

自然免疫活性化物質による
T 細胞ならびに NK 細胞機能の調節作用に関する研究

佐藤 亘

2015

目次

略語一覧

緒論..... 1

第一章 自然免疫活性化物質による T 細胞機能の修飾に関する検討 5

第一章 実験の部.....6

第一節 PAMPs 刺激による脾臓細胞選択的 IFN- γ 産生の抑制機構の検討.....9

1-1-1 菌体由来 β グルカン、 α マンナン、植物由来多糖類、LPS などの PAMPs 刺激によるマウス脾臓細胞でのサイトカイン産生.....9

1-1-2 マウス脾臓細胞からの PAMPs 刺激ならびに未刺激条件下でのサイトカイン産生に対する BWMP の影響9

1-1-3 GM-CSF 添加条件下における CAWS 刺激脾臓細胞からのサイトカイン産生に対する BWMP の影響12

1-1-4 PAMPs による脾臓細胞からのサイトカイン産生に対する BWMP の影響13

第二節 植物多糖 BWMP による T 細胞からのサイトカイン産生の抑制機構の検討 15

1-2-1 BMDC によるサイトカイン産生に対する BWMP の影響.....15

1-2-2 SCG 刺激による脾臓細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生に対する BWMP の影響17

1-2-3 CD3 陽性 T 細胞のサイトカイン産生に対する BWMP の影響.....18

1-2-4 CD3 陽性 T 細胞の細胞増殖と IL-2、IFN- γ 産生に対する BWMP の影響20

1-2-5 CD3 陽性 T 細胞の細胞増殖と IL-2、IFN- γ 産生への BWMP 刺激添加タイミングの影響.....22

1-2-6 CD3 陽性 T 細胞の IL-2 刺激による細胞増殖と IFN- γ 産生への BWMP の影響.....23

第一章 考察..... 24

第二章 食品由来の自然免疫活性化物質による血管炎の修飾とNK細胞の関連性に関する検討.....	27
第二章 実験の部.....	29
第一節 PAMPs に対する抗体産生に関する検討	32
2-1-1 自然免疫活性化作用を有する多糖類に対する抗体に関する検討.....	32
2-1-2 β グルカン、 α マンナンを認識する抗体との交差反応.....	35
2-1-3 様々な β グルカンと抗体との競合反応.....	38
2-1-4 β グルカンと dectin-1 との結合性.....	38
第二節 飼料の違いによる血管炎の病態とNK細胞活性の検討.....	44
2-2-1 NK細胞の機能と自然免疫活性化多糖の関連性に関する検討.....	44
2-2-2 血管炎モデルに対する飼料の影響.....	45
2-2-3 CAWS 血管炎マウスの生存率に及ぼす飼料の影響.....	50
2-2-4 血管炎の進行におよぼす飼料の影響.....	50
2-2-5 飼料の違いによるサイトカイン産生への影響.....	53
2-2-6 飼料の違いによるNK細胞傷害活性への影響.....	56
第二章 考察.....	58
総括.....	61
謝辞.....	63
研究結果の掲載誌.....	64
引用文献.....	65

略語一覧

本論文中に使用した略語は以下の通りである。

ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
AgCA : *Agaricus braziliensis* glucan repeated extraction with cold NaOH
AgHWE : *Agaricus braziliensis* glucan repeated extraction with hot water
APC : antigen presenting cell
AP-1 : activator protein 1
ASBG : aspergillus solubilized beta-glucan
BMDC : bone marrow-derived dendritic cell
BSA : bovine serum albumin
BWMP : bamboo water-soluble methanol precipitation
CAWS : *Candida albicans* water soluble fraction
CD : cluster of differentiation
CLR : C-type lectin receptor
CR3 : complement receptor 3
CSBG : candida solubilized beta-glucan
DC : dendritic cell
DIW : deionized water
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
FACS : fluorescent-activated cell sorting
FBS : fetal bovine serum
GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA : human leukocyte antigen
HSP : heat shock protein
IFN : interferon
Ig : immunoglobulin
IKK : Inhibitor of κ B kinase
IL : interleukin
iNK : immature NK
IP-10 : Interferon gamma-induced protein 10
iPS : induced pluripotent stem
ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KE : kumazasa extract
KD : kawasaki disease
KIR : killer-cell immunoglobulin-like receptor

KLR : killer cell lectin-like receptor
LAK : lymphokine-activated killer
LIF : leukemia inhibitory factor
LPS : lipopolysaccharide
LTA : lipoteichoic acid
MHC : major histocompatibility complex
MIG : monokine induced by gamma interferon
mNK : mature NK
MRSA : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
mTOR : mammalian target of rapamycin
M ϕ : macrophage
NCR : natural cytotoxicity receptor
NFAT : nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B : nuclear factor- κ B
NK : natural killer
PAMP : pathogen-associated molecular pattern
PBS : phosphate-buffered saline
PD-1 : programmed cell death 1
PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate
POX : Peroxidase
PRR : pattern recognition receptor
rpm : round per minutes
SCG : 1,3-beta-D-glucan from *Sparassis crispa*
SPF : specific pathogen free
TCR : T cell receptor
TGF : transforming growth factor
Th : helper T
TLR : Toll-like receptor
TMB : 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine
TNF : tumor necrosis factor
TP3 : TO-PRO-3

緒論

人々はこれまで不老長寿を目指し、医療技術や生活様式など様々なものを発展させてきた。2015年発表によると日本の平均寿命は、男性は80.50歳で3位、女性は86.83歳で1位であり、男女平均においては84歳で世界1位である。しかし、今後、国民の4人に1人は65歳以上という超高齢社会が到来すると言われている。さらに、日本の高齢化率の推移は、他の先進諸国と比べて著しく早いと言われている。また、現状のままでは医療費の拡大により国家予算は破綻に追い込まれる危険性がある。我が国では、高齢化の進展や疾病構造の変化に伴い、国民の健康の増進の重要性が増大しており、健康づくりや疾病予防を積極的に推進するための環境整備が要請されている。そこで、厚生労働省は、これからの高齢社会を健康で活力あるものにするため、生活習慣病などを予防し、壮年期死亡の減少、健康寿命の延伸等を目標とする21世紀における国民健康づくり運動「健康日本21」を提唱している（健康日本21：<http://www.kenkounippon21.gr.jp/>）。

高齢になるにつれ、全身の筋肉の萎縮、骨の減少による骨粗鬆症、免疫力低下による肺炎や肝炎、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : MRSA)、緑膿菌感染症等があげられる。これらの症状や疾病は、通常若齢時に発症しないことから、老化による身体機能、免疫機能が、低下していることが原因と考えられる。また、死亡原因の上位に含まれる、悪性新生物(癌)、心疾患、肺炎などの疾病には、免疫機能の低下が密接に関連している。さらに、腸内細菌叢と免疫機能の関連性についても遺伝子レベルの解析が進んできた。これらのことから、免疫機能の低下を改善することで老化による疾患のリスクを低下させることができると考えられる。

免疫応答は、自然免疫と獲得免疫の2系統で構築されている。自然免疫は、原始的な免疫機構であり、外敵の侵入を最初に防御する役割を持っている。獲得免疫は、より進歩した免疫機構であり、外敵を記憶し、再度同じ外敵の侵入に対して素早く反応する役割を担っている。自然免疫を担当する細胞には、外敵を貪食する樹状細胞(dendritic cell : DC)やマクロファージ(macrophage : Mφ)などの抗原提示細胞(antigen presenting cell : APC)や、ウイルスに対して働くナチュラルキラー(natural killer : NK)細胞などがある。獲得免疫を担当する細胞には、免疫機能の司令塔であるT細胞や抗体を産生するB細胞などのリンパ球があり、ワクチンはこの獲得免疫の仕組みを利用したものである¹⁾。

老化により機能が低下していく免疫細胞として、T細胞とNK細胞が良く知られている。T細胞は胸腺内で分化成熟するが、胸腺機能は性成熟とともに著しく低下することから、それまでの間に成熟したT細胞が一生を支えていくと考えられている。NK細胞の機能はT細胞に支えられているので、同様の運命を

たどることになる。また、T 細胞や NK 細胞以外の免疫細胞も、老化により同様に機能が低下していくと言われている。例えば DC や Mφ などの APC の増加は、老化による自己免疫疾患の増加に関連している可能性がある^{2,3)}。

T 細胞は、1968 年に G. F. Mitchell 及び J. F. P. Miller によりリンパ球の 1 種として発見され、1975 年に P. C. Marrack 及び J. W. Kappler は、T 細胞に様々な集団があることを発見した⁴⁻⁸⁾。T 細胞は cluster of differentiation (CD)3 陽性細胞をさすが、CD3 は T 細胞受容体(T cell receptor: TCR)と補助分子で構成されており、TCR は α - β 鎖、あるいは γ - δ 鎖の二量体で構成されている。前者は $\alpha\beta$ T 細胞、後者を $\gamma\delta$ T 細胞という。CD3 は、細胞内領域に immunoreceptortyrosine-based activation motif (ITAM)を持ち細胞内のシグナル伝達に関与している⁹⁾。

T 細胞は、骨髄の造血幹細胞に由来し、胸腺内へ移動、選択され成熟したのち T 細胞へ分化する。一次レパートリーは自己の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex : MHC)と相互作用できるものを除き、アポトーシスにより死滅する。このとき相互作用する MHC クラスに応じて成熟した胸腺細胞は CD4、あるいは CD8 のいずれかのみを発現するようになり、シングルポジティブ胸腺細胞となる。このように選択された胸腺細胞はさらに、胸腺内の DC や Mφ などにより選択をうけ、自己反応性の T 細胞をアポトーシスによって死滅する。その後、成熟ナイーブ T 細胞として体内循環に入り、二次リンパ組織中で活性化され活性化 T 細胞となる¹⁰⁻¹³⁾。

その後、活性化 T 細胞は CD4 陽性のヘルパー T(helper T : Th)細胞や、CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞、CD4、CD25、Foxp3 陽性の制御性 T 細胞などに分化する^{14,15)}。さらにナイーブヘルパー T 細胞(Th0)は、抗原刺激されることにより Th1 や Th2、Th17 などに分化する。Th1 は Interleukin (IL)-12 や IL-18 の存在下で分化し Interferon (IFN)- γ を産生、Th2 は IL-4 により分化し IL-4 を産生、Th17 は IL-6 や transforming growth factor (TGF)- β により分化し、IL-17 を産生する¹⁶⁾。Th1 細胞は細胞性免疫を介し、自己免疫疾患、遅延型アレルギーに関与し、Th2 細胞は、液性免疫を介し、即時型アレルギーに関与する。また、Th17 細胞は自己免疫疾患モデルマウスにおいて増加が見られることから自己免疫疾患に関わっているものと考えられている¹⁷⁾。末梢に分布する成熟 T 細胞の活性化には、各クローンの TCR-V 領域に、MHC-抗原ペプチド複合体が APC を介して結合することが必要である¹⁸⁻²²⁾。

T 細胞は、胸腺で作成されるが、胸腺は老化と共に萎縮するため、T 細胞は徐々に減少する。また、老化により T 細胞の受容体である programmed cell death 1 (PD-1)の発現が増加する。PD-1 は、T 細胞の機能を抑制する受容体であり、発現が増加することで癌や感染症のリスクが増加する²³⁾。さらに、近年、induced pluripotent stem (iPS)細胞由来 T 細胞を移植することで、より効果的に腫瘍細胞を消失させる方法が開発された²⁴⁾。これらのことから、T 細胞の移植や、T 細

胞の活性を維持できれば老化による免疫力の低下は抑制できると考えられる。

NK 細胞はリンパ球の中でも自然免疫に関係する。NK 細胞は、前述した T 細胞受容体である CD3 が発現していないだけでなく、B 細胞受容体も発現していないリンパ球である。NK 細胞の受容体は、ヒトでは CD16 や CD56、マウスでは NK1.1/1.2 や CD49b、NKp46 を発現したリンパ球である²⁵⁾。さらに、NK 細胞の受容体は肝臓では、NKG2A、Ly49 の発現が高く、CD56、CD16 の発現が低い、皮膚では CD56 の発現が高く、CD16 の発現が低いというように臓器ごとに受容体の発現が異なる²⁶⁾。

NK 細胞は T 細胞と同様に骨髄からの骨髄幹細胞に由来し、骨髄内で CD244、CD10、CD34 を発現した pro-NK 細胞(stage 1)となる。次に CD10、CD244、CD117、IL-2R β (CD122)を発現した pre-NK 細胞(stage 2)となる。さらに、IL-2R β (CD122)、CD244、NKG2D、CD56、CD117、NKp46、NK1.1 の発現した immature NK (iNK) 細胞(stage 3)に分化する。最後に NK 細胞は、CD56bright NK 細胞(Stage 4)、血中の CD56dim NK 細胞(stage 5)である mature NK (mNK)細胞に分化する。mNK 細胞には、CD244、CD122、NK1.1、CD27、CD49b、CD11b、NKp46 など様々な受容体が発現している。少なくとも、iNK 細胞までは骨髄内で分化し、mNK 細胞は組織へと移動、感染などにより活性化する²⁷⁻³⁰⁾。しかし、NK 細胞の分化に必要なとされるサイトカインなどが特定されていないため、人工的に NK 細胞を作成することはいまだに困難である。

NK 細胞は、自然免疫に関与することから、独自に自他を判断する様々な機構を有している。NK 細胞の認識方法として知られる“missing-self”機構は、MHC クラス I を介した方法であり、1986 年に Karre らにより発見された。これは、MHC クラス I 分子を自己のマーカーとして認識する機構であり、MHC クラス I 発現が無い、または低下したものを非自己として認識し排除する機構である³¹⁾。自他を認識する NK 細胞の受容体は、NK 細胞を活性するものと抑制するものが存在し、MHC クラス I を認識していると言われている。NK 細胞の受容体は、Killer cell lectin-like receptor (KLR)、Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR)に大別される。

KLRs は C-type lectin 受容体(C-type lectin receptor : CLR)であり、さらに CD94/NKG2 や、Ly49、Natural cytotoxicity receptor (NCR)などがある。KIR には、KIR2D と KIR3D があり、抑制性は KIR2DL1 や KIR2DL2/3、活性性は KIR2DL4 や KIR2DS が存在する³²⁾。

NK 細胞の受容体は、NKG2D などのようにリガンドが判明しているものがあるが、NKp46 などのようにいまだにリガンドが判明していないものもある。また、近年ではより詳しく解析され、NK 細胞の活性に関わる NKG2D や NKp46、抑制に関わる NKG2A などの受容体があり、活性と抑制のシグナルのバランスによりアポトーシスの誘導が調節されていることが明らかとなっている³³⁾。

NK 細胞は、IL-12 や IFN- α 、- β で活性化され IFN- γ を産生する。また、NK 細胞には、Fc 受容体 (Fc γ RIII, CD16) が発現しており、特異抗体を介して抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity : ADCC) を起こす^{34, 35)}。さらに、体温によっても活性が変化し、体温が上昇すると活性化し、低下すると活性も低下するといわれている。NK 細胞の細胞傷害活性は、特異的な標的細胞 (ヒトでは K562、マウスでは YAC-1) を用いて評価する。NK 細胞の傷害活性に用いる標的細胞には、マウスでは H60 や MULT1、Rae-1 などの NKG2D リガンドが発現しており、これらのリガンドにより NK 細胞特異的な反応として評価している^{36, 37)}。活性化 NK 細胞は、非自己細胞をパーフォリンやグランザイム B により攻撃する³⁸⁻⁴⁰⁾。これらの働きから NK 細胞は、癌細胞に対しても効果的に作用する。また、NK 細胞除去効果のある抗アジアロ GM1 抗体を投与すると、NK 細胞が分化の初期段階で破壊されるため、癌による症状がより悪化する⁴¹⁾。これらのことから、高齢者に癌患者が多いことと、老化に伴い NK 細胞の数や機能が低下することが密接に関連していると考えられている。近年、NK 細胞を高濃度の IL-2 で活性化し、増殖、分化した Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞を癌患者に移植することで、癌が縮小するとの報告があるが個別研究の域を出ていない^{42, 43)}。

以上のことから、病気になりにくい健康な体づくりであるヘルスケアが今後いっそう重要になると考えられる。ヘルスケアとは、健康の維持や増進のための行為や健康管理のことを言い、東洋では、養生、あるいは未病といった概念によって、健康時からの健康の維持や増進のことである。老化により免疫機能が低下することは、感染症の増加、悪性腫瘍の増加など、多くの疾患に直結した課題であり、超高齢社会を迎えた我が国にとっては特に重要性が高い。本研究では食品、特に我国で古くから利用されている機能性食品の可能性を探ることとした。さらに、自然免疫研究の進展によって、食品中には β グルカン、 α マンナンなど多くの活性化物質が含まれていることが明らかとなってきたので、それらの物質に焦点を絞って解析することとした。また、近年では、腸内環境が注目されており、食習慣により腸内環境が変化し、免疫機能が変化するなどの報告もある⁴⁴⁾。

本研究は T 細胞ならびに NK 細胞への影響を中心に解析し、第一章「自然免疫活性化物質による T 細胞機能の修飾に関する検討」を、第二章「食品由来の自然免疫活性化物質による血管炎の修飾と NK 細胞の関連性に関する検討」より構成されている。

第一章 自然免疫活性化物質による T 細胞機能の修飾に関する検討

自然免疫は、感染の初期段階において重要な防御機構であり、主な免疫担当細胞として、DC、Mφ、NK 細胞などが担っている。これらの細胞は、パターン認識受容体(Pattern recognition receptors : PRRs)を介して、病原体の病原体関連分子パターン(Pathogen-associated molecular patterns : PAMPs)の特異的な構造を検知する。様々な PAMPs、例えばグラム陰性細菌に由来するリポ多糖類(Lipopolysaccharide : LPSs)、グラム陽性細菌からのリポテイコ酸(Lipoteichoic acid : LTA)、真菌由来のβグルカン、熱ショックタンパク質(Heat shock proteins : HSP)、細菌由来の CpG DNA など広範囲にわたり研究されており、様々な PAMPs に反応する PRRs が確認されている^{45,46}。Toll 様受容体(Toll-like receptors : TLRs)は、多種存在するファミリー分子であり、最も早期から解析が始まったことから、様々な研究がされている。PAMPs を認識した TLR2 は、細胞内で MyD88、TRAF6、Inhibitor of κB kinase (IKKs)を経て、転写因子である nuclear factor-κB (NF-κB)にシグナル伝達し、遺伝子発現する^{47,48}。その他の PRRs には、糖鎖認識受容体である CLR があり、dectin-1 はβ1,3 グルカンを、dectin-2 はαマンナンを認識する⁴⁹⁻⁵¹。

機能性食品は、真菌、酵母、藻類や植物などの様々な材料から作成される。これらの食品は、ヒトの健康のために有益であるだけでなく、様々な病的な症状に改善効果を示す可能性のあることが知られている。

岩倉らは、食物として摂取したβグルカンが腸内細菌叢を質的に変える事によって、腸管の免疫応答性を調節している事を明らかにした。この結果は、我々が日常摂取している食品成分が腸内の微生物叢に影響を与え、それが免疫系や健康に影響を与えることについての詳細なメカニズムを明らかにしたものである。食品の機能性、特に免疫系の調節作用については未解明の点が多いが、その一端を解明したものであり、βグルカン等の摂取が難治性の免疫関連疾患を予防・治療できる可能性を示している⁴⁴。また、dectin-1 は、ニューモシスチス肺炎の病因である *Pneumocystis jiroveгии* の感染防御に、dectin-2 は、川崎病(Kawasaki disease : KD)の病因の候補微生物の一つである *Candida albicans* (*C. albicans*)の感染防御に重要な役割を担うことが報告されている^{52,53}。

そこで、真菌、酵母、藻類、植物由来のβグルカン、αマンナン等にも上記の岩倉らの報告と関連する機能が期待されると考え、本研究を行った。第一節では、DC や Mφ、T 細胞、B 細胞、NK 細胞など様々な免疫細胞を含む脾臓細胞における作用を、第二節では、これら PAMPs の機能を純化した細胞系で検証するために、DC、T 細胞への影響について詳細に解析した。

第一章 実験の部

実験材料：RPMI 1640 medium は、Invitrogen 社を用いた。Gentamycin sulfate、Poly I:C (TLR 3)、CpG DNA (TLR 9)、Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA)、Tacrolimus (FK506)、Bovine serum albumin (BSA)、laminarin from *Laminaria digitata* は、Sigma-Aldrich 社を用いた。Fetal Bovin Serum (FBS)は、Gibco |Life Technologies 社を用いた。TMB microwell peroxidase substrate system は、KPL Inc.を用いた。生理食塩液(生理食塩水)は、大塚製薬株式会社を用いた。Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (tween 20)は、和光純薬工業株式会社を用いた。Recombinant mouse (rm) Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF)、rm IL-4 は、BD Biosciences 社を用いた。Rm IL-2 は、BioLegend 社を用いた。PAM3CSK4 (TLR 1/2)は、InVivoGen 社を用いた。LPS (TLR 4) from *Escherichia coli* O111:B4 は、フェノール抽出法により分離したのを用いた。Ionomycin、Multiplex cytokine assay kit (Mouse Cytokine/Chemokine Panel : MCYTMAG-70K-PX32)は、Merck Millipore 社を用いた。Mouse CD3 ϵ antibodies functional grade、Mouse CD28 antibodies functional grade は、Miltenyi Biotec 社を用いた。Laminarin from *Eisenia bicyclis* は、東京化成工業株式会社を用いた。Mouse CD3+ T-cell enrichment column は、R&D systems 社を用いた。Cell proliferation ELISA, BrdU は、Roche 社を用いた。非働化 FBS は、FBS を 56°C の水浴中で 30 分間加温し、非働化後、-20°C にて保存、用時解凍した。リン酸緩衝食塩液(phosphate-buffered saline : PBS) は、NaCl (8 g)、KCl (0.2 g)、KH₂PO₄ (0.2 g)、Na₂HPO₄·12H₂O (2.9 g)を脱イオン水 (deionized water : DIW)に溶解して 1000 mL (pH 7.4)とした。C-limiting medium は、Sucrose (10 g)、(NH₄)₂SO₄ (2 g)、KH₂PO₄ (2 g)、CaCl₂·2H₂O (0.05 g)、MgSO₄·7H₂O (0.05 g)、ZnSO₄·7H₂O (1 mg)、CuSO₄·5H₂O (1 mg)、FeSO₄·7H₂O (0.01 g)、biotin (25 μ g)を DIW に溶解し、pH 5.2 に調整後 1 L にした⁵⁴⁾。ACK-lysing buffer は、NH₄Cl (8.29 g)、KHCO₂ (1 g)、EDTA/2NA (37.2 mg)を DIW に溶解し、1000 mL とし、フィルター滅菌した。0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5)は、NaHCO₃ (7.13 g)、Na₂CO₃ (1.59 g)を DIW に溶解して 1000 mL とし、NaOH で pH 9.5 に調整した。FACS buffer は、非働化 FBS を 1% となるように PBS に加え、さらに 0.09% (w/v)のアジ化ナトリウムを加えたものをフィルター滅菌した。

C. albicans water soluble fraction (CAWS)の作成：C. albicans (NBRC1385)は、Biological Resource Center (NITE (NBRC))のものを使用し、サブロー寒天培地 (BD Difco, USA)で 25°C 保存し、3 ヶ月おきに継代した。CAWS は、従来の方法に従い C. albicans (NBRC1385)から作成した。手順は、以下の通り行った。5 L の C-limiting medium を、ガラス製の保温器で、5 L/min で空気供給、400 rpm で攪拌し、27°C で 2 日間培養した。培養後、同容量のエタノールを加え、混和し、

一晚反応後、沈殿物を回収した。沈殿物を 250 mL の蒸留水に溶かし、再度エタノールを加え、混和し、一晚反応後、沈殿物を回収した。沈殿物をアセトンで乾燥した^{55, 56)}。

1,3-beta-D-glucan from *Sparassis crispa* (SCG)の作成 : *Sparassis crispa* (*S. crispa*) は、Minahealth 社のものを用いた。SCG は以下の方法で作成した。乾燥粉末状の *S. crispa* を、10%NaOH/5%尿素で 4°C、2 日間、冷アルカリ処理により抽出した。抽出物は、8M の尿素で溶解し、DEAE Sephadex A25 (Cl-)カラムに未吸着画分を回収した。これを、透析膜を用いて蒸留水で透析し、凍結乾燥した(C : H : N = 40.06 : 6.77 : 0.08)。SCG を使用するにあたっては 0.5N の NaOH に溶解、3 日間生理的食塩水で透析し、オートクレーブ処理し、分注して凍結した^{57, 58)}。

Bamboo water-soluble methanol precipitation (BWMP)の作成 : ホシ隈笹エキス[®]、*S. veitchii* extract (kumazasa extract : KE)は星製薬株式会社を用いた。KE は、*S. veitchii* を 103°C で熱水抽出処置することによって製造された。BWMP は、KE をメタノールによって分離した。KE (5 g)にメタノール(35 mL)を入れ混和し、2 日間放置後、4000 rpm×10 min 4°C で遠心分離した。遠心後、上澄みを捨て、沈殿物を可溶化するために蒸留水(5 mL)を加えた。混和し 2 時間放置後、4000 rpm×10 min 4°C で遠心分離し、上澄みを回収した。これに、再度メタノール(35 mL)を入れ混和し、2 時間放置後、4000 rpm×10 min 4°C で遠心分離した。遠心後の、上澄みを捨て、沈殿物をエタノールとアセトンを用いて乾燥した^{59, 60)}。

実験動物 : 日本 SLC 株式会社の雄性 DBA/2 マウス、雄性 C57BL/6N マウスを用いた。

実験動物の管理 : 実験プロトコルは、東京薬科大学動物実験委員会の承認 (P13-44, P14-34)を得た。マウスは、12 時間毎の明暗のサイクルの下の 55±5% の湿度で、23±1°C、SPF 環境下で維持し、自由摂食とした。

マウス脾臓細胞の調製 : 7~9 週齢のマウスを CO₂ により供し、脾臓を摘出した。脾臓を RPMI 1640 medium 中でステンレスメッシュで懸濁し、1200 rpm×5 min 4°C で遠心分離した。遠心後、赤血球を ACK-lysing buffer で溶血し、RPMI 1640 medium で 2 回洗浄した。顕微鏡下で白血球数を計測し、細胞濃度を調整し、Gentamycin sulfate (50 µg/mL)と非働化 FBS を 10%含む RPMI 1640 medium 中に懸濁し、使用まで氷冷中に保存した。脾臓細胞は、24 well 平底プレートを使用し、37°C・5% CO₂ 環境下で培養した。

マウス骨髄由来樹状細胞 (Bone marrow-derived dendritic cell : BMDCs)の調製 : 7~9 週齢のマウスを CO₂により供し、大腿骨を回収した。大腿骨の骨髄細胞を RPMI1640 medium で回収し、1200 rpm×5 min 4°C で遠心分離した。遠心後、骨髄細胞懸濁液の赤血球を、ACK-lysing buffer で溶血し、RPMI1640 medium で 2 回洗浄した。顕微鏡下で細胞数を計測し、細胞濃度を調整し、Gentamycin sulfate (50 µg/mL)と非働化 FBS を 10%含む RPMI 1640 medium 中に懸濁した。骨髄細胞は、96well 平底プレートに 1×10⁶ 個/mL になるようにし、Gentamycin sulfate (50 µg/mL)、非働化 FBS5%、rm GM-CSF (10 ng/mL)、rm IL-4 (5 ng/mL)を含む RPMI1640 (50 µg/mL)で、37°C・5% CO₂ 環境下で培養した。培養 48 時間後に培養液を除去し、非接着または、粘着の緩い細胞を除去、同様の培養液に交換した。交換 72 時間後の細胞を、BMDC として使用した⁶¹⁾。

