

図6. rDer f 1によるマウス皮膚バリアの破壊. a: プロテアーゼ活性. b: 経皮水分蒸散量 (TEWL) を指標としたバリア機能低減効果の評価. c: リボフラビン浸透量を指標としたバリア機能低減効果の評価. d: 皮膚の電子顕微鏡写真. b-d において活性化rDer f 1で対照 (Vehicle) と差異が見られたが、システインプロテアーゼ特異的阻害剤であるE-64で処理したrDer f 1では対照と差異が見られない.

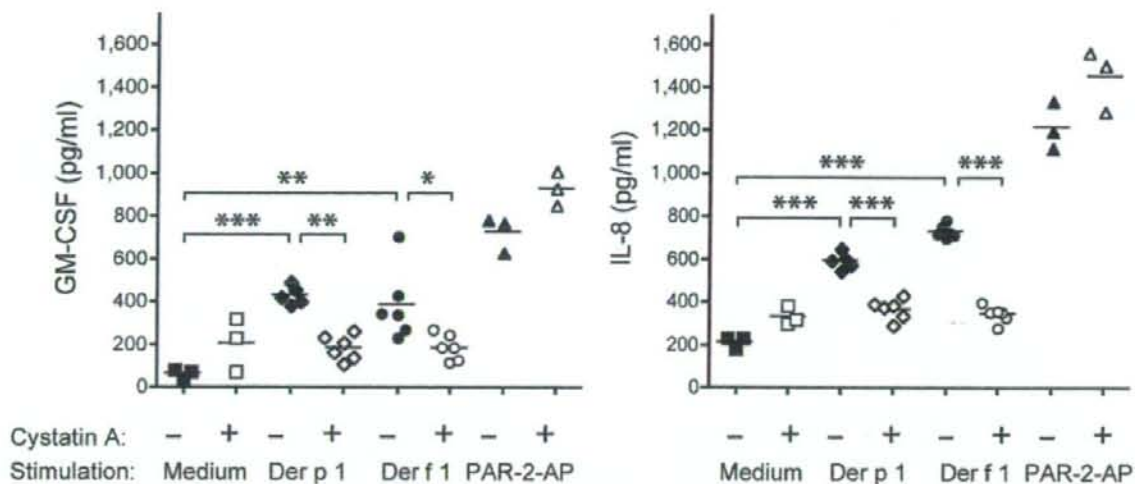


図7. ヒトケラチノサイトからのGM-CSFおよびIL-8放出誘導. rDer f 1/rDer p 1のシステインプロテアーゼ活性に依存的であった(システインプロテアーゼ特異的阻害剤であるcystatin Aで放出が抑制された).

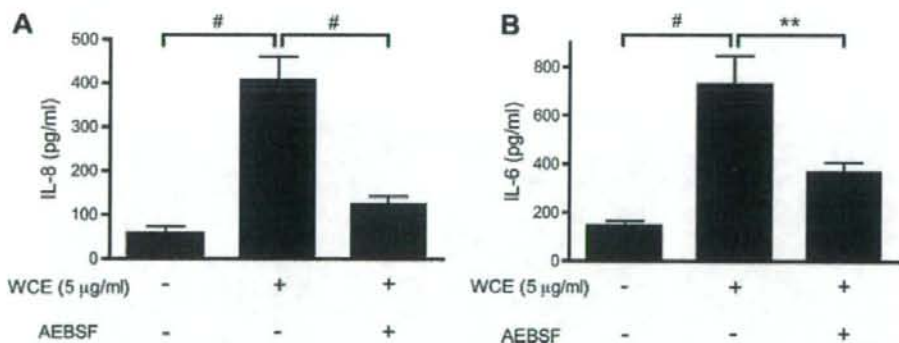


図8. ヒト眼結膜上皮細胞株からのIL-8およびIL-6放出誘導. セリンプロテアーゼ活性に富むダニ培養抽出液(WCE)で刺激. セリンプロテアーゼ特異的阻害剤であるAEBSFで放出が抑制された。

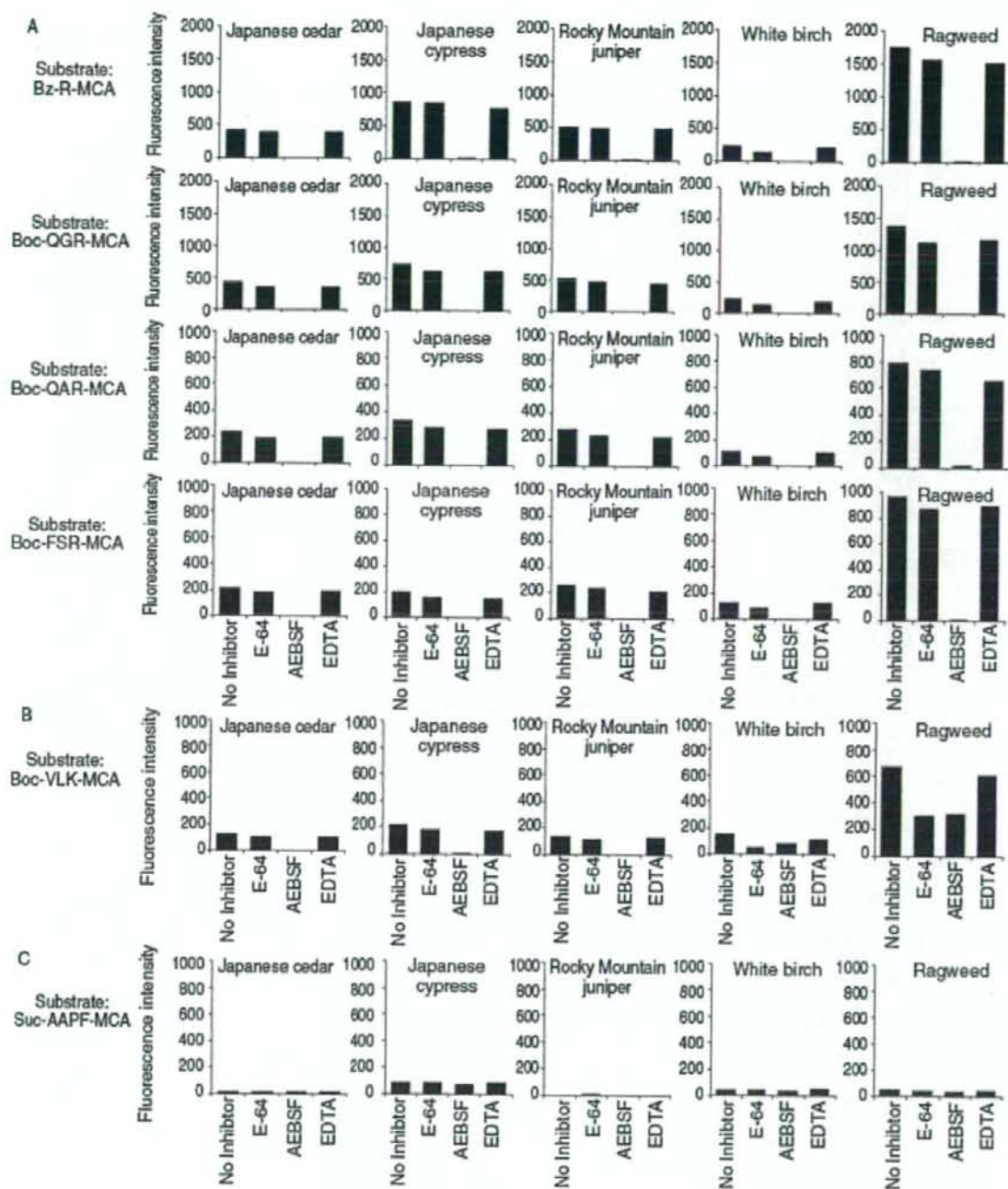


図9. 花粉抽出液中のプロテアーゼ活性. E-64, AEBSF, EDTAはそれぞれシステインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、金属プロテアーゼの阻害剤.

