

# 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食品生物科学専攻食環境学分野：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った。

前年度の研究成果において、マウスHsp60を牛乳とともに経口投与すると、腸間膜リンパ節の細胞から産生される制御性サイトカインIL-10が増加する可能性を見出した。しかし、実験に使用した個体のなかにはIL-10産生量に変化が見られなかったマウスも存在したため、再現性の検討を行った。第一章では、前年度と同様の実験条件下において腸間膜リンパ節におけるCD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、Foxp3<sup>+</sup>のリンパ球の増減をフローサイトメーターにより調べた。その結果、意外にも、マウス由来のHsp60を牛乳とともに経口投与したマウスの腸間膜リンパ節でのCD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、Foxp3<sup>+</sup>を示すTregの頻度が極めて減少することを明らかにした。媒体としてPBSを用いた場合ではTregの頻度が変化しなかったことから、牛乳がマウスHsp60の生理機能発現を助長したため、牛乳のアジュバント効果が明瞭に示された。しかし、当初期待した制御性T細胞群の誘導増加は観察されなかった。マウスHsp60に特異的な効果であったのか、一般的にHspという総称で一群のタンパク質の生理活性を扱うこと自体に間違いがあったのかについての検討課題が残った。

第二章では、上記の課題を明らかにする一環として、ナイーブT細胞の分化に及ぼすHspの影響について解析した。In vitro differentiation assayを構築し、腸間膜リンパ節の細胞群から、磁気ビーズ細胞分離(MACS)法によりCD4<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>のナイーブT細胞と抗原提示細胞(APC)を分離し、調製した両細胞群をHsp抗原存在下で共培養した。CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、Foxp3<sup>+</sup>の指標をもつTregの増減をフローサイトメーターにより調べたところ、マウスHsp60存在下においてTregへの分化誘導は抑制された。このことから、自己由来のマウスHsp60はTregの分化誘導ではなく抑制にはたらき、その作用は特異的であることが示された。

第三章では、離乳後の時期に種々の外来抗原に対して寛容を獲得するために、鍵となる制御性の抗原提示細胞が粘膜固有層内において変動するかについて検討した。その結果、マウス3週齢の

離乳直後に、粘膜固有層におけるCD11c<sup>+</sup> PDCA-1<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>の樹状細胞が増加することを見出した。

平成21年度および平成22年度の本事業により、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ことが示され、アジュバント的な媒体としての作用をもつことが証明された。しかし、今回は、自己応答性リンパ球を刺激することで免疫制御能を高めることを目指したが、予想とは逆に、自己由来のHsp60抗原は抑制的にはたらくことがわかった。抗原間の高い相同性を考慮すると、微生物由来の抗原が期待する効果を発揮する可能性があると思われる。

## 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<sup>1)</sup>。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えるならば、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<sup>2-4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>6,7)</sup>。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<sup>8-11)</sup>。

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<sup>12,13)</sup>。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<sup>14-16)</sup>。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<sup>17)</sup>。

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<sup>5)</sup>、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 腸間膜リンパ節の制御性T細胞の変動に与えるHsp60経口投与の影響

### 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<sup>9)</sup>。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TGF $\beta$ 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。前年度の研究成果において、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。また、マウスHsp60を牛乳とともに経口投与すると、腸間膜リンパ節の細胞から産生される制御性サイトカインIL-10が増加する可能性を見出した。しかし、実験に使用した個体のなかにはIL-10産生量に変化が見られなかったマウスも存在したため、再現性の検討を行うとともに、腸間膜リンパ節におけるCD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、Foxp3<sup>+</sup>のTregの増減をフローサイトメーターにより解析した。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 実験動物

C57BL/6の3週齢♀マウスを購入した。飼育には、購入したCRF-1と0.22 $\mu$ 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 $\phi$  x 38mm長)を用いて投与した。200 $\mu$ gのHsp60を200 $\mu$ 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 $\mu$ 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1)。

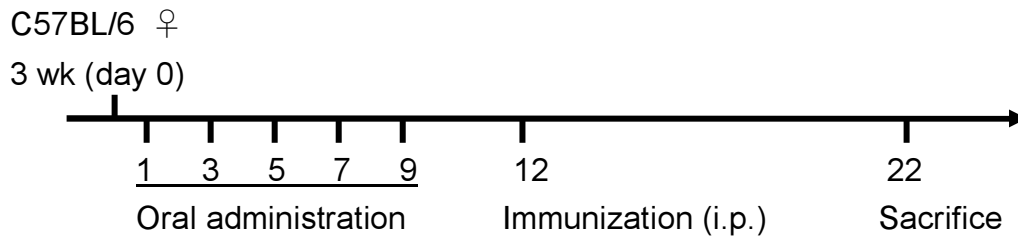


図1 マウスHsp60の経口投与スケジュール

### 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とDNase I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ターした。酵素消化後、40 $\mu$ 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。