マウス脾臓細胞由来 CD3 陽性 T 細胞の調製 : 7~9 週齢のマウスを CO₂により供し、脾臓を摘出した。脾臓を RPMI 1640 medium 中でステンレスメッシュで懸濁し、1200 rpm×5 min 4°C で遠心分離した。遠心後、赤血球を ACK-lysing buffer で溶血し、RPMI 1640 medium で 2 回洗浄した。脾臓細胞を Mouse CD3+ T-cell enrichment column (R&D systems 社)を用いてネガティブ選択により CD3 陽性 T 細胞を回収した。回収後、RPMI 1640 medium で 2 回洗浄した。顕微鏡下で細胞数を計測し、細胞濃度を 1×10⁶ 個/mL に調整し、Gentamycin sulfate (50 µg/mL)と非働化 FBS を 10%含む RPMI 1640 medium 中に懸濁し、使用まで氷冷中に保存した。CD3 陽性 T 細胞は、96 well 平底プレートを使用し、37°C・5% CO₂ 環境下で培養した。

サイトカインの測定 : 細胞培養上清中のサイトカイン濃度は、ELISA キットを用いて測定した。TNF-α、IFN-γ 濃度は BioLegend 社、GM-CSF、IL-6、IL-2、IL-4 濃度は BD Biosciences Pharmingen 社のものを使用して測定した。また、サイトカイン・ケモカインの網羅的濃度測定は、multiplex cytokine assay kit (Mouse Cytokine / Chemokine Panel : MCYTMAG-70K-PX32、Merck Millipore 社)を使用して測定した。

有意差検定 : 本研究における有意差検定は、特に記載のあるほかは Student's *t*-tests によって行い、 $p < 0.05$ のものを「有意差あり」と判定した。

第一節 PAMPs 刺激による脾臓細胞選択的 IFN- γ 産生の抑制機構の検討

1-1-1 菌体由来 β グルカン、 α マンナン、植物由来多糖類、LPS などの PAMPs 刺激によるマウス脾臓細胞でのサイトカイン産生

既に当教室では、DBA/2 マウスが刺激に非常に敏感なことを明らかにしている。そこで、Figure 1-1 で示すように、オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞を PAMPs で刺激し、48 時間培養後の上清中のサイトカイン産生量を測定した。PAMPs として、植物多糖の BWMP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、TLR リガンドの LPS (10 ng/mL)、 β グルカンの SCG (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、 α マンナンの CAWS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を用いた。TNF- α 産生は、使用したすべての PAMPs で有意に増加した。IFN- γ 産生は、LPS では増加傾向が見られ、SCG、CAWS では有意に増加した。しかし、BWMP では未刺激時に産生される IFN- γ 産生も減少し、IFN- γ 産生全体を抑制した。また、IL-6 産生は、LPS、SCG、CAWS では有意に増加したが、BWMP では変化は見られなかった。

1-1-2 マウス脾臓細胞からの PAMPs 刺激ならびに未刺激条件下でのサイトカイン産生に対する BWMP の影響

Figure 1-1 から、BWMP は、DBA/2 マウスの脾臓細胞の未刺激時の IFN- γ 産生を抑制した。そこで、BWMP の脾臓細胞によるサイトカイン産生に対する効果を分析した。オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞を BWMP (0、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で刺激し、48 時間培養後の上清中のサイトカイン産生量を測定した。Figure 1-2 (A-D)で示すように IFN- γ 産生は、BWMP の濃度依存的に有意に抑制された。一方、BWMP は TNF- α 産生を有意に促進した。

CAWS は、CLR の dectin-2 のリガンドである。次に、PAMPs として CAWS 刺激条件下での BWMP の影響を検討した。オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞を、CAWS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で刺激、さらに BWMP (0、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)を添加し、48 時間培養後のサイトカイン産生量を測定した。Figure 1-2 (E-H)で示すように、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-6 産生は、CAWS によって増加した。BWMP は、CAWS による TNF- α 、IL-6 産生への影響は見られなかったが、GM-CSF 産生は抑制傾向が、IFN- γ 産生は有意に抑制した。

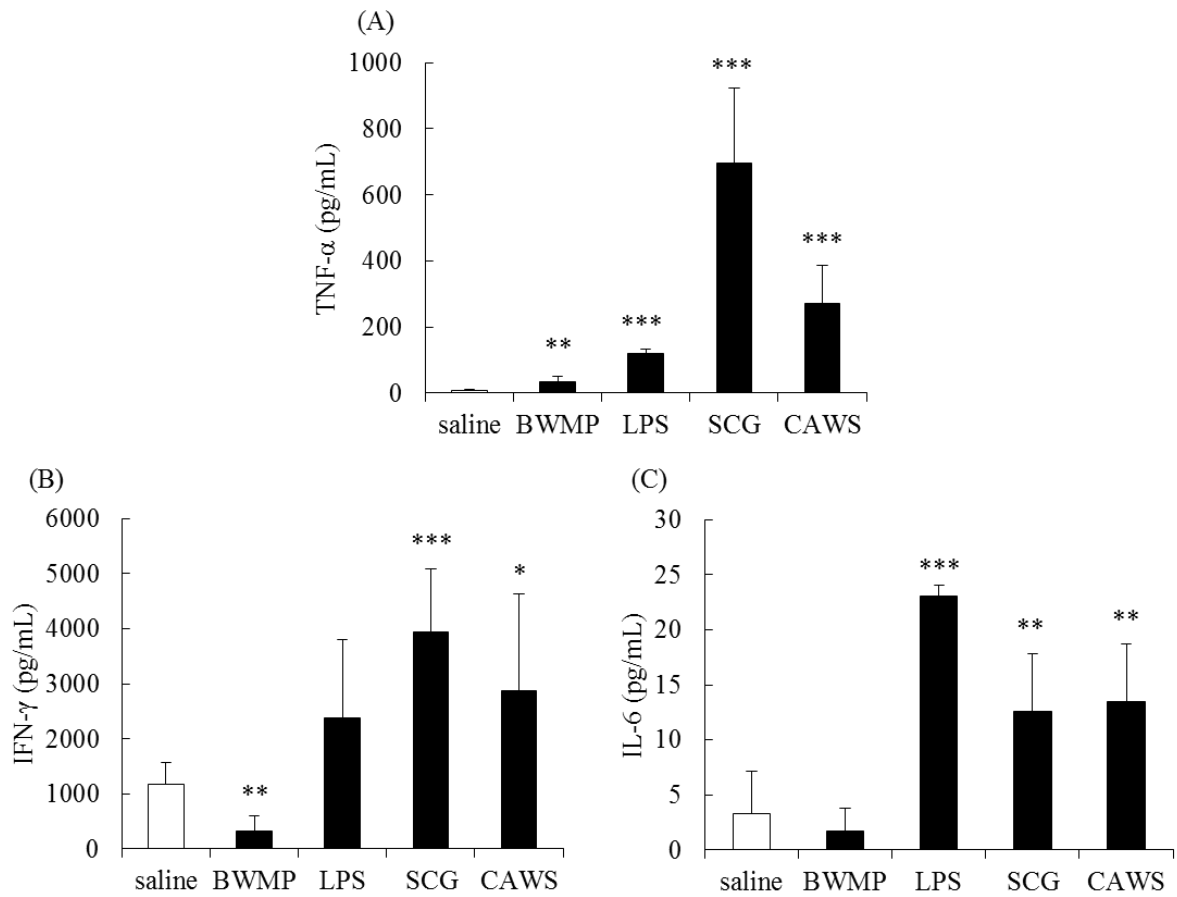


Figure 1-1. Cytokine production in splenocytes from DBA/2 mice.

Cells were incubated for 48 h with BWMP (100 μ g/mL), LPS (10 ng/mL), SCG (100 μ g/mL), or CAWS (100 μ g/mL). The concentrations of (A) TNF- α , (B) IFN- γ and (C) IL-6 were determined by ELISA. Significant differences from the control, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

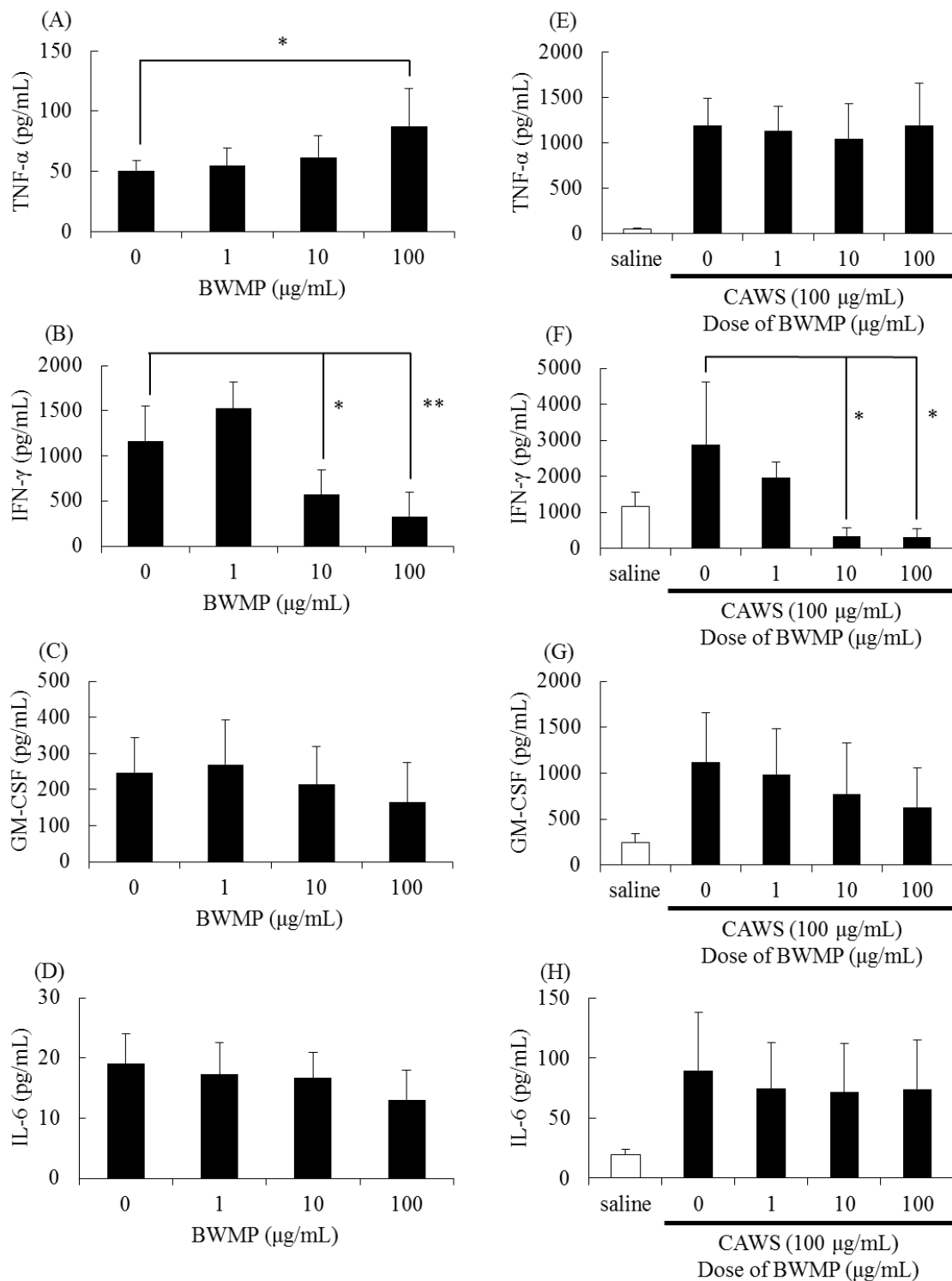


Figure 1-2. Cytokine production induced by CAWS in splenocytes from DBA/2 mice with BWMP.

Cells were incubated for 48 h with BWMP (0, 1, 10 and 100 µg/mL); (A-D) in the presence of CAWS (100 µg/mL); (E-H). (A, E) TNF-α, (B, F) IFN-γ, (C, G) GM-CSF and (D, H) IL-6. Significant differences, *p < 0.05, **p < 0.01.

1-1-3 GM-CSF 添加条件下における CAWS 刺激脾臓細胞からのサイトカイン産生に対する BWMP の影響

脾臓細胞を GM-CSF 添加培養すると、dectin-1、dectin-2 などの自然免疫受容体の発現が上昇する⁵⁶⁾。そこで、BWMP の IFN- γ 産生に対する効果を GM-CSF 添加条件下に検討した。Figure 1-3 で示すように、BWMP は、組み換えマウス GM-CSF (1 ng/mL) 添加条件においても、CAWS (100 μ g/mL) による IFN- γ 産生を抑制した。このことから、BWMP は、GM-CSF 存在の有無にかかわらず IFN- γ 産生に強く影響を及ぼしていることが明らかとなった。

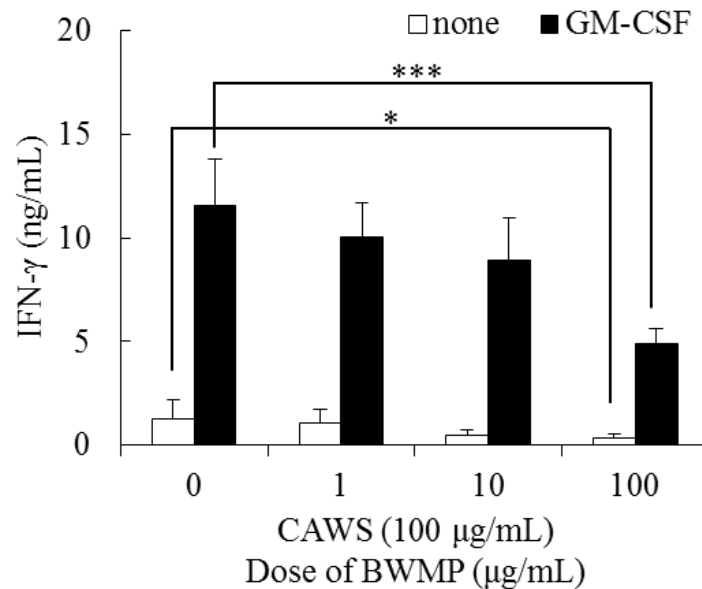


Figure 1-3. IFN- γ production induced by CAWS in splenocytes from DBA/2 mice with BWMP.

Cells were incubated for 48 h with BWMP (0, 1, 10, and 100 μ g/mL) in the presence of CAWS (100 μ g/mL) and in the presence or absence of rmGM-CSF (1 ng/mL). Significant differences, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

1-1-4 PAMPsによる脾臓細胞からのサイトカイン産生に対するBWMPの影響

共同研究者の吉田らは、BWMPが、dectin-1を介したIFN- γ 産生を選択的に抑制することを報告している⁵⁹⁾。そこで、BWMPによるIFN- γ 産生抑制機構をさらに詳細に分析するために、TLRsのリガンドや菌体由来 β グルカン、 α マンナンなどの様々なPAMPsでDBA/2マウスの脾臓細胞を刺激し、BWMPによる相互作用について検討した。オスのDBA/2マウスの脾臓細胞を、PAM3CSK4 (10 ng/mL)、Poly I:C (1 μ g/mL)、LPS (10 ng/mL)、CpG DNA (0.01 nM)、SCG (100 μ g/mL) またはCAWS (100 μ g/mL)で刺激し、さらにBWMP (100 μ g/mL)を添加、48時間培養後の上清中のサイトカイン産生量を測定した。Figure 1-4 (A-D)で示すように、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-6産生は、PAMPsによって増加した。これらのPAMPs中で、SCGとCAWSなどの多糖類の影響は、他のPAMPsよりも影響が強かった。BWMPは、これらのPAMPs刺激した際のIFN- γ 、GM-CSF産生を抑制した。また、BWMPによるIFN- γ 、GM-CSF産生の抑制の程度は、PAMPs毎に異なった。

DBA/2マウスは、自然免疫受容体を高発現していることから、これらの刺激に強い反応性を示す特徴がある。そこで、標準的なマウスであるC57BL/6に対するBWMPの効果を比較検討した。Figure 1-4 (E-H)に示すように、C57BL/6マウスでは、PAMPsによって誘導されるサイトカイン濃度は、C57BL/6の方がDBA/2より著しく低かった。BWMPの有無での産生を比較すると、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-6産生は、PAMPsによって増加し、BWMP添加条件下では、PAM3CSK4とLPSによるIFN- γ 産生が抑制された。

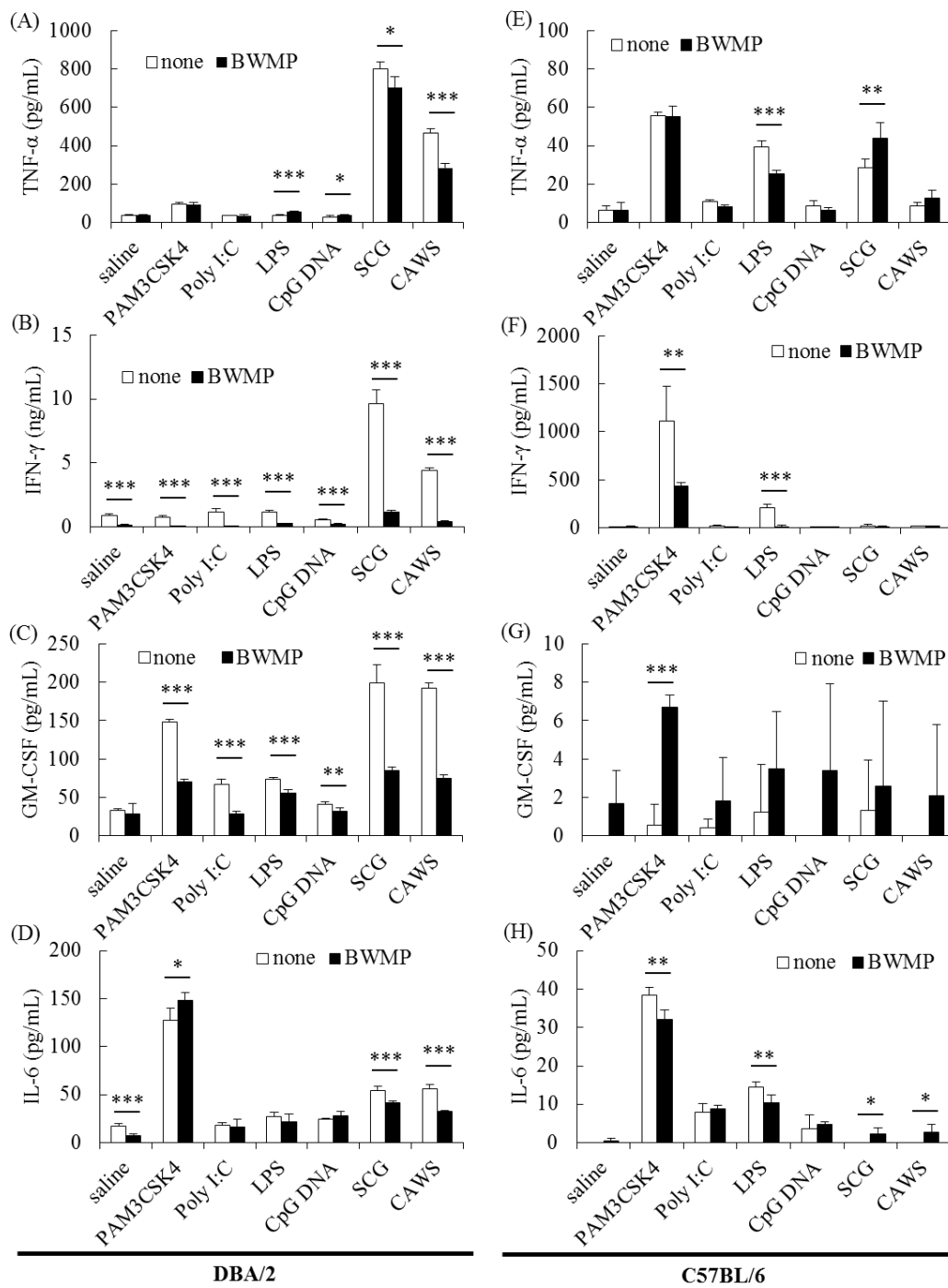


Figure 1-4. Cytokine production induced by PAMPs in splenocytes from DBA/2 or C57BL/6 mice treated with BWMP.

The splenocytes used (A-D) DBA/2 or (E-H) C57BL/6. Cells were incubated for 48 h with BWMP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of PAM3CSK4 (10 ng/mL), Poly I:C (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (10 ng/mL), CpG (0.01 nM), SCG (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or CAWS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The concentrations of (A, E) TNF- α , (B, F) IFN- γ , (C, G) GM-CSF, and (D, H) IL-6 were determined by ELISA. Significant differences from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

第二節 植物多糖 BWMP による T 細胞からのサイトカイン産生の抑制機構の検討

1-2-1 BMDC によるサイトカイン産生に対する BWMP の影響

脾臓細胞は、リンパ球、Mφ、DC 等が混在した *in vitro* 培養系である。したがって BWMP により IFN- γ 産生の選択的な抑制メカニズムは、純化した細胞系での解析が必要である。BWMP の作用をさらに詳細に検討するために、骨髄細胞を DC に分化した BMDC で BWMP の効果を検討した。オスの DBA/2 マウスの大腿骨由来 BMDC を BWMP (100 $\mu\text{g/ml}$)、LPS (10 ng/ml)、SCG (100 $\mu\text{g/ml}$)、CAWS (100 $\mu\text{g/ml}$) で刺激し 48 時間培養後の上清中のサイトカイン産生量を測定した。Figure 1-5 で示すように、BWMP、LPS、SCG、CAWS 刺激により、BMDCs による TNF- α 、IL-6 産生は上昇した。また、BWMP は濃度依存的に、BMDCs による TNF- α と IL-6 産生は上昇した。

さらに、BMDCs を、CAWS (100 $\mu\text{g/mL}$) と、BWMP (0、1、10、100 $\mu\text{g/mL}$) で刺激し、48 時間培養後の上清中のサイトカイン産生量を測定した。その結果、TNF- α 産生は、CAWS と BWMP 刺激した際、BWMP の濃度依存的に上昇した。以上のことから、BWMP は、DC によるサイトカインの産生を抑制せず、他の PAMPs 同様に上昇する事が明らかとなった。

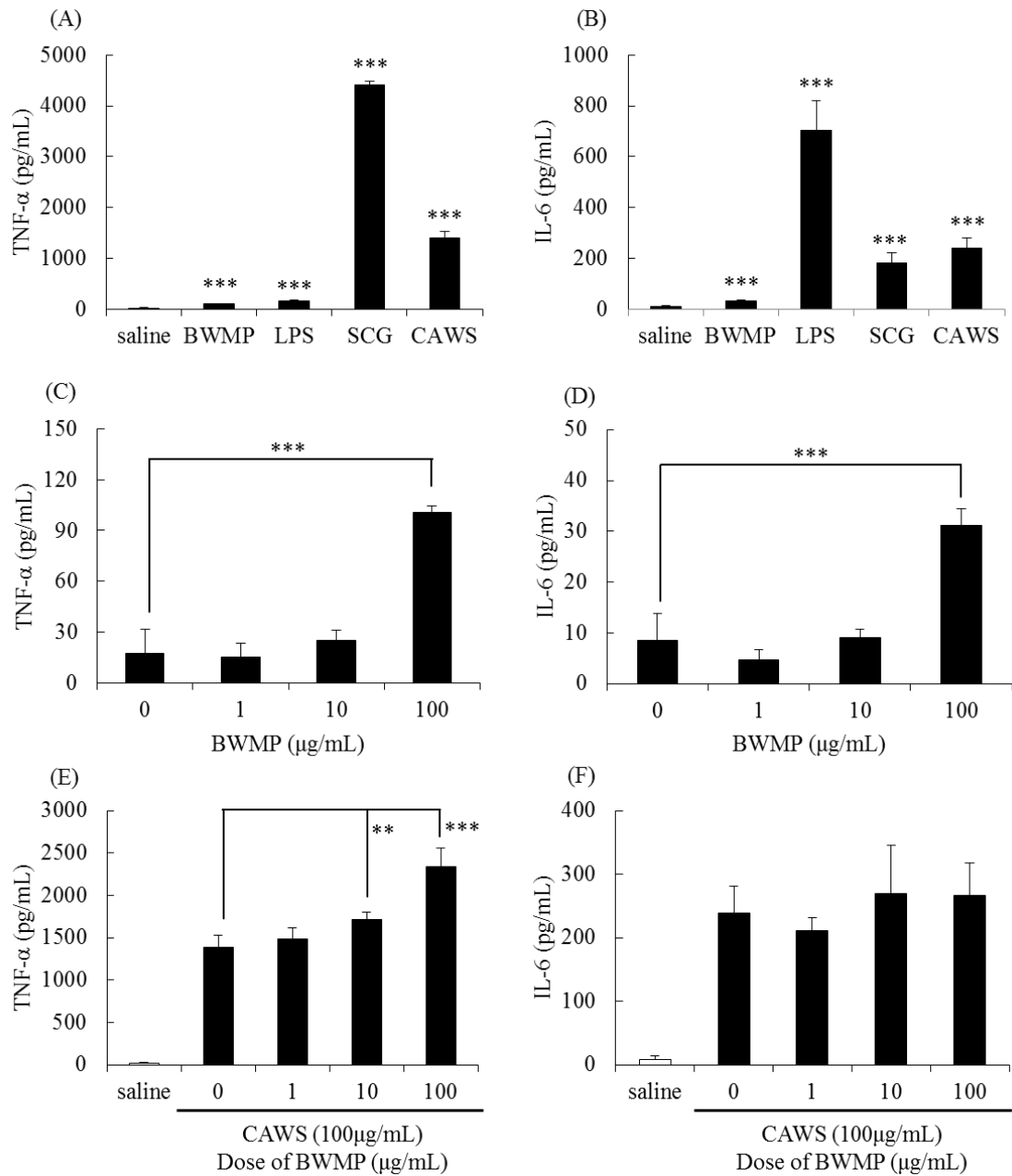


Figure 1-5. Cytokine production in BMDCs from DBA/2 mice.

