

アジュバント的媒体としての乳機能の探索と開発

京都大学大学院農学研究科：谷 史人

要 約

本研究では、生体防御物質である熱ショックタンパク質(Heat shock protein : Hsp)の生体調節機能を牛乳によって向上させることを目的に、乳をアジュバント的な媒体として利用することでHspの機能を高めることを目指した。

Hspは、元来、すべての生物がもっており細胞内でのタンパク質の構造形成にかかわる分子シャペロンとして知られてきたが、近年、Hspを粘膜免疫することによって免疫恒常性を制御する鍵細胞である制御性T細胞(Regulatory T cells : Treg)の産生を誘導できることや、その結果、関節炎や動脈硬化などの疾病の悪化を防ぐ抗炎症反応を誘導できることが報告されている。一方、微量のアレルゲンが母乳に含まれることで、母マウスから哺乳された仔マウスでは同種のアレルゲンに対する喘息が軽減するという報告から、微量成分の生体調節機能を有効に引き出すという乳に潜在するアジュバント的な媒体としての可能性が期待できる。そこで、離乳期から幼少期という生体の生理機構を成立させる極めて重要な時期を対象に、潜在的な乳のアジュバント機能を活かし、Hspによる粘膜機能の制御能を向上させることを目標に実験を行い以下の成果を得た。

第一章では、Hspはすべての生物に共通して存在するがゆえに、食餌や腸内細菌由来のHspが粘膜免疫に作用することが考えられる。まず、消化管内での内容物として、Hspがタンパク質性抗原として存在し、機能し得るかについて検討した。その結果、マウスの腸管内容物には、Hsp60そのものであるか、またはその断片が存在することを明らかにした。また、検出された腸管内容物中のHsp60様反応物は腸内細菌に由来することを示唆した。

第二章では、消化管内のHsp様抗原の情報が腸間膜リンパ節においてどのように処理され、その後のリンパ球応答を引き起こすのかについて解析した。その結果、マウスの生体内には、自己成分であるHsp60に対するリンパ球が存在すること、この自己応答性のTリンパ球はHsp60抗原刺激によってサイトカインIFN- γ やIL-10を産生することを見出した。また、腸間膜リンパ節の細胞をHsp-60抗原の存在下にて刺激すると、CD4陽性のTリンパ球に占めるFoxp3+の細胞の割合が増加することを明らかにした。この結果は、Hsp60に反応性を示す自己応答性T細胞は末梢組織において生存し、IL-10などの抗炎症性サイトカインの産生を通して、粘膜免疫系を制御し得るTregなどの機能調節にかかわる可能性を示唆した。

第三章では、離乳後の幼少期という生体の生理機構を形成させる重要な時期に、乳を担体として、Hspを経口投与することによってその免疫調節機能を高めることが可能か否かについて調べた。その結果、マウスにHsp60を牛乳とともに経口投与することによって制御性サイトカインと言われるIL-10の産生が増強されることを明らかにした。牛乳は何らかのメカニズムによってHspの生体防御機能を高める可能性を見出し、アジュバント的な媒体として作用し得ることを示唆した。

緒 言

牛乳は、非常に栄養価に優れた食品として知られている。牛乳は、哺乳類であるウシがつくる滋養物であるが、一般的に、乳というものは、哺乳類が生後に母親から与えられる唯一の食べ物である。糖質、脂質、タンパク質の栄養素に富むことから、哺乳類は離乳期まで乳によって成長する。乳を構成する成分を詳細に解析すると、糖質の構成成分、脂質の割合やタンパク質成分においてそれぞれの哺乳類ごとに違いが見られる。人乳では、乳糖が糖質の大部分を占めており、牛乳に比べて、カゼインの割合が低く、乳清においてはラクトフェリンの割合が多くβ-ラクトグロブリンはほとんど含まれていないなどの特徴がある。このような相違はそれぞれの哺乳類の生態や生理的環境を反映したものと考えられるが、一般的に、牛乳はヒトにおいても乳幼児の成長・発育や生体機能の調節には欠かすことのできない食品の一つであることは言うまでもない。一方、乳幼児に対して牛乳がアレルギーを引き起こすことが知られており、その発症にかかるメカニズムをはじめ低アレルゲンを目指した乳製品の開発も盛んに行なわれてきた。

三大栄養成分やビタミン、ミネラルといった栄養素のほかに、乳タンパク質からは様々な生理活性や薬理活性を示すペプチドも見出されてきた(1)。乳を、元来、哺乳類に食べられることを目的に生合成された、言い換えれば、生物として不完全な乳幼動物の生体機能を補完するものと考えれば、未だに明らかにされていない生体調節作用が乳に潜在している可能性がある。このような潜在機能を探索し活用することは従来から製造されている乳製品の高機能化を目指すことにつながる。乳の液性成分の他にも、ヒト初乳やウシの生乳などには細胞性成分が含まれている。たとえば、人乳中には白血球が含まれており、その数は泌乳期に応じて減少するが、殺菌力などは哺乳中を通して認められるなどの報告がある(2-4)。しかしながら、乳中に存在する細胞成分の生理作用についてはあまり明らかにされていないと言える。また最近、アレルゲンに暴露した母マウスから哺乳された仔マウスでは同種のアレルゲンに対する喘息が軽減するという報告がある(5)。その機序としては、母マウスが曝されたアレルゲンが乳中に移行し哺乳マウスに免疫寛容を誘導することが推論されている。乳中に存在するアレルゲンの量が微量であるデータを考慮すると、何らかのメカニズムによって乳が生体防御機能を高めている可能性が疑われる。言い換えれば、乳は極めて微量な成分の生体調節機能を有効に引き出すアジュバント的な媒体として作用し得る可能性が浮かびあがる。

経口や経鼻によって取り込まれるものは口腔や鼻腔内、消化管や気管支の粘膜組織と相互作用する。粘膜組織には、生物にもともと備わっている自然免疫を主体とした生体防御が存在する。消化管は多細胞動物にみられる最も原始的な器官である。単細胞から多細胞動物へと進化した結果、より多様な生活環境に適応できるようになるとともに、遺伝子を複製して子孫を作り出すための外界からの素材（栄養物）を効率的に取り込む構造として消化管が発達したとされる。消化管内は、「内なる外」の環境にあるとも言われ、食餌由来の雑多な外来性抗原や腸内細菌由来の抗原、また病原性微生物などに常に曝されている。そのため、粘膜免疫系では、自己と非自己を識別し異物の侵入を防ぐための巧妙な防御機構が張り巡らされている(6,7)。この防御機構には、異物の情報を処理する樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞群や、粘膜固有層や上皮細胞間に存在するリンパ球（分泌型IgAを産生するB細胞や種々のサブセットからなるT細胞）など多種多様な細胞で構成されており、消化管内の生体調節因子とそれらの相互作用は非常に複雑に絡み合っている(8-11)。

近年、消化管の粘膜免疫系の正しい制御が、炎症性大腸炎などの疾患や肥満・糖尿病を防ぐ生体恒常性の維持に重要であると指摘されている。免疫恒常性に係る細胞群のなかでも、最近注目されているのは制御性T細胞(Regulatory T cells : Treg)と対極に位置づけられているIL-17産生型T細胞(Th17)である(12,13)。Tregは、Th1やTh2などの細胞性免疫や液性免疫といった免疫のバランスを制御する一方で、Th17は、腸内細菌の定着や変動とも関連しており、そのはたらきが過度になると炎症性腸疾患を引き起こすとも言われる。このような免疫細胞の機能を調節するような因子は数多く見出されている。サイトカインは勿論のこと、その他にも、最近では、すべての生物がもっている熱ショックタンパク質(Heat shock protein : Hsp)を粘膜免疫することによってTregの産生を誘導できることや、その結果、関節炎や動脈硬化などの疾患の悪化を防ぐ抗炎症反応を誘導できることが報告されている(14-16)。元来、Hspは、細胞内でのタンパク質の構造形成にかかわる分子シャペロンとして知られてきた。Hspは自己がもつ因子でもあるがゆえに、これまでの定説に従うと、自己Hspに反応するT細胞は胸腺において選択排除されるはずである。しかし、一部の自己反応性T細胞は末梢に逃れて存在している。この矛盾は完全には解明されていないが、それを説明する作業仮説として、末梢組織においてHspによる刺激を受けて制御性T細胞として機能するためではないかという説がある(17)。

本研究では、この生体防御物質であるHspの免疫制御機能を牛乳によって向上させることを目的としている。乳を媒体として利用することでHspの機能を高めることを目指している。上述したように、微量のアレルゲンが母乳に含まれることで、母マウスから哺乳された仔マウスでは同種のアレルゲンに対する喘息が軽減するという報告に基づき(5)、微量成分の生体調節機能を有効に引き出す乳に潜在するアジュバント的な媒体としての可能性を探るものである。母乳は生後から離乳期まで、牛乳の摂取は離乳期以降においても消化管の粘膜免疫の発達に深くかかわっているが、このような時期を対象とした研究も少なく、その生理的現象の解明はあまり行なわれていない。哺乳期、離乳後や幼少期という生体の生理機構を成立させる極めて重要な時期を対象にHspによる粘膜機能の制御を解明するとともに、それに基づきアレルギーや糖尿病といった生活習慣病を軽減させることに本研究の成果を繋げることを目指している。