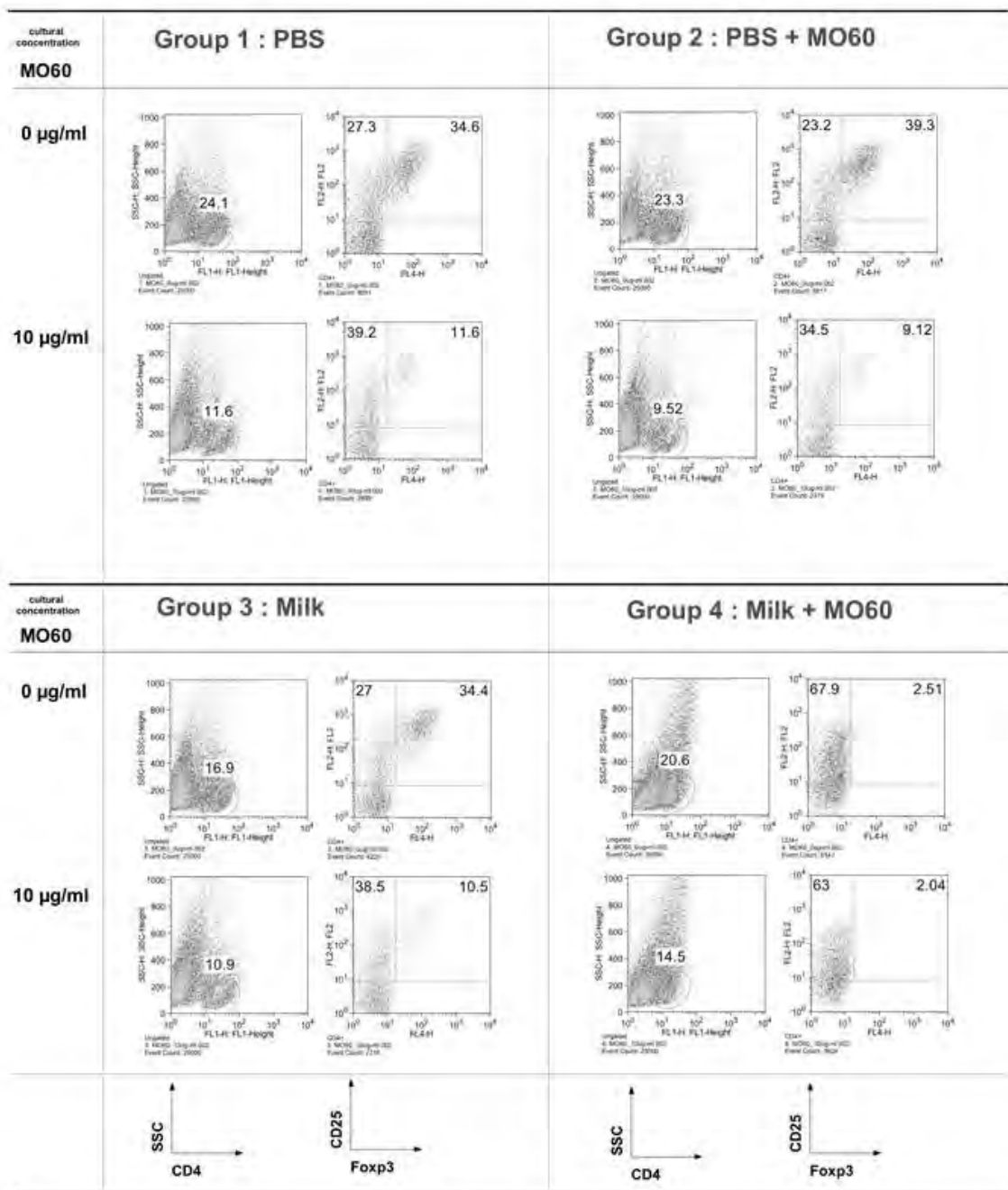
### 2.4. 腸間膜リンパ節に存在するTregの解析

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を用いて行い、データの解析はFlowJo ver. 3を用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1. 腸間膜リンパ節のTreg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 $20 \times 10^4$ 個を、10  $\mu$ g/mLのマウスHsp60の存在下および非存在下にて37°C、6日間培養し、転写因子Foxp3を発現している細胞群の頻度をフローサイトメーターにより解析した。その結果、PBSとともにマウスHsp60抗原を経口投与した群におけるTregの頻度は、Hsp非投与群と変わらなかった。また、牛乳の媒体のみを経口投与した場合においても、Hsp60の抗原存在下、非存在下のいずれの場合においてもTregの頻度は変化しなかった。しかし、意外なことに、マウスHsp60抗原を牛乳とともに与えた群においては、同抗原の刺激の有無にかかわらず腸間膜リンパ節のTregの頻度は極めて低下した (図2)。



MO60 Concn. (µg/ml)	CD4+ Pop. of Flow	CD4+CD25+ Pop. of Flow	CD4+CD25+ Pop. of Flow
1. MO60_0µg/ml.002	24.4	27.3	34.6
2. MO60_0µg/ml.002	23.3	23.2	39.3
3. MO60_0µg/ml.002	16.9	27	34.4
4. MO60_0µg/ml.002	20.6	67.9	2.51
1. MO60_10µg/ml.002	11.6	39.2	11.6
2. MO60_10µg/ml.002	9.52	34.5	9.12
3. MO60_10µg/ml.002	10.9	38.5	10.5
4. MO60_10µg/ml.002	14.5	63	2.04

図2 マウスHsp60経口投与による腸間膜リンパ節のTreg頻度  
 10 µg/mLのマウスHsp60の存在下にてMLN細胞を培養。MO60 : マウスHsp60

マウスHsp60抗原は、腸間膜リンパ節の細胞群に対してサイトカインIL-10を産生させていた。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、牛乳とともにHsp60を投与した群においてのみ転写因子Foxp3を発現する細胞群が顕著に減少していた(図2)。これらの結果を合わせて考えると、まず、マウスHsp60の免疫学的活性は牛乳という媒体によって高められることは示された。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踏まえると、粘膜免疫へのHsp60の投与は何らかの制御性免疫を駆動したものであると思われる。今回の実験系においては、経口投与後のマウス腸間膜リンパ節におけるTregの頻度も調べるべきであった。マウスHsp60を牛乳とともに投与した群では、抗原刺激の非存在下においてもTregが減少していたことは、Hsp60の経口投与によってHsp反応性の制御性T細胞が活性化されていたことを反映したものと考えられる。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における粘膜免疫系での抗原提示細胞の変化と役割について解明することは非常に意義深いと思われる。

## 第2章 未感作T細胞の分化誘導に対するHsp抗原の作用

### 1. 序論

これまでに、マウスHsp60を牛乳とともに経口投与すると、腸間膜リンパ節の細胞から産生される制御性サイトカインIL-10が増加する可能性を見出し、腸間膜リンパ節におけるCD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、Foxp3<sup>+</sup>のリンパ球の増減をフローサイトメーターにより調べたところ、マウス由来のHsp60を牛乳とともに経口投与したマウスの腸間膜リンパ節を培養後、CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、Foxp3<sup>+</sup>を示すTregの頻度が減少することを明らかにした。媒体としてPBSを用いた場合ではTregの頻度が変化しなかったことから、牛乳がマウスHsp60の生理機能発現を助長したため、牛乳のアジュバント効果が明瞭に示された。しかし、当初期待した制御性T細胞群の誘導増加は見かけ上観察されなかった。この観察は、マウスHsp60に特異的な効果であったのか、一般的にHspという総称で一群のタンパク質の生理活性を一括りに扱うこと自体に問題があるのかについての検討課題が残った。そこで、第二章では、上記の課題を明らかにする一環として、腸間膜リンパ節の細胞群から、磁気ビーズ細胞分離(MACS)法によりCD4<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>のナイーブT細胞と抗原提示細胞(APC)を分離し、調製した両細胞群をHsp抗原存在下にて共培養するIn vitro differentiation assayを構築し、ナイーブT細胞の分化誘導に及ぼすHspの影響について解析した。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 実験動物