Cells were incubated for 48 h with BWMP (100 μg/mL), LPS (10 ng/mL), SCG (100 μg/mL), or CAWS (100 μg/mL); (A, B), BWMP (0, 1, 10, and 100 μg/mL); (C, D) or in the presence of CAWS (100 μg/mL); (E, F). The concentrations of (A, C, E) TNF-α and (B, D, F) IL-6 were determined by ELISA. Significant differences from the control, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

1-2-2 SCG 刺激による脾臓細胞からのサイトカイン・ケモカイン産生に対する BWMP の影響

第一節において、BWMP は SCG により刺激された脾臓細胞からのサイトカイン産生、特に IFN- γ 産生を抑制することを明らかにした。また、Figure 1-5 で示すように、DC では BWMP によるサイトカイン産生抑制効果は見られなかった。そこで、BWMP によるサイトカイン産生抑制メカニズムを調べるために、培養上清のサイトカイン・ケモカイン濃度を、multiplex cytokine assay kit によって網羅的に測定した。DBA/2 マウスの脾臓細胞を、SCG (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で刺激し、BWMP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の添加非添加条件下に、48 時間培養後、上清中のサイトカイン・ケモカイン産生量を測定した。Figure 1-6 で示すように、BWMP は、SCG により産生される IFN- γ 、GM-CSF、monokine induced by gamma interferon (MIG : CXCL9)、interferon gamma-induced protein 10 (IP-10 : CXCL10)、IL-3、leukemia inhibitory factor (LIF) の産生を抑制した。特に、IFN- γ 、IL-3、MIG の産生は、BWMP によって著しく抑制された。

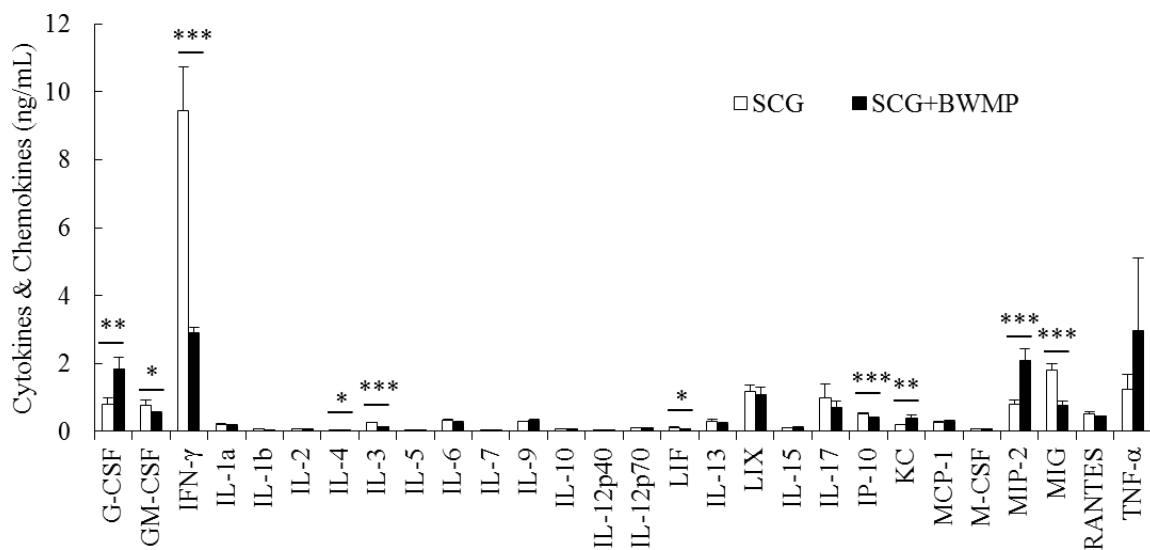


Figure 1-6. Effects of BWMP on SCG-induced cytokine and chemokine production by splenocytes from DBA/2 mice assessed using the multiplex assay.

Significant differences, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1-2-3 CD3 陽性 T 細胞のサイトカイン産生に対する BWMP の影響

Figure 1-6 で示すように、BWMP は SCG 刺激による脾臓細胞からの IFN- γ 、IL-3、MIG 産生を抑制した。MIG は、IFN- γ によって誘導されることから、IFN- γ 産生の抑制により減少したと考えられる。IFN- γ 、IL-3 は、活性化 T 細胞により産生される⁶²⁾。そこで、T-cell enrichment column により CD3 陽性 T 細胞を回収し、BWMP による T 細胞のサイトカイン産生に対する影響を検討した。オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞由来 CD3 陽性 T 細胞を、Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA)(500 ng/mL) + Ionomycin (20 nM)、マウス CD3 ϵ 抗体(250 ng/ml)、マウス CD28 抗体(100 ng/ml)で刺激し、BWMP (100 μ g/mL)の添加非添加条件下に、48 時間培養後の上清中のサイトカイン産生量を測定した。

Figure 1-7 (A-D) で示すように、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-4 産生は、PMA + Ionomycin とマウス CD3 ϵ 抗体により増加し、マウス CD3 ϵ 抗体では著しく増加した。BWMP はマウス CD3 ϵ 抗体による IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-4 産生を抑制し、特に IFN- γ 産生を著しく抑制した。

DBA/2 マウスは自然免疫受容体刺激に対して強い反応性を示す。そこで、第一節と同様に、標準的なマウスである C57BL/6 を用いて BWMP の効果を検証した。オスの C57BL/6N マウスの脾臓細胞由来 CD3 陽性 T 細胞を、PMA (500 ng/mL) + Ionomycin (20 nM)、マウス CD3 ϵ 抗体 (250 ng/mL)、マウス CD28 抗体 (100 ng/mL)で刺激し、BWMP (100 μ g/mL)の有無で、48 時間培養後の上清中のサイトカイン産生量を測定した。Figure 1-7 (E-H) で示すように、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-4 産生は、PMA + Ionomycin とマウス CD3 ϵ 抗体により増加し、マウス CD3 ϵ 抗体では著しく増加した。DBA/2 マウスと同様に、C57BL/6 マウスにおいても、BWMP はマウス CD3 ϵ 抗体によって誘導される IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF、IL-4 産生を著しく抑制した。

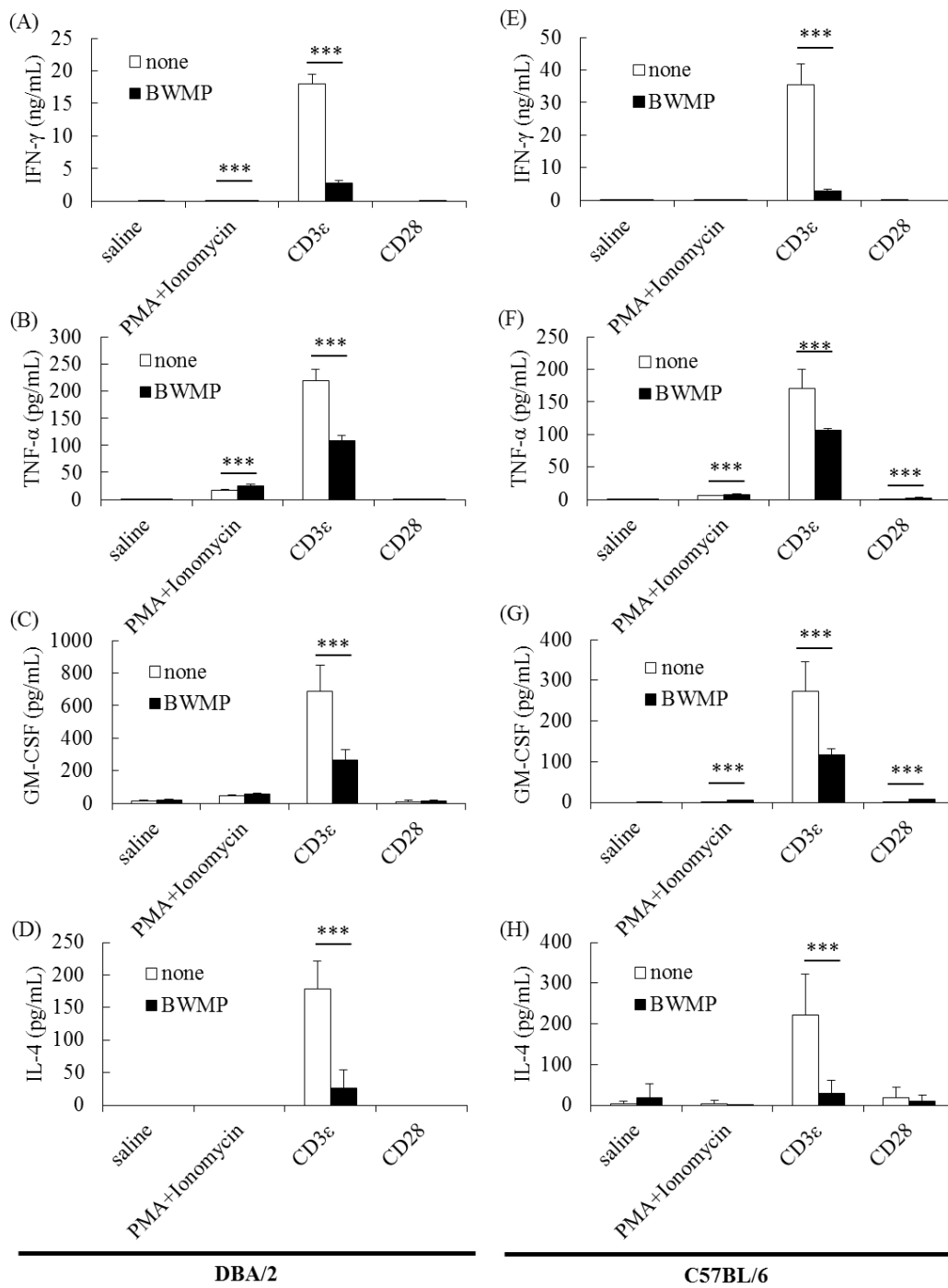


Figure 1-7. Effects of BWMP on cytokine production by splenic CD3⁺ T-cells from DBA/2 or C57BL/6 mice.

The splenic CD3⁺ T-cells used (A-D) DBA/2 or (E-H) C57BL/6. T-cells were incubated for 48 h with BWMP (100 μg/mL) in the presence of various stimuli, i.e., PMA (500 ng/mL), Ionomycin (20 nM), a mouse CD3ε antibody (250 ng/mL) or mouse CD28 antibody (100 ng/mL). The concentrations of (A, E) IFN-γ, (B, F) TNF-α, (C, G) GM-CSF, and (D, H) IL-4 were determined by ELISA. Significant differences, ***p < 0.001.

1-2-4 CD3 陽性 T 細胞の細胞増殖と IL-2、IFN- γ 産生に対する BWMP の影響

Figure 1-7 に示したように、BWMP は主に Th1 から産生される IFN- γ と Th2 から産生される IL-4 を抑制した^{63, 64})。BWMP は、T 細胞の増殖を抑制することにより、様々な T 細胞のサブセットに影響を与えている可能性がある。そこで、T 細胞の増殖を分析するために、BWMP のナイーブヘルパー T 細胞(Th0)への影響と IL-2 の産生について検討した。オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞由来 CD3 陽性 T 細胞を、マウス CD3 ϵ 抗体(250 ng/mL)で刺激し、BWMP (100 μ g/mL)の添加非添加条件で 48 時間培養後の細胞増殖能と上清中の IFN- γ 、IL-2 産生量を測定した。Figure 1-8 (A-C) より、BWMP は、マウス CD3 ϵ 抗体による T 細胞の細胞増殖能と IFN- γ 産生を抑制した。

一方、48 時間培養後では、IL-2 の上清中の濃度に違いは見られなかった。T 細胞は、増殖する際に産生した IL-2 を、オートクライン、パラクラインにより消費している。そこで、BWMP の IL-2、IFN- γ 産生に対する時間依存的な効果について検討した。オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞由来 CD3 陽性 T 細胞に、マウス CD3 ϵ 抗体(250 ng/mL)で刺激し、BWMP (100 μ g/mL)の有無で、1、2、4、8、20、48 時間培養後の上清中の IL-2、IFN- γ 産生量を測定した。また陰性コントロールとして、マウス CD3 ϵ 抗体(250ng/mL)刺激に tacrolimus (10 ng/ml)を追加した。Figure 1-8 (D, E) より、BWMP は、刺激後の培養 4、8、20 時間目の時点で IL-2 濃度は低下し、20、48 時間目で IFN- γ 濃度は低下した。

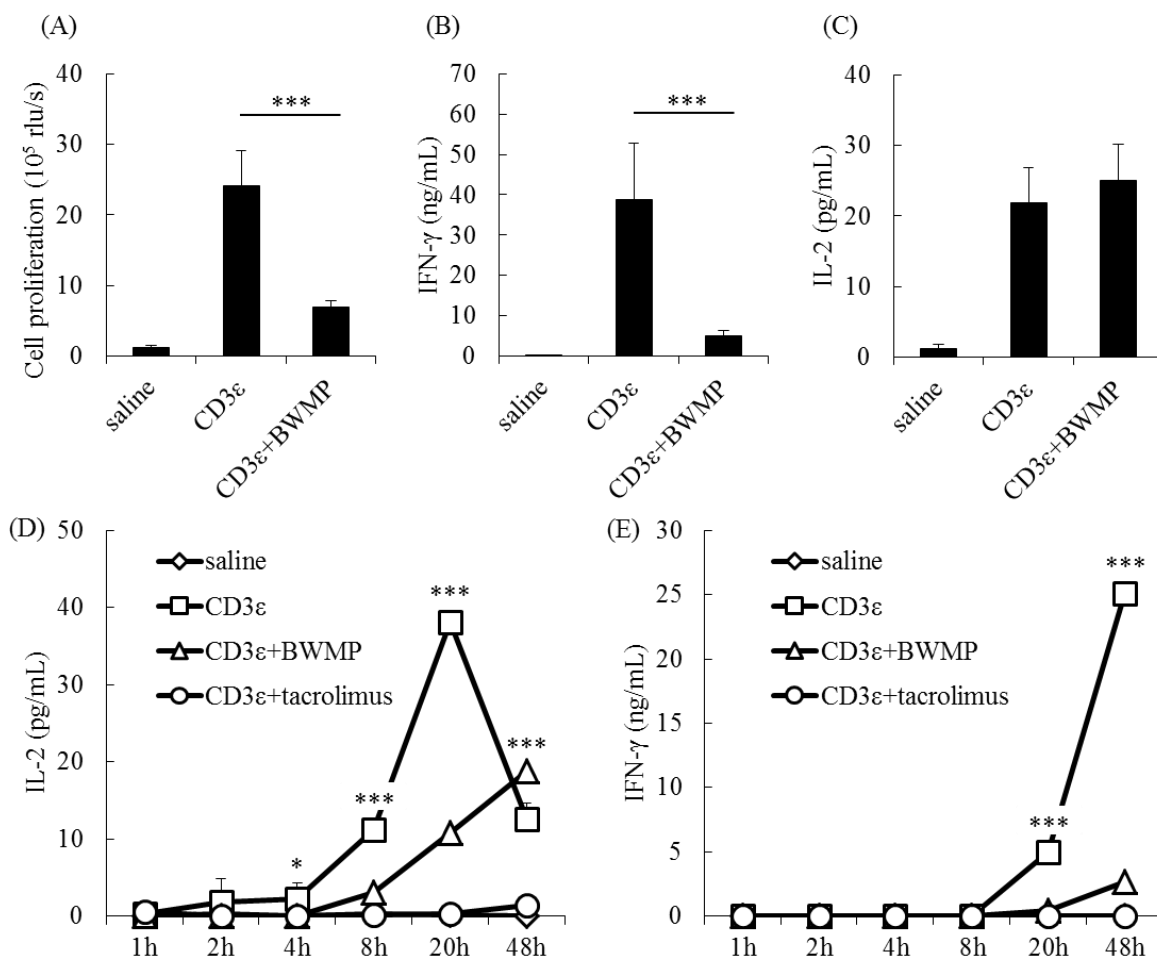


Figure 1-8. Effects of BWMP on cell proliferation, IFN- γ and IL-2, and time-dependent effect of BWMP on IL-2 and IFN- γ production by splenic CD3⁺ T-cells from DBA/2 mice. T-cells were stimulated for (A-C) 48 h with a mouse CD3 ϵ antibody (250 ng/mL) in the presence or absence of BWMP (100 μ g/mL), and stimulated for (D, E) 1, 2, 4, 8, 20, and 48 h with various stimuli in the presence or absence of BWMP (100 μ g/mL). A mouse CD3 ϵ antibody (250 ng/mL) and mouse CD3 ϵ antibody were used as stimuli. The immunosuppressant, tacrolimus (10 ng/mL) was used as a reference. (A) Cell proliferation was determined by BrdU. The concentration of (B and E) IFN- γ and (C and D) IL-2 were determined by ELISA. Significant differences; (D, E) CD3 ϵ vs CD3 ϵ +BWMP, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

1-2-5 CD3 陽性 T 細胞の細胞増殖と IL-2、IFN- γ 産生への BWMP 刺激添加タイミングの影響

Figure 1-8 で示すように、BWMP は、マウス CD3 ϵ 抗体で刺激された T 細胞による IL-2、IFN- γ 産生を抑制した。IFN- γ は、活性化 T 細胞により産生される¹⁹⁾。T 細胞の活性化には、2 つのプロセスが関与しており、第一は TCR からの刺激により IL-2 を産生する行程で、第二は T 細胞から産生された IL-2 をオートクラインやパラクラインにより消費し、増殖する行程である^{20, 21)}。

そこで、T 細胞をマウス CD3 ϵ 抗体で刺激し、刺激開始時または 24 時間培養後に BWMP で刺激することで、BWMP の活性化 T 細胞に対する影響を検討した。オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞由来 CD3 陽性 T 細胞を、マウス CD3 ϵ 抗体(250 ng/mL)で刺激し、培養 0 時間目と培養 24 時間目に BWMP (100 μ g/mL)を添加し、マウス CD3 ϵ 抗体刺激から培養 48 時間目の細胞増殖能と上清中の IFN- γ 産生を測定した。Figure 1-9 で示すように、BWMP は、培養 0 時間目に加えられたときが最も影響が強く、細胞増殖能、IFN- γ 産生を抑制した。これとは対照的に、培養 24 時間目に BWMP 刺激した場合、BWMP の T 細胞に対する細胞増殖能、IFN- γ 産生を抑制する効果は見られなかった。

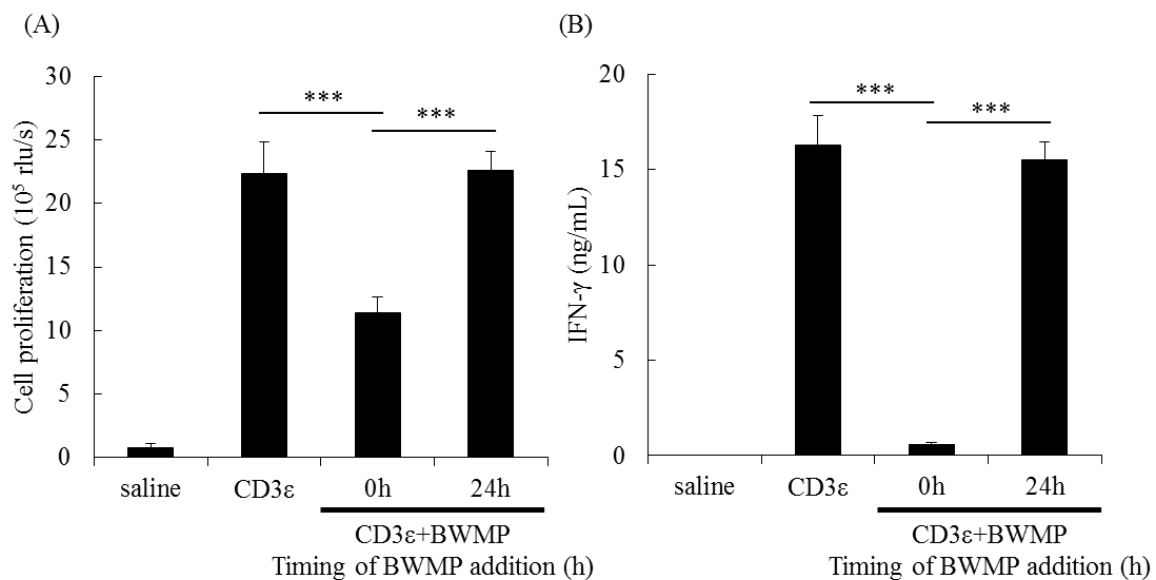


Figure 1-9. Assessment of the minimum incubation period of BWMP for cell proliferation and cytokine production by splenic CD3⁺ T-cells from DBA/2 mice.

(A) Cell proliferation was determined by BrdU. (B) The concentration of IFN- γ was determined by ELISA. Significant differences, ***p < 0.001.

1-2-6 CD3 陽性 T 細胞の IL-2 刺激による細胞増殖と IFN- γ 産生への BWMP の影響

T 細胞の増殖は、TCR を介した NF- κ B の活性と関連していることが知られている^{21, 22}。BWMP は IL-2 産生を抑制することから、IL-2 添加における T 細胞の細胞増殖と IFN- γ 産生に対する BWMP の影響について検討した。

オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞由来 CD3 陽性 T 細胞を、マウス CD3 ϵ 抗体 (250 ng/mL) と BWMP (100 μ g/mL) で同時に刺激し、さらに組み換えマウス IL-2 (0、1、10、100 ng/mL) を添加し、48 時間培養後の細胞増殖能、IFN- γ 産生を測定した。Figure 1-10 で示すように、IL-2 存在下では、細胞増殖能、IFN- γ 産生に対する BWMP の抑制効果は消失した。

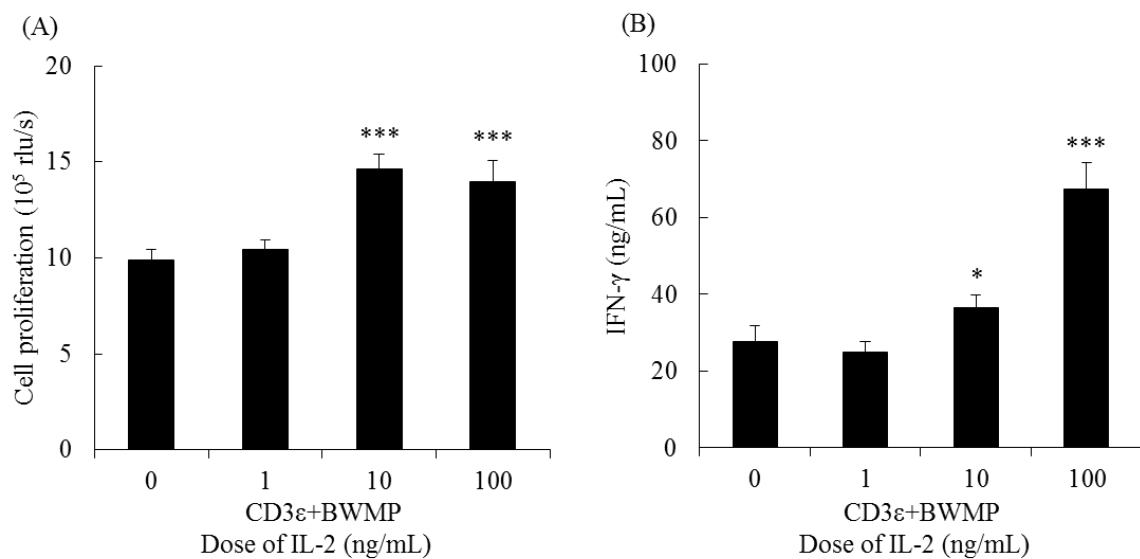


Figure 1-10. Effects of BWMP on cell proliferation and IFN- γ production by splenic CD3 ϵ T-cells from DBA/2 mice in the presence or absence of IL-2 (0, 1, 10, 100 ng/mL).

(A) Cell proliferation was determined by BrdU. (B) The concentration of IFN- γ was determined by ELISA. Significant differences from rm-IL-2 (0 ng/mL), * p < 0.05, *** p < 0.001.

第一章 考察

機能性食品はヒトの健康のために汎用されている。本章では、真菌、酵母、藻類、植物などの β グルカン、 α マンナンや植物多糖、細菌由来のLPSやCpG DNAなど、食品に含まれる自然免疫活性化物質(PAMPs)に着目し、T細胞機能への影響について検討した。さらに、食品中には、複数のPAMPsが併存する可能性もあることから、相互作用についても免疫機構の視点から検討した。

第一節に示した通り、PAMPs刺激によりサイトカイン産生が見られたが、BWMPは、未刺激時ならびにPAMPs刺激によるIFN- γ 産生をいずれも抑制した。他のサイトカイン産生への影響についても検討したが、それらへの影響はほとんど認められなかった。また、この効果と、自然免疫受容体の発現レベルとの関連性について検討するために、GM-CSFを培養系に添加してIFN- γ 産生を比較したが、BWMPによる抑制効果には影響を与えなかった。

BWMPはイネ科、ササ属の*S. veitchii*由来の高分子多糖類である。*S. veitchii*は、日本では隈笹と呼ばれ、民間療法として古くから汎用されている。前臨床試験において*S. veitchii*由来抽出物には、抗腫瘍、抗アレルギー性、抗炎症性、抗潰瘍、抗菌性、免疫賦活作用、血圧低下効果、高血糖、高脂血症の改善などのヒトの健康維持のために有益な様々な生物活性が認められている⁶⁵⁻⁷¹)。また、*S. veitchii*から、orientinやvitexinなどの抗酸化物質、phytoncideやvitamin K、chlorophyllなどの抗菌性物質、tricinなどの抗ウイルス物質が見出されている⁷²⁻⁷⁵)。さらに、多糖類としては、可溶性hemicellulose、ligninには抗腫瘍活性が、arabinoxylanには免疫賦活作用が見出されている^{76, 77})。

自然免疫系は、感染時の初期応答において、病原体由来のPAMPsが宿主免疫担当細胞のPRRsと反応し、種々の細胞の活性化やサイトカインネットワークを発動する。DC、M ϕ などのAPCは、病原体の抗原を認識して貪食作用を促進する。APCから細胞間相互作用により抗原がT細胞に提示され、認識し、活性化することでTh1またはTh2へ分化する。真菌に由来するTLRリガンドやCLRリガンドによりAPCからのシグナルを介して、Th1細胞はIFN- γ 産生を、Th2細胞はIL-4産生を促進する⁷⁸⁻⁸¹)。BWMPはIFN- γ 産生を中心に産生を制御したことから、DCとTh1細胞の間での細胞間相互作用のプロセスに影響を与えている可能性が考えられる。

また、BWMPは、PRRsを介したサイトカイン産生のみならず、未刺激条件下に産生されるIFN- γ 産生も抑制した。これらのことから、真菌、酵母、藻類、植物などのPAMPsの作用は、免疫調節系の中で広範に及んでいる可能性がある⁵⁹)。

脾臓細胞は、リンパ球、M ϕ 、DC等が混在したin vitro培養系である。したがってBWMPによるIFN- γ 産生の選択的な抑制メカニズムは、純化した細胞系で

の解析が必要である。そこで、骨髄から DC を分化誘導し、BWMP の影響を検討したところサイトカイン産生の抑制効果は認められず、むしろ促進的に作用した。次に、脾臓細胞から CD3 陽性 T 細胞を純化し、CD3 ϵ 抗体刺激によるサイトカイン産生に及ぼす BWMP の効果についてを検討したところ IFN- γ 産生ならびに IL-4 産生を抑制した。さらに、T 細胞の増殖機構について解析したところ、BWMP は、細胞増殖能ならびに IL-2 産生も抑制した。また、BWMP は培養初期に添加するほうが顕著な効果を示したことから、活性化前の T 細胞に影響を与え、IL-2 産生を抑制していることが示唆された。一方、外因性の IL-2 濃度が十分にある場合、T 細胞は IL-2 に反応し、増殖、IFN- γ を産生した。本結果は、BWMP は、IL-2 受容体の機能や、NF- κ B による Aurora B、Survivin の促進と G1/S チェックポイントの mammalian target of rapamycin (mTOR) の機能などの T 細胞の機能を抑制しないことから、ラパマイシンなどが示す mTOR 阻害作用とは異なる機構に基づくものであることが示唆された²²⁾。

BWMP による T 細胞の増殖能、IFN- γ 産生の抑制効果を打ち消すためには、高濃度の外因性 IL-2 を必要とした。IL-2 の感受性は、IL-2 受容体 α (CD25) の発現により上昇することから、BWMP により、CD25 の発現が低下したために、高濃度の IL-2 が必要であったと推測される⁸²⁻⁸⁴⁾。

IL-2 産生のプロセスは、TCR によって促進される。その後、T 細胞内の IL-2 の転写制御因子である NF- κ B、Nuclear factor of activated T-cells (NFAT)、Activator protein 1 (AP-1) にシグナル伝達される^{21, 22)}。Tacrolimus は、NFAT を抑制することで IL-2 産生を抑制し、結果として T 細胞の IFN- γ 産生を抑制する。また、tacrolimus の場合、DC からの TNF- α 産生も抑制することが知られている⁸⁵⁾。一方、BWMP は、DC からの TNF- α 産生を抑制しなかったことから、tacrolimus とは異なる機構で IL-2 産生を抑制しているものと考えられる。