第1章 消化管内容物におけるHsp様抗原の解析

1. 序論

食物として経口的に摂取されたタンパク質は、胃においてペプシンで消化された後、小腸において膵酵素であるトリプシン、キモトリプシンやペプチダーゼなどで断片化、消化される。以前は、アミノ酸として吸収上皮細胞から取り込まれると考えられてきたが、最近では、オリゴペプチドをはじめ、サイズのより大きいペプチドやタンパク質としても吸収されることが明らかとなってきた。また、消化管内には、莫大な数の腸内細菌も棲息しており、これに由来する数多くの抗原も存在する。消化管に広がる粘膜免疫系はこのような広範な抗原の情報を的確に処理しなければならない。免疫細胞の一つに樹状細胞(Dendritic cells : DC)という細胞がある。DCは強力な抗原提示能をもつが、消化管の粘膜固有層に存在するDCのサブセットは、管腔内にその突起を伸ばし、消化管内の多様な抗原の情報を収集することが見出された(18)。そこで、Hspに免疫調節機能があるならば、Hspは管腔内においてタンパク質としての形態で存在するのが効果的であるかもしれない。また、Hspはすべての生物に共通して存在するために、食餌由来だけでなく腸内細菌

由来のHspも粘膜免疫に作用することは十二分に考えられる。第一章では、消化管内の内容物として、Hspがタンパク質性の抗原として存在し機能し得るかについて検討した。

2. 材料と方法

2.1. 試薬と実験動物

腸管内容物中のHsp様物質をウェスタンブロッティングで検出するために用いた抗Hsp60モノクローナル抗体(clone LK-2)は、StressGen社より購入した。一般試薬はNacalai Tesqueと和光純薬より購入した。

BALB/c、C3H/HeJ、C57BL/6系統の6週齢♀マウスは日本LSCより購入した。無菌マウスIQI/Jic 5～6週齢♀は、日本クレアより購入した。飼育には、ガンマ線滅菌されたCRF-1（日本チャールズリバー）を用いた。

2.2. 腸管内容物サンプルの調製

マウスを頸椎脱臼により屠殺し開腹した。腸管に付着する脂肪組織を剥がしながら、十二指腸の部分から肛門に至るまでの腸管を取り出した。摘出した腸管を小腸近位部、小腸遠位部、盲腸、大腸の4つの部位に分け、それぞれ1.5 mLのPBSで腸管内容物を洗い出した後、直ちに液体窒素で凍結し、使用時まで -80°C にて保存した。

2.3. タンパク質定量

保存サンプルを融解後、混在する消化酵素によるタンパク質の分解を防ぐために、EDTAとプロテアーゼ阻害剤カクテル（Nacalai Tesque）を添加した。試料を4,500 rpmで30分間遠心し、得られた上清を0.45 μm のフィルターろ過に供するため、12,000 rpm, 5分間の遠心を行った。

タンパク質の定量には、プロテインアッセイビシンコニン酸キット（Nacalai Tesque）を用いた。検量線用標準液としてはBSAを用いて、562 nmでの吸光度値からタンパク質量を算出した。

2.4. ウェスタンブロッティングによる解析

10%ポリアクリルアミドゲルを用いてLaemmliの方法に従って電気泳動を行なった。泳動後、ゲルをPVDF膜に、2.5 mA/cm^2 ゲル面積で20分間通電を行うことによりタンパク質をPVDF膜に転写した。1次抗体として抗Hsp60抗体(clone LK-2)を、2次抗体としてヤギ抗マウスIgG抗体-HRPを用いて、PVDF膜をペルオキシダーゼ染色し、抗Hsp60抗体と反応性を示す物質を検出した。

3. 結果と考察

3.1. マウス消化管内容物の抗Hsp60抗体との反応性

各系統のマウスから4部位の腸管内容物サンプルを調製し、各部位に含まれるタンパク質の定量を行なった (図1)。

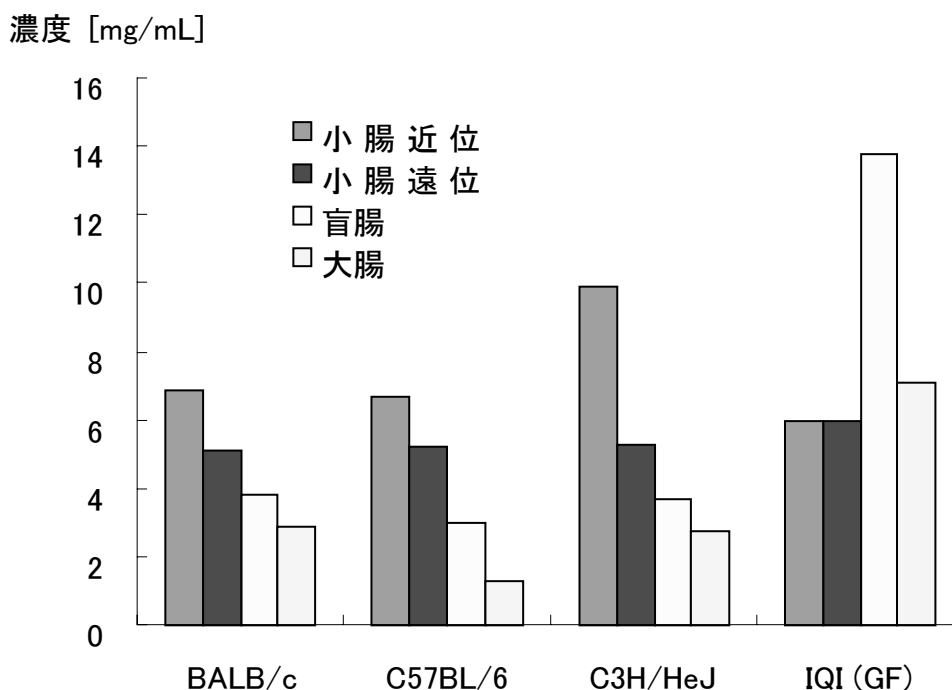


図1 各系統のマウスにおける腸管内容物のタンパク質定量

タンパク質濃度はプロテインアッセイビシンコニン酸法により定量し、2~3匹の個体から求めた平均値を示す。

通常飼育されている腸内細菌をもつマウスでは、小腸の近位部から大腸へと進むにつれて、タンパク質量が減少していた。これは、アッセイに使用した試薬の特性により、酵素で消化されるにつれてペプチド結合が短くなるために発色の程度が減少することに起因すると考えられる。また、無菌マウスIQIでは盲腸で高い値を示した。

2匹のBALB/cの腸管内容物サンプルをSDS-PAGE後、CBB染色およびウェスタンブロッティングに供した (図2, 3)。CBB染色でタンパク質の挙動を調べたところ、小腸では、サイズが30kDa前後あるいはそれ以下のタンパク質が共通して存在していた。抗Hsp60抗体を用いたウェスタンブロッティングによってHsp60反応性を調べると、どちらの個体でも反応性を示したが、個体によって反応性が見られる部位に差がみられた。

次に、BALB/c、C57BL/6、C3H/HeJの3系統間でHsp60反応性の比較を、同様にウェスタンブロッティングを用いて行った (図4)。小腸と大腸において、類似したパターンが観察された。また、通常飼育のBALB/cマウスと無菌マウスIQIとの間でHsp60反応性を比較したところ、BALB/cでは4つの部位でバンドが確認できたが、IQIではバンドが見られなかった (図5)。

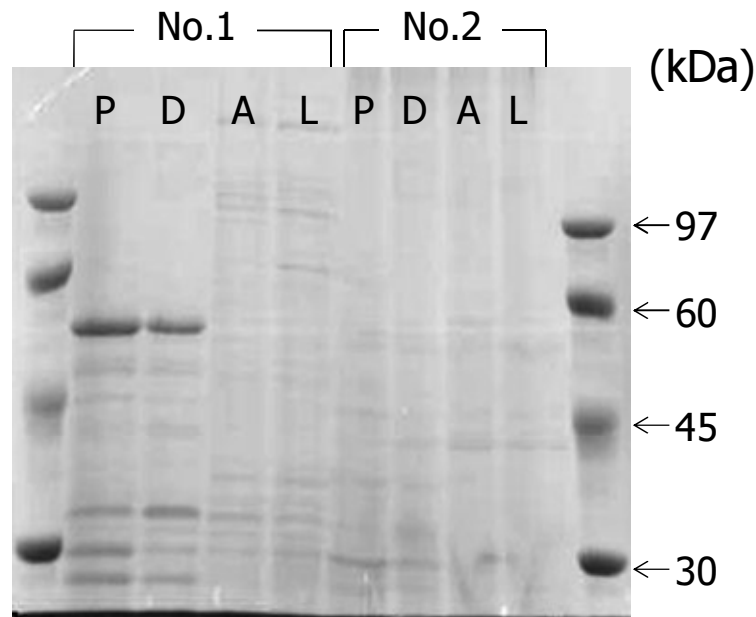


図2 BALB/cマウスの腸管内容物の電気泳動 (CBB染色)
 レーンに記すアルファベットは各部位の略称。P: Proximal small intestine (小腸近位部)、D: Distal small intestine (小腸遠位部)
 A: Appendix (盲腸)、L: Large intestine (大腸)