C57BL/6系統の6~8週齢♀マウスを購入した。飼育には、購入したCRF-1と0.22 $\mu$ mフィルターろ過したミリQ水を用いた。

### 2.2. 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)を摘出後、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とDNase I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ターした。酵素消化後、40 $\mu$ 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。

### 2.3. In vitro differentiation assay (IVDAS)

未感作(ナイーブ)T細胞の分取は、C57BL/6系統の6~8週齢♀マウス5~6匹から調製したMLN細胞懸濁液に、ビオチン標識された抗マウスCD抗体カクテルを反応させた。磁気標識の抗ビオチン抗体と反応させた後、マグネットカラムにてCD4<sup>+</sup>T細胞のネガティブセレクションを行い、非標識の細胞画分を調製した。続いて、この画分に、磁気標識の抗マウスCD62L抗体を添加し、CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>T細胞をMACSにより回収した。得られた細胞群は、95%以上がCD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>を示すナイーブT細胞であった(図3)。

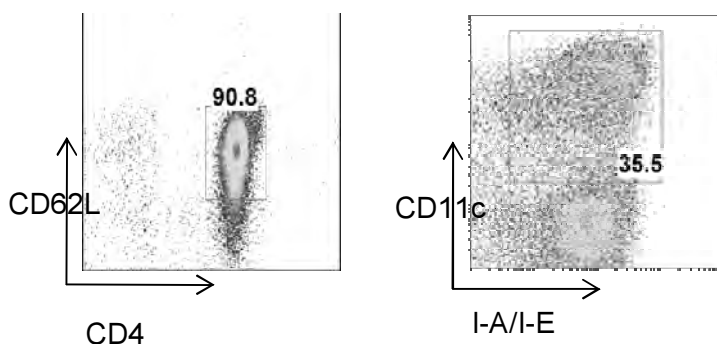


図3 マウス腸間膜リンパ節からMACSにより調製したナイーブT細胞(左)と抗原提示細胞(右)

C57BL/6系統の6~8週齢♀マウス9~10匹から調製したMLN細胞懸濁液に、ビオチン標識の抗マウスCD3 $\epsilon$ 抗体を反応させた。磁気標識の抗ビオチン抗体と反応させた後、マグネットカラムにてT細胞を除くネガティブセレクションを行い、非標識の細胞画分を調製した。続いて、この画分に、磁気標識の抗マウスPan DC抗体を添加し、CD11c陽性の細胞群をMACSにより回収した。得られた細胞群は、90%以上がMHC II<sup>+</sup>を示し、40%程度の細胞がCD11c<sup>+</sup>であった(図3)。

調製したナイーブT細胞50 x 10<sup>4</sup>とCD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>細胞5 x 10<sup>4</sup>をHsp抗原存在下にて3~7日間培



養し、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregが産生される頻度を解析した。

## 2.4. Flow cytometry

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を用いて行い、データの解析はFlowJo ver. 3を用いた。

## 3. 結果と考察

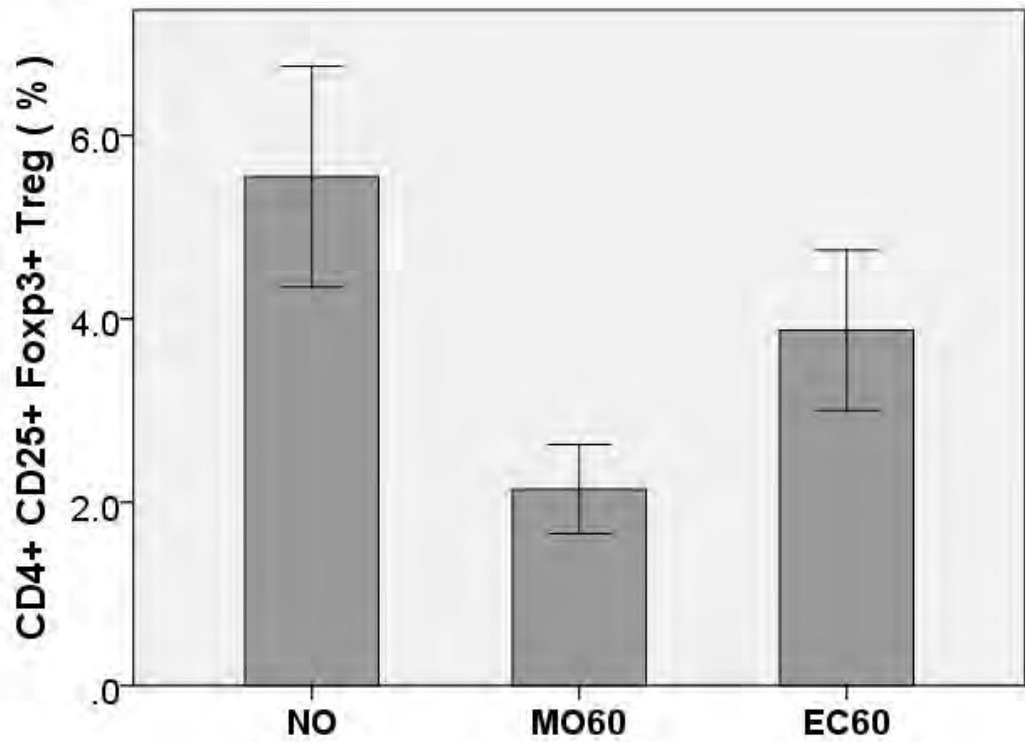
### 3.1. IVDasにおけるTreg産生

調製したナイーブT細胞 $50 \times 10^4$ とCD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>細胞 $5 \times 10^4$ をHsp抗原存在下にて3日間培養したところ、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregが産生された頻度は、抗原非存在下において5.5%であったのに対して、M060とEC60存在下ではそれぞれ2.1%と3.9%であった(図4)。しかし、7日間の培養を行ったところ、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregが産生された頻度は、抗原非存在下において0.8%であったのに対して、M060とEC60存在下ではそれぞれ0.7%と3.7%であった(図5)。この結果は、今回用いた実験条件では、Hsp抗原の有無にかかわらず、ナイーブT細胞から数%のTregが誘導されるが、微生物由来のEC60存在下では生成したTregを維持する一方で、自己HspであるM060存在下では維持する効果が見られなかったということを示唆している。