本章では、様々な PAMPs を用いてサイトカイン産生パターンを比較検討することで、個々の PAMPs の特徴づけを行った。その結果、1) DBA/2 マウスと C57Bl/6 マウスでは PAMPs ごとにサイトカイン産生パターンが著しく異なり、2) DBA/2 マウスは dectin-1、dectin-2 リガンドによる刺激の応答性が特に強く、3) TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-6 産生は PAMPs ごとに産生パターンが異なり、4) BWMP は IFN- γ 産生を特異的に抑制し、5) BWMP の抑制効果は骨髄由来の DC では認められない、等の特徴づけができた。多くの PAMPs は、受容体である PRRs が DC や M ϕ といった APC 側に発現しており、T 細胞への作用は、細胞間相互作用を介したものが主であるものと思われる。一方、BWMP は IFN- γ 産生を制御するという特徴を示し、この作用は T 細胞に対する直接的な作用であることを明らかとした。BWMP は植物多糖であり、構造の概要はすでに報告しているが、特異的な受容体等、活性発現機構はまだ十分には解明しきれていない。BWMP の特徴的な T 細胞制御機構を食品や医薬品に応用するためには、さ

らに詳細な検討が必要である(Figure 1-11)。

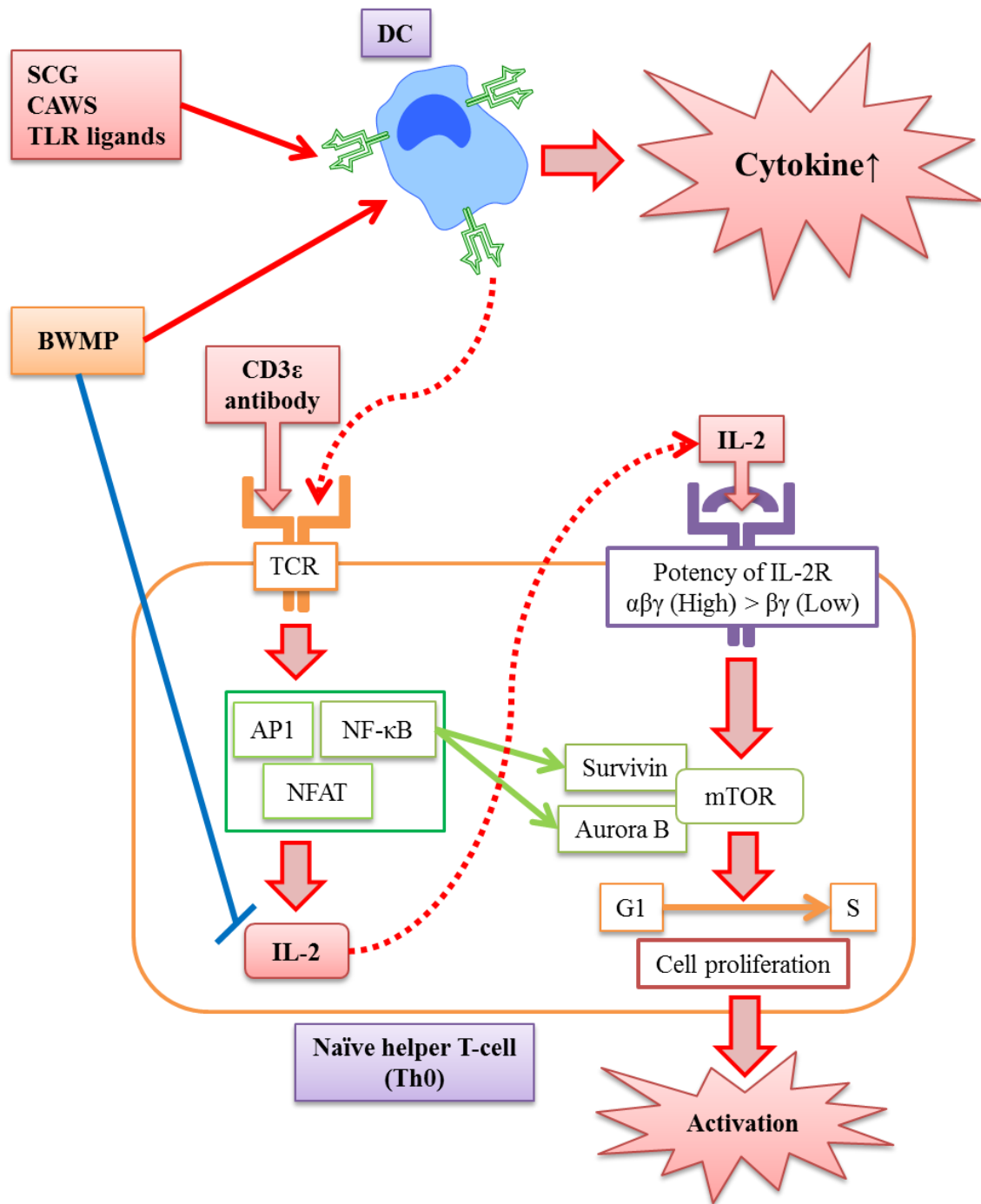


Figure 1-11. Effect of PAMPs on modulation of immune function.

第二章 食品由来の自然免疫活性化物質による血管炎の修飾と NK 細胞の関連性に関する検討

緒論に示したごとく、NK 細胞機能は免疫力低下と密接に関連すると考えられている。NK 細胞機能を制御することができれば、免疫力低下を軽減、または積極的に増強することができる可能性がある。NK 細胞は、immunoglobulin (Ig)G の Fc 部分と結合する Fc 受容体を発現しており、液性免疫により感作された細胞に ADCC を起こすだけでなく、APC との細胞間相互作用を介した反応によっても傷害活性が上昇する。自然免疫活性化物質(PAMPs)は、感染症における自然免疫系の活性化において重要であるばかりでなく、食品中にも含有されており、それらは食事を通じての恒常的な免疫機能の向上に関わっている可能性がある。したがって、NK 細胞機能と自然免疫活性化物質の作用の関連性を追求することは、NK 細胞制御法を開発するうえにおいて意義あるものと思われる。

自然免疫受容体 Dectin-1 は、真菌感染に対する生体防御機構にとって重要であるばかりでなく^{52, 86-88)}、APC に発現し、Th17 を介した獲得免疫系の誘導と制御にも関連している^{89, 90)}。リガンドである β グルカンや α マンナンは、真菌細胞壁の主要な構成成分である⁹¹⁻⁹³⁾。 β 1,3/1,6 グルカンは堅い骨格を構成し、細胞壁を強固にしており、真菌感染において、TNF- α などの炎症性物質の産生、補体の活性など、様々な生物活性を示す^{94, 95)}。一方では、菌類、酵母類は有用な食品素材としても用いられている。

多糖は、特異的な抗体を誘導しにくいと考えられていることことから、NK 細胞の ADCC 機能への影響も少ないものと考えられてきた。むしろ、抗原性の低さを利用することで、免疫賦活化物質として医薬品へも応用されてきた。 β グルカンについても抗原性が低いものと一般的に認識されてきたが、石橋らはヒトや様々な動物の血清中から、抗 β グルカン抗体が存在することを発見した⁹⁶⁾。また、 β 1,3 グルカン陽性の抗体価は、真菌症に感染した患者の症状によって変化することを明らかとしてきた⁹⁷⁻⁹⁹⁾。また、 α マンナンである CAWS は、マウスに投与することで KD 患者に類似した血管炎を心臓の冠状動脈起始部に誘発する^{100, 101)}。KD は、幼少時に発症する自己免疫疾患であり、1961 年、川崎富作により特定された^{102, 103)}。また、CAWS を用いた研究から、血管炎の重症度がマウスにより異なり、CBA/j では軽度の血管炎を、DBA/2 では重篤な致死性の血管炎を誘発する⁵⁶⁾。CAWS は、可溶性多糖類でありマンナン部位は、主鎖は α 1,6 マンナン、側鎖は α 1,2 と α 1,3 マンナンで構成されている¹⁰⁴⁾。

当教室では既に、自然界に存在する様々な真菌や酵母から β グルカンや α マンナンを分離している。また、標準的な実験動物飼料中には、酵母由来の β グルカンが豊富に含まれている。腸管粘膜には β グルカン認識受容体が発現しており、飼料中の β グルカンが刺激となり、全身の免疫機構に影響を与えること

が報告されている。

第二章では、真菌などの β グルカンや α マンナンに対する抗体の特徴を明らかにすることを目的として、特異抗体の力価と交差反応を検討した(第一節)。また、飼料ならびに含有される β グルカンの影響を明らかにすることを目的として、飼料の β グルカンの有無と CAWS 血管炎の病態との関連性について検討した(第二節)。さらに、病態と NK 細胞の機能との関連性を明確にすることを目的として、脾臓細胞を用いた *in vitro* 評価系ならびに、CAWS 血管炎モデルを用いた *in vivo* 評価系を用いて検討した(第二節)。

第二章 実験の部

実験材料 : RPMI 1640 medium は、Invitrogen 社を用いた。Gentamycin sulfate、IgG from human serum、IgM from human serum、Anti-human IgG (Fc Specific)-peroxidase (POX) conjugate、Anti-human IgM (μ -chain specific)-POX conjugate、Anti-human IgA (α -chain specific)-POX conjugate、laminarin from *Laminaria digitata*、BSA、PKH-26 は、Sigma-Aldrich 社を用いた。FBS は、Gibco |Life Technologies 社を用いた。TMB microwell peroxidase substrate system は、KPL Inc.を用いた。Rm GM-CSF は、BioLegend 社を用いた。LPS (TLR 4) from *Escherichia coli* O111:B4 は、フェノール抽出法により分離したものをを用いた。生理食塩液(生理食塩水) は、大塚製薬株式会社を用いた。Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (tween 20)は、和光純薬工業株式会を用いた。Kenketu glovenin-I for i.v. injections (IVIg) は、日本製薬株式会社を用いた。Human Reference Serum は、Bethyl Laboratories 社を用いた。Laminarin from *Eisenia bicyclis* は、東京化成工業株式会社を用いた。TO-PRO-3 (TP3)は、Molecular Probes 社を用いた。Fungitec G-test MKII は、日水製薬株式会社を用いた。AC buffer は、NH₄Cl (8.29 g)を Tris-HCl buffer (pH 7.5) に溶解して 1000 mL としフィルター滅菌した。YAC-1 (RCB1165)は、RIKEN Cell Bank のものをを用いた。非働化 FBS、C-limiting medium、PBS、0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5)、ACK-lysing buffer は、第一章と同様に調整した。

Soluble dectin-1-Fc の作成 : 可溶性 dectin-1 はヒトの免疫グロブリン(IgG1)の Fc 部分と dectin-1 の糖鎖認識受容体(CRD)の融合タンパク質(sdectin-1)として設計し、組み換え型 dectin-1 を作成した。組換え体の cDNA を 293T 細胞に組み込み、組換え型 Fc キメラ・タンパク質(sdectin-1)は、Hitrap Protein A コラム(GE Healthcare and Biotechnology)を用いて培養上清から回収した¹⁰⁵⁾。

Candida solubilized beta-glucan (CSBG)の作成 : 脱脂乾燥した *C. albicans* (NBRC 1385)菌体(2 g)を 4°C 条件下で 1 日、NaClO 溶液で酸化させ、反応混合物を遠心し、不溶性画分を回収した。乾燥した画分を Me₂SO₄ に懸濁し、超音波処理後、遠心分離して、可溶化画分をエタノールとアセトンで再び乾燥した。これを、CSBG (Candida 由来 β -1,3-D-グルカン)とした¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾。

Aspergillus solubilized beta-glucan (ASBG)の作成 : Aspergillus 由来のアセトン乾燥菌糸(2 g)を、4°C 条件下で 1 日、NaClO 溶液で酸化させた。反応終了後、反応混合物を、遠心分離し、不溶性画分を回収した。不溶性画分を 8M の尿素の中に溶解し、120°C、20 分でオートクレーブ処理し、可溶化画分を回収した。これを再度エタノールとアセトンにより乾燥した。これを、ASBG (Aspergillus

由来 β 1,3-D-グルカン)とした¹⁰⁹⁾。

Agaricus braziliensis glucan by repeated extraction with hot water (AgHWE-1), cold NaOH (AgCA-1)の作成：乾燥粉末 *Agaricus braziliensis* (*A. braziliensis*)を、121°C の熱水で2時間抽出し、抽出物を4倍量の EtOH で処理し得られた多糖画分を AgHWE-1 とした。残渣は、さらに熱水で二回抽出した。熱水処理後の残渣を、10%の NaOH と5%の尿素で、4°C、1日間冷アルカリ処理し、抽出物を中和、透析、EtOH 沈殿し、得られた多糖画分を AgCA-1 とした¹¹⁰⁾。

SCG の作成：第一章参照。

CAWS の作成：第一章参照。

BWMP の作成：第一章参照。

実験動物：日本 SLC 株式会社の雄性 DBA/2 マウス、雄性 C57BL/6N マウスを用いた。

動物飼料：CE-2 は日本クレア株式会社、AIN93G はオリエンタル酵母株式会社を用いた。

実験動物の管理：実験プロトコルは、東京薬科大学実験動物委員会の承認 (P15-42)を得た。飼育環境は第一章参照。本実験では、飼料として CE-2 または AIN93G を与えた。

血管炎モデルマウスの作成：4週齢の雄性の DBA/2 マウスを、CE-2 または AIN93G の飼料で1週間順化後、腹腔に PBS または PBS に溶解した CAWS (250 μ g/匹)を5日間連続投与した。投与したマウスは、投与後1日目、3日目、7日目、14日目、28日目に供し、体重、心臓、脾臓、肝臓、腎臓の重量を測定、小腸、大腸の長さを測定した。脾臓は、以下の培養の方法で調整した。心臓、肝臓、腎臓、小腸、大腸は、切片とし観察した。

生存率：上記と同様に、4週齢の雄性の DBA/2 マウスを、CE-2 または AIN93G の飼料で1週間順化後、腹腔に PBS または PBS に溶解した CAWS (1 mg/匹)を5日間連続投与した。その後、死亡するまで観察した。生存率は、カプラン=マイヤー法を用いた。

マウス脾臓細胞の調製：マウスは CO₂ により供し、脾臓を摘出した。脾臓を RPMI 1640 medium 中でステンレスメッシュで懸濁し、1200 rpm×5 min 4°C で遠心分離

した。遠心後、細胞懸濁液の赤血球を刺激培養時は ACK-lysing buffer、NK 細胞傷害活性時は AC buffer で溶血し、RPMI 1640 medium で 2 回洗浄した。顕微鏡下で細胞数を計測し、細胞濃度を調整し、Gentamycin sulfate (50 µg/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中に懸濁し、使用まで氷冷中に保存した。脾臓細胞は、96 well 平底プレートを使用し、37°C・5% CO₂ 環境下で培養した。

標的細胞 YAC-1 の調製: マウスの NK 細胞特異的標的細胞である YAC-1 を使用した。YAC-1 は、Gentamycin sulfate (50 µg/mL) と非働化 FBS を 10% 含む RPMI 1640 medium 中で 37°C・5% CO₂ 環境下、非接触状態で培養した。標的細胞は、PKH-26 で染色した。染色後の標的細胞を RPMI 1640 medium で 2 回洗浄した。

マウス脾臓細胞由来 NK 細胞の活性測定: 染色した標的細胞と脾臓細胞を共に 96 well U 底プレートへ 200 µL 入れ、37°C・5% CO₂ 環境下で 24 時間培養した。脾臓細胞と標的細胞の比率(E:T)は、100:1、50:1、25:1 で行った。死細胞は TP3 で染色した。細胞の自然死を、標的細胞のみ培養したもので決定した。測定は、in vitro は BD FACS Accuri C6、in vivo は BD FACS Canto (BD Biosciences 社)で行った。PKH-26 標識の標的細胞を FL2 または phyco-erythrin で検出した。TP3 染色された死細胞を FL4 または allophycocyanin により検出した。PKH-26 標識された細胞数を 3000 個測定し、そこから死細胞の割合を割り出した。解析は、FlowJo (Tree Star Inc.)を用いた¹¹¹⁾。

血清中抗 β グルカン、α マンナン抗体の検出: 96well Nunc プレートに 0.1 M sodium carbonate buffer に溶解した β グルカン、α マンナン(25 µg/mL)を添加し、4°C で一晚固相化した。固相化後を、0.05%の Tween 20 を含んだ PBS (PBST)で洗浄し、0.1%の BSA を含んだ PBST (BPBST)で 37°C・60 分間ブロッキングした。ブロッキング後、PBST で洗浄し、BPBST に溶解した未処理ヒト血清、ヒト血清由来 IgG または IgM を添加し、37°C・60 分反応した。反応後、PBST で洗浄し、BPBST に溶解した POX 標識抗ヒト IgG、IgM または IgA 抗体を添加し、37°C 30 分反応した。反応後、PBST で洗浄し、TMB で発色させた。発色現像は 1N のリン酸で停止し、450/630 nm の吸光度を測定した。

サイトカインの測定: 細胞培養上清中のサイトカイン濃度は、ELISA キットを用いて測定した。TNF-α、IFN-γ 濃度は BioLegend 社のものを使用して測定した。

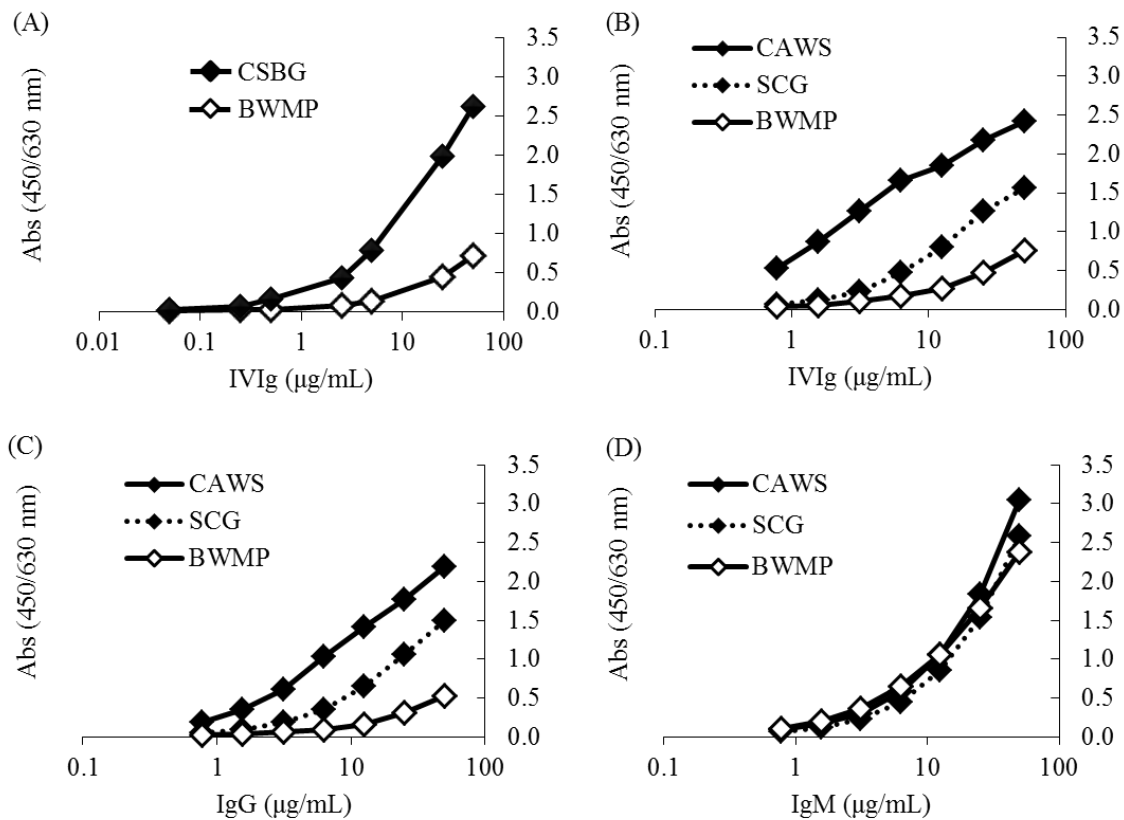
有意差検定: 本研究における有意差検定は、特に記載のある場合を除き Student's *t*-tests によって行った。生存率はログランク検定によって行った。p<0.05 のものを「有意差あり」と判定した。

第一節 PAMPs に対する抗体産生に関する検討

2-1-1 自然免疫活性化作用を有する多糖類に対する抗体に関する検討

抗体は、体内に侵入してきた細菌やウイルス、感染した細胞を抗原として認識し結合する。抗原抗体複合体は、Mφ や DC などの貪食能を有する食細胞が認識、貪食することで免疫担当細胞を活性化するとともに病原体を排除する。また、NK 細胞では、Fc 認識受容体を介して ADCC を示す。これらのことから、抗体は、感染防御機構において多彩な機能を発揮し重要な役割を担っている。そこで、真菌、酵母、藻類、植物由来の β グルカン、 α マンナンに特異的な抗体の有無について検証した。CSBG、CAWS、SCG、BWMP を ELISA プレートに固層化し、ヒト血清中抗体の結合能を検討した。固層化した CSBG、CAWS、SCG、BWMP に、献血血液から製造された医療用グロブリンである IVIg、ヒト血清由来の実験用に市販されている IgG、IgM と結合させ、IgG、IgM の結合能を測定した。Figure 2-1 に示すように、CSBG、CAWS、SCG、BWMP は IVIg、IgG、IgM と結合した。また、IVIg の相対的な力価を比較したところ、BWMP の力価が最も低かった。IgG も IVIg と類似した結果となり、BWMP の力価が最も低かった。

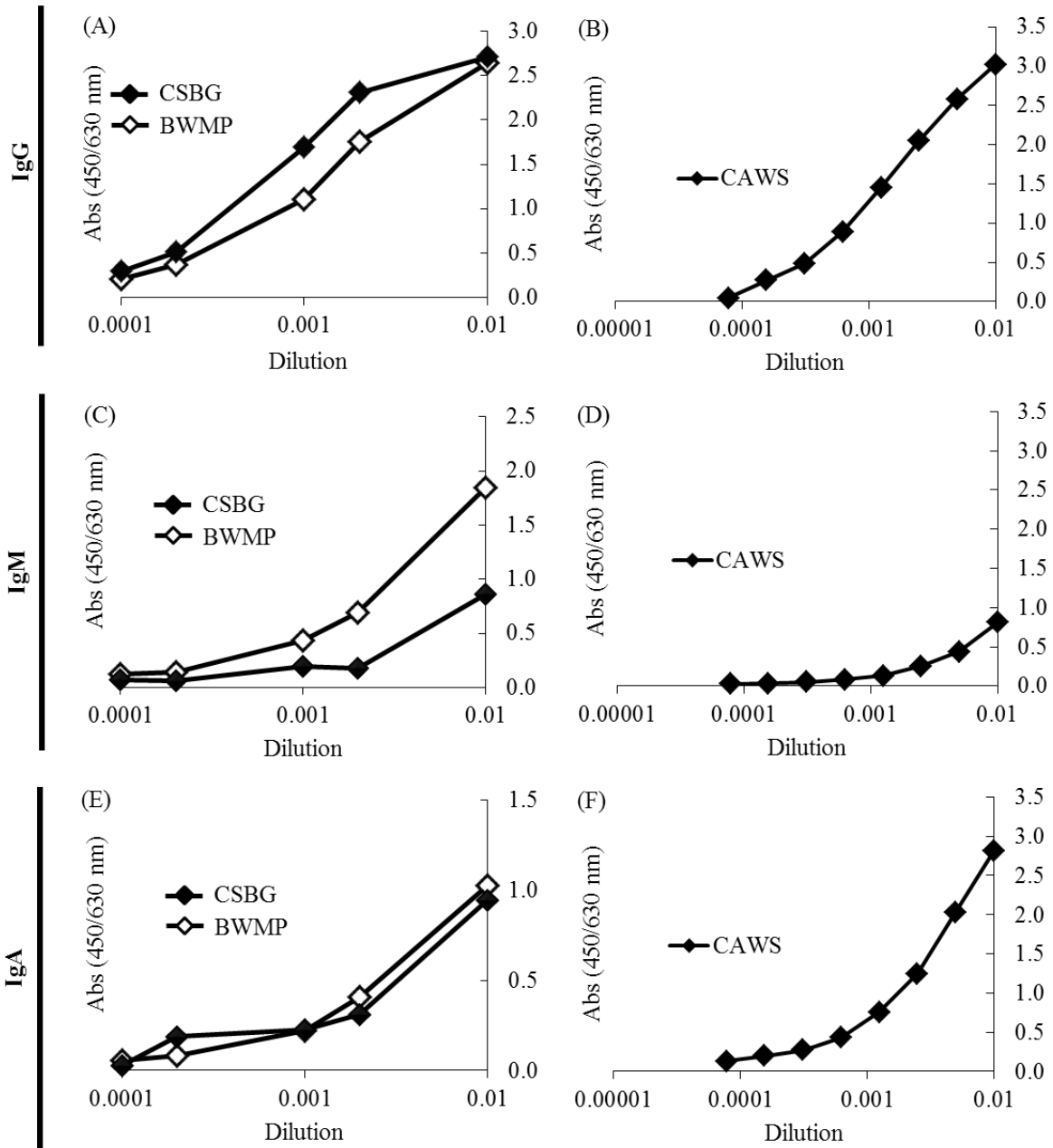
さらにアイソタイプを分析するために、CSBG、CAWS、BWMP を ELISA プレートに固相化し、未処理ヒト血清中の抗体と結合させ、IgG、IgM、IgA に対する特異抗体を用いて力価を比較した。Figure 2-2 で示すように、CSBG、CAWS、BWMP に対する抗体は、IgG、IgM、IgA のいずれも含んでいた。以上のことから、IVIg、IgG、IgM、IgA は β グルカン、 α マンナン等の自然免疫活性化多糖に対する特異抗体を含むことが明らかとなった。



Reactivity of IVIg, IgG and IgM from human serum to CSBG, CAWS, SCG and BWMP-coated plates

Figure 2-1. Comparison of the class-specific antibody titer of CSBG, CAWS, SCG and BWMP assessed by class specific anti-immunoglobulin.

Each ELISA plate was coated with CSBG, CAWS, SCG or BWMP, respectively. Various concentrations of (A, B) IVIg, (C) IgG or (D) IgM from human serum were added to each well, pre-coated with CSBG, CAWS, SCG or BWMP, and the titer of antibody binding was detected with anti-human (A-C) IgG or (D) IgM-POX.



Reactivity of human reference serum to CSBG, CAWS and BWMP-coated plates

Figure 2-2. Comparison of the class-specific antibody titer of CSBG, CAWS and BWMP assessed by class specific anti-immunoglobulin.