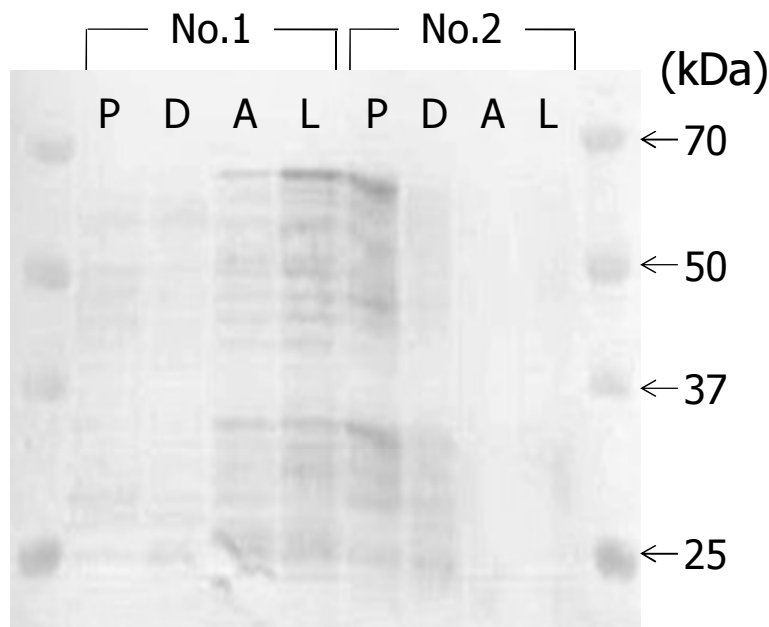


図3 BALB/cマウスの腸管内容物に対するWestern Blotting
 PVDF膜を抗Hsp60抗体(clone LK-2)を用いて染色した。レーン
 に記すアルファベットは図2と同様。

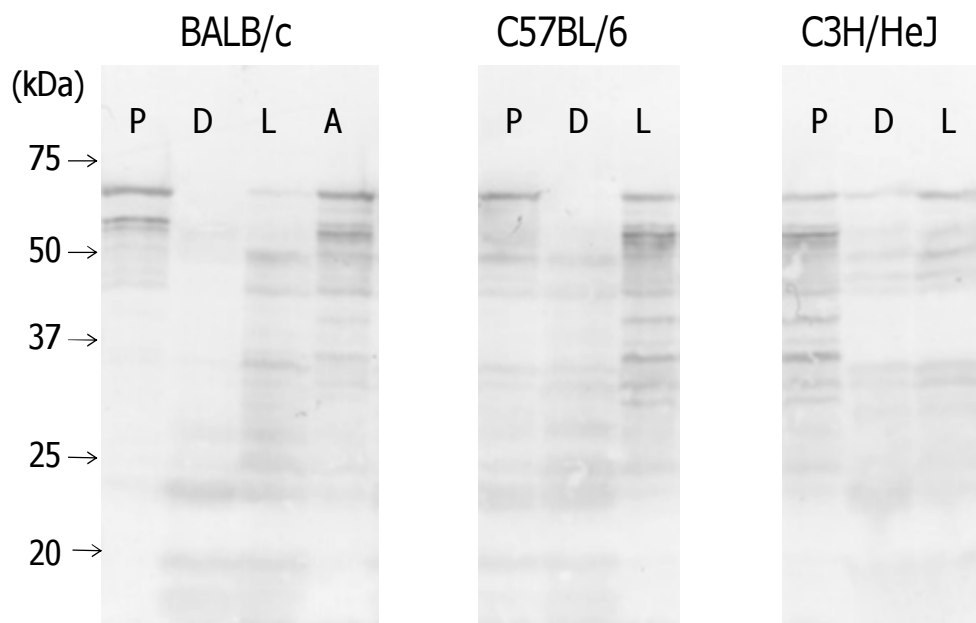


図4 マウス系統間におけるHsp60反応性の比較
 BALB/c、C57BL/6、C3H/HeJの腸管内容物サンプルを、抗Hsp60抗体を用いたWestern Blottingにより検出した。レーンに記すアルファベットは図2と同様。

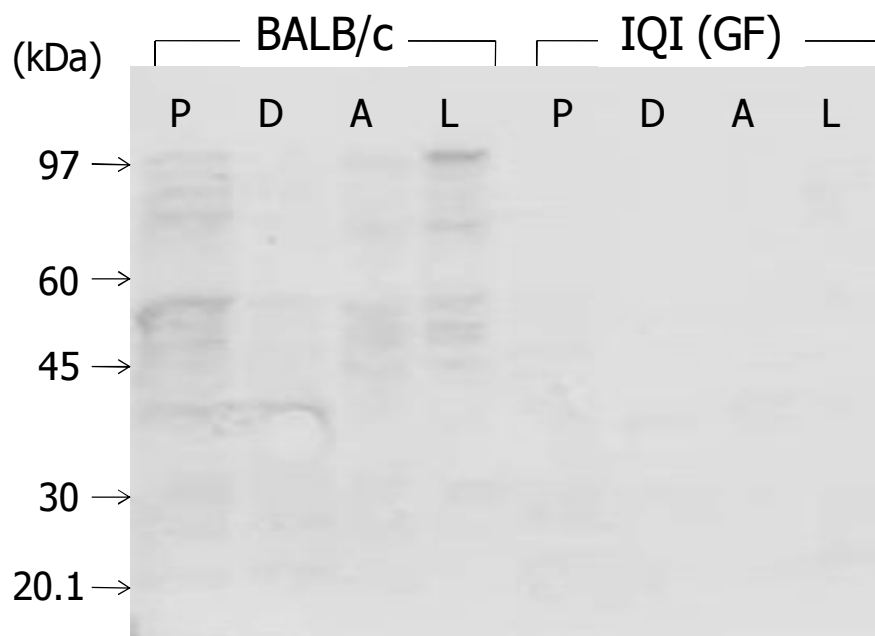


図5 通常マウス (BALB/c) と無菌マウス (IQI) とのHsp60反応性の比較
 BALB/c とIQIの腸管内容物サンプルを、抗Hsp60抗体を用いたWestern Blottingにより検出した。レーンに記すアルファベットは図2と同様。

消化管の下流になるにつれてタンパク質量と電気泳動におけるバンドのサイズが減少することから、大腸に至るまでにタンパク質が分解・吸収されている。また、無菌マウスの盲腸でタンパク質量が多かったのは、細菌が常在していない小腸でタンパク質が分解されずに蓄積しているためではないかと予想されるが、その詳細については検討できていない。

2個体のBALB/cの腸管内容物の結果から、CBB染色による内容物の泳動パターンについて個体差が見られるものの、抗Hsp60抗体を用いたウェスタンブロッティングではHsp60様の反応物がいずれの個体でも検出された。つまり、腸管内容物にHsp60そのものであるか、またはその断片が存在することを明らかにした。マウスの系統間でのHsp60様反応物を比較したところ、反応性を示すバンドは類似したパターンを示していたことから、マウスの系統によって腸管内容物中のHsp60様反応物の分解形態に差はないものと思われる。今回、Hsp60様物質の存在が示されたものの、実験に使用した個体数が少ないことを踏まえて、個体数を増やして解析する必要がある。

通常マウスでは腸内に細菌が定着しているが、無菌マウスでは腸管内が無菌状態に保たれている。これらのマウス間で比較することで、検出されたHsp60様物質がマウスに由来するのか、あるいは腸内細菌に由来するのかを検討した。図5に示したとおり、Hsp60様物質を示すバンドは通常マウスで検出されたが、無菌マウスでは検出されていない。両マウスに与えていた食餌ペレットについて同様のウェスタンブロッティングを行ったが、抗Hsp60抗体と反応する物質の存在は確認できなかった。これらのことから、今回検出した腸管内容物中のHsp60様物質は主に腸内細菌に由来することを明らかにした。