我々の生体内には、自己のHspに応答性を示すT細胞が胸腺内における負の選択を逃れて末梢に至ることが知られている。末梢性の自己応答性T細胞の機能が解明されておらず、その機能を説明し得るものとして、制御性T細胞としてはたらくのではないかという作業仮説がある。そのため、本研究では、リガンドとしてマウスHsp60 (M060)を中心に考えてきた。しかしながら、M060が強いTregの分化誘導因子としてはたらくというよりはむしろ、逆に、制御性T細胞の産生を抑える傾向にあると言える。

消化管内には無数の腸内細菌が共生している。昨年度の本事業の成果として、消化管内にはタンパク質レベルにおいてHsp抗原が存在していることを明らかにしてきた。Hsp抗原の高い相同性を考慮して、EC60によるTreg産生の維持効果のメカニズムを考察すると、相同性のある腸内細菌由来のHspエピトープが、末梢に逃れてきた自己Hsp応答性T細胞のTregとしての機能の維持に関与しているのではないか、ということが考えられる。

### Day 3



N = 4, Error bar: SEM, Non significant

One - way ANOVA: P = 0.073

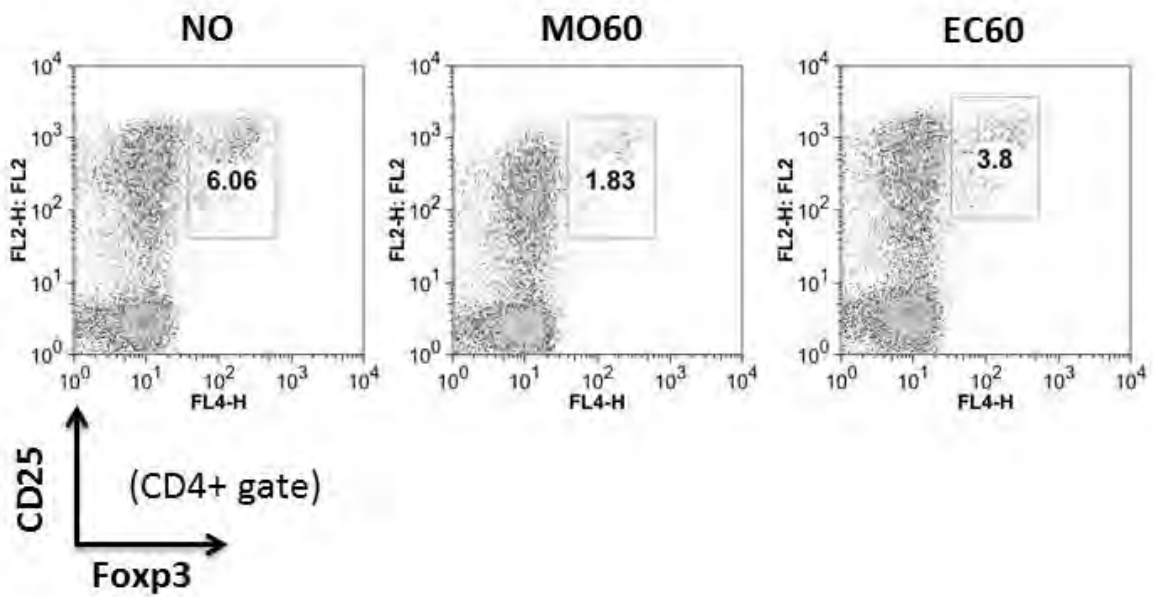
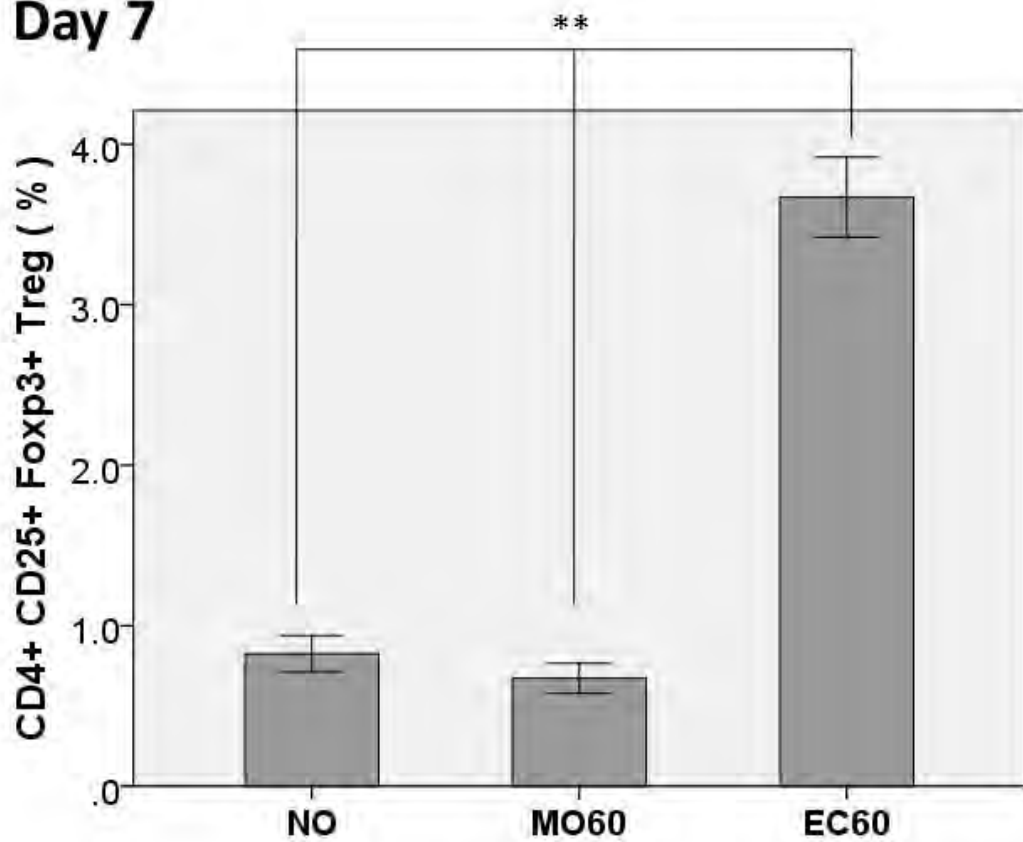