## 経皮免疫法によるアレルギー免疫療法の開発

分担研究者：内藤 誠之郎 国立感染症研究所 検定検査品質保証室 主任研究官

### 研究要旨

経皮免疫法は、皮膚の表面に抗原を投与することによって免疫応答を誘導する、注射に依らない免疫法である。近年、コレラ毒素をアジュバントとして用いることにより有効な経皮免疫応答を誘導できることが報告された。本研究では、経皮免疫法のアレルギー免疫療法への応用を検討した。抗原溶液を含ませたガーゼパッチを皮膚に貼付する方法（パッチ法）でマウスを経皮免疫したところ、パッチ貼付の時間を長くすることにより、必ずしもアジュバントを用いなくても経皮免疫応答が誘導された。テープストリッピングによる角質層の除去やエタノール、オレイン酸塗布による皮膚の前処理により経皮免疫応答は増強された。しかし、様々な方法により経皮免疫を促進しても、注射に比べると免疫効率は低かった。そこで、効率的な抗原の皮膚送達を実現できると考えられる溶解性マイクロニードルアレイ（dMNA）を用いた経皮免疫を検討した。dMNAを用いた経皮免疫では、パッチ法による経皮免疫に比べてはるかに強力な免疫応答が誘導され、皮内注射と比べても遜色ないレベルであった。dMNAによる経皮免疫法は、皮内注射に替わる低侵襲性の減感作療法投与ルートとして有望であると思われた。

### A. 研究目的

経皮免疫法は、皮膚の表面に抗原を投与することによって動物に抗原特異的な免疫応答を誘導する、注射に依らない免疫法である。経皮免疫法を、アレルギー免疫療法における抗原投与方法に適用できれば、簡便で安全な方法として有用性の高い方法になる可能性がある。しかし、一般に正常な皮膚は抗原のような高分子物質の通過を阻止するバリアー機能を有しており、これが経皮免疫法の効果を阻害する要因と考えられる。そこで、本研究では、安全で効果的な経皮免疫法を確立するために、経皮免疫における効果的な抗原の皮膚送達法を検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 動物

初回免疫の時点で 6～8 週令のメスの C57BL/6 マウスまたは BALB/c マウス（日本 SLC、浜松）を用いた。

#### 2. 試薬

卵白アルブミン（OVA）、コレラ毒素（CT）（シグマ社）、オレイン酸（和光純薬工業）、HRP 標識抗マウス IgG（ザイメッド社）、抗マウス IgE 抗体（ベクトン・ディッキンソン社）を用いた。

#### 3. 溶解性マイクロニードルアレイの作製

基剤のコンドロイチン硫酸と抗原の OVA をよく混合した後に鋳型に入れ、乾燥・固化させたものを基盤上に 100 本配列した（図 2）。

#### 4. ガーゼパッチによる経皮免疫（パッチ法）

マウスの腹部または耳介の皮膚に抗原溶液を含ませたガーゼパッチ（メディパッチ®；白十字）を貼付してテープで固定した（図1）。パッチの貼付は、ケタミンとキシラジンによる麻酔下で行なった。腹部の皮膚にパッチを貼る場合には、その2日前にバリカン（No.40）で腹部または背部の毛を、皮膚を傷つけないように慎重に刈った。免疫終了後にパッチを貼付していた皮膚部位を滅菌水でよく洗浄して、ペーパータオルで拭き取った。

#### 5. 溶解性マイクロニードルアレイによる経皮免疫（dMNA法）

ガーゼパッチによる免疫と同様な方法で、免疫の2日前にマウスの背部皮膚の毛を刈った。露出した皮膚の表面に溶解性マイクロニードルアレイ（dMNA）を、5分間圧着した後、テープで18時間固定した。

#### 6. テープストリッピング

セロテープ（ニチバン）をマウスの皮膚に貼って、勢いよくはがす操作を10回繰り返した。セロテープは1回ごとに新しいテープを用いた。

#### 7. ELISAによる血清中の抗原特異的IgG抗体価の測定

初回免疫および2回目の免疫それぞれ2週間後に採血して、血清中のOVA特異的IgGおよびIgE抗体価をELISA法により測定した。

#### 8. 倫理面への配慮

マウスを用いた実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得たのち、国立感染症研究所動物実験指針にしたがって実施した。

### C. 結果

#### 1. ガーゼパッチの貼付時間による抗体応答の増強

OVAを100 $\mu$ g含んだパッチをマウスの腹部に貼付した。貼付時間を2時間から16時間の間で変えて比較した。アジュバントとしてCTを10 $\mu$ g加えたパッチでは、2時間の貼付で血清中に有意な抗原特異的IgG抗体産生が誘導された。一方、CTを用いないOVA単独の免疫では、2時間の貼付では有意な抗体産生は観察されなかったが、16時間の貼付では有意な抗体産生が誘導された（図3）。このことから、必ずしもCTをアジュバントとして用いなくても経皮免疫応答を誘導できると考えられた。

#### 2. テープストリッピングによる経皮免疫応答の促進

マウスの耳介の皮膚の角質層をテープストリッピングにより除去した後に、OVAを10 $\mu$ g含んだパッチを16時間貼付した。テープストリッピングを施すことにより、抗原特異的IgG抗体産生は顕著に増強された（図4）。

#### 3. エタノールおよびオレイン酸前処理による経皮免疫応答の増強

マウスの耳介の皮膚を70%エタノールまたは70%エタノール+10%オレイン酸を含んだ脱脂綿で20回清拭した後に、OVAを100 $\mu$ g含んだパッチを16時間貼付した。前処理を施さなかった場合に比べて70%エタノールで前処理することにより抗原特異的IgG抗体産生は増強され、前処理に10%オレイン酸を加えることにより増強効果は

さらに改善された (図 5)。

#### 4. dMNA を用いた経皮免疫

ここまでの検討により、抗原の皮膚内への送達を促進する皮膚処理を施すことにより、パッチ法による経皮免疫応答を増強できることが明らかになった。しかし、パッチ法による経皮免疫応答は、注射に比べると免疫効率が低かった。そこで、より効率的な抗原の皮膚送達が可能である dMNA による経皮免疫を検討した。dMNA は、抗原を添加した水溶性の微小針を基盤上に多数配列したものである。皮膚に圧着すると、微小針は角質層を貫いて皮膚上層内で溶けて抗原を放出する。このように dMNA は、低侵襲かつ効率的に抗原を皮内に送達することができると考えられた。

パッチ法または dMNA 法によりマウスの背部皮膚を免疫し、誘導される血清中の抗体応答を比較した。パッチ法では有意な OVA 特異的 IgG 抗体産生を誘導するためには 2 回の免疫が必要だったが、dMNA 法では初回免疫で抗体産生が誘導された (図 6)。また、パッチ法では抗体の誘導に 100  $\mu$ g の OVA 量が必要だったが、dMNA 法では、10  $\mu$ g の投与でも十分な抗体が誘導された。さらに、パッチ法において、アジュバントとしてコレラ毒素を同時に投与した場合でも、アジュバントを使用しない dMNA 法に及ばなかった。このように、dMNA を用いることによりガーゼパッチの貼付よりも効率的に抗体応答が誘導された。