以上の結果から、マウスの腸管内容物には、Hsp60そのものであるか、またはその断片が存在すること、さらに、それらは主に腸内細菌に由来することを明らかにした。Hsp60は主に多量体を形成しているが、今回、検出されたHsp60の腸管内での存在形態についてまでは調べるに至っていない。しかし、この事実は、腸内細菌以外のほかのHspなどを経口投与することによって生体内の免疫恒常性を調節できる可能性を示唆しているであろう。

第2章 Hspに対する腸間膜リンパ節のリンパ球応答

1. 序論

消化管は多細胞動物にみられる最も原始的な器官である。単細胞から多細胞動物へと進化した結果、より多様な生活環境に適応できるようになるとともに、遺伝子を複製して子孫を作り出すための外界からの素材（栄養物）を効率的に取り込む構造、すなわち消化管が発達したと考えられる。消化管内は「内なる外」の環境にあるといわれており、食餌由来の雑多な外来性抗原や腸内細菌由来の抗原、また病原性微生物などに常に曝される。それ故、腸管内には、自己と非自己を識別し異物の侵入を防ぐために粘膜免疫という巧妙な防御機構が張り巡らされている(6,7)。粘膜免疫系は、異物の情報を処理する樹状細胞やマクロファージ、粘膜固有層や上皮細胞間に存在する多様なリンパ球（分泌型IgAを産生するB細胞や種々のT細胞サブセット）で構成されている(8-11)。粘膜免疫系を介した抗原の投与は、局所的に的確な抗原特異的応答を誘導するほかに、全身的にも抗原特異的な免疫応答を成立させることが特徴である。一方、逆に、粘膜免疫系に負荷された抗原に対してネガティブなシグナルを送ることによって全身性の免疫を不応答や寛容の状態にすることも可能である(19)。

消化管内に存在するさまざまな抗原の情報は抗原提示細胞によって末梢の腸間膜リンパ節に運

ばれる。その器官では、得られた抗原の情報に対処するために多様なリンパ球の応答が繰り広げられる。第二章では、消化管内のHsp様抗原の情報が腸間膜リンパ節においてどのように処理され、その後のリンパ球応答を引き起こすのかについて解析した。

2. 材料と方法

2.1. 実験動物

C57BL/6、ICR系統の6週齢♀マウスは日本LSCより購入した。飼育には、CRF-1（日本チャールズリバー）を用いた。

2.2. マウスHsp60のクローニングとタンパク質発現

マウスHsp60に相当する遺伝子をクローニングし、そのタンパク質を大腸菌にて発現させた。

BALB/cマウス由来の株化細胞RAW264.7を材料に、 1×10^8 個の細胞から、全mRNAをmRNA Purification kit (GE HealthCare)を用いて抽出し調製した。得られたmRNA 0.5 μ gを鋳型として、oligo-(dT)₁₂₋₁₈をプライマーにSuperScript III Reverse transcriptase (Invitrogen)を50°C, 60分反応させた。70°C, 15分間の熱処理によって逆転写酵素を失活させた後、RNase Hを37°C, 20分反応させ、ssDNAサンプルを調製した。

得られたssDNAを鋳型として、マウスHsp60のプレ配列を含む全長の遺伝子をforward primerとreverse primerを用いてPCRにて増幅した。PCR増幅産物を1%アガロースの電気泳動に供し、マーカーを指標にサイズが1.9 kbpの付近に存在するバンドを切り出し、Gel Extraction kit (QIAGEN)を用いて遺伝子産物を精製した。精製したPCR産物をpCR-Blunt II TOPO vector (Invitrogen)にクローニングし、薬剤カナマイシン耐性を示すコロニーを得た。SP6とT7 primersを用いてPCRを行い、mouse prehsp60 cDNAを含むコロニーを確認後、プラスミドを調製した。DNA配列を解析後、正確なmouse prehsp60配列をもつcDNAをもつプラスミドを得た。

大腸菌でのタンパク質発現には、プレ配列を除去する必要がある⁽²⁰⁾。そこで、プレ配列直後に位置する部位をコードするforward primerとC末端側にHis-tagを接続するためのreverse primerを用いて、上記で得られたmouse prehsp60 cDNAを鋳型に再度PCRを行なった。PCR産物をPCR Purification kit (QIAGEN)で精製後、制限酵素Bam HIとNde Iで消化した。酵素消化物を1%アガロースの電気泳動に供し、1.6 kbpのバンドを切り出し、Gel Extraction kit (QIAGEN)を用いて遺伝子産物を精製した。精製したPCR産物を、pET-22b(+)を同じ制限酵素Bam HIとNde Iで消化した発現ベクターとともにLigation-Convenience kit (日本ジーン)により室温で15分間反応させた。DH5 α のコンピテントセル(TOYOBO)を反応物で形質転換し、アンピシリン耐性を示すコロニーを得た。T7 forward primerとT7 reverse primerを用いてPCRを行い、mature-type hsp60 cDNAを含むコロニーを確認後、プラスミドを調製した。DNA配列を解析後、正確なmature-type hsp60配列をもつcDNAをもつプラスミドを得た。タンパク質発現のために、BL21(DE3) Starのコンピテントセル(Invitrogen)をプラスミドで形質転換し、アンピシリン耐性を示すコロニーを得た。

タンパク質Hsp60の発現は、対数増殖期にある形質転換されたBL21(DE3) Star株にIPTGを1 mMになるように添加し、菌体を37°Cで4時間培養した。遠心により菌体を回収し、使用まで-80°Cにて保存した。プロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma)、リゾチームとBenzonase (Merck)を含むBugBuster (Merck)を菌体ペレットに加え大腸菌を溶解させ、遠心後、可溶性タンパク質を含む上

清を回収した。抽出された上清をNi-NTA agaroseカラム(QIAGEN)に供し、カラムを洗浄後、カラムに結合したmature-type マウスHsp60を500 mMイミダゾールを含む緩衝液にて溶出した。280 nmにおける吸光度を示す溶出画分をCentricon-10YM (Amicon)を用いて遠心し、イミダゾールの脱塩とともに目的タンパク質を濃縮した。

2.3. 脾臓と腸間膜リンパ節からの細胞調製

マウスを頸椎脱臼により屠殺し開腹した。脾臓は、摘出した後、2枚のスライドガラスのすりの部分の間に挟んで磨り潰した。磨り潰した懸濁液を15mLのコニカルチューブに入れて、1500rpm, 5分間で遠心した。細胞ペレットを2mL ACK Lysing bufferに懸濁し溶血させ、RPMI 1640培地で希釈後、遠心した。得られた細胞をRPMI培地にて2回洗浄した。10% FBS/RPMI 1640培地にて懸濁し、脾細胞懸濁液とした。

腸間膜リンパ節(Mesenteric lymph nodes : MLN)は、摘出後、付着する脂肪組織を剥がし、はさみで細かくせん断した。0.5 mg/mLのコラゲナーゼ type I(和光純薬)とDNase I (Roche)を含む10mLの10% FBS/RPMI 1640に組織断片を加え、37°C, 40分間振とうインキュベートした。酵素消化後、40 μ mのセルストレーナーで消化物を濾し、残渣はシリンジにて押し潰した。セルストレーナー上の残渣をRPMI培地にて洗いこみ、消化物と洗液をともに遠心した。得られた細胞ペレットを2mL ACK Lysing bufferに懸濁し溶血させ、RPMI 1640培地で希釈後、遠心した。得られた細胞をRPMI培地にて2回洗浄した。10% FBS/RPMI 1640培地にて懸濁し、MLN細胞懸濁液とした。

2.4. Hsp60による脾細胞の増殖試験

96穴プレートの一穴あたり、 20×10^4 個の脾細胞を播種した。20 μ g/mLのマウスHsp60の存在下および非存在下にて5% CO₂, 37°C, 48時間培養した。生細胞数カウンティングキット (DOJINDO) CCK-8を用いて、生細胞数を計測した。

2.5. 腸間膜リンパ節のリンパ球に対するHsp60の刺激作用

96穴プレートの一穴あたり、腸間膜リンパ節から調製した細胞を 20×10^4 個播種した。5~20 μ g/mLのマウスHsp60の存在下および非存在下にて5% CO₂, 37°C, 4日間培養した。培養上清は48時間ごとに回収し、新しい培地と交換した。培養上清中に含まれたIFN- γ とIL-10のサイトカインをELISA (eBioscience)にて測定し、定量した。

6日間培養後のT細胞内における転写因子Foxp3の発現はFlow cytometryにより解析した。培養後の細胞を回収し、PBSで洗浄後、FITC標識の抗CD4モノクローナル抗体で細胞の表面抗原を染色した。その後、Fixation/Permeabilization試薬(eBioscience)で細胞を固定化・細胞膜の透過処理を行ない、APC標識の抗Foxp3モノクローナル抗体にて転写因子を細胞内染色した。測定はFACSCalibur (Becton Dickinson)を用いて行い、データの解析はFlowJo ver.3 (TriStar)を用いた。