図4 3日間培養後のTreg産生頻度に与えるHsp抗原の影響

**Day 7**



N = 4, Error bar: SEM, \*\*P < 0.01, Tukey HSD  
One - way ANOVA: P < 0.01

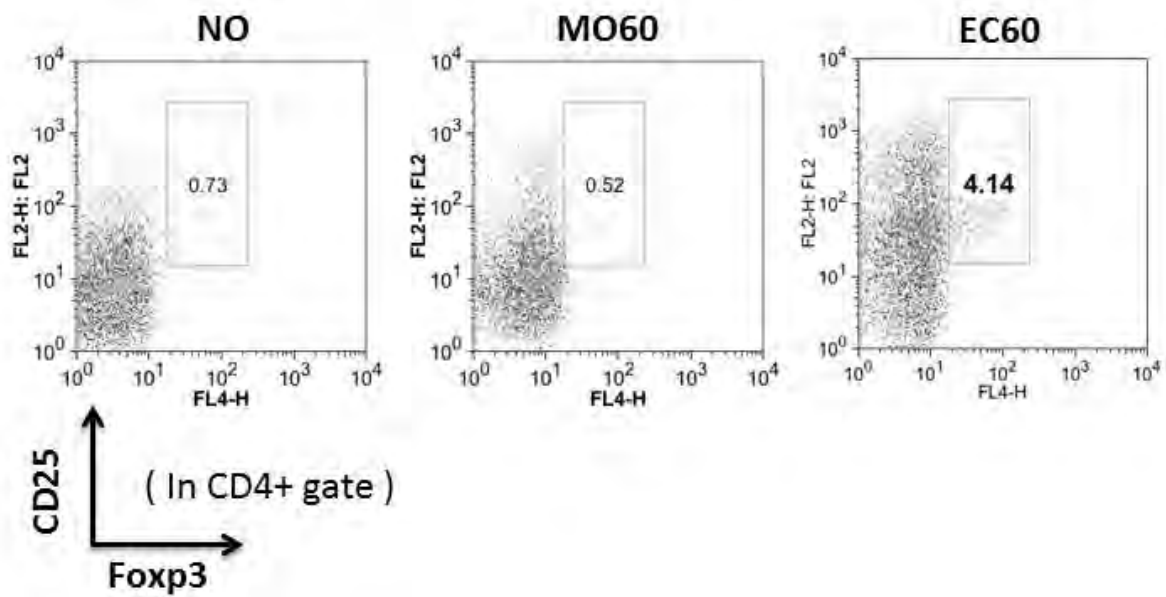


図5 7日間培養後のTreg産生頻度に与えるHsp抗原の影響

## 第3章 離乳後の粘膜固有層における抗原提示細胞群の変化

### 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<sup>6,7)</sup>。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<sup>8-11)</sup>。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<sup>19)</sup>。

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返される。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<sup>18)</sup>。離乳という時期は、食事とともに消化管内に多種多様な外来抗原が大量に入ってくる時期である。つまり、腸管内内腔の環境が質的量的に劇的に変化する<sup>20)</sup>。そのため、消化管に散在する抗原提示細胞の種類と量は大きく変動することが予想される。そこで、第三章では、離乳直後の時期にタンパク質抗原が消化管内に入ってきたときの粘膜固有層における樹状細胞の挙動変化について検討した。

### 2. 材料と方法

#### 2.1. 実験動物

C57BL/6系統14～18日齢の♀哺乳マウスを母マウスとともに購入し飼養した。生後21日齢目に母マウスから離乳させ仔マウスそれぞれを別々のケージに移し飼育した。飼育には、タンパク質源としてのカゼインを構成するアミノ酸からなる混合ペレット食を用いた。

## 2.2. 経口免疫寛容モデル

生後21日齢のマウスを2群に分けた。一方の群には、一日一回10 mgの卵白アルブミン (Ovalbumin: OVA)を10回連続して経腸投与し (図6)、他方の群にはタンパク質抗原の摂取を行わなかった。離乳後2, 4, 6, 10日後に、それぞれの群のマウスから、脾臓と腸管の粘膜固有層から細胞懸濁液を調製した。

OVAの経口投与により免疫寛容が成立しているかについては、経口投与後、サポニンベースのアジュバントとともに同抗原を2回腹腔内に免疫し、離乳45日後に尾静脈から採血し、血中の抗OVA抗体量の増減を定量することによって評価した。抗体レベルは、OVAを固相化したプレートに血漿サンプルを添加し、OVAに結合した血中IgGを酵素標識した2次抗体で検出するELISA法を用いた。

## 2.3. 脾臓と粘膜固有層からの細胞調製

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。

マウスの大腸および小腸を摘出し、氷冷したHBSS (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>含有)の入ったシャーレに入れ、それぞれリンパ節とパイエル板を取り除いてから、腸管を縦に切り開いて、内容物を取り除いた。腸管を0.5~1 cmに切断し、37°Cに加熱した約40 mLの5% FBS-HBSS(-)を入れたコニカルチューブに入れ、37°C、150 min<sup>-1</sup>で30分間振とうした。チューブを20回ほど振って、滅菌ガーゼでチューブ内の腸管を内容物ごと濾過し、再度同じ振とう操作を行った。ガーゼで濾過後、35 mgコラゲナーゼを含む50 mLの5% FBS-HBSS(+)を入れた100 mL三角フラスコ内で約40分間攪拌した。腸管の形態がほぼなくなる程度まで攪拌し、氷冷した後ガーゼで濾過した。得られたろ液を20°C・1500 rpmで10分間遠心し、上清を取り除いて細胞ペレットを回収した。細胞ペレットを27% Percoll溶液に懸濁し、20°C、1800 rpmで20分間遠心した。細胞を洗浄後、得られた細胞ペレットを5% FBS-HBSS(+)に懸濁し、17.5% Accudenz溶液を下層に重層し、20°C、1800 rpmで20分間遠心した。境界面に存在する密度1.058~1.093 g/mLをもつ浮遊細胞を回収し、細胞を5% FBS-HBSS(+)で2回洗浄し、粘膜固有層細胞とした。