#### 5. dMNA 法と皮内注射の比較

dMNA 法と皮内注射について、それぞれ

マウスへの OVA 投与量を 0.5  $\mu$ g、2.5  $\mu$ g、10  $\mu$ g に変えて実験を行い、OVA 特異的 IgG 抗体の産生を比較した。皮内注射に比べて dMNA 法では抗体産生量がやや低値となる傾向が認められたものの、大きくは劣らない結果が得られた (図 7)。

#### 6. IgE 抗体産生および IgG サブクラス抗体産生の比較

dMNA 法、パッチ法および皮内注射による OVA 特異的 IgE 抗体産生および IgG サブクラス抗体産生を、2 回免疫後 2 週の段階の血清で比較した。パッチ法に比べて、dMNA 法および皮内注射では、IgE 抗体の産生が低値となる傾向が認められた (図 8)。一方、IgG<sub>1</sub> 抗体と IgG<sub>2a</sub> 抗体の比率には、3 種の投与方法で違いは認められなかった (図 9)。

#### D. 考察

抗原を含んだパッチを皮膚に貼付する時間を長くするほど免疫応答は増強された。16 時間の貼付ではアジュバントとして CT を用いなくても有意な抗体産生が誘導された。これまでは、一般的に、有意な経皮免疫応答の誘導にはアジュバントの使用が不可欠と考えられていたが、長時間のパッチ貼付を行えば、必ずしもアジュバントを使用しなくても経皮免疫が可能であることが明らかになった。このことは、CT のような毒性の強いアジュバントを使用しないで、より安全性の高い経皮免疫法を開発できる可能性があることを示している。

テープストリッピングによる角質層の除去、エタノールおよびオレイン酸による皮膚の前処理は、経皮免疫応答を増強した。このよ

うに抗原の皮膚送達を促進することにより経皮免疫応答を増強することができたが、注射に比べると、免疫効率は低かった。そこで、より効率的に抗原を皮膚に送達できる方法として、dMNA 法による経皮免疫を検討した。その結果、dMNA 法は、パッチ法に比べてはるかに効率的に免疫応答を誘導できることが明かになった。その一方で、dMNA は皮膚のごく表層に刺し込まれるだけなので痛みなく、低侵襲性は保たれている。さらに、dMNA 法による経皮免疫では、量的 (dose-response) および質的 (IgE 抗体の抑制傾向) に、皮内注射と同等の抗体応答が観察された。これらのことから、dMNA 法は皮内注射に替わる低侵襲性のアレルゲン投与方法としてきわめて有望であると考えられた。

#### E. 結論

抗原の皮膚送達を促進するような条件を整えることにより、コレラ毒素などのアジュバントを用いなくても経皮免疫応答を誘導できる。抗原を効率的に皮膚送達する dMNA を用いた経皮免疫では、皮内注射に匹敵する効率で免疫応答が誘導された。dMNA による経皮免疫法は、皮内注射に替わる低侵襲性の減感作療法投与ルートとして有望と思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Naito S, Maeyama J, Mizukami T, Takahashi M, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. *Vaccine* 2007; 25: 8762-8770.

2) 内藤誠之郎: 経皮ワクチン. 日本臨床 66(10): 1888-93, 2008.

##### 2. 学会発表

1) 内藤誠之郎, 前山順一, 水上拓郎, 長谷川秀樹, 浜口 功, 山口一成: 経皮ワクチンに関する研究—抗原の皮膚送達促進による免疫効果の増強とインフルエンザ HA ワクチンへの応用. 第 11 回日本ワクチン学会, 平成 19 年 12 月, 横浜.

2) 内藤誠之郎: 自己溶解性マイクロバイルアレイによる経皮ワクチンの試み. 第 2 回ナノメディスン・アプリケーション研究会, 2008 年 9 月 18 日

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

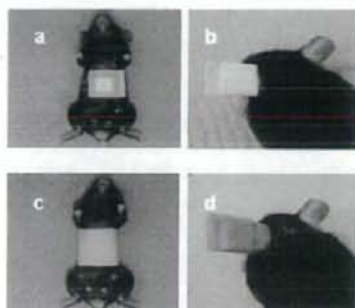


図1. 経皮免疫の方法

パッチを腹部または耳介に貼付して(a,b)テープで固定する(c,d)。



図2. 溶解性マイクロアレイ(dMNA)