3. 結果と考察

3.1. マウスHsp60のcDNAのクローニング

BALB/cマウス由来の株化細胞RAW264.7を材料に全mRNAを調製し、SuperScript III Reverse transcriptase (Invitrogen)によってssDNAサンプルを調製した。得られたssDNAを鋳型として、マウスHsp60のプレ配列を含む全長の遺伝子をPCRにて増幅し、正確なmouse prehsp60配列をもつcDNAをもつプラスミドを得た。その後、プレ配列を除去し、C末端側にHis-tagを接続するためのPCRを行ない、最終的に、正確なmature-type hsp60配列をもつcDNAをもつプラスミドを得た(図6)。

タンパク質発現はBL21(DE3) Starの菌体を用いた。プロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma)、リゾチームとBenzonaseを含むBugBusterを菌体ペレットに加え大腸菌を溶解させ、遠心後、可溶性タンパク質を含む上清を回収した。抽出された上清をNi-NTA agaroseカラムに供し、カラムを洗浄後、カラムに結合したmature-type マウスHsp60を500 mMイミダゾールを含む緩衝液にて溶出した。2Lの培養から、およそ30 mgの組換えmature-typeマウスHsp60を精製した。

gcc aaa gat gta aaa ttt ggt gcg gac gct cga gcc tta atg ctt caa ggt
gta gac ctt tta gca gat gct gta gct gtt aca atg ggg cca aag gga aga
act gtg att att gaa cag agt tgg gga agt ccc aaa gta aca aaa gat ggg
gtc act gtt gca aag tca att gat tta aag gat aaa tac aaa aat att gga
gct aaa ctt gtt cag gac gtt gcc aat aac aca aac gaa gag gct ggg gat
ggc acc acc act gcc act gtt ctg gca cga tct att gcc aag gag ggc ttt
gag aag atc agc aaa ggg gct aat cca gtg gaa atc cgg aga ggt gtg atg
ttg gct gtg gat gct gta att gct gaa ctt aag aaa cag tct aaa cct gtg
aca acc cct gaa gaa att gct cag gtt gct aca att tct gca aat gga gac
aaa gac att ggg aac atc att tct gat gca atg aaa aag gtt gga aga aag
ggt gtc atc aca gtg aag gat gga aaa acc ctg aat gat gag cta gaa att
att gaa ggc atg aag ttt gat aga gga tat att tcc ccg tat ttt att aac
aca tca aaa ggt caa aag tgt gaa ttc caa gat gcc tat gtc ttg ttg agt
gaa aag aaa att tcc agt gtt cag tcc att gtc cct gct ctt gaa att gct
aat gct cat cgg aag cca ttg gtc ata atc gcc gaa gac gtt gac gga gaa
gct cta agc acg ctg gtt ttg aac agg cta aaa gtt ggt ctt cag gtt gtg
gca gtc aaa gct cca gga ttt ggg gac aat agg aag aac cag ctt aaa gat
atg gct att gct act ggt ggt gca gtg ttt gga gaa gag ggg ttg aat cta
aat ctt gaa gat gtt caa gct cat gac tta gga aaa gtt ggg gag gtc att
gtc acc aaa gat gat gcc atg ctt ttg aaa gga aaa ggt gac aaa gct cac
att gaa aaa cgt att caa gaa atc act gag cag cta gac atc aca act agt
gaa tat gaa aaa gaa aag ctg aac gag cga ctt gct aaa ctt tca gat gga
gta gct gtg ttg aag gtt gga gga aca agt gat gtt gaa gtg aat gag aaa
aaa gac aga gtt act gat gct ctc aat gct aca aga gca gct gtt gaa gaa
ggc att gtt cta gga ggg ggc tgc gct ctg ctt cgg tgc atc cca gcc ttg
gat tca tta aag cct gct aat gaa gac cag aaa ata ggt ata gaa att att
aaa aga gca ctt aaa att cct gca atg acg att gct aag aat gca ggt gtt
gaa gga tct ttg ata gtt gag aaa att ctg cag agt tcc tca gaa gtt ggt
tat gac gcc atg ctt gga gat ttt gtg aac atg gtg gaa aaa ggg atc att
gat cca aca aag gtt gtg aga act gcc tta ctg gat gct gct ggg gtg gcc
tcc ttg cta act aca gcc gaa gct gta gtg aca gaa att cct aaa gaa gag
aag gac cct gga atg ggt gca atg ggt ggc atg gga ggg ggt atg gga ggc
ggc atg ttc taa

図6 クローニングしたmature-typeマウスHsp60のcDNA配列

3.2. マウスHsp60による脾細胞の増殖作用

免疫系は非自己である異物に対して誘導される。言い換えれば、自己の成分は自らの免疫系に無視されなければ生体恒常性が破綻することになるであろう。この定説に従えば、元来、マウスの免疫細胞には自己成分の一つであるHsp60には応答しないと予想される。Hspファミリーに属するタンパク質は構造的に相同性が非常に高いが、異物となる外来生物においてもハウスキーピングなタンパク質として存在する。たとえば、細菌が感染して、細菌由来の物質に免疫系が応答すると、細菌がもつHspに対しても免疫が誘導される。しかし、高い相同性のために、誘導された免疫系は自己のHspに対しても反応する可能性が生じる。これが自己免疫疾患や炎症性疾患の引き金になるというのである。

そこで炎症性の疾患を発症していない通常マウスにおいて自己のHspと反応するリンパ球が存在しないのか否かについて、リンパ球増殖試験を用いて検討した。20 x 10⁴個の脾細胞に対して、20 µg/mLのマウスHsp60、大腸菌GroELの存在下およびHspの非存在下にて37°C、48時間培養した。その後、生細胞数カウンティングキットを用いて、生細胞数を計測した (図7)。その結果、自身のHsp60に反応する自己応答性のリンパ球の存在が示唆された。

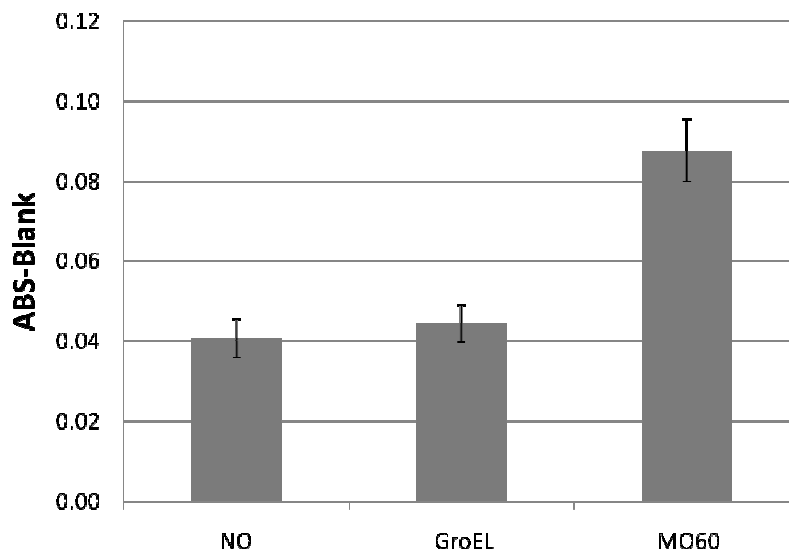


図7 ICRマウスの脾細胞に対するHsp60とGroELの増殖効果
20 µg/mLのマウスHsp60、大腸菌GroELの存在下および非存在下にて48時間培養し、生細胞数カウンティングキットを用いて、生細胞数を定量した。

3.3. 腸間膜リンパ節のリンパ球に対するマウスHsp60の刺激効果

このHsp60により刺激される自己応答性リンパ球の特性を検討するために、消化管内の情報が集積する末梢リンパ組織の腸間膜リンパ節(MLN)に注目し、MLNの細胞に対するHspの作用を検討した (図8)。