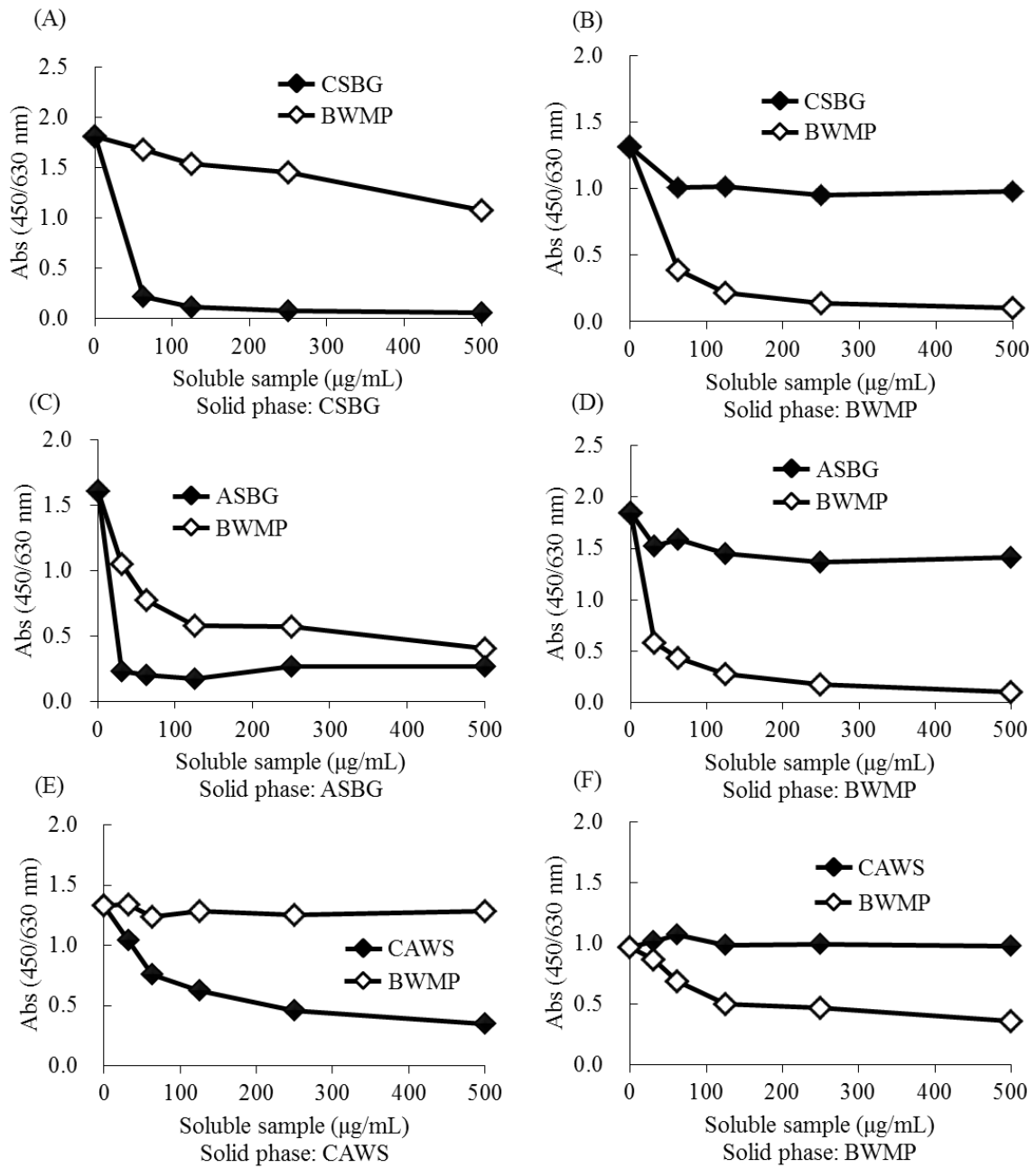
Each ELISA plate was coated with CSBG, CAWS or BWMP, respectively. Various concentrations of (A-F) human reference serum were added to each well, pre-coated with CSBG, CAWS or BWMP, and the titer of antibody binding was detected with anti-human (A, B) IgG, (C, D) IgM, or (E, F) IgA-POX.

2-1-2 β グルカン、 α マンナンを認識する抗体との交差反応

S. vetchii の糖鎖構造について、共同研究者である坪井らがラムノース、アラビノース、キシロース、マンノース、グルコース、ガラクトースから成るヘテロ多糖類を含むことを報告している⁶⁰⁾。これらの糖鎖は、抗 *Sasa* 抗体のエピトープである可能性がある。一方、石橋らは、ヒト血中に抗 β グルカン抗体が存在することを明らかにし、その抗体は真菌感染防御の重要な因子であることを報告している⁹⁶⁾。そこで、CSBG、ASBG、CAWS を ELISA プレートに固層化し、IVIg を用いて BWMP との交差反応性について検討した。Figure 2-3 (A, C, E) で示すように、BWMP は、CSBG に対する IVIg の結合、ASBG に対する IVIg の結合を競合的に阻害した。しかし、BWMP は、CAWS に対する IVIg の結合を阻害しなかった。これらのことから、BWMP には、CSBG や ASBG などの β グルカンと免疫化学的に類似の構造を有していることが示唆された。また、BWMP を ELISA プレートに固層化し、CSBG、ASBG、CAWS を用いて交差反応を比較した。Figure 2-3 (B, D, F) で示すように、BWMP は、ASBG、CSBG と結合する IVIg と競合反応を示した。以上のことから、CSBG や ASBG と BWMP の交差反応において、BWMP のエピトープの一部は β グルカンとも反応することが示された。

さらに、Figure 2-1 (D) で示すように IgM では、 α マンナンである CAWS と β グルカンである SCG で力価に違いが見られなかった。そこで、 α マンナン、 β グルカンに対して共通して結合する抗体の有無についても検討した。CAWS を ELISA プレートに固相化し、CAWS、SCG、BWMP の有無で IVIg、IgG、IgM との結合反応の競合性を検討した。

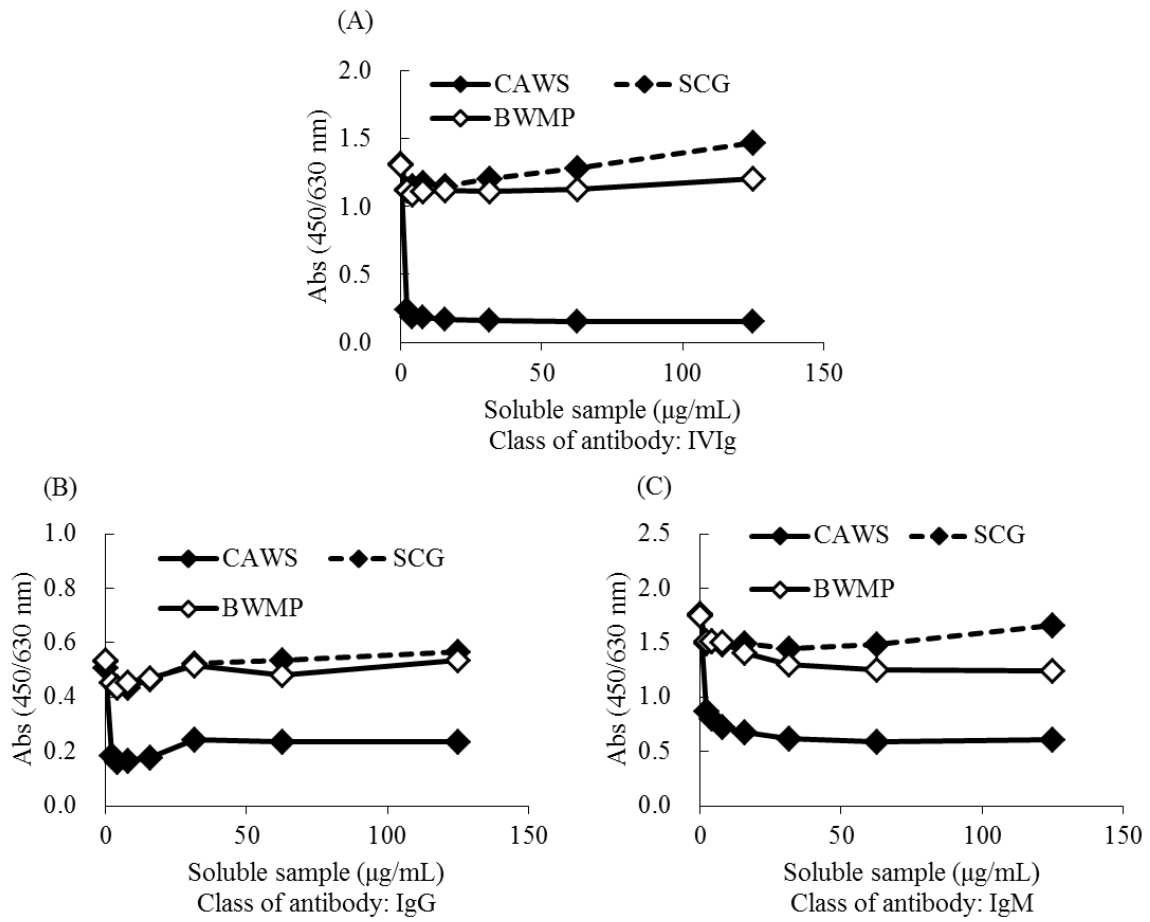
Figure 2-4 で示すように、CAWS は、SCG と結合する IVIg、IgG、IgM で結合反応の阻害が見られないことから、IVIg、IgG、IgM は、 β グルカン、 α マンナンの各々に対し、特異的なエピトープを認識していることが示唆された。一方、BWMP は、CAWS と結合する IgM と競合反応を示した。このことから、BWMP は α マンナンと免疫化学的交差性を示す構造を含有していることが示唆された。



Reactivity of IVIg to CSBG, ASBG, CAWS and BWMP-coated plates

Figure 2-3. Assessment of the specificity of immunoreactivity by the addition of soluble β -glucans or α -mannan.

Each ELISA plate was coated with (A) CSBG, (C) ASBG, (E) CAWS or (B, D, F) BWMP, respectively. IVIg was added to each well in the presence of various concentrations of soluble antigens. Plate bound immunoglobulin was detected with anti-human IgG-POX.



Reactivity of IVIg, IgG and IgM to CAWS-coated plates

Figure 2-4. Assessment of the specificity of immunoreactivity by the addition of soluble β -glucans or α -mannan.

Each ELISA plate was coated with (A-C) CAWS. (A) IVIg, (B) IgG or (C) IgM was added to each well in the presence of various concentrations of soluble antigens. Plate bound immunoglobulin was detected with anti-human (A, B) IgG or (C) IgM-POX.

2-1-3 様々な β グルカンと抗体との競合反応

交差反応をより明らかにするために、 β 1,3 グルカンである CSBG、ASBG、laminarin-Sigma、 β 1,6 グルカンである AgHWE-1、AgCA-1、laminarin-TCI など様々な β グルカンを ELISA プレートに固層化した。IVIg、IgG、未処理ヒト血清中 IgG と固層化した β グルカンの有無により交差反応が変化するのか検討した。Figure 2-5, 6 で示すように、IVIg、IgG は ELISA プレートに固層化した β グルカンと、可溶性 β グルカンで競合反応を示した。また、BWMP は ELISA プレートに固層化した β グルカンと軽度の競合反応を示した。さらに、同様の実験を IgM、未処理ヒト血清中 IgM についても検討した。Figure 2-7, 8 で示すように、BWMP は ELISA プレートに固層化した β グルカンと競合反応を示した。また、BWMP は、IgM の方が、 β グルカンとの競合反応が強く見られた。以上のことから、BWMP には、 β 1,3 グルカンと β 1,6 グルカンを含むことが示唆された。

2-1-4 β グルカンと dectin-1 との結合性

上記の結果は、BWMP に β グルカンが存在することを強く示唆した。植物の細胞壁は、 β 1,3 グルカンが結合した多糖類であるカロースを含むことが知られている。 β 1,3 グルカンの存在を調べるために、 β 1,3 グルカンに特有の反応を認めず Limulus G テストを用いて BWMP に β 1,3 グルカン濃度を測定したところ、3.29 ng/mg であった。これらのことから β グルカンに対する抗体の交差反応は、植物中のカロース類似の構造が関連している可能性がある。

そこで、 β 1,3 グルカンとの結合能をさらに詳細に検証するために、 β グルカン認識受容体である dectin-1 との結合性について検討した。Dectin-1 との結合を評価するために、BWMP、CSBG、ASBG を ELISA プレートに固層化し、可溶性糖鎖の有無で、組み換え型可溶性 dectin-1 を加えた。Figure 2-9 (A, C) で示すように、BWMP、CSBG、ASBG は、可溶性 dectin-1 に強く結合し、可溶性 BWMP、CSBG、ASBG と競合反応を示した。さらに、 β 1,3 グルカン分解酵素である zymolyase で BWMP を処理し、同様に ELISA を行った。Figure 2-9 (B, D) で示すように、BWMP の競合反応は、zymolyase 処理により顕著に減少した。これらの結果から、BWMP がカロースのような β 1,3 グルカンを含み、真菌由来 β グルカンや、特異的な抗体、 β グルカン認識受容体である dectin-1 と競合反応を示すことを明らかにした。

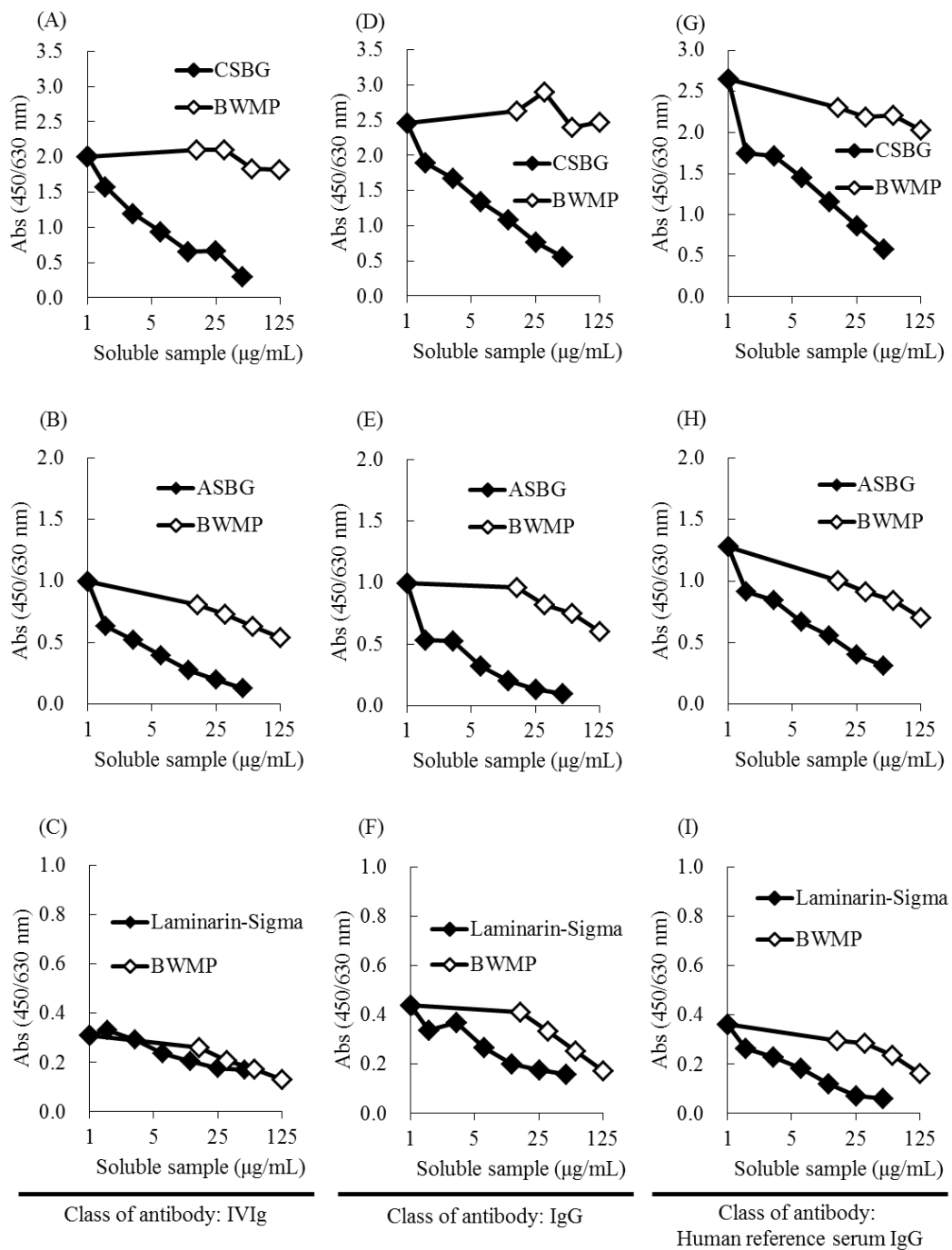


Figure 2-5. Assessment of the specificity of immunoreactivity by the addition of soluble β -glucans.

Each ELISA plate was coated with (A, D, G) CSBG, (B, E, H) ASBG or (C, F, I) Laminarin-Sigma, respectively. (A-C) IVIg, (D-F) IgG from human serum and (G-I) human reference serum were added to each well in the presence of various concentrations of soluble antigens or BWMP, and detected with anti-human IgG-POX.

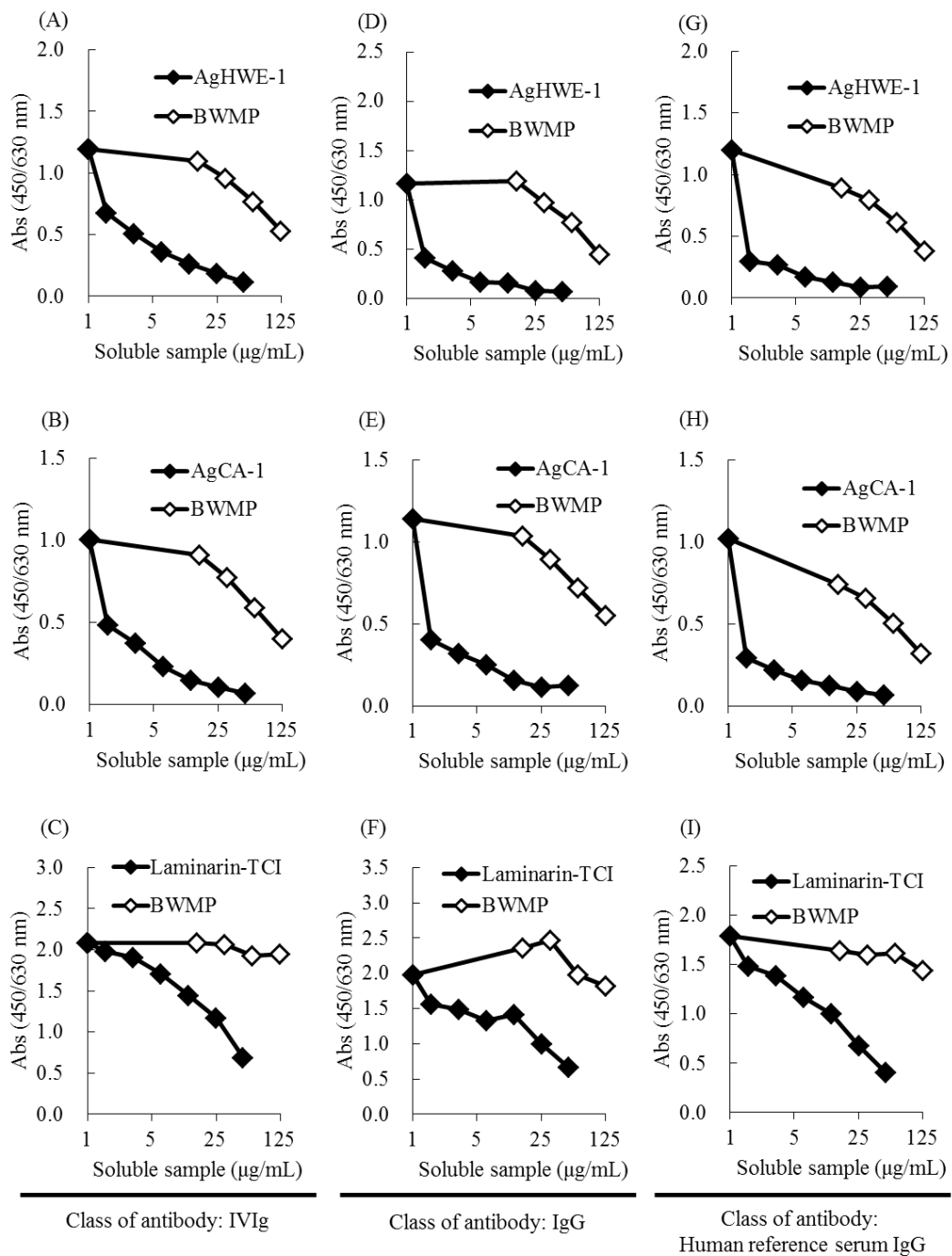


Figure 2-6. Assessment of the specificity of immunoreactivity by the addition of soluble β -glucans.

Each ELISA plate was coated with (A, D, G) AgHWE-1, (B, E, H) AgCA-1 or (C, F, I) Laminarin-TCI, respectively. (A-C) IVIg, (D-F) IgG from human serum and (G-I) human reference serum were added to each well in the presence of various concentrations of soluble antigens or BWMP, and detected with anti-human IgG-POX.

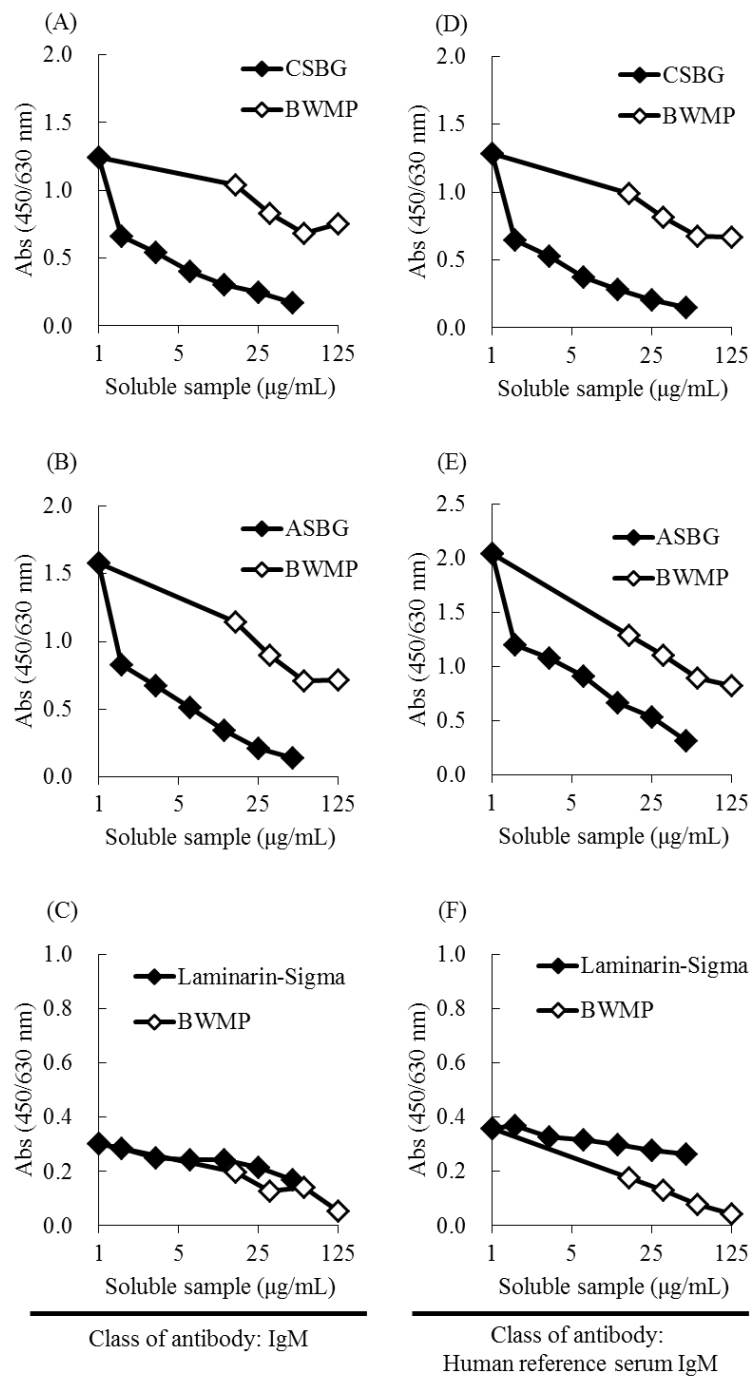


Figure 2-7. Assessment of the specificity of immunoreactivity by the addition of soluble β -glucans.

Each ELISA plate was coated with (A, D) CSBG, (B, E) ASBG and (C, F) Laminarin-Sigma, respectively. (A-C) IgM from human serum and (D-F) human reference serum were added to each well in the presence or absence of various concentrations of soluble antigen or BWMP, and detected with anti-human IgM-POX.

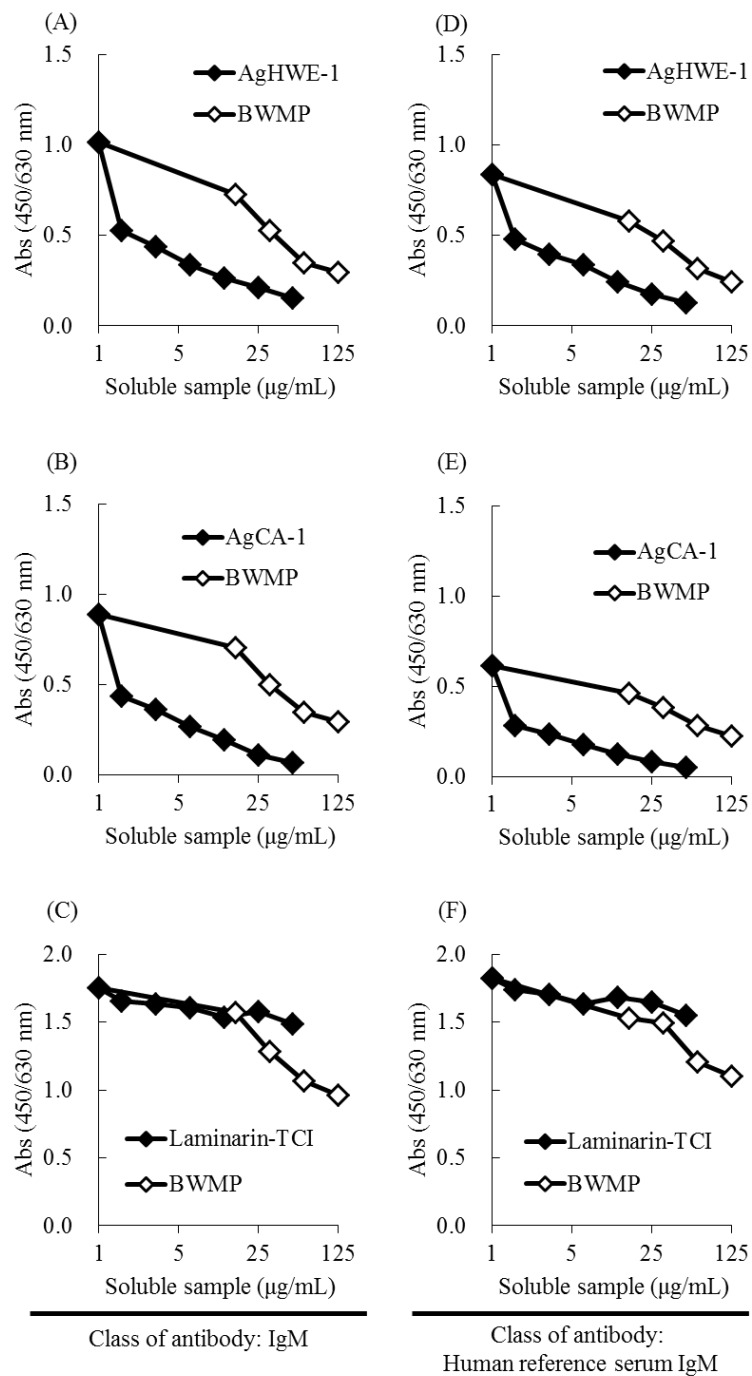
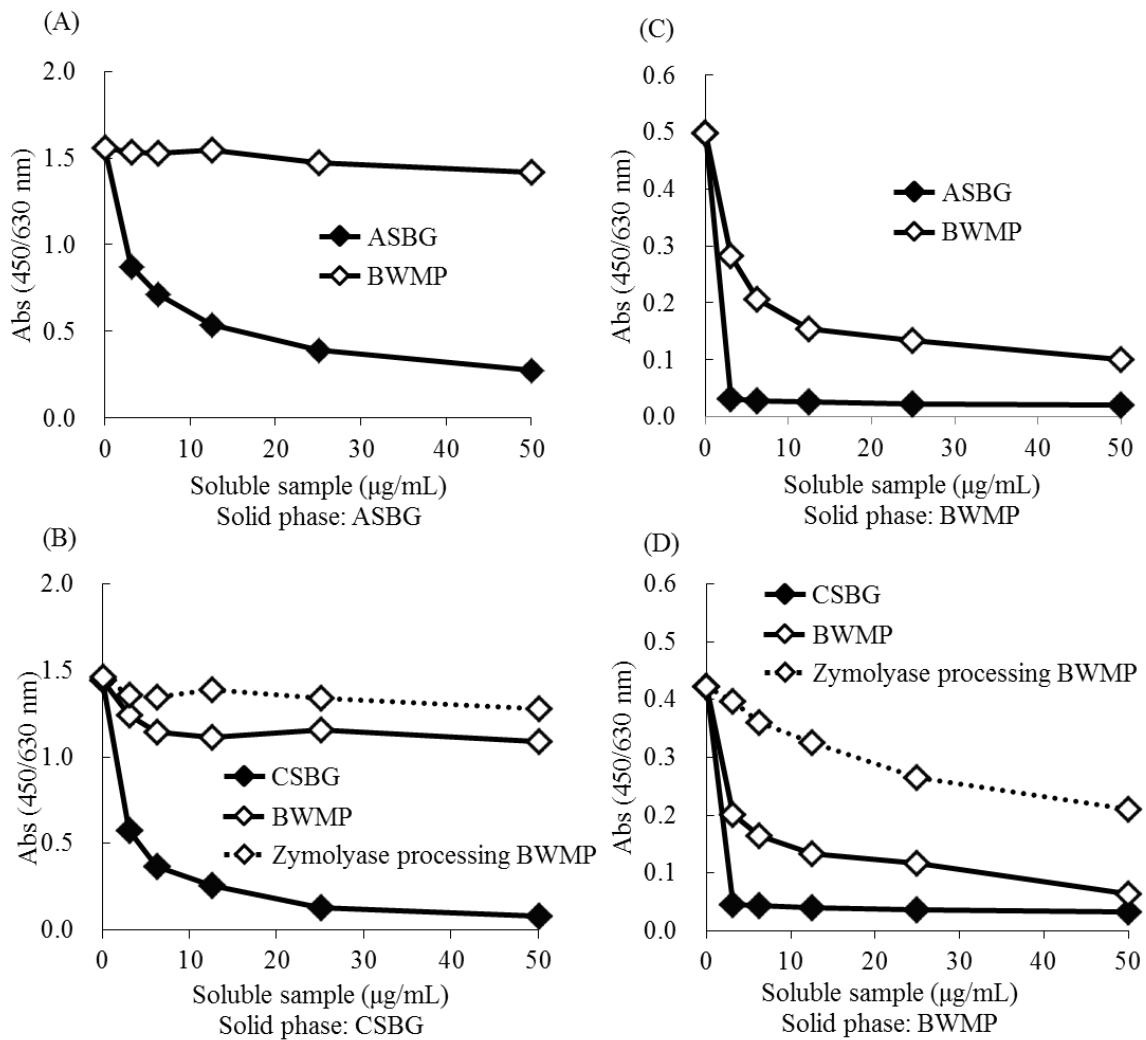


Figure 2-8. Assessment of the specificity of immunoreactivity by the addition of soluble β -glucans.