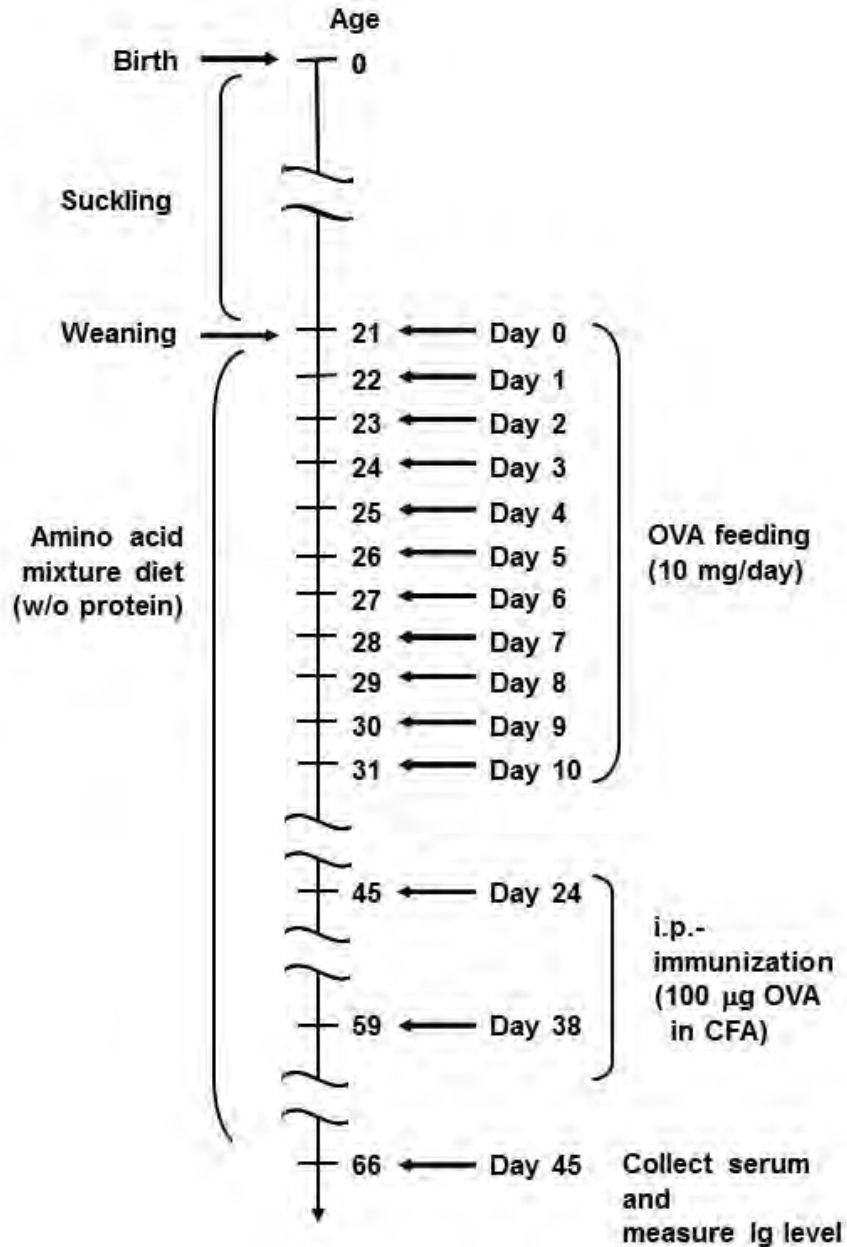


図6 OVA経腸投与による経口免疫寛容モデル

#### 2.4. Flow cytometry

5×10<sup>5</sup>個の粘膜固有層細胞をポリエチレンチューブに分注し、氷冷したPBSで細胞を洗浄した。以下の操作はすべて氷上で行った。非特異的な結合をブロックするため、Fc block™を加え10分間インキュベートした。その後、FITC標識された抗PDCA-1 (clone eBio927) 抗体あるいはFITC標識された抗CD103 (clone 2E7) 抗体、PE標識された抗CD11c (clone HL3) 抗体、APC標識された抗I-A/I-E (clone M5/114.15.2) 抗体を各々添加し、30分間インキュベートした。細胞を洗浄後、7-AADを添加し死細胞を染色した後、FACS Calibur HGを用いて細胞を解析した。データ処理はFlowJoソフトウェアを用いて行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. 経口免疫寛容の成立

図6に示したプロトコールで作製したマウス群（OVA投与群と非投与群）のそれぞれに対して、OVAを腹腔内免疫したときの血中抗OVA抗体量を示す吸光度値の平均値が、投与群では0.295（無免疫では0.148）、非投与群では0.634（無免疫では0.117）であった。この結果は、一日一回10 mgのOVAを10回連続して経腸投与することにより免疫寛容が誘導されていることを示唆していた。

#### 3.2. 粘膜固有層における制御性樹状細胞の変化

粘膜固有層において対象とした樹状細胞は、表面抗原としてCD103あるいはPDCA-1を発現しているDCである。CD103<sup>+</sup> DCは、ナイーブT細胞を制御性T細胞(Treg)に分化誘導する性質をもつことが言われている<sup>21, 22)</sup>。他方、抗PDCA-1抗体を体内に注入しPDCA-1<sup>+</sup> DCを枯渇させたマウスにおいては免疫寛容が激減することがしめされている<sup>23, 24)</sup>。言い換えれば、CD103<sup>+</sup> DCとPDCA-1<sup>+</sup> DCは制御的にはたらく抗原提示細胞ということができる。