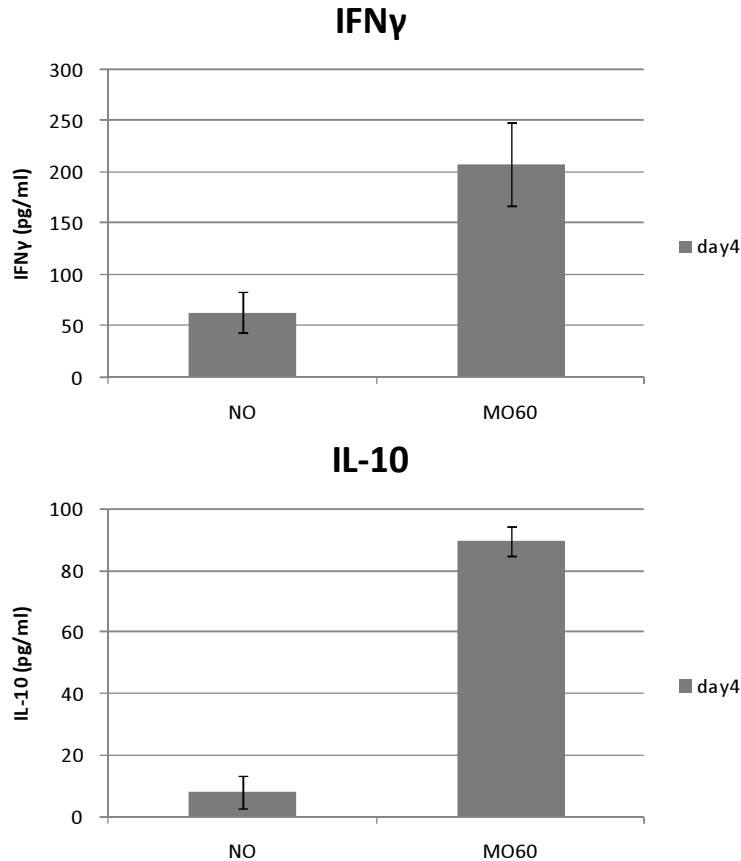


図8 Hsp60によるMLN細胞からのサイトカイン産生

20 $\mu\text{g/mL}$ のマウスHsp60の存在下および非存在下にて96時間培養し、培養上清中のサイトカイン量を定量した。

腸間膜リンパ節から調製した細胞 20×10^4 個を、20 $\mu\text{g/mL}$ のマウスHsp60の存在下および非存在下にて37°C、4日間培養し、培養上清に産生されたサイトカインを測定した。その結果、Hsp60の存在下において、サイトカインIFN γ およびIL-10の産生量が有意に増加した。

マウスHsp60存在下における4日間培養後の培養上清中にサイトカインIL-10の産生が有意に認められたことから、MLN細胞のポピュレーション中にTregの割合が増加した可能性が示唆される。そこで、6日間培養後のT細胞内における転写因子Foxp3の発現をFlow cytometryにより解析した。その結果、Hsp60非存在下ではCD4陽性のリンパ球に占めるFoxp3+の細胞の割合が11.3%であったのに対して、Hsp60存在下においてはその割合が19.5%に増加していることが判明した (図9)。

以上の結果から、マウスの生体内には、自己の成分であるHsp60に対するリンパ球が存在すること、この自己応答性Tリンパ球はHsp60抗原刺激によってサイトカインIFN γ やIL-10を産生すること、ならびに、CD4陽性のTリンパ球に占めるFoxp3+の細胞の割合が増加することを明らかにした。本来は、自己応答性T細胞は、その分化過程において、胸腺内においてアポトーシスを介

して個体から排除されるはずである。しかし、Hsp60に反応性を示す自己応答性T細胞は末梢組織において生存し、IL-10などの抗炎症性サイトカインの産生を通して、粘膜免疫系を制御し得るTregなどの機能調節にかかわっている可能性が見出された。

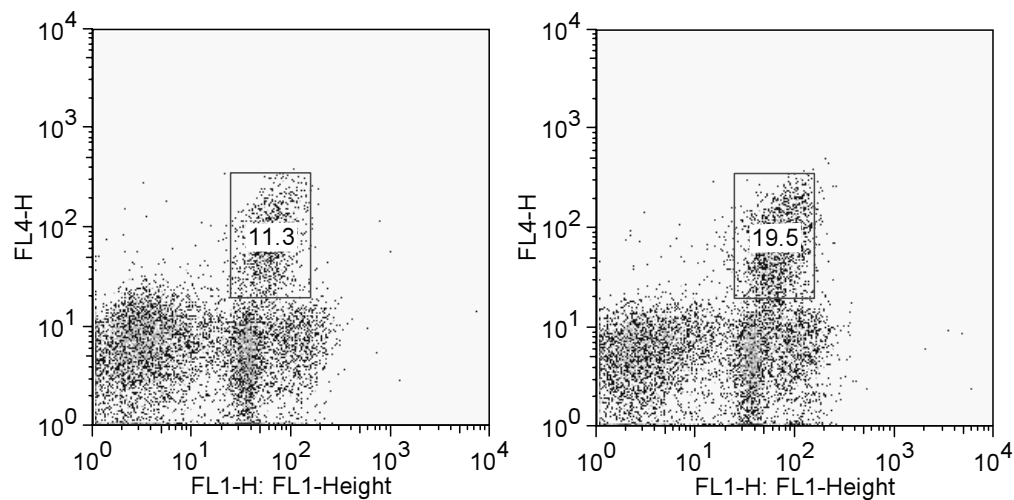


図9 Hsp60存在下の培養におけるCD4+ Foxp3+細胞の増加

20 μg/mLのマウスHsp60の存在下(右)および非存在下(左)にて96時間培養し、リンパ球内の転写因子Foxp3発現の増加を細胞内染色により解析した。横軸：CD4-FITC、縦軸：Foxp3-APC

第3章 Hspの経口投与によるリンパ球応答制御に対する乳のアジュバント効果

1. 序論

牛乳はヒトにおいても乳幼児の成長・発育や生体機能の調節には欠かすことのできない食品の一つであることは言うまでもないが、乳幼児に対して牛乳の成分がアレルギーを引き起こすことも知られている。近年、低アレルギーを目指した乳製品の開発も実現化しており、その基盤となるアレルギーの発症にかかるメカニズムの解析も盛んに行なわれてきているが、完全に解明されたわけではない。最近、アレルギーに暴露した母マウスから哺乳された仔マウスでは同種のアレルギーに対する喘息が軽減するという報告がある(5)。その機序としては、アレルギーが乳中に移行し哺乳マウスに免疫寛容を誘導することが推論されている。乳中に存在するアレルギーの量が微量であることを考慮すると、何らかのメカニズムによって乳が生体防御機能を高めている可能性が示唆される。つまり、乳は微量成分の生体調節機能を有効に引き出すアジュバント的な媒体として作用し得るという可能性である。

母乳は生後から離乳期まで、牛乳の摂取は離乳期以降においても消化管の粘膜免疫の発達に深くかかわっている。無論、乳にはタンパク質が含まれており、通常では、この高分子化合物も抗原性を示す。しかし同時に、乳の成分として含まれている、抑制的にはたらくTGFβなどのサイトカインが幼少期の免疫寛容の成立に重要であるという報告はあるが、離乳期から幼少期という時期を対象とした研究は少なく、粘膜免疫系の形成についての解明はあまり行なわれていない。前章では、腸間膜リンパ節の細胞に対して、Hsp抗原がサイトカインIL-10の産生を促すことやTreg

を誘導することを報告した。そこで、本章では、哺乳期、離乳後や幼少期という生体の生理機構を成立させる極めて重要な時期を対象に、乳を担体として、このようなHspの免疫調節機能を高めることが可能か否かについて考察した。

2. 材料と方法

2.1. 実験動物

C57BL/6の3週齢♀マウスを日本LSCより購入した。飼育には、日本チャールズリバーから購入したCRF-1と0.22 μ mフィルターろ過したミリQ水を用いた。

2.2. 経口投与プロトコール

C57BL/6の3週齢♀マウスを4群に分けて飼育した。I群はPBSを、II群はPBSを媒体としてマウスHsp60を、III群は牛乳を、IV群は牛乳を媒体としてマウスHsp60を、それぞれ経口ゾンデ(0.9 ϕ x 38mm長)を用いて投与した。200 μ gのHsp60を200 μ lの容量で、マウスが3週齢になった翌日(day 1)から2日ごとに5回投与を行なった。5回目の経口投与(day 9)の3日後(day 12)に、Freund Incomplete Adjuvant (ICF)とともにエマルジョンにした100 μ gのHsp60を腹腔内に免疫した。10日後(day 22)に、マウスを頸椎脱臼により屠殺し、腸間膜リンパ節(Mesenteric lymph nodes : MLN)を摘出して実験に用いた (図10)。

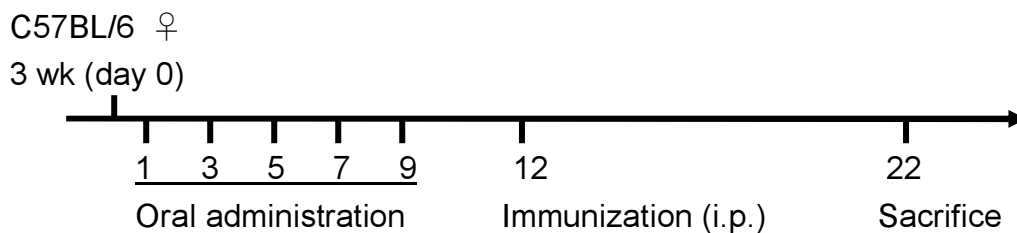


図10 マウスHsp60の経口投与スケジュール

2.3. 腸間膜リンパ節からの細胞調製

マウスを頸椎脱臼により屠殺し開腹した。腸間膜リンパ節(Mesenteric lymph nodes : MLN)は、摘出後、付着する脂肪組織を剥がし、はさみで細かくせん断した。0.5 mg/mLのコラゲナーゼ type I (和光純薬) とDNase I (Roche)を含む10mLの10% FBS/RPMI 1640に組織断片を加え、37 $^{\circ}$ C, 40分間振とうインキュベートした。酵素消化後、40 μ mのセルストレーナーで消化物を濾し、残渣はシリンジにて押し潰した。セルストレーナー上の残渣をRPMI培地にて洗いこみ、消化物と洗液とともに遠心した。得られた細胞ペレットを2mL ACK Lysing bufferに懸濁し溶血させ、RPMI 1640培地で希釈後、遠心した。得られた細胞をRPMI培地にて2回洗浄した。10% FBS/RPMI 1640培地にて懸濁し、MLN細胞懸濁液とした。