Each ELISA plate was coated with (A, D) AgHWE-1, (B, E) AgCA-1 or (C, F) Laminarin-TCI, respectively. (A-C) IgM from human serum and (D-F) human reference serum were added to each well in the presence or absence of various concentrations of soluble antigen or BWMP, and detected with anti-human IgM-POX.



Specificity of sDec-1-Fc to ASBG-, CSBG- and BWMP-coated plates

Figure 2-9. Assessment of the specificity of immunoreactivity by the addition of soluble β -glucans.

Each ELISA plate was coated with (A) ASBG, (B) CSBG, and (C and D) BWMP, respectively. Soluble dectin-1-Fc was added to each well in the presence of various concentrations of soluble β -glucans, BWMP, or zymolyase processing BWMP, and detected with anti-IgG-POX.

第二節 飼料の違いによる血管炎の病態と NK 細胞活性の検討

2-2-1 NK 細胞の機能と自然免疫活性化多糖の関連性に関する検討

NK 細胞は、自然免疫で重要な細胞であり、抗原を認識する様々な受容体が存在し、認識することで障害活性が上昇する。また、APC を介することによっても傷害活性が上昇することが報告されている。そこで、 β グルカン、 α マンナンで刺激した際の *in vitro* における脾臓細胞での NK 細胞傷害活性を検証した。オスの DBA/2 マウスの脾臓細胞を、SCG (100 μ g/mL)、CAWS (100 μ g/mL)、GM-CSF (5 ng/mL) と CAWS (100 μ g/mL) で刺激し、NK 細胞の細胞傷害活性を評価した。Figure 2-10 で示すように、SCG、CAWS 刺激により活性が上昇した。また、GM-CSF 刺激条件下では、CAWS 刺激のみよりも NK 細胞の細胞傷害活性が上昇した。

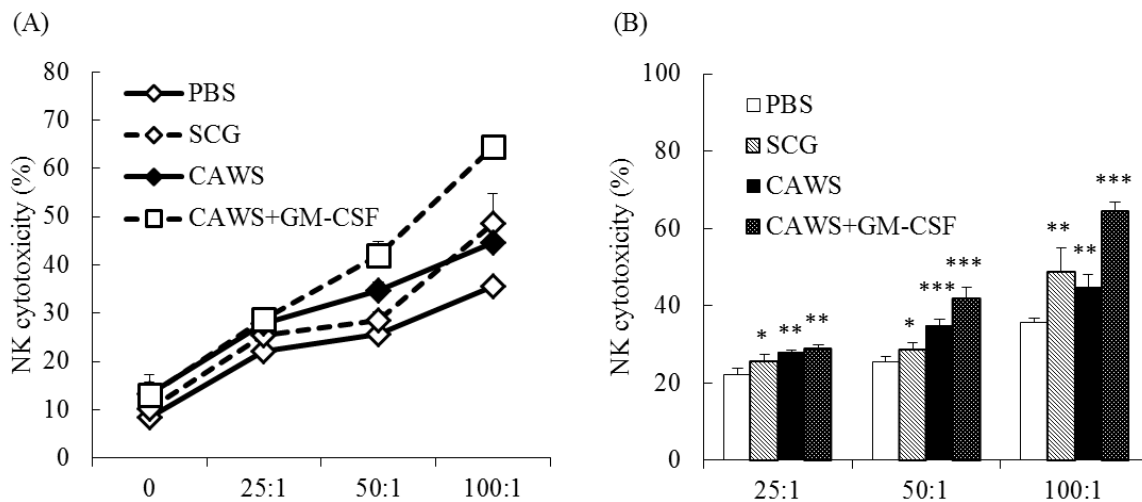


Figure 2-10. NK cytotoxicity in splenocytes from DBA/2 mice.

Cells were incubated for 24 h with SCG (100 μ g/mL), CAWS (100 μ g/mL) or CAWS + rmGM-CSF (5 ng/mL). (A) NK cytotoxicity was assayed by FACS Accuri C6 and determined by FlowJo. (B) Significant differences from PBS, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2-2-2 血管炎モデルに対する飼料の影響

β グルカンは免疫機能を高める機能性食品として使用されていることから、飼料中の β グルカンの影響について検討した。本研究では、汎用されている市販の実験動物飼料である CE-2 と、合成飼料であり β グルカンを制限した AIN93G を使用した。どちらの飼料もマウスの肥育用に使用されるものである。成分組成は、Table 2-1 に示した。飼料である CE-2 と AIN93G では、割合は、粗脂質は、AIN93G の方が多く、粗繊維、粗灰分は、CE-2 の方が多かった。また、Mn、Fe、Retinol は CE-2 の方が多く含有していた。これらの飼育条件のもとに、マウスに CAWS 血管炎を惹起し、その病態を比較した。CAWS 血管炎は、CAWS をマウスに腹腔内投与することにより KD 類似の血管炎を大動脈起始部に惹起するモデルである⁵⁵⁾。本研究では、飼料中の β グルカンはマウスの病態形成にいかなる影響を与えるかを解析するためのモデルとして用いた。

Figure 2-11 で示すように、血清中の血液生化学検査では、飼料による違いは見られなかった。また、Figure 2-12, 13 で示すように、AIN93G では CE-2 よりも体重が増加した。また、心臓、肝臓、腎臓などの組織重量を測定したが、14 日目に心臓重量が AIN93G の方が増加するなど、顕著な差は認められなかった。しかし、小腸、大腸の長さは、AIN93G では CE-2 よりも顕著に短くなった。また、CAWS 投与条件下には、AIN93G の方が CE-2 よりも体重が増加した。さらに、48 日目では、AIN93G で心臓重量が増加し、1 日目、14 日目で脾臓重量が増加した。小腸、大腸は、AIN93G では CE-2 よりも顕著に短くなった。以上のことから、体重、組織重量は、飼料の影響を強く受けることが明らかとなった。

Table 2-1. Ingredient composition of feed.

		CE-2	AIN93G
A nourishment ingredient and calorie	Moisture (%)	8.83	9.00
	Crude protein (%)	25.13	17.90
	Crude fat (%)	4.92	7.00
	Crude fiber (%)	4.42	3.00
	Crude ash (%)	6.86	2.50
	NFE (%)	49.84	60.60
	Energy (Kcal)	344.20	377.00
Quantity of mineral addition	Ca (g)	1.10	0.50
	P (g)	1.09	0.40
	Mg (g)	0.32	0.05
	K (g)	1.01	0.36
	Mn (mg)	11.61	1.00
	Fe (mg)	31.02	3.50
	Cu (mg)	0.80	0.60
	Zn (mg)	5.76	3.00
	Na (g)	0.35	0.10
Quantity of vitamin addition	Retinol (IU)	1515	400
	Vitamin B1 (mg)	1.9	0.6
	Vitamin B2 (mg)	1.4	0.6
	Vitamin B6 (mg)	1.3	0.7
	Vitamin B12 (µg)	6.4	2.5
	Total vitamin C (mg)	25	N.D.
	Vitamin D3 (IU)	220	100
	Vitamin E (mg)	6.2	7.5
	Pantothenic acid (mg)	3.6	1.6
	Niacin (mg)	18.1	3
	Folic acid (mg)	0.2	0.2
	Choline (mg)	190	250
	Biotin (µg)	44.1	20
	Inositol (mg)	613	N.D.

(content in 100 g of feed)

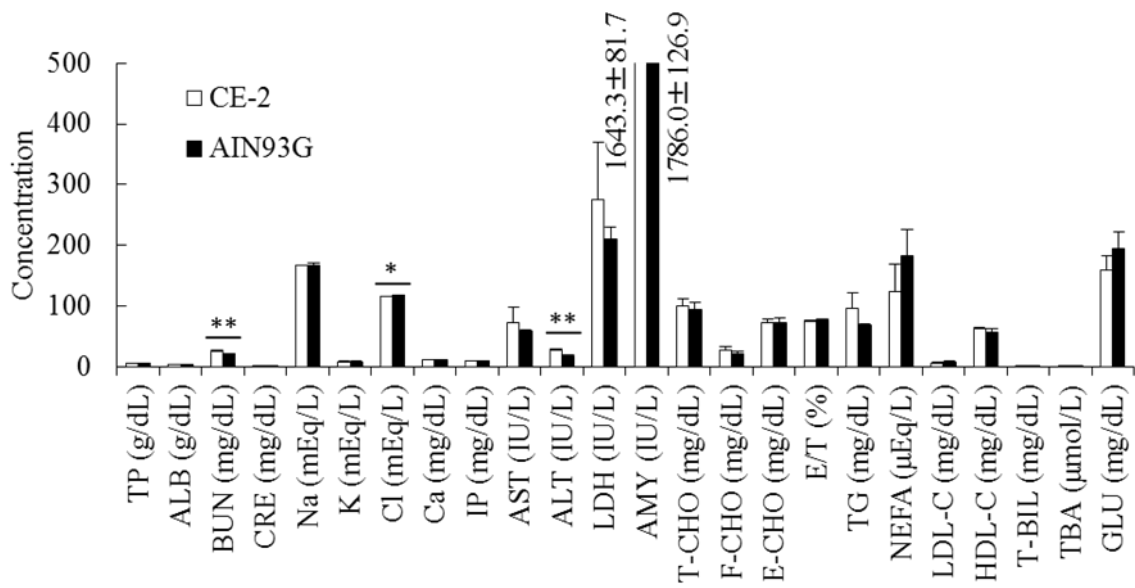


Figure 2-11. Biochemical examination in serum from DBA/2 mice feeding of CE-2 or AIN93G.

Significant differences, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

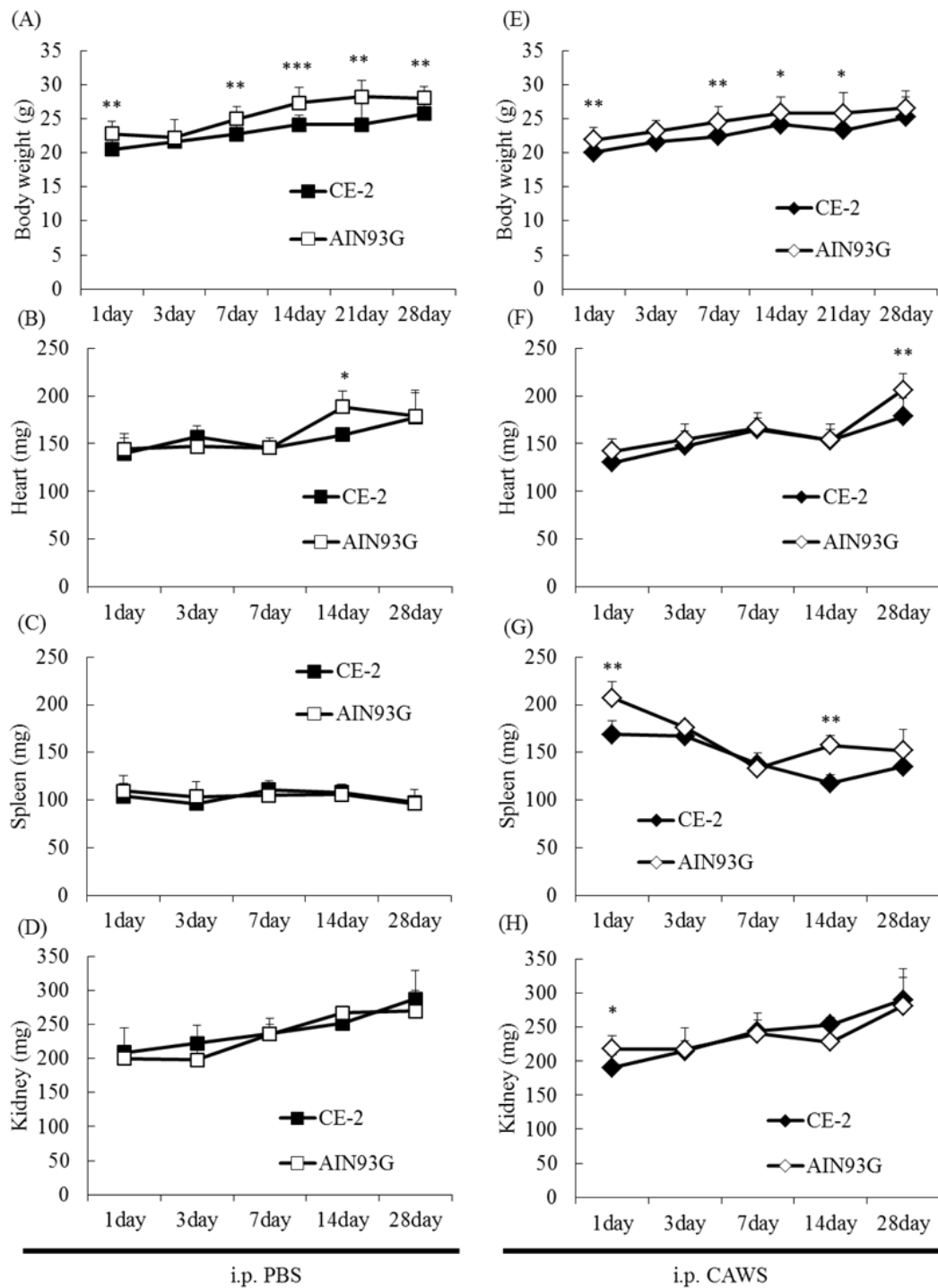


Figure 2-12. Scale for weight in body, heart, spleen or kidney from DBA/2 mice feeding of CE-2 or AIN93G.

(A-D) i.p. PBS or (E-H) i.p. CAWS. Significant differences, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

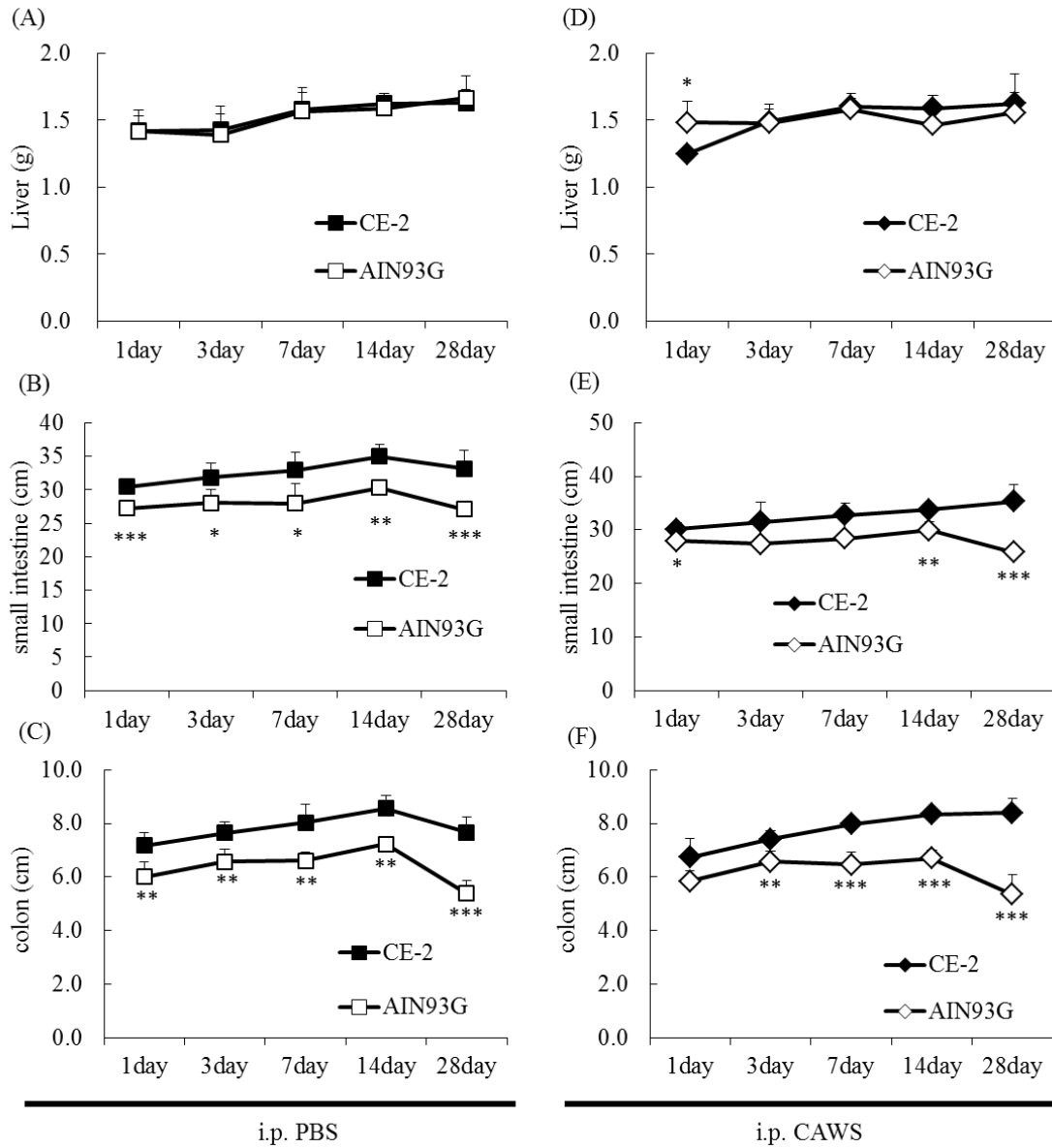


Figure 2-13. Scale for weight and length in liver, small intestine or colon from DBA/2 mice feeding of CE-2 or AIN93G.

(A-C) i.p. PBS or (D-F) i.p. CAWS. Significant differences, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

2-2-3 CAWS 血管炎マウスの生存率に及ぼす飼料の影響

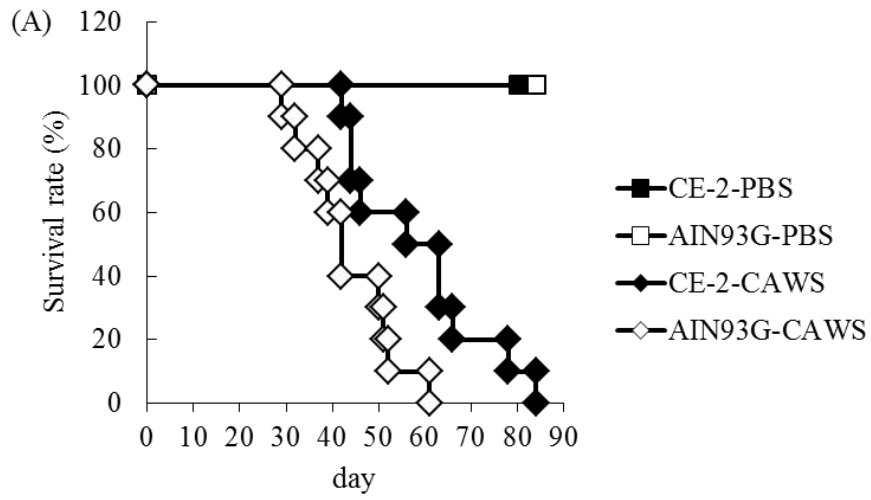
DBA/2 マウスにおける CAWS 血管炎は、慢性期においては大動脈弁の機能不全を起こし、心不全死を誘発する。そこで、本研究では、飼料中の β グルカンの CAWS 血管炎マウスの生存率に及ぼす影響について検討した。

Figure 2-14 で示すように、PBS 投与では、どちらの飼料でも死亡は見られなかった。しかし、CAWS 投与では、両飼料ともすべてのマウスが死亡し、平均生存日数は AIN93G の方が短かった。また、一匹目の死亡日数(CE-2 ; 42 日目、AIN93G ; 29 日目)、最後のマウスが死亡日数(CE-2 ; 84 日目、AIN93G ; 61 日目)、ならびに、1 匹目から全マウスが死亡するまでの日数(CE-2 ; 45 日間、AIN93G ; 32 日間)のいずれにおいても、飼料の違いは血管炎の病態に著しく影響を与えていることが明らかとなった。さらに、死亡したマウスの心臓の炎症像は、CE-2、AIN93G 共に血管壁の外部、内部共に炎症浸潤がみられ、飼料による違いは見られなかった。

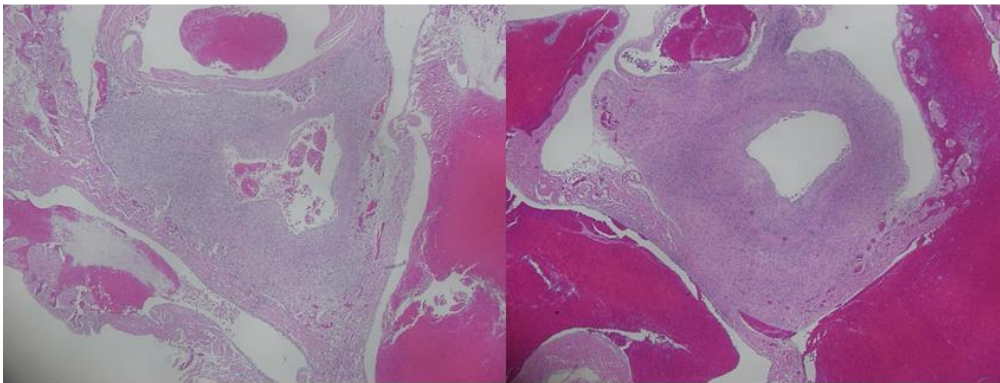
2-2-4 血管炎の進行におよぼす飼料の影響

CAWS 血管炎の発症と進行に及ぼす飼料の影響についてさらに詳細に検討するために、経時的に組織像を比較検討した。

PBS 投与では、血管炎は形成されなかった。また、Figure 2-15 で示すように、CAWS 投与では、飼料により血管炎の形成までの期間に違いが見られた。CAWS 投与による血管炎は、CE-2 では 7 日目から形成され始めたが、AIN93G では 3 日目から形成が見られた。また、炎症細胞の血管壁内部への浸潤は、CE-2 では 28 日目から見られたが、AIN93G では 14 日目からみられた。さらに、血管炎の重症度を高橋、小原関らの方法でスコア化したところ^{112, 113)}、Figure 2-16 で示すように、AIN93G の方が 14 日目に有意差がつくなど、早期から血管炎が悪化することが示された。これらのことから、CE-2 よりも AIN93G の方が血管炎の形成が早期に起こることが明らかとなった。また、肝臓、腎臓、小腸、大腸についても炎症像について検証したが、炎症像は見られなかった。

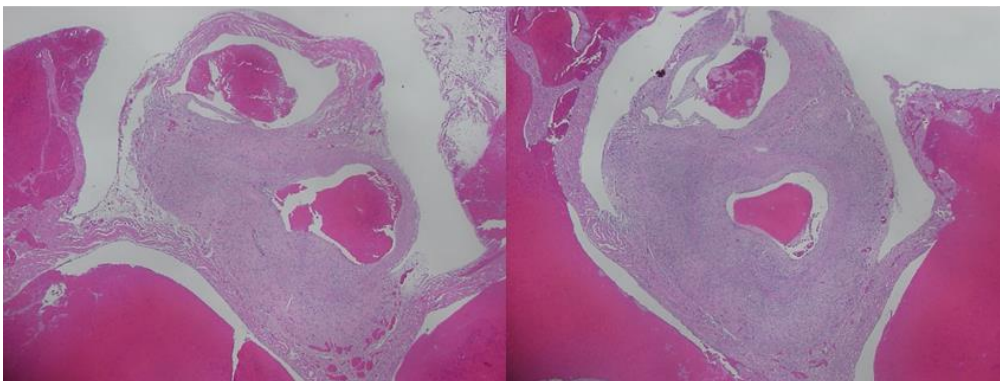


(B)



CE-2

(C)



AIN93G

Figure 2-14. (A) Survival rate following i.p. PBS or CAWS-induced vasculitis from DBA/2 mice feeding of CE-2 or AIN93G. Vasculitis induced by CAWS from dead mice feeding of (B) CE-2 or (C) AIN93G.

