らかにし、粘膜免疫と食物アレルギーの関連性について追求している。PP に存在する主な免疫担当細胞群の内 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 細胞が IL-10 を高産生していることを突き止め、食物アレルギー発症抑制における PP と IL-10 産生性 Treg 細胞の重要性について論じている。

抗原が小腸で取り込まれる際、小腸 PP は抗原の取り込みを行い、その処理・提示の過程を経て抗原特異的免疫応答を誘導・惹起する場として知られてる。しかしながら同組織のアレルゲンに対する免疫応答誘導制御については不明な点が多い。そこで、本研究は食物アレルギーの誘導・制御における PP の役割を直接的に解明している。高山氏は、彼女の所属している研究室で確立した食物アレルギー発症動物モデルにおいて、アレルギー応答が大腸に局限し小腸では観察されていないことに注目し、「小腸 PP にアレルギー制御システムが存在するのではないか」という仮説のもと、抗 IL-7R $\alpha$ 抗体をマウス胎生期に投与することで作成した PP 欠損マウス (PP-null) を用いて研究を進めた。

食物アレルギーは、完全フロイントアジュバンドと共に OVA で全身感作し、一週間後に経口で OVA を連続投与することで誘導している。食物アレルギーの発症は、8-10回の経口投与後に Th2 型の免疫応答と共に抗原特異的 IgE 産生が上昇し、下痢の症状として観察される。食物アレルギーにおける PP の役割を直接的に明らかにするべく、作成した PP-null 又はコントロール抗体を投与した PP が正常に発達したマウス (PP-intact) の両マウスに、低濃度である 10mg の OVA を経口投与することでアレルギー性下痢の発症を比較検討している。この実験により PP-null 群の一部において経口投与一回目という早期にアレルギーを発症したのに対し PP-intact ではアレルギー性下痢の症状が観察されないことを示した。次に低濃度である 10mg の OVA を投与した PP-intact マウスにおいて PP-null マウスと比較してアレルギー性下痢の発症が見られないことから、マウス PP から細胞を回収してサイトカイン産生を検討した。アレルギーの発症を抑制しているマウスの PP において抑制性サイトカインである IL-10 が高産生されていることを明らかにした。さらに、どの免疫担当細胞群が IL-10 を産生しているかを特定するために、主な細胞群を精製・回収し定量的 RT-PCR 法にて IL-10 mRNA 発現を検討している。これにより CD4 陽性細胞画分に高い IL-10 の発現を認め、さらに IL-10 産生性の CD4 陽性細胞は CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞であることも示した。この IL-10 産生性の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞は Foxp3 陽性であることも示し、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> の Treg 細胞であることを明確に特定した。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 細胞を PP-null

マウスに移入することでアレルギー性下痢の発症を抑制することも同時に示し、PP に存在する IL-10 産生性 Treg 細胞が食物アレルギー発症を抑制していることを明らかにした。

次に、第二章は第一章で得られた結果を基盤として、PP に制御性の DX5 陽性細胞が存在することを同定し、その細胞は CD4 及び TCR $\beta$ 陽性で抗原特異的に脾臓から PP に遊走することで PP 内に制御性ネットワークを構築する事について論じている。

第一章において食物アレルギーをコントロールする IL-10 産生細胞として CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞の存在を同定したが、同様に DX5 陽性細胞からも高い IL-10 mRNA 発現が認められることを突き止めた。また、*in vivo* での抗体処理による CD25 及び IL-10 の影響を除く実験系において、抗 IL-10 抗体を投与したマウス群の方が抗 CD25 抗体を投与したマウスに比べて早期に下痢が観察されることに注目し、「IL-10 産生性 Treg 細胞の他に同サイトカインを産生し食物アレルギーの発症を制御する細胞が存在する」と仮説し実験を進めた。そこで、アレルギー発症を抑制する新規細胞として IL-10 産生性 DX5 陽性細胞が制御性細胞として働いていることを、IL-10KO マウスから回収した DX5 陽性細胞を PP-null マウスに移入する実験を行うことで明らかにした。DX5 は NK、NKT 及び顆粒球に発現していることが知られているので、細胞を特定するべく NK に発現している ASGM1 と T 細胞マーカーである CD3 を用いて確認し、それぞれの細胞群における IL-10 mRNA 発現を検討している。この実験により DX5<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>ASGM1<sup>-</sup>細胞が IL-10 を高産生していることを突き止め、さらにこの細胞は CD4 及び TCR $\beta$ 陽性であることを明らかにした。DX5<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>ASGM1<sup>-</sup>細胞は NKT 細胞様の表現型を示していたので、多様性の低い V $\alpha$ 14T 細胞レセプターを持った NKT 細胞が欠損している CD1dKO マウスを用いる実験系を立て検討した。この実験により、コントロール群である CD1d<sup>+/+</sup>と同じく CD1d<sup>+/+</sup>マウスにおいても下痢の発症が観察されないことを示し、DX5<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>ASGM1<sup>-</sup>細胞は典型的な V $\alpha$ 14NKT 細胞とは異なる細胞であることを明らかにした。さらに DX5<sup>+</sup>TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>ASGM1<sup>-</sup>細胞の移入実験によりこの細胞が強い抑制能を持ち食物アレルギーの発症を制御することを示し、粘膜組織に存在する新しい制御性細胞として MUCODX5 と命名している。次に、この MUCODX5 細胞がどこに由来し PP において制御性細胞として作用するのかを明らかにすべく Green fluorescence protein-transgenic (GFP-Tg)マウスの脾臓から精製・回収した DX5 陽性細胞を PP-intact マウスに移入する実験を行っている。これにより GFP<sup>+</sup>MUCODX5 細胞が PP のドーム直下に抗原特異的に遊走していること示し、さらに MUCODX5 細胞が粘膜指向性インテグリンである  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 を発現して抗原特異的に脾臓から PP に遊走することを明らかにした。また、MUCODX5 細胞と naïve マウスから回収した CD4<sup>+</sup>T 細胞を共培養することで Foxp3 陽性の CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 細胞が増加する事も示し、MUCODX5 細胞が Treg 細胞誘導能も持つことも明らかにした。

以上より、脾臓から PP へ抗原特異的に遊走してきた IL-10 高産生 MUCODX5 細胞が、食物アレルギーの発症を制御することを論理的に検討・証明し、その結果を詳細にまとめている。

なお、本論文は論文提出者が主体となって遂行および解析した研究であり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、高山氏は博士（生命科学）の学位を授与できると認める。