2.4. 腸間膜リンパ節のリンパ球に対するHsp60の刺激作用

96穴プレートの一穴あたり、腸間膜リンパ節から調製した細胞を 20×10^4 個播種した。5~20 μ g/mLのマウスHsp60の存在下および非存在下にて5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C, 4日間培養した。培養上清は48時

間ごとに回収し、新しい培地と交換した。培養上清に含まれ、分泌されたIFN- γ とIL-10のサイトカインをELISA (eBioscience)にて測定し、定量した。

6日間培養後のT細胞内における転写因子Foxp3の発現はFlow cytometryにより解析した。培養後の細胞を回収し、PBSで洗浄後、FITC標識の抗CD4モノクローナル抗体で細胞の表面抗原を染色した。その後、Fixation/Permeabilization試薬(eBioscience)で細胞を固定化・細胞膜の透過処理を行ない、APC標識の抗Foxp3モノクローナル抗体にて転写因子を細胞内染色した。測定はFACSCalibur (Becton Dickinson)を用いて行い、データの解析はFlowJo ver.3 (TriStar)を用いた。

3. 結果と考察

3.1. 腸間膜リンパ節のリンパ球に対するマウスHsp60投与の影響

腸間膜リンパ節から調製した細胞 20×10^4 個を、 $20 \mu\text{g/mL}$ のマウスHsp60の存在下および非存在下にて 37°C 、4日間培養し、培養上清に産生されたサイトカインを測定した。その結果、腸間膜リンパ節の細胞群に対してHsp60抗原はサイトカインIFN- γ を産生させた。3~5週齢にかけてHsp60を経口投与すると、Hsp60存在下におけるIFN- γ 産生量が低下したことから、今回のプロトコールによって免疫寛容が誘導される傾向が示された。しかし、同様な傾向は、Hsp60を含まない牛乳だけを投与した群においても観察された。Hsp60を牛乳とともに与えた群においては、意外なことに、同抗原の非存在下において腸間膜リンパ節の細胞を培養してもIFN- γ の産生が増加した。同抗原存在下で培養してもIFN- γ の産生量には変化が見られなかった (図11)。

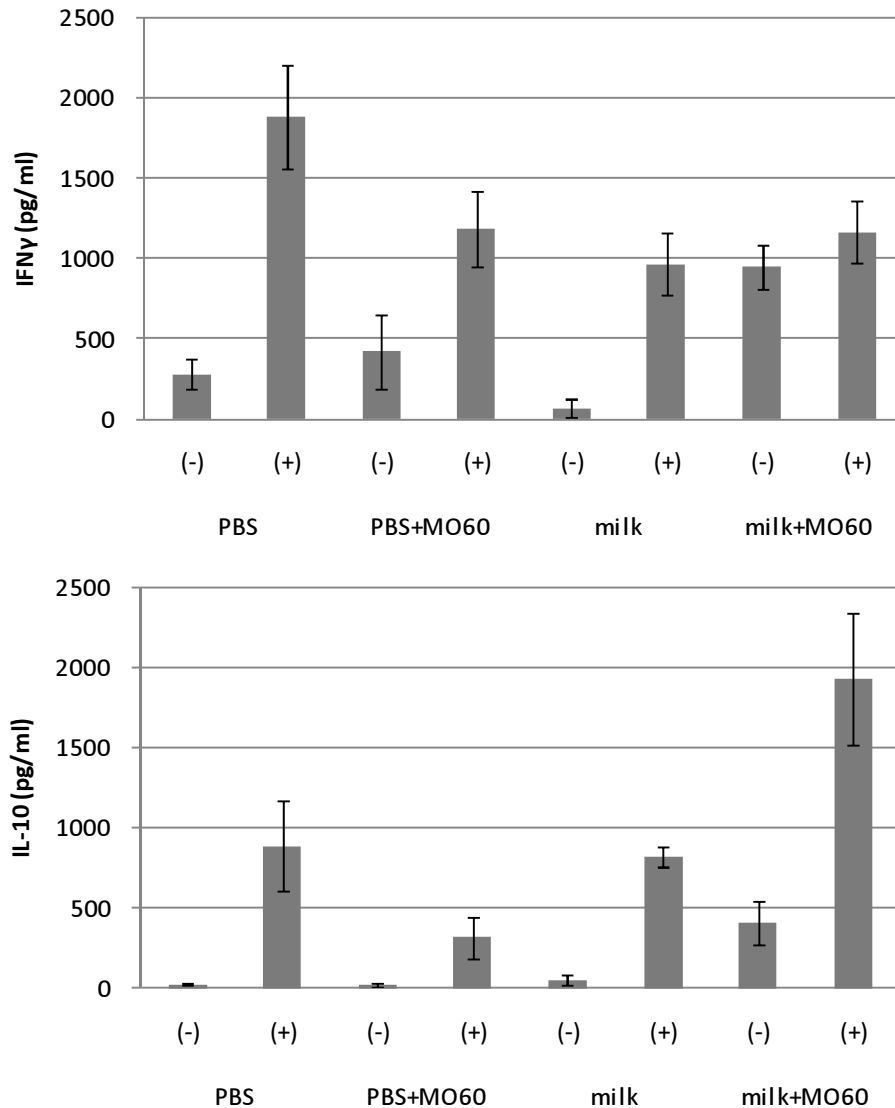


図11 マウスHsp60経口投与によるサイトカイン産生の誘導

20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のマウスHsp60の存在下(+)および非存在下(-)にてMLN細胞を96時間培養し、培養上清中のIFN- γ (上)とIL-10 (下)をELISAにて測定した。

MO60 : マウスHsp60

一方、Hsp60抗原は、IFN- γ の場合と同様に、腸間膜リンパ節の細胞群に対してサイトカインIL-10を産生させた。しかし、PBSを媒体としてHsp60を経口投与すると、Hsp60存在下においてIL-10産生量が低下した。牛乳を媒体とした場合、牛乳のみの投与ならばIL-10の産生はPBSを媒体とした場合と変化はなかったが、Hsp60を牛乳とともに投与した場合、Hsp60存在下における培養上清中のサイトカインIL-10産生量が有意に上昇した。しかし、培養6日後では、IFN- γ とIL-10の産生量が低下し、6日間培養後のT細胞内における転写因子Foxp3の発現をFlow cytometryで解析したが、その時点でのCD4⁺、Foxp3⁺の細胞の割合はIV群において低値であった(data not shown)。

以上の結果から、マウスにHsp60を牛乳とともに経口投与することによって制御性サイトカインと言われるIL-10の産生が増強されることを明らかにした。また、逆に、抗原の刺激なしに自発的なIFN- γ の産生も引き起こされる可能性も示されたが、このようなサイトカインの変動の意味

は今後詳細に検討する必要がある。しかし、当初予想したように、牛乳が何らかのメカニズムによって生体防御機能を高めている可能性は示唆された。つまり、乳は微量な成分、今回の場合はHsp60という生体機能調節物質が対象であったが、その作用を有効に引き出すアジュバント的な媒体として作用し得ることが示されたのである。母乳は生後から離乳期まで、牛乳の摂取は離乳期以降においても消化管の粘膜免疫の発達に深くかかわっていることを鑑みると、離乳期から幼少期という時期を対象とした粘膜免疫系の形成に対する牛乳の作用について解明することは非常に意義深いと思われる。

結 語

哺乳類にとっての乳というものは、「食べられることを目的に生み出された食物である」と言われる。乳は、糖質、脂質やタンパク質の栄養素に富むことから、哺乳類の生後から離乳期までの成長を支えている。牛乳は、哺乳類の一種であるウシの産物であるが、非常に栄養価に優れた食品となっている。一般的に、乳を構成する成分は哺乳類の種ごとに違いが見られ、このような相違はそれぞれの哺乳類の生態や生理的環境を反映したものと考えられる。乳を生合成する乳腺という生体組織は自然免疫系である分泌腺が進化したものであると考察する研究者がいる(21)。このように考えると、乳は、我々が食するもののなかでは最も自然な形態である食ということになり、それ故、本来の乳にはこれまで解明されてきた主要な栄養成分以外にも必要不可欠な成分が含まれている可能性はあるであろうし、機能性成分を効果的に生体に送り込む物性や特性が賦与されていると考えても不思議でない。