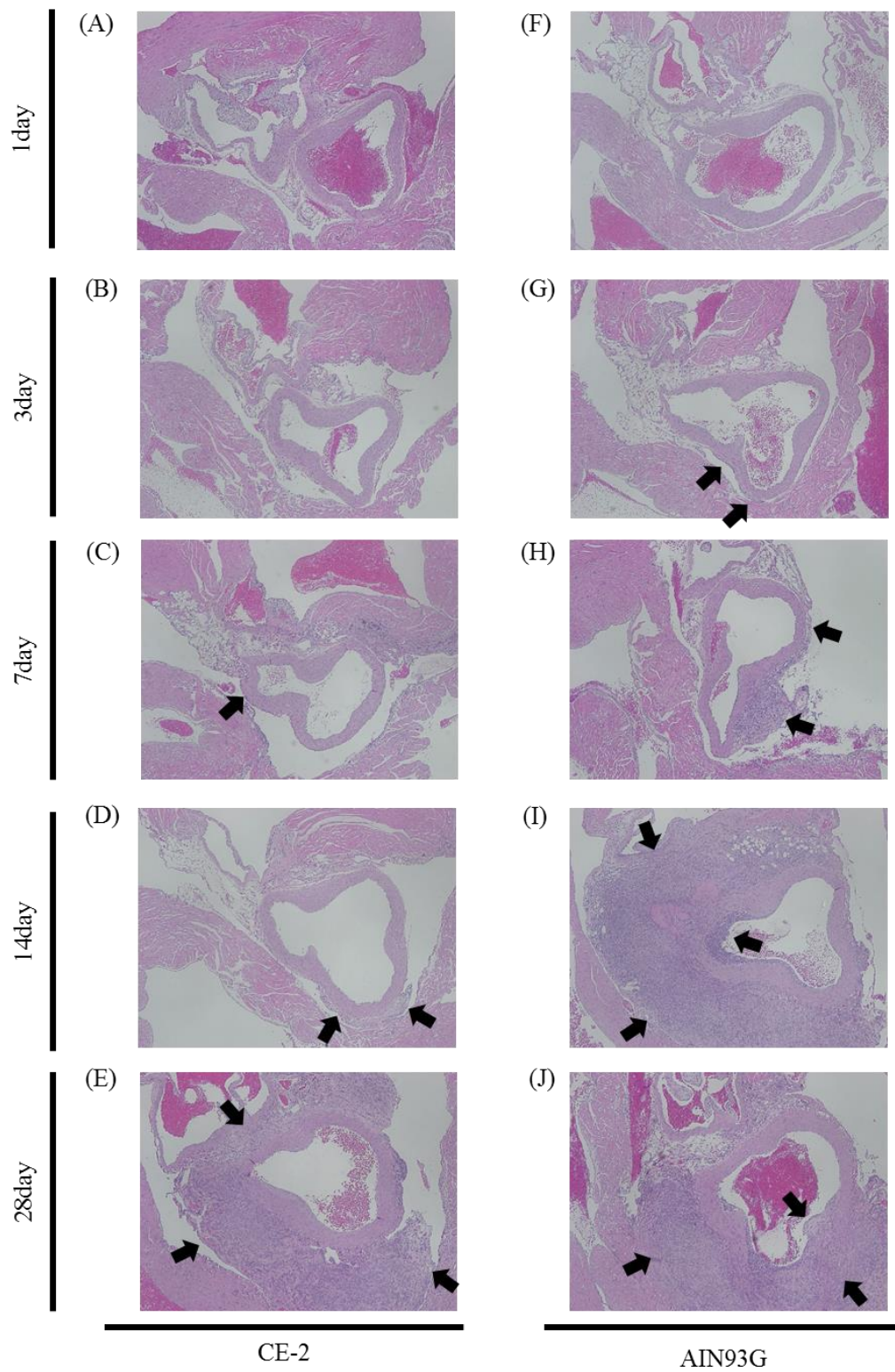


Figure 2-15. Vasculitis induced by CAWS from DBA/2 mice feeding of (A-E) CE-2 or (F-J) AIN93G.

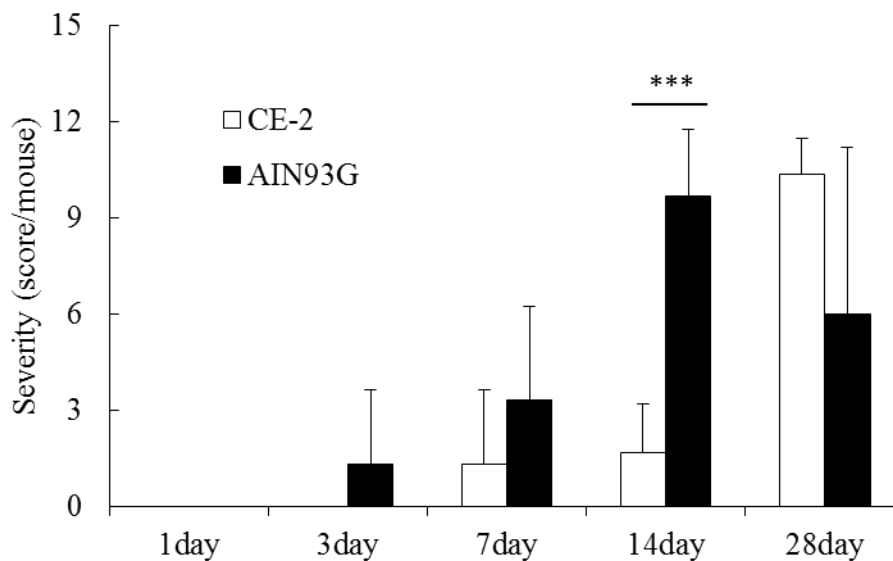


Figure 2-16. Incidence of vasculitis induced by CAWS, severity score of coronary arteritis feeding of CE-2 or AIN93G.

Severity score of each segment. Significant differences, *** $p < 0.001$.

2-2-5 飼料の違いによるサイトカイン産生への影響

すでに、第一章で DBA/2 マウスが他のマウスよりも自然免疫受容体刺激に対して高い感受性を示すことを明らかにした。また、GM-CSF 刺激によって CAWS の影響がより顕著になることも明らかにした。

そこで、それぞれの飼料を給餌し、DBA/2 マウスの脾臓細胞を CAWS 刺激だけでなく、GM-CSF と CAWS で刺激した場合、そして第一章で使用した植物多糖 BWMP と CAWS で刺激し、培養 48 時間後の上清中の TNF- α 、IFN- γ 産生を測定した。Figure 2-17, 18 で示すように、PBS 投与、CAWS 投与共に、CAWS、CAWS と BWMP、CAWS と GM-CSF で刺激した場合、TNF- α 、IFN- γ 産生が増加した。また、GM-CSF 刺激することにより CAWS 刺激のみと比べ、TNF- α 、IFN- γ 産生は増加した。さらに、CAWS 投与において、CE-2 よりも AIN93G の方が、TNF- α 、IFN- γ 産生が、14 日目、28 日目で有意に増加した。また、PBS 投与と、CAWS 投与を比べると CAWS 投与の方が、CAWS 刺激した際の TNF- α 、IFN- γ 産生が増加した。しかし、TNF- α 産生では、GM-CSF が加わることで、PBS 投与、CAWS 投与による違いが見られなかった。また、IFN- γ 産生は、CAWS 刺激のみと比べると、BWMP により低下した。

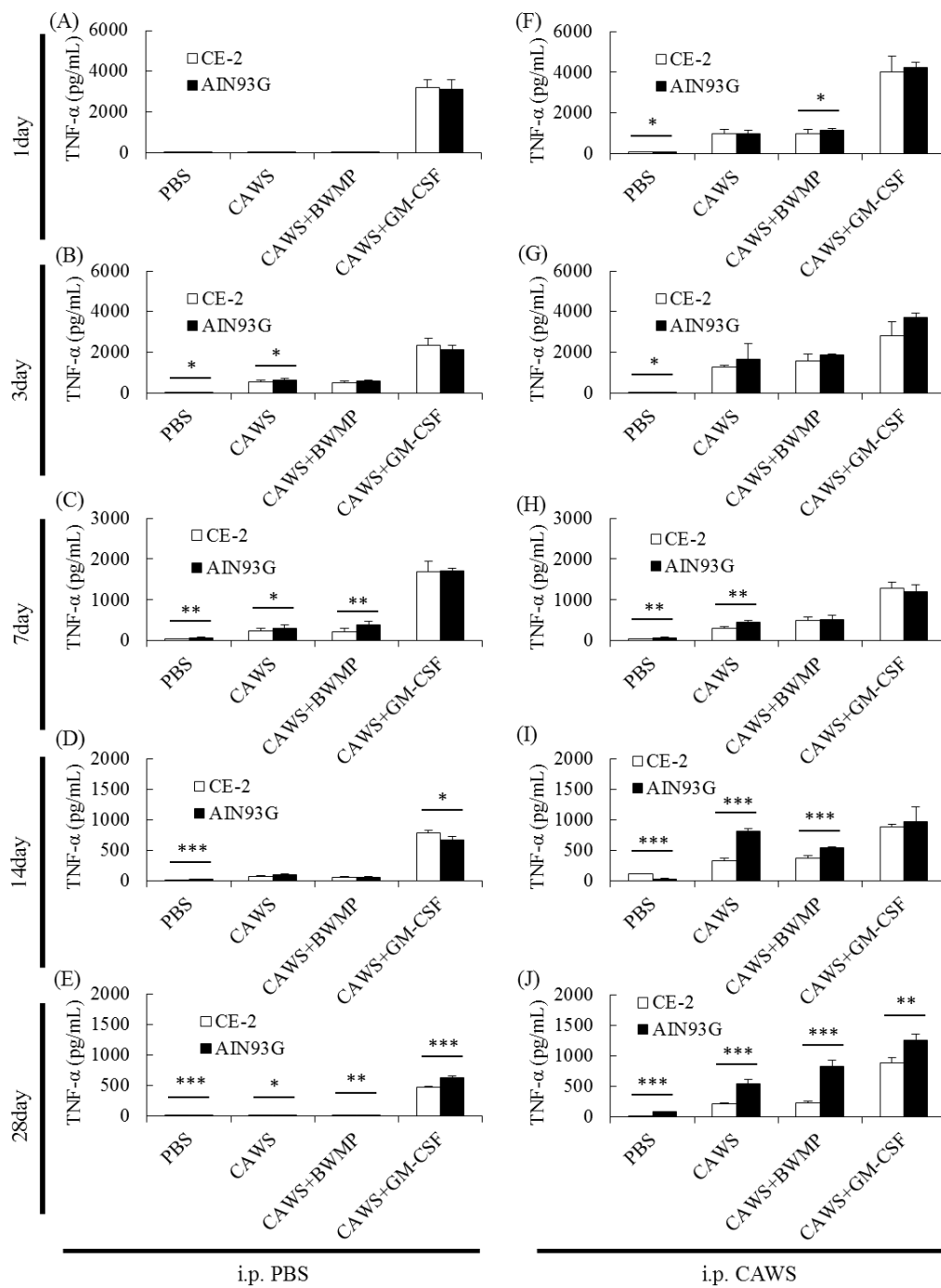


Figure 2-17. TNF- α production in splenocytes from DBA/2 mice feeding of CE-2 or AIN93G.

Cells were incubated for 48 h with CAWS (100 μ g/mL), CAWS + BWMP (100 μ g/mL) and CAWS + rmGM-CSF (5 ng/mL). (A-E) i.p. PBS or (F-J) i.p. CAWS. The concentrations of TNF- α were determined by ELISA. Significant differences, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

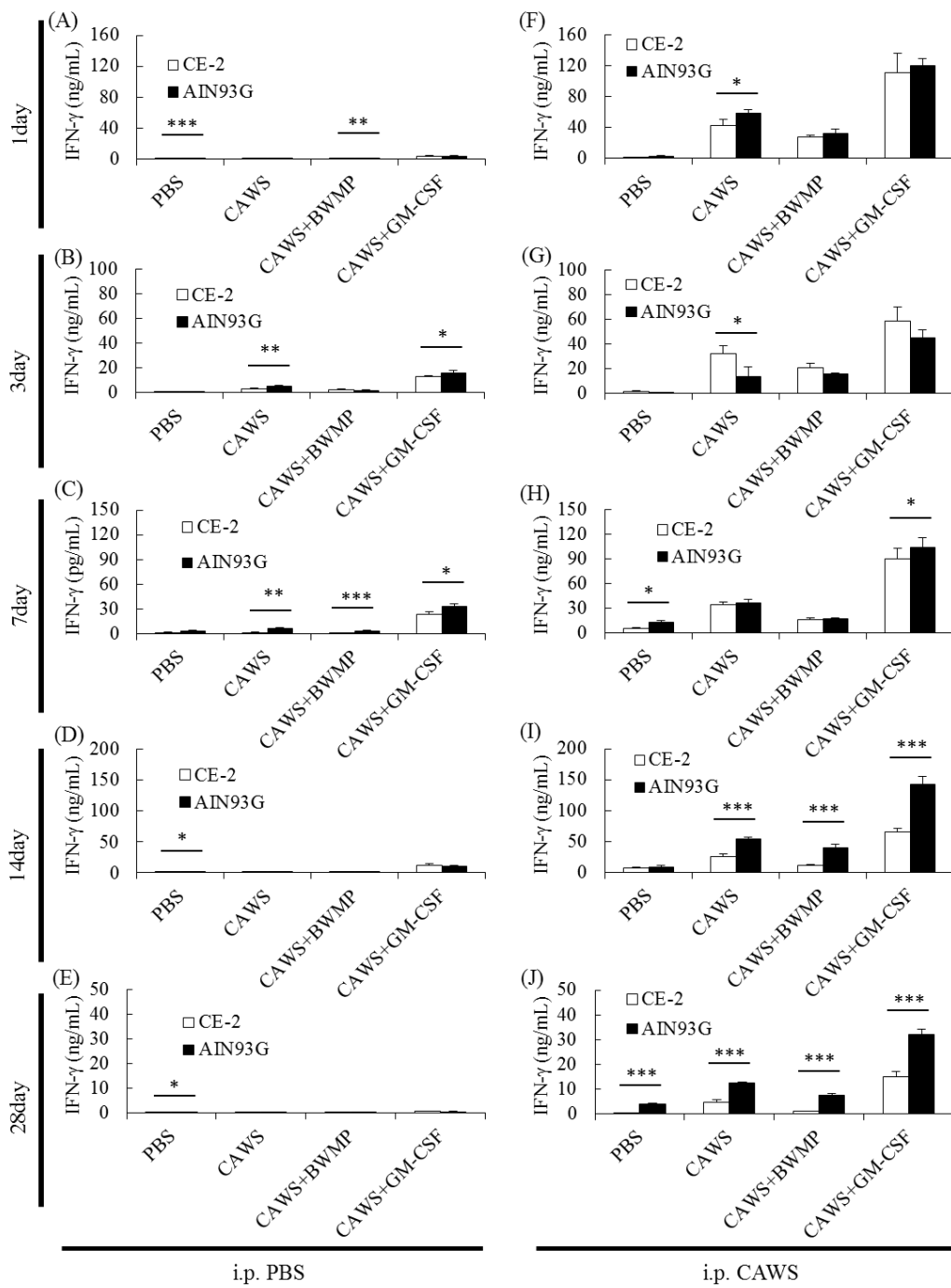


Figure 2-18. IFN- γ production in splenocytes from DBA/2 mice feeding of CE-2 or AIN93G.

Cells were incubated for 48 h with CAWS (100 μ g/mL), CAWS + BWMP (100 μ g/mL) and CAWS + rmGM-CSF (5 ng/mL). (A-E) i.p. PBS or (F-J) i.p. CAWS. The concentrations of IFN- γ were determined by ELISA. Significant differences, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

2-2-6 飼料の違いによる NK 細胞傷害活性への影響

諸論に示した通り、NK 細胞機能は免疫機能の低下や老化に伴って低下する。そこで、CAWS 血管炎における NK 細胞の傷害活性に影響があるのか経時的に検討した。

Figure 2-19 で示しように、NK 細胞の傷害活性を測定したところ、PBS 投与では NK 細胞の傷害活性に違いは見られなかった。しかし、CAWS 投与では、14 日目までは飼料による違いが見られなかったが、28 日目では、AIN93G の方が NK 細胞の傷害活性が低下した。また、PBS 投与と比べると CAWS 投与の方が 1 日目、14 日目、28 日目では、NK 細胞の傷害活性が低下した。

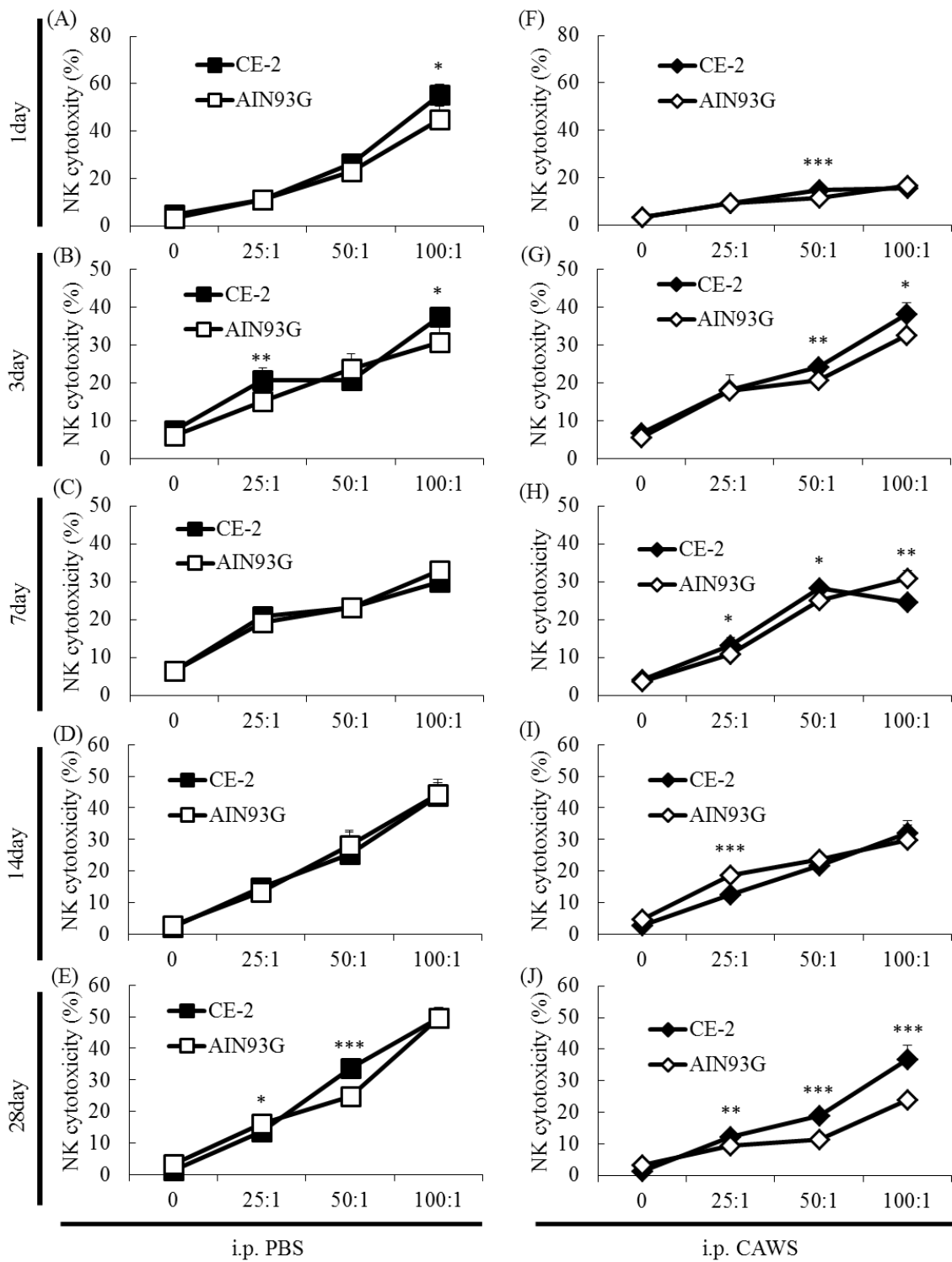


Figure 2-19. NK cytotoxicity in splenocytes from DBA/2 mice feeding of CE-2 or AIN93G. Cells were incubated for 24 h. (A-E) i.p. PBS or (F-J) i.p. CAWS. NK cytotoxicity was assayed by BD FACS Canto and determined by FlowJo. Significant differences, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

第二章 考察

第二章では、NK 細胞 ADCC 活性に対する自然免疫活性化物質の関与を明確にすることを目的に、真菌などの β グルカンや α マンナンに対する抗体の特徴について検討した(第一節)。また、飼料ならびに含有される β グルカンの影響を明らかにすることを目的として、飼料の β グルカンの有無と CAWS 血管炎の病態との関連性について検討した(第二節)。さらに、病態と NK 細胞の機能との関連性を明確にすることを目的として、脾臓細胞を用いた *in vitro* 評価系ならびに、CAWS 血管炎モデルをもちいた *in vivo* 評価系を用いて検討した(第二節)。

先に示した通り、健常人血清中には抗 β 1,3 グルカン抗体と抗 β 1,6 グルカン抗体が含まれ、真菌感染症患者では抗体価が増加する。これらの抗体は、病原真菌の細胞壁に結合するだけでなく^{55, 96, 114)}、薬用茸由来の β グルカンと結合する。本章では、植物由来の PAMPs である BWMP とも反応する抗体がヒト血清中に含まれていることを明らかにした。また、BWMP は β 1,3 グルカン特異的な反応を示すリムルス G テストに陽性反応を示し、 β 1,3 グルカン受容体である *dectin-1* に結合し⁸⁷⁾、その結合性は *zymolyase* 処理により顕著に減少したことから、BWMP が β 1,3 グルカンを含み、抗 BWMP 抗体の一部は、真菌、藻類、ならびに植物の β グルカンと反応する広範囲の認識機構を有するものであることを強く示唆した。NK 細胞は、標的細胞に結合した IgG 抗体の Fc 部位を、CD16 (Fc γ RIII)で認識し、ADCC を引き起こす¹¹⁵⁾。本章の結果から、ヒトは、 β グルカン、 α マンナンに対する IgG クラスの抗体を有するので、NK 細胞による ADCC を惹起する可能性が示唆された。

また、脾臓細胞を β グルカンならびに α マンナンで *in vitro* 刺激し、NK 細胞の傷害活性に影響を与えるのか検討したところ、SCG、CAWS により NK 細胞の傷害活性が増加した。脾臓細胞は様々な細胞から構築されており、SCG ならびに CAWS は GM-CSF、IL-12、IFN- γ などのサイトカイン産生を増強する。ここで産生されたサイトカインは NK 活性化作用を有することから、脾臓細胞の細胞間相互作用によって活性が増強されたものと考えられる。また、GM-CSF 刺激により活性が上昇したことからも、上記した細胞間相互作用によって NK 活性が増強されたものと考えられる。また、*dectin-1* を介した NK 細胞の活性として、APC が *dectin-1* 刺激を介したシグナルを NK 細胞へ伝達し、活性化させる機構があることが判明している¹¹⁶⁾。このことから、*dectin-2* においても、*dectin-1* のように APC を介した反応により NK 細胞が活性化した可能性が示唆された。NK 細胞と *dectin-2* の関係は不明な点も多い。NK 細胞を理解し活用するためにも、NK 細胞の受容体ならびに活性化機構に関する多くの研究が必要である (Figure 2-20)¹¹⁷⁻¹²¹⁾。

CAWS は、KD 患者から分離された *C. albicans* 由来の PAMPs であり、マウス

に腹腔内投与することで CAWS 血管炎を生じる⁵⁵⁾。また、先に示した通り、CAWS に対する特異抗体が産生され、NK 細胞の ADCC 活性に関与していると考えられる。そこで、PAMPs の NK 活性に及ぼす影響について解析することを目的として、病態モデルとして CAWS 血管炎を用い、in vivo で検討することとした。また、飼料中の β グルカンが腸管内の β グルカン受容体を刺激し、全身の免疫機構へ影響を与えていることが報告されている⁴⁴⁾。そこで、飼料による血管炎への影響と、NK 細胞への影響について検討した。

通常飼料である CE-2 と合成飼料である AIN93G を用いて、飼料の違いによる組織への影響を検討したところ、心臓、脾臓、肝臓、腎臓の重量に違いは見られなかった。しかし、小腸、大腸の長さは AIN93G の方が短いことから、CE-2 と比べ AIN93G に繊維が少ないことが影響したと思われる。また、PBS 投与、CWAS 投与による違いを比較したところ、CAWS 投与により脾臓重量が増加し、肥大化した。これは、CAWS によって補体ならびに自然免疫系が強く活性化され全身性の炎症が惹起されたためであると考えられる。CAWS 投与群の生存率は、AIN93G 摂取群で有意に低下した。さらに、血管炎の変化を経時的に観察したところ、血管炎の形成、進行は飼料により異なり、AIN93G は、CE-2 よりも早期に炎症像が形成され始めるだけでなく、早期に血管壁を破壊し、内部にまで炎症が浸潤していた。このことから、AIN93G 摂取により血管炎の進行が速いだけでなく、重篤化していることが示唆された。飼料と血管炎の関係として、アラキドン酸カスケードに関与するリノール酸などの増加により CAWS 血管炎の症状が重症化することが報告されている¹²²⁾。また、Retinol の減少により心疾患が悪化することが報告されている^{122, 123)}。本研究で使用した AIN93G の脂質の割合が多いことが影響している可能性が考えられるが、Retinol の含有量が少ないことも心疾患が悪化した原因であると考えられる。

脾臓細胞の NK 細胞の傷害活性は、PBS 投与と比べて、CAWS 投与により細胞傷害活性が低下した。投与後 1 日目において活性が低下したのは、CAWS 投与による急性炎症によって、DC を介して Th17 細胞が活性化され、炎症の初期応答に関わる顆粒球系細胞が増加していたためであると考えられる。また、CAWS 投与による血管炎の症状の進行とともに、細胞傷害活性が低下するだけでなく、AIN93G ではさらに顕著に活性が低下した。AIN93G では生存率が低下していることから、血管炎の進行が心機能全体を低下させ、免疫機能のレベルが低下した可能性がある。さらに、AIN93G は β グルカン含量が著しく低いことから、消化管での自然免疫機能の強化が行われず、免疫系の低下が顕著に現れた可能性がある (Figure 2-21)。

以上、本章では、自然免疫活性化物質の多くは特異抗体を産生することで NK 細胞の ADCC 活性の増強に関与することを明らかにした。また、飼料中の自然免疫活性化物質は消化管免疫系を介して免疫機能、NK 細胞活性を増強すること

を明らかにした。これらの結果は、自然免疫活性化物質を活用することで、NK細胞機能の低下の軽減や機能の向上に貢献できる可能性を示したものであり、NK細胞機能制御法に新たな可能性を示唆したものである。

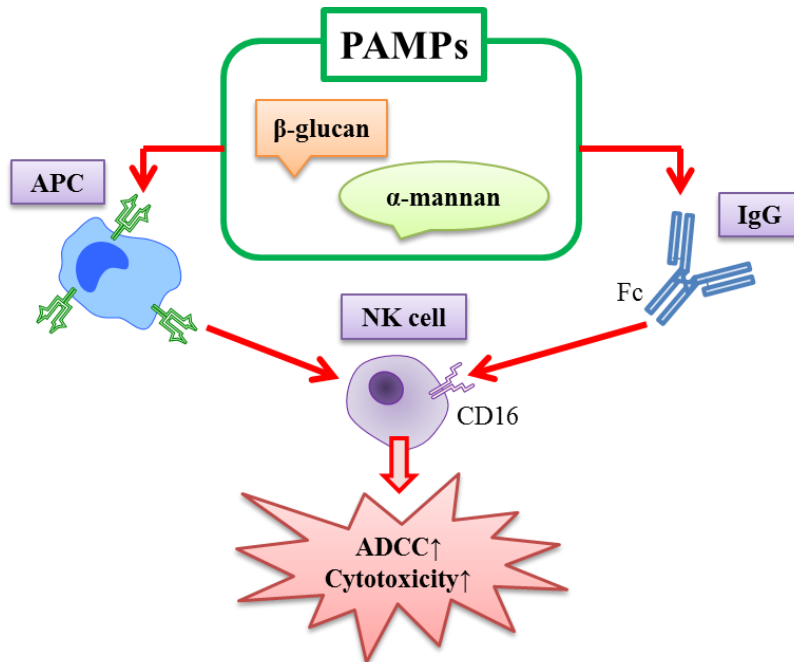


Figure 2-20. Effect of PAMPs on augmentation of NK cytotoxicity through cytokines of APC and ADCC.