左: 1セントコイン上のdMNA

右: dMNAのクローズアップ

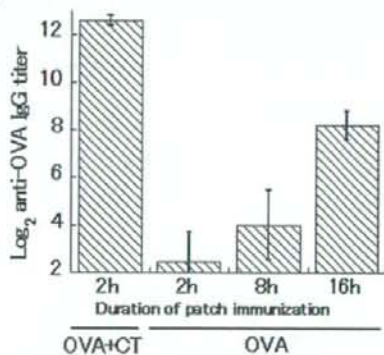


図3. パッチ貼付時間の延長による抗体応答の増強

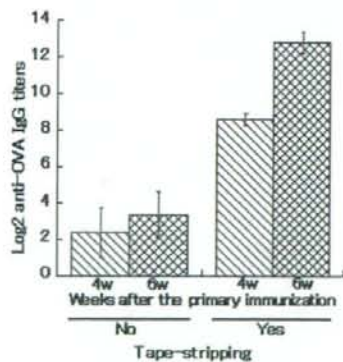


図4. テープストリッピングによる経皮免疫応答の促進

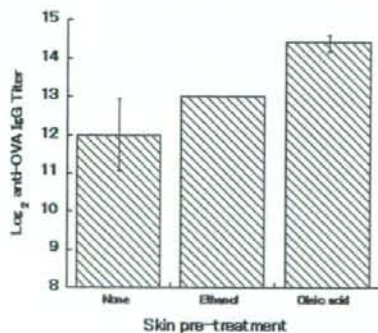


図5. エタノールおよびオレイン酸前処理による経皮免疫応答の増強



図6. パッチ法とdMNA法におけるIgG抗体産生の比較

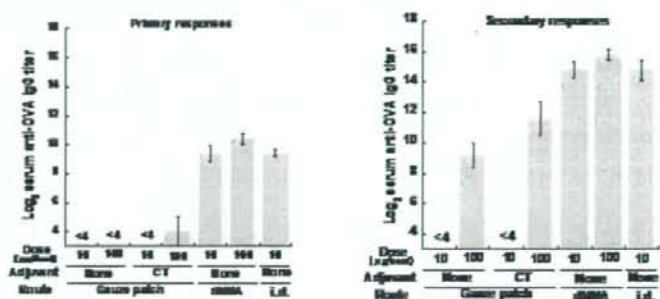


図7. dMNA法と皮内注射におけるIgG抗体産生の比較

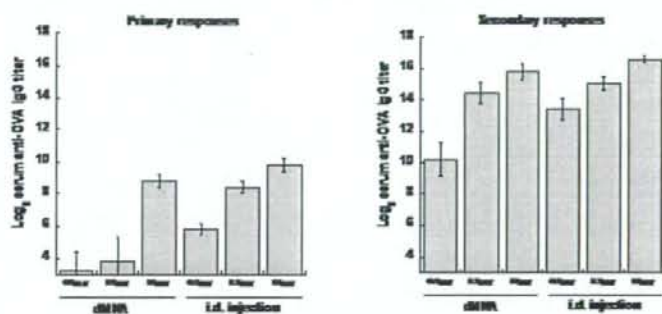


図8. パッチ法、dMNA法、皮内注射によるIgE抗体産生

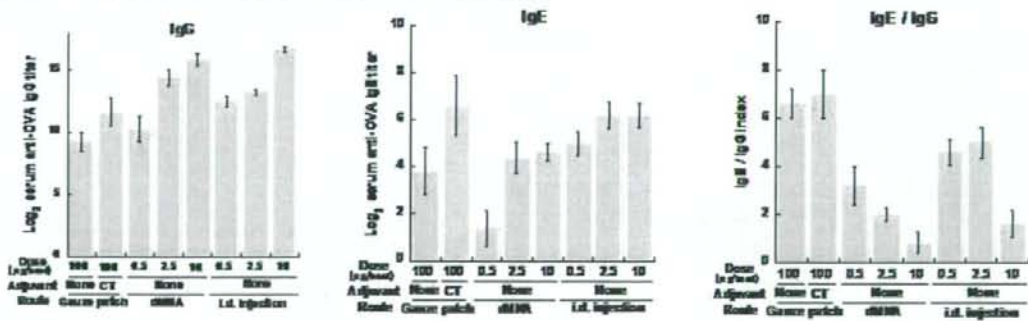
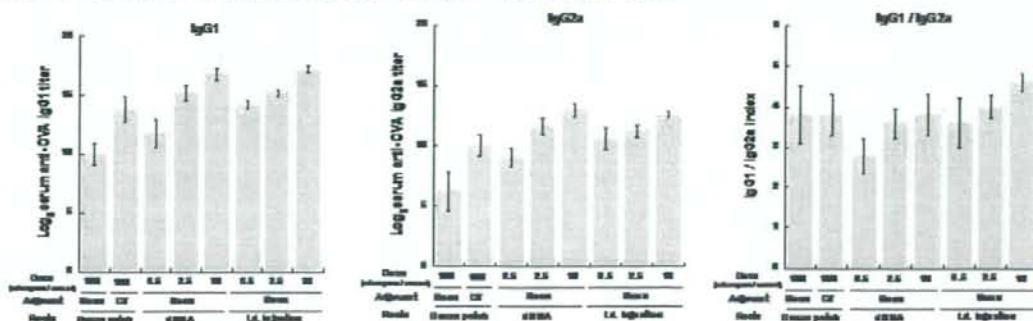


図9. パッチ法、dMNA法、皮内注射によるIgGサブクラス抗体産生



## 免疫療法におけるヒノキ花粉アレルゲンの必要性の検討

分担研究者 斎藤 三郎 東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所分子免疫学研究所  
研究協力者 藤村孝志 千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学  
岡本美孝 千葉大学大学院 医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部腫瘍学

### 研究要旨

本研究ではスギ花粉アレルゲンを用いた減感作療法がスギ花粉症を根治するための免疫療法として十分かどうか、T細胞エピトープの観点から追及した。スギ花粉アレルゲンの Cry j 1 の主要なT細胞エピトープ部位とそれに相当する Cha o 1 のペプチド部分に対するスギ花粉症患者末梢血単核球の反応性から、それぞれのアレルゲン特異的あるいは共通T細胞エピトープ部位が存在するのか解析した。その結果、pp211-230 は共通エピトープ部位であり、pp61-80, pp91-110, pp161-180, および pp311-330 はそれぞれのアレルゲン特異的T細胞エピトープ部位であることが判明した。解析は充分ではないが、pp231-250 は共通エピトープ部位に、pp151-170 および pp271-280 は Cry j 1 特異的エピトープ部位になることが示唆された。ヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 特異的T細胞エピトープの存在は、スギ花粉アレルゲンエキスをを用いた免疫療法を評価する上で重要な情報となり、今後の解析により免疫療法におけるヒノキ花粉アレルゲンの必要性が明らかになると思われた。さらに、マウスにおいては、3系統について Cry j 1 および Cha o 1 特異的T細胞エピトープ部位を明らかにし、免疫療法においてヒノキ花粉アレルゲンの必要性を確認した。

### A. 研究目的

スギ花粉症の症状は、スギ花粉飛散の時期ばかりでなくヒノキ花粉飛散の時期にも増悪することが知られている。スギ花粉アレルゲンエキスをを用いた減感作療法を受けている患者においても、ヒノキ花粉飛散時期にはその効果が減弱することが知られている。ヒノキ花粉の飛散量は近年増加しており、スギ花粉と同じくらい飛散する地域も観察されている。したがって、現在行なわれている、スギ花粉アレルゲンエキスをを用いた減感作療法が、今後増加が予想されるヒノキ花粉症に対しても十分な免疫療法になりうるかどうか検討することは重要と思われる。

スギ花粉の主要なアレルゲン Cry j 1 とヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 の相同性は、アミノ酸レベルで80%であり、ヒノキ花粉飛散時期に症状が増悪するのはこのためと推測されている。しかしながら、Cha o 1

特異的T細胞の存在もモデル動物では見出されており、スギ花粉アレルゲンエキスをを用いた減感作療法の効果がヒノキ花粉飛散時期に減弱するのは、スギ花粉症患者においても Cha o 1 特異的T細胞の存在によるのかも知れない。

本研究では、現行のスギ花粉アレルゲンエキスをを用いた根本的な治療に、ヒノキ花粉アレルゲンの必要性を検討するために、スギ花粉症患者において Cha o 1 特異的T細胞が存在するのか、T細胞エピトープの観点から解析を試みる。

さらに、マウスを用いて免疫療法にヒノキ花粉アレルゲンが必要かどうか、それぞれのアレルゲン特異的T細胞エピトープ部位を含めて検討する。これらの解析は、ヒノキ花粉アレルゲンの必要性を明らかにするばかりか、スギ花粉アレルゲンエキスをを用いた免疫療法を評価する上で重要な情報を提供すると思われる。

## B. 研究方法

### (1) スギ花粉症患者についての検討

すでに明らかになっている Cry j 1 の T 細胞エピトープ部位とそれぞれに相当する Cha o 1 のペプチド部分に対する花粉症患者末梢血単核球(PBMC)の反応性から、共通および特異的 T 細胞エピトープの存在を解析した。

#### 1) Cry j 1 あるいは Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープ部位の存在

最初に、Cry j 1 の主要な T 細胞エピトープ部位に相当する Cha o 1 のペプチド部分を合成して、それぞれを抗原として患者末梢血単核球との増殖反応性を調べた(表 1)。

#### 2) 舌下療法患者の客観的評価

舌下療法の効果を客観的に評価するために、患者 PBMC の Cry j 1, cry j 2, Cha o 1 および PPD に対する増殖反応を解析した。なお、スギ花粉症患者末梢血は千葉大学から提供された。

### (2) マウスでの検討

B10.S マウスに精製 Cry j 1 を週 4 回、2 週間経口投与後、Cry j 1 あるいは Cha o 1 で 2 週間点鼻感作した。感作終了 1 週間後、Cry j 1 と Cha o 1 に対する T 細胞の反応性および血清抗体価を測定した。Cry j 1 あるいは Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープ部位の同定は、B10.S、BALB/c および C57BL/6 マウスにそれぞれのアレルゲンで感作した後に、マウス脾細胞の部分合成ペプチドに対する増殖反応性を検討することにより解析した。

## C. 結果

### (1) スギ花粉症患者についての検討

T 細胞エピトープ部位が解析できたのは患者 62 名であった。その結果、pp211-230 は共通エピトープ部位であり、pp61-80, pp91-110, pp161-180, および pp311-330 はそれぞれのアレルゲン特異的 T 細胞エピトープ部位であることが示唆された。解析は充分ではないが、pp231-250 は共通エピトープ部位に、pp151-170 および pp271-280 は Cry j 1 特異的エピトープ部位になるが示唆

された(図 1)。さらに、千葉大学から提供された患者 104 名について、Cry j 1, Cry j 2, Cha o 1 および PPD に対する増殖反応性を解析した。