OVAを10回連続して経腸投与した離乳後10日目のマウスの粘膜固有層におけるDCの変化を調べたところ（図7）、CD103<sup>+</sup> DCの頻度はOVA投与群と非投与群においてあまり差がなかったが、PDCA-1<sup>+</sup> DCの頻度は、統計的有意差は認められなかったもののOVA投与群において増加する傾向を示した。これは、タンパク質性の高分子抗原の消化管内への侵入によって、その外来性の情報を免疫系に伝搬する役目を担うDCが動員される可能性を示唆した。そこで、OVAの投与が2回のみという抗原刺激直後でのDC変動について解析した。その結果、CD103<sup>+</sup> DCの頻度はOVA投与群と非投与群において差が観察されなかったが、PDCA-1<sup>+</sup> DCの頻度は、OVA投与群において統計的に有意に増加した（図8）。

以上の結果から、消化管には、外来性の抗原が侵入してくると、それに応答してDCなどの抗原提示細胞を動員する機構が備わっていることが見出された。哺乳動物では、生後、消化管内環境が劇的に変化する時期が2回ある。出生時と離乳期である。出産期は、消化管内の無菌的なところに腸内細菌が定着し増殖する時期である。離乳期以降では、乳幼期に母親から供給される乳の成分と質的量的に異なる抗原物質が大量に入ってくる。今回の実験は、実験可能な条件ということで離乳期に焦点をあてたが、出生時の時期においても、定着を開始する腸内細菌やそれに由来する非自己成分に応答して、DCが粘膜固有層に動員されることが考えられる。

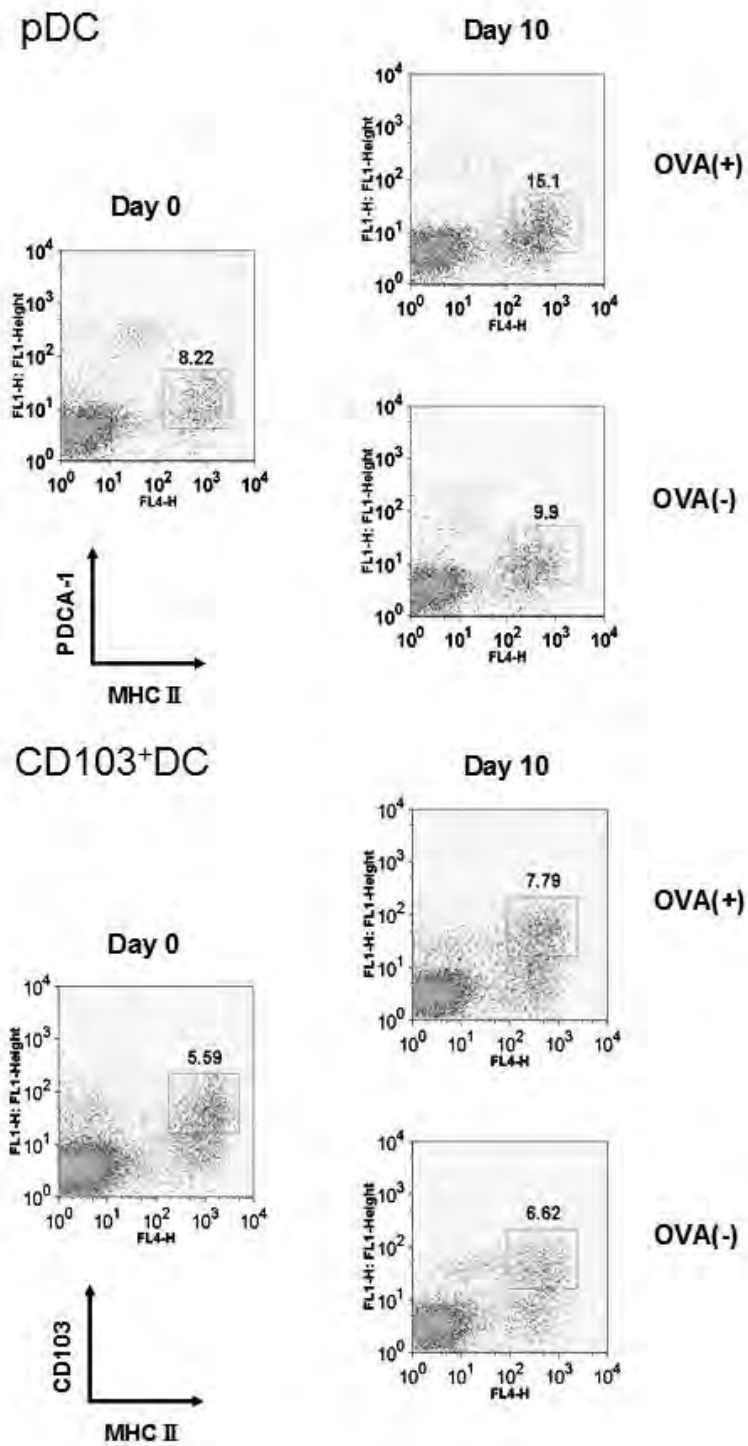


図7 卵白アルブミン経口投与による粘膜固有層内での樹状細胞の頻度変化

10 mg OVAを10日間経口投与したあと、粘膜固有層のCD11c<sup>+</sup> DCに占める表面抗原PDCA-1およびCD103を発現するDCの頻度を示す