本研究では、微量のアレルゲンが乳汁中に混在することによって粘膜免疫系を介して免疫寛容を哺乳期に獲得させたという報告を基に(5)、乳は粘膜免疫系に対する微量成分の生体調節機能を有効に引き出すアジュバント的な媒体として作用する可能性があるという仮説を立て、それを立証する実験を試みた結果、以下の成果を得た。

第一章では、Hspはすべての生物に共通して存在するがゆえに、食餌や腸内細菌由来のHspが粘膜免疫に作用することが考えられる。まず、消化管内での内容物として、Hspがタンパク質性抗原として存在し、機能し得るかについて検討した。その結果、マウスの腸管内容物には、Hsp60そのものであるか、またはその断片が存在することを明らかにした。また、検出された腸管内容物中のHsp60様反応物は腸内細菌に由来することを示唆した。

第二章では、消化管内のHsp様抗原の情報が腸間膜リンパ節においてどのように処理され、その後のリンパ球応答を引き起こすのかについて解析した。その結果、マウスの生体内には、自己成分であるHsp60に対するリンパ球が存在すること、この自己応答性のTリンパ球はHsp60抗原刺激によってサイトカインIFN γ やIL-10を産生することを見出した。また、腸間膜リンパ節の細胞をHsp60抗原の存在下にて刺激すると、CD4陽性のTリンパ球に占めるFoxp3+の細胞の割合が増加することを明らかにした。この結果は、Hsp60に反応性を示す自己応答性T細胞は末梢組織において生存し、IL-10などの抗炎症性サイトカインの産生を通して、粘膜免疫系を制御し得るTregなどの機能調節にかかわる可能性を示唆した。

第三章では、離乳後の幼少期という生体の生理機構を形成させる重要な時期に、乳を担体として、Hspを経口投与することによってその免疫調節機能を高めることが可能か否かについて調べた。その結果、マウスにHsp60を牛乳とともに経口投与することによって制御性サイトカインと

言われるIL-10の産生が増強されることを明らかにした。牛乳は何らかのメカニズムによってHspの生体防御機能を高める可能性を見出し、アジュバント的な媒体として作用し得ることを示唆した。

以上のように、マウスにHsp60を牛乳とともに経口投与することによって制御性サイトカインと言われるIL-10の産生が増強されることを明らかにしたが、逆に、抗原の刺激なしに自発的なIFN- γ の産生が引き起こされる可能性も示された。このようなサイトカインの変動の意味は今後詳細に検討する必要がある。しかし、当初予想したように、牛乳が何らかのメカニズムによって生体防御機能を高めている可能性は示唆された。つまり、乳は微量な生体機能調節物質の作用を有効に引き出すアジュバント的な媒体として作用し得ることを明らかにしたのである。母乳は生後から離乳期まで、牛乳の摂取は離乳期以降においても消化管の粘膜免疫の発達に深くかかわっていることを鑑みると、離乳期から幼少期という時期を対象とした粘膜免疫系の形成に対する牛乳の作用について解明することは非常に意義深い。本研究では、使用したマウスの系統は単一ではなく、実験に使用した匹数も限られているなかでの結果であったので、今回のデータを踏まえて統計処理が可能なレベルにおける検証が必要である。

Hspは、すべての生物に遍く存在し、タンパク質レベルにおいてもそれぞれの生物間で相同性が高い特徴をもつ。そのため、全身性免疫の誘導能が高く、外来性Hspに対して免疫が惹起されると相同的な抗原性がゆえに自己のHspにも反応してしまい、最終的には自己免疫疾患の原因物質であろうと考えられてきた。最初に、Hsp60がアジュバント関節炎の病態を引き起こすのではなく、免疫手法によっては病態を緩和させる方向に作用する可能性が示されたのは1988年であった(22)。その後、Hsp60の24残基から成る部分ペプチドp277を投与すると自己免疫疾患であるI型糖尿病の予防に効果があるというデータも1990年代から蓄積されてきており、欧米では臨床的な応用も検討されている(23)。2002年に、Hsp65を粘膜免疫するとLDLR-KOマウスにおけるアテローム性動脈硬化を軽減できることが報告され(15)、2007年には、Hsp60を経口免疫することで同等の効果が現れることが報告された(16)。このように、Hspは、その免疫手法にも依るが、免疫制御へのはたらきが注目されている物質である。

粘膜免疫系に寛容を誘導して、アレルギーや自己免疫疾患の発症や悪化を防ぐことは有望である。しかし、疾患の発症にかかわる抗原そのものを免疫し寛容を誘導することは、一つ間違うと抗原によって疾患を悪化させてしまう危険性を孕んでいる。また、食物アレルギーはアレルギーマーチと呼ばれるように数種類のアレルゲンが交差性を示す場合が多く対処療法は難しい。本研究は、本来、内因性物質であるものを抗原として利用して、本来の抗原とは異なる様式でその免疫抑制能を生活習慣病の予防に応用することにも繋がり得るため、安全な療法を提供する契機となり得るのではないだろうか。また、乳が、ある機能成分に対する効果的な媒体としての作用するのであれば、うま味料理やメニューに取り入れることが可能となり、食べ方に応じて乳幼児から成人、老人に至るまで牛乳を広く普及させることができるであろう。

参考文献

- 1) Schlimme E. & Meisel H. (1995) Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung/Food* **39**, 1-20.
- 2) Ogra S.S. & Ogra P.L. (1978) Immunological aspects of human colostrum and milk. II. Characteristics of lymphocyte reactivity and distribution of E-rosette forming cells at different times after the onset of lactation. *J. Pediatr.* **92**, 550-555.
- 3) Pitt J. (1979) The milk mononuclear phagocyte. *Pediatrics* **64** (Suppl.), 745-749.
- 4) Bhaskaram P. & Reddy V. (1981) Bactericidal activity of human milk leukocytes. *Acta. Paediatr. Scand.* **70**, 87-90.
- 5) Verhasselt V., Milcent V., Cazareth J., Kanda A., Fleury S., Dombrowicz D., Glaichenhaus N. & Julia V. (2008) Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nat. Med.* **14**, 170-175.
- 6) 清野宏, 石川博通, 名倉宏:「粘膜免疫 ～腸は免疫の司令塔～」 (中山出版, 2001).
- 7) Mowat A.M. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 331-341.
- 8) Steinman R.M., Hawiger D. & Nussenzweig M.C. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685-711.
- 9) Groux H., Fournier N. & Cottrez F. (2004) Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin. Immunol.* **16**, 99-106.
- 10) Mantovani A., Sica A. & Locati M. (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* **23**, 344-346.
- 11) Kelsall B. & Rescigno M. (2004) Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation. *Nat. Immunol.* **5**, 1091-1095.
- 12) Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T. & Ono M. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* **133**, 775-787.
- 13) Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L. & Kuchroo V.K. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238.
- 14) Moudgil K.D. & Durai M. (2008) Regulation of autoimmune arthritis by self-heat shock proteins. *Trends Immunol.* **29**, 412-418.
- 15) Maron R., Sukhova G., Faria A.-M., Hoffmann E., Mach F., Libby P. & Weiner H.L. (2002) Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein

- receptor-deficient mice. *Circulation* **106**, 1708-1715.
- 16) van Puijvelde G.H.M., van Es T., van Wanrooij E.J.A., Habets K.L.L., de Vos P., van der Zee R., van Eden W., van Berkel Th.J.C. & Kuiper, J. (2007) Induction of oral tolerance to Hsp60 or an HSP60-peptide activates T cell regulation and reduces atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2677-2683.
 - 17) van Eden W., van der Zee R. & Prakken B. (2005) Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 318-330.
 - 18) Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., Francolini M., Rotta G., Bonasio R., Granucci F., Kraehenbuhl J.P. & Ricciardi-Castagnoli P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2**, 361-367.
 - 19) Yuki Y. & Kiyono H. (2003) New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* **13**, 293-310.
 - 20) Peralta D., Hartman D.J., McIntosh A.M., Hoogenraad N.J. & Høj P.B. (1990) cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver prehs60 (chaperonin-60). *Nucl. Acids Res.* **18**, 7162.
 - 21) Vorbach C., Capecchi M.R. & Penninger J.M. (2006) Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *Bioessays* **28**, 606-616.
 - 22) van Eden W., Thole J.E., van der Zee R., Noordzij A., van Embden J.D., Hensen E.J. & Cohen I.R. (1988) Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* **331**, 171-173.
 - 23) Raz I., Eldor R. & Naparstek Y. (2005) Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. *Trends Biotechnol.* **23**, 128-134.

謝 辞

本研究は、平成21年度牛乳栄養学術研究「アジュバント的媒体としての乳機能の探索と開発」の委託事業として行なわれた。本委託に際しましては、(社)日本酪農乳業協会に厚く御礼申し上げます。