### (2) マウスでの検討

B10.S マウスを用いた系では、Cry j 1 の感作により誘導された Cry j 1 に対する免疫応答は Cry j 1 の経口投与により T 細胞と B 細胞レベルで抑制された。さらに、Cry j 1 の感作により誘導された Cha o 1 に対する交叉反応性も Cry j 1 の経口投与により抑制されることが判明した(図 2)。これに対して、Cha o 1 の感作により誘導された Cha o 1 に対する免疫応答は抑制できなかった。この結果から Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープの存在が示唆されたため、Cry j 1 あるいは Cha o 1 で感作したマウスを作成し、それぞれのアレルゲンの部分合成ペプチドに対する増殖反応性から T 細胞エピトープ部位を同定した(表 2)。その結果、B10.S マウスでは共通エピトープ部位は p211-230、Cry j 1 特異的的部位は 3 ヶ所(p81-100, p111-130, p311-330)、Cha o 1 特異的的部位は 2 ヶ所(p68-82, p278-292) 存在することが判明した。BALB/c マウスでは、Cry j 1 特異的 T 細胞エピトープ部位は一ヶ所 p271-290、Cha o 1 特異的的部位は 2 ヶ所(p63-77, p136-148)であった。なお、交叉反応がないために共通エピトープ部位は認められなかった。C57BL/6 は Cry j 1 に対しては無応答性であるが、Cha o 1 には反応する。この Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープ部位は p311-325 一ヶ所であった。この結果から、Cry j 1 特異的あるいは Cha o 1 特異的マウス T 細胞エピトープの存在が明らかになった。

## D. 考察

ヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 特異的 T 細胞エピトープの存在は、スギ花粉アレルゲンエキスをを用いた免疫療法を評価する上で重要な情報となり、今後の解析によりヒノキ花粉アレルゲンの必要性が明らかにされると思われた。本研究は、Cry j 1 の T 細胞エピトープ部位の観点から解析

しているので、Cry j 1 のT細胞エピトープ部位とはまったく異なった Cha o 1 特異的T細胞エピトープが存在するのか、網羅的に解析する必要があると思われる。

B10.S マウスを用いた解析から、スギ花粉アレルゲンCry j 1 の経口投与により、Cry j 1 に対する免疫応答性がばかりでなく、Cry j 1で誘導されたCha o 1に対する交叉免疫応答性も抑制される事が判明した。これは、スギ花粉アレルゲンCry j 1の主要なT細胞エピトープ部位がp22の共通T細胞エピトープ部位である患者は、スギ花粉エキスをを用いた免疫療法によりヒノキ花粉アレルゲンCha o 1に対する交叉反応も抑制されることを示唆している。しかし、Cha o 1で誘導された免疫応答は、Cha o 1特異的T細胞エピトープ部位が存在するためにCry j 1 の経口投与により抑えられない。この結果は、ヒトにおいてもCha o 1特異的T細胞エピトープをもつ患者ではスギ花粉エキスをを用いた免疫療法では、ヒノキ花粉アレルゲンCha o 1に対する反応は抑制できないことを示唆している。さらに、3系統のマウスで Cha o 1 特異的T細胞エピトープを明らかにしたことは、免疫療法におけるヒノキアレルゲンの有用性を解明する上で意味があると思われる。

#### E. 結語

ヒノキ花粉アレルゲン Cha o 1 には、Cry j 1 とは異なった Cha o 1 特異的T細胞エピトープのペプチドが存在することが、スギ花粉症患者およびマウスにおいて明らかになった。このことは、スギ花粉アレルゲンエキスをを用いた免疫療法を評価する上で重要な情報を提供するとともに、今後ヒノキ花粉飛散時期に免疫療法の効果が減弱する症例を解析することにより、免疫療法におけるヒノキ花粉アレルゲンの必要性が明らかになるとと思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Akiyama N, Ohno Y, Fukuda T, Manome Y, Saito S. Enhancing activity of N-glycosylation for constitutive proteins secretions in non-polarized cells. (Biochem Biophys Res Commun Available online 25 February 2009)
- 2) Yamada K, Akiyama N, Yamada S, Tanaka H, Saito S, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Taip2 is a novel cell death-related gene expressed in the brain during development. Biochem Biophys Res Commun. 2008; 369: 426-31.
- 3) Ikeshima-Kataoka H, Shen JS, Eto Y, Saito S, Yuasa S. Alternation of inflammatory cytokine production in the injured central nervous system of tenascin-deficient mice. In Vivo 2008; 22: 409-413.
- 4) Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice-Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate-. Eur J Pharmacol 2008; 578: 87-96.
- 5) Ikeshima-Kataoka H, Saito S, Yuasa S. Tenascin-C is required for proliferation of astrocytes in primary culture. In Vivo 2007; 21, 629-633.
- 6) Wakahara K, Tanaka H, Takahashi G, Tamari M, Nasu R, Toyohara T, Takano H, Saito S, Inagaki N, Shimokata K, Nagai H. Repeated instillations of *Dermatophagoides farinae* into the airways can induce Th2-dependent airway hyperresponsiveness, eosinophilia and remodeling in mice -Effect of intratracheal treatment of fluticasone propionate. Eur J Pharmacol 578: 87-96 2008.
- 7) Kurosaka D, Yasuda J, Ikeshima-Kataoka H, Ozawa Y, Yoshida K, Yasuda C, Kingetsu I, Saito S, Yamada A. Decreased numbers of signal-joint t cell receptor excision circle-containing CD4+ and CD8+ cells in systemic lupus erythematosus patients. Mod Rheumatol 17: 296-300, 2007.
- 8) Kurosaka D, Yasueda J, Yoshida K, Yoneda

A, Yasuda C, Kingetsu I, Toyokawa Y, Saito S, Yamada T. Abnormal telomerase activity and telomere length in T and B cells from patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol. 2006; 33: 1102-1107.

9) Suzuki H, Akiyama N, Ohashi T, Saito S, Eto Y. Human shugoshin mediates kinetochore-drive formation of kinetochore microtubules. Cell Cycles 2006; 5:1094-1101.

10) Kohno H, Sakai T, Saito S, Okano K, Kitahara K. Treatment of experimental autoimmune uveoretinitis with atorvastatin and lovastatin. Experimental Eye Research 2007; 84: 569-576.

## 2. 学会発表

1) 小澤 仁, 齋藤三郎 ほか. 好塩基球活性化テストを用いたスギ花粉特異的免疫療法の効果判定. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008.

2) 飯倉克人, 谷野千鶴子, 佐藤哲夫, 勝沼俊雄, 中川秀巳, 永田欽也, 秋山暢丈, 齋藤三郎. 喘息患者末梢血単核球の IL-31 産生能. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008.

3) 齋藤三郎, 秋山暢丈, 神野英生, 大野裕治. IL-31 は血清 IgE レベルを増強する. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 2008.

4) Saito S, Akiyama N, Ohno Y, Ikeshima K. IgE responses triggered by IL-31. EAACI 62 Supplement 83: 457, June, 2007. Goteborg, Sweden.

5) 齋藤三郎, 秋山暢丈. IL-31 過剰発現マウスの皮膚症状と血清 IgE レベル. 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2007年9月.

6) 齋藤三郎. スギ花粉症の食べるワクチン (シンポジウム). 第56回日本アレルギー学会. 2006年11月.

7) 三好康介, 齋藤三郎 ほか. ダニ抗原誘発マウス気道炎症における Th2 サイトカインの意義 (2). 第56回日本アレルギー学

会. 2006年11月.

8) 佐藤哲夫, 齋藤三郎 ほか. 喘息およびアトピー性皮膚炎患者末梢血単核球の IL-31 産生能と血清 IgE 値. 第56回日本アレルギー学会. 2006年11月.