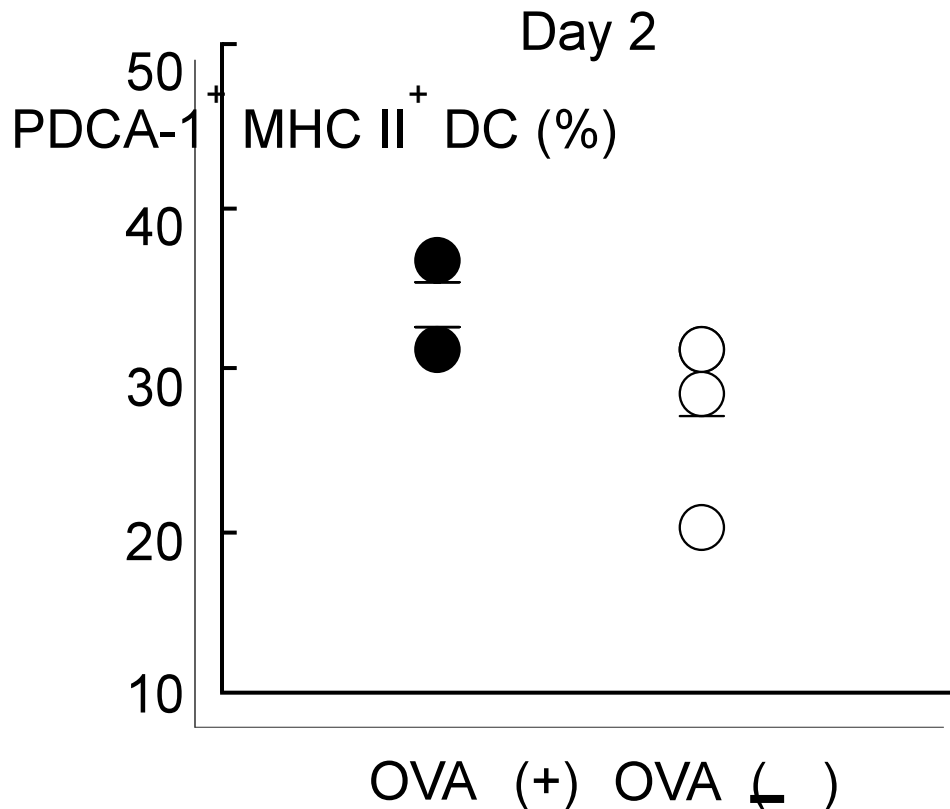


図8 粘膜固有層中のCD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>細胞に占めるPDCA-1<sup>+</sup>細胞の割合

## 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<sup>25)</sup>。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<sup>5)</sup>、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、本年度においては以下の成果を得た。

第一章では、前年度に、離乳後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腸間膜リンパ節の細胞から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見出していた。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ため、Tregの産生頻度について検討した。その結果、意外なことに、マウスHsp60抗原を牛乳とともに与えた群においては、同抗原の刺激の有無にかかわらず腸間膜リンパ節のTregの頻度は極めて低下した。

第二章では、第一章の結果を受けて、マウスHsp60抗原はそもそもTreg産生を亢進するのか、それとも産生を抑制するのかについて、In vitro differentiation assayを構築して解析した。その結果、ナイーブT細胞とCD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>細胞をHsp抗原存在下にて3日間培養したところ、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregが産生された頻度は、抗原非存在下において5.5%であったのに対して、M060とEC60存在下ではそれぞれ2.1%と3.9%であった。しかし、7日間の培養を行ったところ、Tregの頻度は、抗原非存在下において0.8%であったのに対して、M060とEC60存在下ではそれぞれ0.7%と3.7%であったことから、Hsp抗原の有無にかかわらず、ナイーブT細胞から数%のTregが誘導されるが、微生物由来のEC60存在下では生成したTregを維持する可能性が示された。

第三章では、離乳後2回のみというOVAの投与によって、抗原刺激直後のCD103<sup>+</sup> DCの頻度はOVA投与群と非投与群において差が観察されなかったが、PDCA-1<sup>+</sup> DCの頻度は、OVA投与群において統計的に有意に増加した。このことから、消化管には、外来性の抗原が侵入してくると、それに応答してDCなどの抗原提示細胞を動員する機構が備わっていることが見出された。

前年度の成果から、消化管内にはHsp様の抗原が存在すること、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傾向を明らかにした。今年度、Tregの産生頻度を調べたところ、マウスHsp60抗原を牛乳とともに与えた群においては、同抗原の刺激の有無にかかわらず腸間膜リンパ節のTregの頻度は極めて低下した。しかし、このTreg頻度の低下は、マウスHsp60を牛乳という媒体とともに摂取させたときのみを観察されたという点は非常に重要な発見で、乳がアジュバント効果をもっていることを明確に示した結果と言える。IL-10の産生が増強されることを踏まえると、粘膜免疫へのHsp60の投与は何らかの制御性免疫を駆動したものと考えられる。今回の実験系においては、経口投与後のマウス腸間膜リンパ節におけるTregの頻度も調べるべきであったが、Hsp60の経口投与によってHsp応答性の制御性T細胞が活性化されていたことを反映したものであるかもしれない。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。

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<sup>26)</sup>。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<sup>27)</sup>。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<sup>15)</sup>、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<sup>16)</sup>。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。今回、第二章において、マウスHsp60ではなく、大腸菌由来のHsp60 (GroEL) が、In vitro differentiation assayにおいてTregの機能維持にかかわる可能性を示唆したことは意義深いと思われる。前年度、消化管内には腸内細菌由来のHsp抗原が存在していることを示しているため、出生から離乳期に至る幼少期における取り込む外来性抗原への寛容獲得に際して、自己Hsp応答性T細胞に刺激を与える交差性をもつ腸内細菌由来のHspは、Tregの誘導とともにその機能維持の両面においてはたらく可能性があるためである。

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、一つ間違える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。

## 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) Bailey M., Haverson K., Inman C., Harris C., Jones P., Corfield G., Miller B. & Stokes C. (2005) The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proc. Nutr. Soc.* 64, 451-457.
  - 21) Coombes J.L., Siddiqui K.R.R., Arancibia-Cárcamo C.V., Hall J., Sun C.-M., Belkaid Y. & Powrie F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$ - and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 204, 1757-1764.
  - 22) Coombes J.L. & Powrie F. (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 435-446.
  - 23) Goubier A., Dubois B., Gheit H., Joubert G., Villard-Truc F., Asselin-Paturel C., Trinchieri G. & Kaiserlian D. (2008) Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 29, 464-475.
  - 24) Dubois B., Joubert G., de Agüero M.G., Gouanvic M., Goubier A. & Kaiserlian D. (2009) Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral

- tolerance. *Gastroenterol.* 137, 1019-1028.
- 25) Vorbach C., Capecchi M.R. & Penninger J.M. (2006) Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *Bioessays* 28, 606-616.
- 26) 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.
- 27) Raz I., Eldor R. & Naparstek Y. (2005) Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. *Trends Biotechnol.* 23, 128-134.