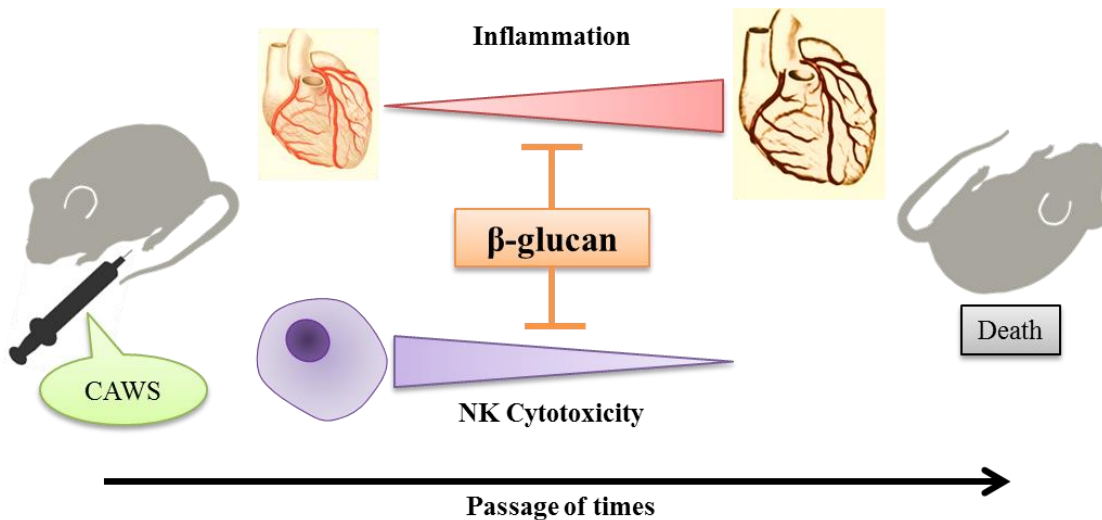


Figure 2-21. Modulation of inflammation and NK cytotoxicity by β -glucan in feed.

総括

人々は不老長寿を目指し、医療技術や生活様式など様々なものを発展させてきた。高齢になるにつれ、免疫力が低下し疾患が増加するが、本研究では、機能性食品を用いることで、免疫機能の低下を改善し、高齢化による疾患のリスクを低下させることができるのではないかと考えた。そこで、老化により機能が低下する免疫細胞として、T細胞とNK細胞に着目した。T細胞とNK細胞の機能を検証するうえで、食品由来の自然免疫活性化物質として、真菌、酵母、藻類、植物、微生物から抽出した、 β グルカン、 α マンナン、植物多糖などの様々なPAMPsを用いた。

第一章では、PAMPsの免疫系に及ぼす作用について単独ならびに併用条件下に検討した。その結果、 β グルカン、 α マンナンなどは自然免疫受容体を介してサイトカインの産生増強作用などを示し、免疫力を上昇させた。一方、植物多糖であるBWMPは、T細胞に選択的に働きIL-2産生を抑制することで、細胞増殖能を抑制し、結果としてIFN- γ 産生を抑制するなど、免疫機能を抑制する働きをもつことを明らかにした。BWMPの作用は β グルカンや α マンナン併用時においても示された。一方、BWMPは他のPAMPsと同様にDCからのサイトカイン産生を増強した。これらのことから、PAMPsは、免疫系に対し活性化ならびに抑制の両面の作用を示し、単独で免疫機能を増強するばかりでなく、併用することによって免疫機能を調整する可能性のあることが明らかとなった。

第二章では、 β グルカン、 α マンナンはヒト血清中に特異的な抗体が存在し、そのクラスはIgM、IgG、ならびにIgAのすべてに及ぶことが明らかとなった。また、*in vitro*脾臓細胞培養系において、 β グルカン、 α マンナンはNK細胞の活性を上昇した。このことから、 β グルカン、 α マンナンは、Fc受容体を介したADCCだけでなく、APC上のdectin-1、dectin-2ならびに細胞間相互作用に基づくサイトカインネットワークの活性化によりNK細胞を活性化することが示唆された。また、飼料の免疫系ならびにNK作用に及ぼす影響を検討したところ、CAWS血管炎は β グルカンを含有しない飼料において症状が悪化するだけでなく、NK細胞の活性も低下した。これらのことから、食餌の質が免疫機構を調整し、疾患に影響することが示唆された。

生体防御機構は、様々な生物に存在する機構である。本研究から、真菌、酵母、藻類、植物、微生物由来のPAMPsが、それぞれに類似した反応だけでなく、対称的な反応をすることから、免疫機能の調節において重要な働きがあることが明らかとなった。また、飼料の違いが疾患の症状の進行に影響したことから、食事の質が免疫機能に多大な影響を与えていることが明らかとなった。これらのことから、高齢社会において、食事の質の改善が免疫機能の維持と向上に重要であることが強く示唆された。国が掲げる「健康日本21」にある健康寿命の

延伸においても考慮すべき点であると考えられる(Figure 3-1)。

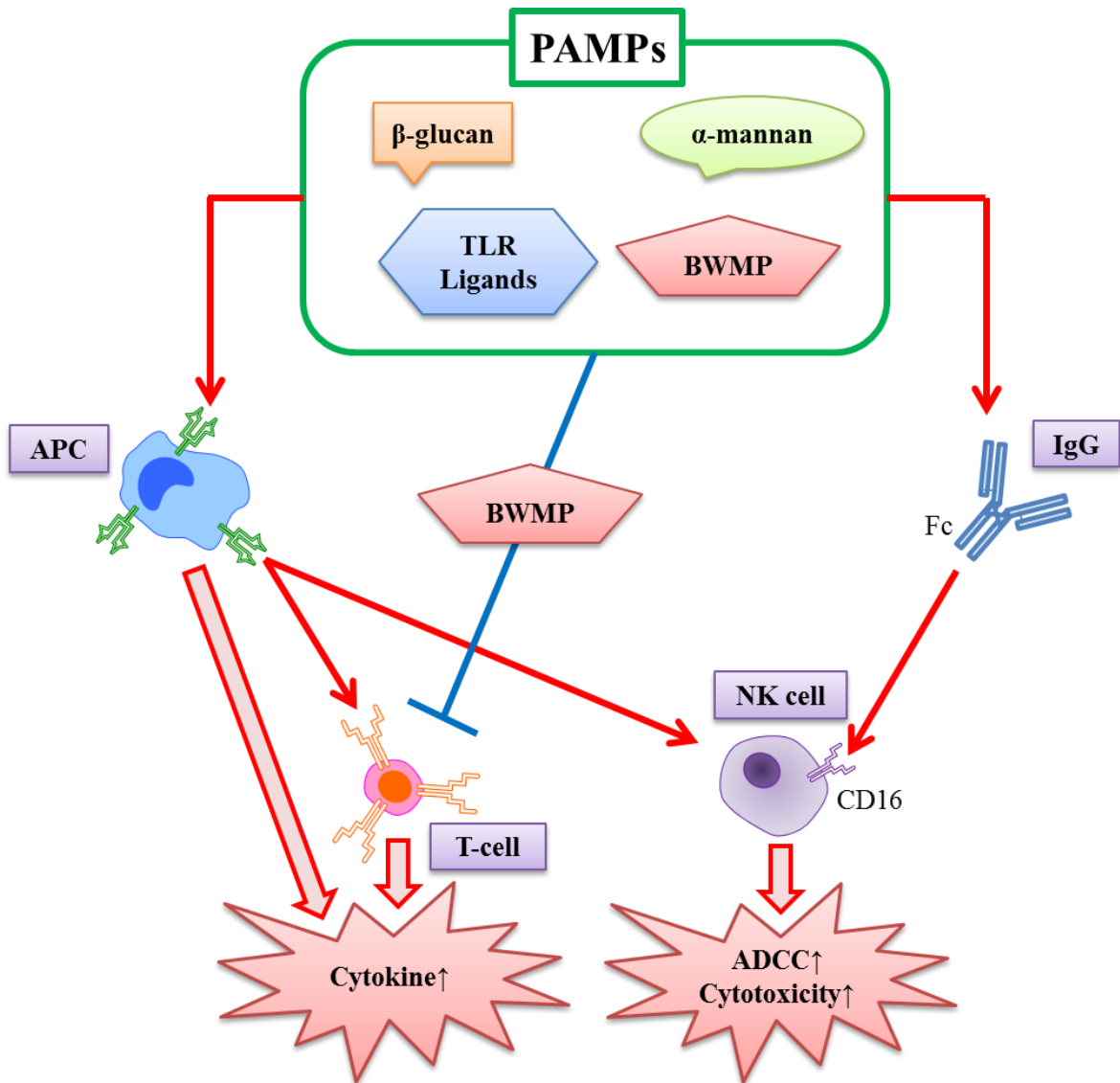


Figure 3-1. Modulation of immune function of T-cells and NK cells by PAMPs.

謝辞

本研究の推進ならびに本論文の作成に関して、始終御懇篤なご指導、御鞭撻を賜りました恩師、東京薬科大学薬学部、大野尚仁教授に衷心より深甚なる誠意を示します。

本研究の推進ならびに本論文の作成に関して、数多くのご指導、御助言を賜りました東京薬科大学薬学部、安達禎之准教授、石橋健一講師、山中大補助教授に心から感謝いたします。

本研究の推進ならびに本論文の作成に関して、数々の適切な御指導、御助力を賜りました、坪井正道先生、金森政人先生、竹下一夫先生に厚く御礼申し上げます。

本研究ならびに本論文の作成を遂行するにあたり、数々の適切な御指導、御助力を賜りました **NapaJen Pharma, Inc.**、樋口貞春博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の推進ならびに本論文の作成に関して御協力いただきました吉田美亜氏、東京薬科大学薬学部、三浦典子准教授に深謝いたしますと共に、本研究に御協力いただきました東京薬科大学免疫学教室の皆様にも心から御礼申し上げます。

最後に、申請者の学生生活および研究活動を温かく見守り、絶えず支援してくださった両親に感謝いたします。

研究結果の掲載誌

本博士学位申請論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

第一章

Specificity of the Immunomodulating Activity of *Sasa veitchii* (Japanese Folk Medicine Kumazasa) to Fungal Polysaccharides

Wataru Sato, Kazuo Takeshita, Masamichi Tsuboi, Masato Kanamori, Ken-Ichi Ishibashi, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Naohito Ohno

Int J Med Mushrooms. **17**.415-26. (2015)

Mechanism of Immunosuppressive Effect of a Folk Medicine *Sasa Veitchii* by Analyzing the Cytokine Synthesis of Splenocytes in Mice In Vitro

Wataru Sato, Ken-ichi Ishibashi, Daisuke Yamanaka, Yoshiyuki Adachi and Naohito Ohno

BAOJ Allergy & Immunology. **1**:002. (2015)

第二章

Immunochemical cross reactivity of beta-glucan in the medicinal plant, *Sasa veitchii*, and medicinal mushrooms

Wataru Sato, Mia Yoshida, Ken-ichi Ishibashi, Kazuo Takeshita, Masamichi Tsuboi, Masato Kanamori, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, and Naohito Ohno

Int J Med Mushrooms. **18**.191-202. (2016)

引用文献

- 1) Dranoff G. *Nat Rev Cancer*, **4**, 11-22 (2004)
- 2) Solana R, Pawelec G, Tarazona R. *Immunity*, **24**, 491-494 (2006)
- 3) Montoya-Ortiz G. *Autoimmune Diseases*, **2013**, 15 (2013)
- 4) Mitchell GF, Miller JF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **59**, 296-303 (1968)
- 5) Mitchell GF, Miller JF. *J Exp Med*, **128**, 821-837 (1968)
- 6) Van Epps HL. *J Exp Med*, **201**, 5 (2005)
- 7) Araneo BA, Marrack PC, Kappler JW. *J Immunol*, **114**, 747-751 (1975)
- 8) Burns FD, Marrack PC, Kappler JW, Janeway CA, Jr. *J Immunol*, **114**, 1345-1347 (1975)
- 9) van der Merwe PA, Dushek O. *Nat Rev Immunol*, **11**, 47-55 (2011)
- 10) Ceredig R, Rolink T. *Nat Rev Immunol*, **2**, 888-897 (2002)
- 11) von Boehmer H. *Nat Rev Immunol*, **5**, 571-577 (2005)
- 12) Godfrey DI, Berzins SP. *Nat Rev Immunol*, **7**, 505-518 (2007)
- 13) Morrot A. *ISRN Infectious Diseases*, **2013**, 11 (2013)
- 14) Germain RN. *Nat Rev Immunol*, **2**, 309-322 (2002)
- 15) Caramalho Í, Nunes-Cabaço H, Foxall R, Sousa AE. *Frontiers in Immunology*, **6** (2015)
- 16) Nurieva RI, Chung Y. *Cell Mol Immunol*, **7**, 190-197 (2010)
- 17) Sethi A, Kulkarni N, Sonar S, Lal G. *Frontiers in Genetics*, **4** (2013)
- 18) June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Schieven GL, Siegel JN, Phillips AF, Samelson LE. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 7722-7726 (1990)
- 19) Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chretien I, Abrams J, de Vries J, Spits H. *J Immunol*, **141**, 849-855 (1988)
- 20) Sagerstrom CG, Kerr EM, Allison JP, Davis MM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8987-8991 (1993)
- 21) Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. *Nat Rev Immunol*, **9**, 324-337 (2009)
- 22) Weichhart T, Saemann MD. *Trends Immunol*, **30**, 218-226 (2009)
- 23) Lages CS, Lewkowich I, Sproles A, Wills-Karp M, Chougnet C. *Aging Cell*, **9**, 785-798 (2010)
- 24) Ando M, Nishimura T, Yamazaki S, Yamaguchi T, Kawana-Tachikawa A, Hayama T, Nakauchi Y, Ando J, Ota Y, Takahashi S, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Miles JJ, Burrows SR, Brenner MK, Nakauchi H. *Stem Cell Reports*, **5**, 597-608 (2015)
- 25) Vivier E, Anfossi N. *Nat Rev Immunol*, **4**, 190-198 (2004)
- 26) Shi FD, Ljunggren HG, La Cava A, Van Kaer L. *Nat Rev Immunol*, **11**, 658-671

- (2011)
- 27) Cichocki F, Miller JS, Anderson SK, Bryceson YT. *Front Immunol*, **4**, 55 (2013)
 - 28) Huntington ND, Nutt SL, Carotta S. *Front Immunol*, **4**, 14 (2013)
 - 29) Ali AK, Nandagopal N, Lee SH. *Front Immunol*, **6**, 355 (2015)
 - 30) Caligiuri MA. *Blood*, **112**, 461-469 (2008)
 - 31) Karre K. *Scand J Immunol*, **55**, 221-228 (2002)
 - 32) Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. *Nat Immunol*, **9**, 503-510 (2008)
 - 33) Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. *Science*, **331**, 44-49 (2011)
 - 34) Yokoyama WM, Plougastel BF. *Nat Rev Immunol*, **3**, 304-316 (2003)
 - 35) Weiner LM, Surana R, Wang S. *Nat Rev Immunol*, **10**, 317-327 (2010)
 - 36) Phillips LK, Gould EA, Babu H, Krams SM, Palmer TD, Martinez OM. *Stem Cells*, **31**, 1829-1839 (2013)
 - 37) Mishra R, Chen AT, Welsh RM, Szomolanyi-Tsuda E. *PLoS Pathog*, **6**, e1000924 (2010)
 - 38) Ida H, Utz PJ, Anderson P, Eguchi K. *Mod Rheumatol*, **15**, 315-322 (2005)
 - 39) Li P, Zheng G, Yang Y, Zhang C, Xiong P, Xu Y, Fang M, Tan Z, Zheng F, Gong F. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 3197-3208 (2010)
 - 40) Trapani JA, Smyth MJ. *Nat Rev Immunol*, **2**, 735-747 (2002)
 - 41) Skinner MA, Thompson K, Ezaki T, Marbrook J. *Br J Cancer*, **55**, 259-263 (1987)
 - 42) Yu TK, Caudell EG, Smid C, Grimm EA. *J Immunol*, **164**, 6244-6251 (2000)
 - 43) Orucevic A, Lala PK. *Cell Immunol*, **169**, 125-132 (1996)
 - 44) Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, Hattori M, Takeshita K, Kanai T, Saijo S, Ohno N, Iwakura Y. *Cell Host Microbe*, **18**, 183-197 (2015)
 - 45) *Am J Respir Crit Care Med*, **158**, S1-S76 (1998)
 - 46) Douwes J, Le Gros G, Gibson P, Pearce N. *J Allergy Clin Immunol*, **114**, 1051-1054 (2004)
 - 47) Akira S, Takeda K. *Nat Rev Immunol*, **4**, 499-511 (2004)
 - 48) Takeda K, Akira S. *Int Immunol*, **17**, 1-14 (2005)
 - 49) Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD, Jr., Ariizumi K. *J Biol Chem*, **281**, 38854-38866 (2006)
 - 50) Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. *Nat Rev Immunol*, **9**, 465-479 (2009)
 - 51) Barrett NA, Maekawa A, Rahman OM, Austen KF, Kanaoka Y. *J Immunol*, **182**, 1119-1128 (2009)
 - 52) Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung SH, Kotaki H, Seki K, Sudo K, Akira S,

- Adachi Y, Ohno N, Kinjo T, Nakamura K, Kawakami K, Iwakura Y. *Nat Immunol*, **8**, 39-46 (2007)
- 53) Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, Fujikado N, Kusaka T, Kubo S, Chung SH, Komatsu R, Miura N, Adachi Y, Ohno N, Shibuya K, Yamamoto N, Kawakami K, Yamasaki S, Saito T, Akira S, Iwakura Y. *Immunity*, **32**, 681-691 (2010)
- 54) Shepherd MG, Sullivan PA. *J Gen Microbiol*, **93**, 361-370 (1976)
- 55) Uchiyama M, Ohno N, Miura NN, Adachi Y, Aizawa MW, Tamura H, Tanaka S, Yadomae T. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **24**, 411-420 (1999)
- 56) Nagi-Miura N, Harada T, Shinohara H, Kurihara K, Adachi Y, Ishida-Okawara A, Oharaseki T, Takahashi K, Naoe S, Suzuki K, Ohno N. *Atherosclerosis*, **186**, 310-320 (2006)
- 57) Harada T, Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohn N. *Biol Pharm Bull*, **25**, 931-939 (2002)
- 58) Ohno N, Miura NN, Nakajima M, Yadomae T. *Biol Pharm Bull*, **23**, 866-872 (2000)
- 59) Yoshida M, Hida TH, Takeshita K, Tsuboi M, Kanamori M, Akachi N, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *Int J Med Mushrooms*, **14**, 537-547 (2012)
- 60) Tsuboi M, Takeshita K, Kanamori M, Umemura K, Ogawa K, Akachi N, Yoshida M, Ohno N. *Open Plant Science Journal*, **7**, 1-9 (2013)
- 61) Hida TH, Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Shirasu Y, Ohno N. *Inflamm Res*, **58**, 9-14 (2009)
- 62) Ymer S, Tucker WQ, Sanderson CJ, Hapel AJ, Campbell HD, Young IG. *Nature*, **317**, 255-258 (1985)
- 63) Charlton B, Lafferty KJ. *Curr Opin Immunol*, **7**, 793-798 (1995)
- 64) Nicholson LB, Kuchroo VK. *Curr Opin Immunol*, **8**, 837-842 (1996)
- 65) Shibata M, Yamatake Y, Sakamoto M, Kanamori M, Takagi K. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, **71**, 481-490 (1975)
- 66) Shibata M, Kubo K, Onoda M. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, **72**, 531-541 (1976)
- 67) Shibata M, Kubo K, Onoda M. *Yakugaku Zasshi*, **98**, 1436-1440 (1978)
- 68) Chuyen NV, Kurata T, Kato H, Fujimaki M. *Agricultural and Biological Chemistry*, **46**, 971-978 (1982)
- 69) Tsunoda S, Yamamoto K, Sakamoto S, Inoue H, Nagasawa H. *Anticancer Res*, **18**, 153-158 (1998)
- 70) Otani K, Yanaura S, Yuda Y, Kawaoto H, Kajita T, Hirano F, Osawa F, Inouye S. *Int J Tissue React*, **12**, 319-332 (1990)
- 71) Ren M, Reilly RT, Sacchi N. *Anticancer Res*, **24**, 2879-2884 (2004)

- 72) Hasegawa T, Tanaka A, Hosoda A, Takano F, Ohta T. *Phytochemistry*, **69**, 1419-1424 (2008)
- 73) Fujimori H, Hisama M, Shibayama H, Kawase A, Iwaki M. *Biosci Biotechnol Biochem*, **74**, 918-922 (2010)
- 74) Sakai A, Watanabe K, Koketsu M, Akuzawa K, Yamada R, Li Z, Sadanari H, Matsubara K, Muroyama T. *Antivir Chem Chemother*, **19**, 125-132 (2008)
- 75) Iwata K, Naito E, Yamashita K, Kakino K, Taharaguchi S, Kimachi Y, Hara M, Takase K. *Biocontrol Sci*, **15**, 123-128 (2010)
- 76) Suzuki S, Saito T, Uchiyama M, Akiya S. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **16**, 2032-2039 (1968)
- 77) Cao L, Liu X, Qian T, Sun G, Guo Y, Chang F, Zhou S, Sun X. *Int J Biol Macromol*, **48**, 160-164 (2011)
- 78) van de Vosse E, van Dissel JT, Ottenhoff TH. *Lancet Infect Dis*, **9**, 688-698 (2009)
- 79) Arancibia SA, Beltran CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. *Biol Res*, **40**, 97-112 (2007)
- 80) Ramirez-Ortiz ZG, Specht CA, Wang JP, Lee CK, Bartholomeu DC, Gazzinelli RT, Levitz SM. *Infect Immun*, **76**, 2123-2129 (2008)
- 81) Romani L. *Nat Rev Immunol*, **11**, 275-288 (2011)
- 82) Depper JM, Leonard WJ, Drogula C, Kronke M, Waldmann TA, Greene WC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4230-4234 (1985)
- 83) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. *J Immunol*, **155**, 1151-1164 (1995)
- 84) Sereti I, Gea-Banacloche J, Kan MY, Hallahan CW, Lane HC. *Clin Immunol*, **97**, 266-276 (2000)
- 85) Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Paul LC, Daha MR, van Kooten C. *Eur J Immunol*, **30**, 1807-1812 (2000)
- 86) Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R, 3rd, Kumamoto T, Edelbaum D, Morita A, Bergstresser PR, Takashima A. *J Biol Chem*, **275**, 20157-20167 (2000)
- 87) Brown GD. *Nat Rev Immunol*, **6**, 33-43 (2006)
- 88) Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, Gordon S, Brown GD. *Nat Immunol*, **8**, 31-38 (2007)
- 89) Osorio F, LeibundGut-Landmann S, Lochner M, Lahl K, Sparwasser T, Eberl G, Reis e Sousa C. *Eur J Immunol*, **38**, 3274-3281 (2008)
- 90) Carvalho A, Giovannini G, De Luca A, D'Angelo C, Casagrande A, Iannitti RG, Ricci G, Cunha C, Romani L. *Cell Mol Immunol*, **9**, 276-286 (2012)

- 91) Cabib E, Bowers B, Sburlati A, Silverman SJ. *Microbiol Sci*, **5**, 370-375 (1988)
- 92) Douglas CM. *Med Mycol*, **39 Suppl 1**, 55-66 (2001)
- 93) Bowman SM, Free SJ. *Bioessays*, **28**, 799-808 (2006)
- 94) Bohn JA, BeMiller JN. *Carbohydrate Polymers*, **28**, 3-14 (1995)
- 95) Hida T, Kawaminami H, Ishibashi K, Miura N, Adachi Y, Ohno N. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, **51**, 199-206 (2010)
- 96) Ishibashi K, Dogasaki C, Motoi M, Miura N, Adachi Y, Ohno N. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, **51**, 99-107 (2010)
- 97) Kondori N, Edebo L, Mattsby-Baltzer I. *Clin Diagn Lab Immunol*, **11**, 344-350 (2004)
- 98) Ishibashi K, Yoshida M, Nakabayashi I, Shinohara H, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **44**, 99-109 (2005)
- 99) Presterl E, Parschalk B, Bauer E, Lassnigg A, Hajdu S, Graninger W. *Int J Infect Dis*, **13**, 707-712 (2009)
- 100) Murata H. *Microbiol Immunol*, **23**, 825-831 (1979)
- 101) Murata H, Naoe S. *Prog Clin Biol Res*, **250**, 523 (1987)
- 102) Kawasaki T. *Arerugi*, **16**, 178-222 (1967)
- 103) Rowley AH, Shulman ST. *Clin Microbiol Rev*, **11**, 405-414 (1998)
- 104) Hobson RP, Munro CA, Bates S, MacCallum DM, Cutler JE, Heinsbroek SE, Brown GD, Odds FC, Gow NA. *J Biol Chem*, **279**, 39628-39635 (2004)
- 105) Tada R, Ikeda F, Aoki K, Yoshikawa M, Kato Y, Adachi Y, Tanioka A, Ishibashi K, Tsubaki K, Ohno N. *Immunol Lett*, **123**, 144-148 (2009)
- 106) Miura NN, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **44**, 2137-2141 (1996)
- 107) Ohno N, Uchiyama M, Tsuzuki A, Tokunaka K, Miura NN, Adachi Y, Aizawa MW, Tamura H, Tanaka S, Yadomae T. *Carbohydr Res*, **316**, 161-172 (1999)
- 108) Tokunaka K, Ohno N, Adachi Y, Tanaka S, Tamura H, Yadomae T. *Int J Immunopharmacol*, **22**, 383-394 (2000)
- 109) Ishibashi K, Miura NN, Adachi Y, Tamura H, Tanaka S, Ohno N. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **42**, 155-166 (2004)
- 110) Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. *Biol Pharm Bull*, **24**, 820-828 (2001)
- 111) Lee-MacAry AE, Ross EL, Davies D, Laylor R, Honeychurch J, Glennie MJ, Snary D, Wilkinson RW. *J Immunol Methods*, **252**, 83-92 (2001)
- 112) Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y, Miura NN, Ohno N, Okawara AI, Murata H, Naoe S, Suzuki K. *Mod Rheumatol*, **20**, 160-167 (2010)
- 113) Takahashi K, Oharaseki T, Nagao T, Yokouchi Y, Yamada H, Nagi-Miura N,

- Ohno N, Saji T, Okazaki T, Suzuki K. *Pediatr Rheumatol Online J*, **9**, 30 (2011)
- 114) Ishibashi K-i, Yoshida M, Nakabayashi I, Shinohara H, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **44**, 99-109 (2005)
- 115) Seidel UJE, Schlegel P, Lang P. *Frontiers in Immunology*, **4** (2013)
- 116) Chiba S, Ikushima H, Ueki H, Yanai H, Kimura Y, Hangai S, Nishio J, Negishi H, Tamura T, Saijo S, Iwakura Y, Taniguchi T. *Elife*, **3** (2014)
- 117) Kerscher B, Willment JA, Brown GD. *Int Immunol*, **25**, 271-277 (2013)
- 118) Graham LM, Brown GD. *Cytokine*, **48**, 148-155 (2009)
- 119) Sato A, Mayer WE, Overath P, Klein J. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 7779-7784 (2003)
- 120) Xie J. *Glycoconj J*, **29**, 273-284 (2012)
- 121) Bartel Y, Bauer B, Steinle A. *Front Immunol*, **4**, 362 (2013)
- 122) Ramsden CE, Zamora D, Leelarthapin B, Majchrzak-Hong SF, Faurot KR, Suchindran CM, Ringel A, Davis JM, Hibbeln JR. *Bmj*, **346**, e8707 (2013)
- 123) Karppi J, Laukkanen JA, Makikallio TH, Kurl S. *Eur J Public Health*, **22**, 835-840 (2012)