## H. 知的財産の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

表 1. 解析に用いた Cry j 1 の主要な T 細胞エピトープ部位とそれに相当する Cha o 1 のペプチド配列

P7 (61-80) GATDRPLWIIFSGNMNIK **** * ***** * **** GATRERSLWIIFSKNLNIK	P22 (211-230) KSMKVTVAFNQFGPNCQGRM ***** KSMKVTVAFNQFGPNAGQRM
P10 (91-110) TFDGRGAQVYIGNGGCVFI * ***** * ***** * TIDGRGAEVHIGNGGCLFM	P24 (231-250) PRARYGLVHVANNYDPWTI ***** PRARYGLIHVANNYDPWSI
P16 (151-170) DALTLRTATNIWIDHNSFSN ** * * * ***** * DAITMRNVTDVWIDHNSLSD	P28 (271-290) PNESSYKKQVTIRIGCKTSSS ** * * * * * * * * PNDSKKKEVTRRVGCESPST
P17 (161-180) IWIDHNSFSNSSDGLVDVTL ***** * ***** VWIDHNSLSDSSDGLVDVTL	P32 (312-330) SSGKYEGGNIYTKKEAFNVE **** * * * * * * * * SSGKNEGTNIYNNNEAFKVE
上段が Cry j 1, 下段が Cha o 1	

図 1. 末梢血単核球の Cry j 1 の主要エピトープ部位とそれに相当する Cha o 1 のペプチドに対する増殖反応性

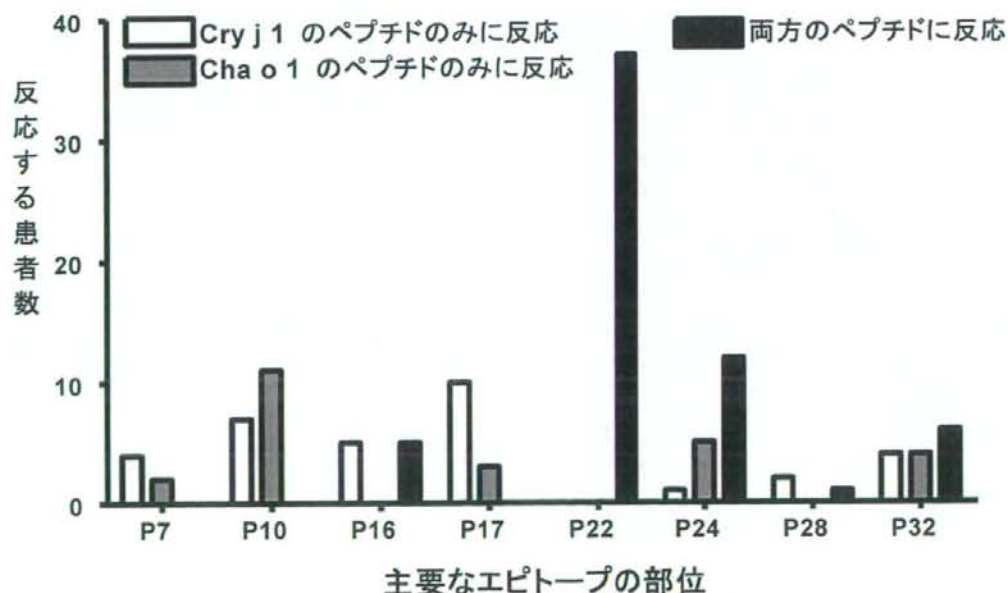
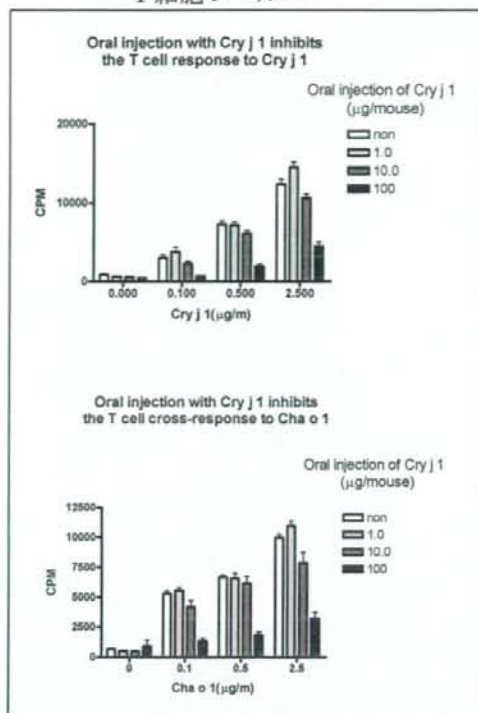


図 2. Cry j 1 の経口免疫寛容  
- T 細胞 レベル -



- B 細胞 レベル -

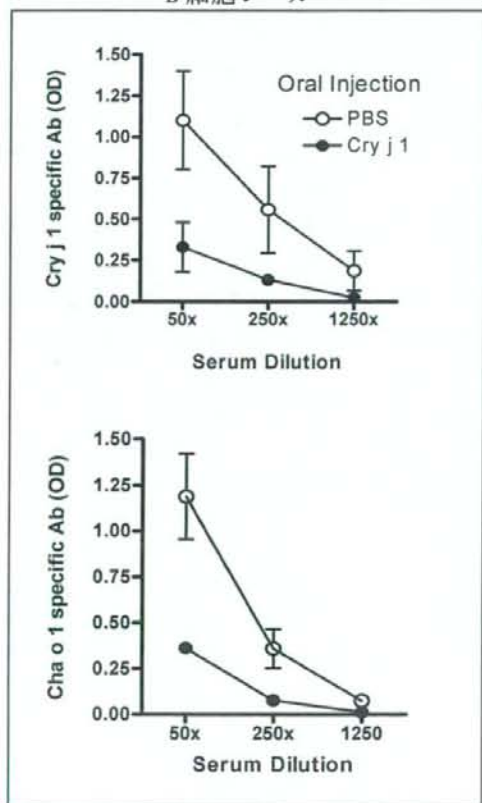


表 2. マウス T 細胞エピトープの配列

**A. BALB/c mouse**

61 80  
GATRERSLWII FSKNLNIKL: Cha o 1  
 \*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*  
 GATDRPLWII FSGNMNIKL: Cry j 1  
 131 150  
 SGNVLI SEASGVVPVHAQDG: Cha o 1  
 \*\*\*\*\* \* \*\* \* \* \* \* \*  
 LGNVLINE SFGVEPVHPQDG: Cry j 1  
 271 290  
 PNDSDKKEVTRRVGCEPST: Cha o 1  
 \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
PNESYKKQVTIRIGCKTSSS: Cry j 1

**B. B10.S mouse**

81 100  
 NMPLYIAGNKTIDGRGAEVH: Cha o 1  
 \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
KMPMYIAGYKTFDGRGAQVY: Cry j 1  
 111 130  
 RTVSHVILHGLNIHGCVTSV: Cha o 1  
 \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
KRVSNVIIHGLHLYGCSTSV: Cry j 1  
 211 230  
KSMKVTVAFNQFGPNAGQRM: Cha o 1  
 \*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
KSMKVTVAFNQFGPNCGQRM: Cry j 1  
 278 292  
EVTRRVGCEPSTCA: Cha o 1  
 \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
 QVTIRIGCKTSSSCS: Cry j 1  
 311 330  
 SSGKNEGNTIYNNNEAFKVE: Cha o 1  
 \*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
SSGKYEGGNIYTKKEAFNVE: Cry j 1

**C. C57BL/6 mouse**

311 325  
SSGKNEGNTIYNNNE: Cha o 1  
 \*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*  
 SSGKYEGGNIYTKKE: Cry j 1

T 細胞エピトープ部位: 下線部分

舌下免疫療法における臨床試験および作用機序の解析に関する研究

主任研究者	阪口雅弘	麻布大学獣医学部獣医学科微生物学第1研究室	教授
分担研究者	岡本美孝	千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学・頭頸部腫瘍学	教授
	中山俊憲	千葉大学大学院医学研究院免疫発生学	教授
	大久保公裕	日本医科大学耳鼻咽喉科	准教授
	安枝 浩	国立病院機構相模原病院臨床研究センター	室長
	斎藤三郎	東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所	准教授
研究協力者	堀口茂俊	千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学・頭頸部腫瘍学	講師
	大川 徹	千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学・頭頸部腫瘍学	助教
	茶園英明	千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学・頭頸部外科	助教
	藤村孝志	千葉大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学・頭頸部腫瘍学	G-COE フェロー

研究要旨：舌下免疫療法は、皮下注射型減感作療法に替わるより安全な根治療法として注目されているが、その治療効果および治療機序については明らかになっていない。本研究では2重盲検比較臨床試験により舌下免疫療法の治療効果と安全性を評価した。2重盲検試験に先立ち、内部ボランティアを対象とした小規模キーオープン試験を行い、末梢血リンパ球をもちいた培養実験により舌下免疫療法治療バイオマーカーの検索、治療機序の解明を試みた。オープン試験における舌下施行群において活性化T細胞中のFoxp3<sup>+</sup>IL10<sup>+</sup>細胞(iTreg)の割合が無施行群に比べ高かったことから、本細胞集団の治療バイオマーカーとしての可能性を2重盲検試験において検討した。その結果、iTregの割合が増加している実薬群の集団において、より花粉症症状が軽症であった。以上の結果から、iTregの治療効果を反映するバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

A. 研究目的

スギ花粉症は典型的な1型アレルギー疾患であり、国民の20%以上が発症していると考えられている。現在、根治的な治療法の開発が急務となっている。

1. キーオープン試験

抗原特異的免疫療法はアレルギー疾患における唯一有効な根治療法であるが、アナフィラキシー等の重篤な副反応が生じる危険性があるために、一般には普及していない。近年、副反応の少ない免疫療法として口腔内舌下にアレルギーエキスを投与する舌下免疫療法が開発され、より安全な免疫療法として注目されている。

本試験では2006年10月から2007年5月まで千葉大学内部ボランティアを対象に舌下免疫療法を行い、舌下免疫療法の安全性と臨床効果について検討することを目的とした。また、舌下免疫療法の治療メカニズムおよび治療効果を反映するバイオマーカーも明らかとなっていない。

そこで、患者末梢血よりリンパ球および血漿を分離し、免疫生化学的パラメーターを解析することにより、治療効果を反映するバイオマーカー候補の探索を試みた。また、治療機序解明を目的として、末梢血単核球を分離し、スギ花粉主要抗原Cry j 1により刺激後のCD4陽性細胞を精製し、mRNA抽出後 transcriptome 解析を行った。

2. 二重盲検比較偽薬対照臨床試験

本試験では、2006年9月から2008年5月まで二重盲検比較偽薬対照臨床試験を行い、舌下免疫療法の有効性および安全性の検討を行った。また、キーオープン試験により見出された、舌下免疫療法により変動する治療バイオマーカーと臨床効果の関連について、症状スコア、薬剤・症状スコアを用いて評価した。

B. 研究方法

1. キーオープン試験



2006年10月から2007年5月まで、スギ花粉症を発症している千葉大学内部ボランティア20例を対照にキーオープン試験を行った。舌下投与群12例にトリイ社の標準化スギ花粉減感作エキスを維持量2,000JAUにて1週間に1度、各自宅にて保持剤なしで2分間舌下保持後吐き出す吐出し法により投与を行った。治療開始前、花粉飛散前・中・後に来院していただき、末梢血を採血し、末梢血単核球(PBMC)と血漿を分離し凍結保存した。また、花粉飛散中にQOL調査票(JRQLQ No. 1)を記入していただき、臨床症状の指標とした。分離した血漿中のスギ花粉主要抗原Cry j 1特異的IgEおよびIgG4抗体価をELISAにて測定した。分離したPBMCをCry j 1刺激後のサイトカイン産生量ならびに、誘導性制御性T細胞(iTreg)の指標としてCD25陽性CD4リンパ球中のIL10<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>細胞の割合をflow cytometryにて解析した。

PBMCをCry j 1刺激にて培養後、CD4陽性細胞を磁器ビーズを用いて単離後、mRNAを抽出した。抽出したmRNAを用いてマイクロアレイ解析を行い、実薬投与群で無投与群に比べ特異的に変動する遺伝子の解析を行った。

## 2. 二重盲検比較偽薬対照臨床試験

本試験では、2006年9月から2008年5月まで、千葉・首都圏のスギ花粉症患者120人を対照に二重盲検比較偽薬対照臨床試験を行った。投与法はオープン試験と同様に行った。来院は治療開始前、花粉飛散前後、2007年秋に行い、採血を行った。花粉飛散中にアレルギー性鼻炎症状日記を毎日記載していただき、日記を元に症状スコア、薬剤・症状スコアを算出した。また、花粉飛散前・中・後にQOL調査票(JRQLQ No.1)の記入をお願いした。採血後、オープン試験同様にPBMCと血漿を分離し、Cry j 1特異的抗体価、サイトカイン産生、iTregの割合を解析した。

## C. 研究結果

### 1. キーオープン試験

実薬投与群および無投与群間でCry j 1特異的IgE、IgG4抗体価に有意な差はなかった。しかしながら、無投与群では花粉飛散後で飛散前に比べCry j 1特異的IgE抗体価が有意に上昇していたのに対し、実薬投与群では有意な増加は見られなかった。一方で、Cry j 1特異的IgG4

抗体価は花粉飛散前後において両群で有意な変動は見られなかった。採取したPBMCをCry j 1により*in vitro*にて刺激し、そのサイトカイン産生を解析した。培養上清中のIL5、IL13産生は実薬投与群で無投与群に比べ低い傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。一方、IL2産生に関しては花粉飛散後において施行群で無投与群に比べ有意に低値であった。また、CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>活性化T細胞中のIL10<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞(iTreg)の割合は、無投与群では花粉飛散期後に飛散前より有意に低下したが、実薬投与群では有意な変動は見られなかった。投与群において抑制性T細胞割合が飛散前後で増加した群と低下した群に分け、Th2サイトカイン産生量及び飛散期中のQOL症状スコアを階層化した結果、iTreg割合が増加していた集団において、Th2サイトカイン産生ならびにQOL症状スコアがより低い傾向にあった(図1)。

末梢血単核球より分離したCD4陽性細胞のマイクロアレイによるクラスター解析の結果、Cry j 1刺激後の遺伝子変動は無投与群に比べ投与群で、花粉飛散前、花粉飛散後でより明確なクラスターを形成する傾向にあった。このことより、無投与群に比べ投与群において、より多くの転写産物が花粉飛散後に共通して発現亢進もしくは抑制されていることが示唆された(図2)。実薬投与群で無投与群と比べ有意に発現が抑制されている遺伝子として、IL9、IL13が見出された。

### 2. 二重盲検比較偽薬対照臨床試験

120名にて試験を開始し、最終的には103検体にて終了した。17検体のドロップアウトは、すべて転居・仕事の都合等個人的な理由によるものであり副反応によりドロップアウトした被験者はいなかった。来院や投薬を必要とする副反応は発生しなかった。2年目の花粉飛散期中の薬剤・症状スコアは実薬群において偽薬群に比べ、7時点で有意に症状が軽かった(図3)。オープン試験の結果により、iTregが症状を反映するバイオマーカーの候補と考えられたことから、実薬群をiTregの増加群と減少群に階層化し、薬剤・症状スコアを比較した結果、iTreg増加群では偽薬群と比べ花粉飛散中のほとんどの時点で有意に症状が軽く、iTregの減少群と比較しても症状が軽い傾向にあった(図4)。一方でTh2サイトカイン産生量は実

薬群および偽薬群間で有意な差はなく、オープン試験の結果とは異なり、iTreg の増加群においても偽薬群に比べ、有意な差はなかった。一方で、偽薬群においても iTreg の増加群と減少群が存在したが、症状の階層化を行った結果、偽薬群の iTreg 増加群、減少群間で薬剤・症状スコアに違いは見られなかった。

#### D. 考察

オープン試験、二重盲検試験とも来院、治療からの離脱を要する副反応は生じなかったことから、舌下免疫療法の安全性が確認できた。また、二重盲検試験の結果、偽薬群と比べ実薬群で症状の緩和が見られたことから、舌下免疫療法の効果を認めた。しかしながら、今回の試験において寛解に至った検体はいなかったことから、今後の症状の追跡調査も必要であると考えられる。

オープン試験の結果、iTreg が増加している集団で症状スコアがより改善しており、Th2 サイトカイン産生も抑制されていたことから、治療バイオマーカーの有用性が示唆された。二重盲検試験においても、実薬群中の iTreg が増加している集団において、偽薬群と比べより症状が軽症になっていた。二重盲検試験では、偽薬群中にも iTreg の増加群が存在したが、症状の違いは見られなかった。このことは、舌下実薬投与により誘導・維持される iTreg が治療効果に関与していることを示唆している。以上のことから、iTreg が症状および治療効果を反映するバイオマーカーとして有用であることが示された。

舌下免疫療法の治療機序に iTreg が関与していることが示唆されたが、その治療機序は明らかにできなかった。オープン試験においては、iTreg 増加群で Th2 サイトカイン産生の産生抑制がみられたが、一方で、二重盲検試験においては、実薬群と偽薬群の間で Th2 サイトカイン産生に差がなかったことから、必ずしも治療効果と末梢の T 細胞応答の関連は明らかではなかった。花粉飛散量の違いがこれらの T 細胞応答の違いに影響しているのかもしれない。免疫療法により局所の鼻粘膜において Treg が集積するという報告もあることから、末梢での反応ではなく炎症局所である鼻粘膜での iTreg の誘導ならびに Th2 応答について今後解析する必要がある

と考えられた。

一方で、CD4 陽性細胞のマイクロアレイ解析により実薬投与群で偽薬群に比べ Th2 サイトカインの有意な抑制が見られたことから、二重盲検試験の結果についても遺伝子レベルの更なる解析が必要であると考えられる。

#### E. 結論

二つの臨床試験の結果から、舌下免疫療法の安全性と、症状に対するある程度の有効性が確認できた。今後、更なる層別解析等の更なる検討が必要であるが、全体としては iTreg の関与以外、末梢血での免疫学的解析では、免疫療法の作用機序は必ずしも明らかとならなかった。しかしながら、治療効果・症状を反映するバイオマーカーとして iTreg が有用であることを見出した点においては、非常に画期的な結果であると思われる。

今後は、炎症の場である鼻粘膜局所での炎症・免疫反応の解析が重要であると考えられる。飛散中の鼻粘膜誘発試験や、鼻粘膜検体の擦過採取、鼻洗浄等による局所サンプルの採取が必要であるが、花粉飛散中のサンプリングはその後の花粉症症状への影響を考えると困難であるため、花粉人工飛散室を用いた局所における免疫反応の解析、ならびに同一飛散状況下での治療効果の判定が必要になると考えられる。今回、本試験にて明らかとなった末梢における iTreg の誘導、マイクロアレイ解析の結果が今後の局所での検討の糸口になると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fujimura T, Futamura N, Midoro-Horiuti T, Togawa A, Goldblum RM, Yasueda H, Saito A, Shinohara K, Masuda K, Kurata K, Sakaguchi M. Isolation and characterization of native Cry j 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy* 2007;62:547-53.
2. Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, Nagata Y, Ishii Y, Kojo S, Horiguchi S, Okamoto Y, Nakayama T, Suzuki N, Yeh W,

- Akira S, Kitamura H, Ohara O, Seino K, Taniguchi M. IL-21-induced B<sub>6</sub> cell apoptosis mediated by natural killer T cells in the suppression of IgE responses. *J Exp Med* 2006;**23**:2929-37.
- Delaunay J, Sasajima H, Yokota M, Okamoto Y. Side-by-side comparison of automatic pollen counters for use in pollen information systems. *Ann Allergy Asth Immunol* 2007;**98**:553-8.
  - Yamamoto H, Okamoto Y, Horiguchi S, Kunii N, Yonekura S, Nakayama T. Detection of natural killer T cells in the sinus mucosa from asthmatics with chronic sinusitis. *Allergy* 2007;**62**:1451-5.
  - Horiguchi S, Tanaka Y, Uchida T, Chazono H, Okawa T, Okamoto Y. Seasonal changes in antigen-specific Th clone sizes in patients with Japanese cedar pollinosis: A 2-year study. *Clin Exp Allergy* 2007;**38**:405-12.
  - Horiguchi S, Okamoto Y, Yonekura S, Okawa T, Yamamoto H, Kunii N, Sakurai D, Fujimura T, Nakazawa K, Yasueda H. A randomized controlled trial of sublingual immunotherapy for Japanese cedar pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;**146**:76-84.
  - Okubo K, Gotoh M, Fujieda S, Okano M, Yoshida H, Morikawa H, Masuyama K, Okamoto Y, Kobayashi M. A randomized double-blind comparative study of sublingual immunotherapy for cedar pollinosis. *Allergol Int* 2008;**57**:265-75.
  - Sasaki K, Okamoto Y, Yonekura S, Okawa T, Horiguchi S, Chazono H, Hisamitsu M, Sakurai D, Hanazawa T, Okubo K. Cedar and cypress pollinosis and allergic rhinitis: Quality of life effects of early intervention with Leukotriene receptor antagonists. *Int Arch Allergy Immunol* (in press)
  - Yonekura S, Okamoto Y, Okubo K, Okawa T, Minoru G, Suzuki H, Kakuma T, Horiguchi S, Hanazawa T, Konno A, Okuda M. Beneficial effects of leukotriene receptor antagonists in prevention of cedar pollinosis in a community setting. *J Invest Allergy Clin Immunol* (in press)
  - Nigo IY, Yamashita M, Hirahara K, Shinnakasu R, Inami M, Kimura M, Hasegawa A, Kohno Y, Nakayama T. Regulation of allergic airway inflammation through Toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**:2286-91.
  - Yamashita M, Hirahara K, Shinnakasu R, Hosokawa H, Norikane S, Kimura YM, Hasegawa A, Nakayama T. Crucial role of MLL for the maintenance of memory T helper type 2 cell responses. *Immunity* 2006;**24**:611-22.
  - Tenda Y, Yamashita M, Kimura YM, Hasegawa A, Shimizu C, Kitajima M, Onodera A, Suzuki A, Seki N, Nakayama T. Hyperresponsive T<sub>H</sub>2 cells with enhanced nuclear factor- $\kappa$ B activation induce atopic dermatitis-like skin lesions in Nishiki-nezumi Cinnamon/Nagoya mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**:725-33.
  - Hosokawa H, Kimura YM, Shinnakasu R, Suzuki A, Miki T, Koseki H, van Lohuizen M, Yamashita M, Nakayama T. Regulation of Th2 cell development by *Polycomb* group gene *bmi-1* through the stabilization of GATA3. *J Immunol* 2006;**177**:7656-64.
  - Meyer EH, Goya S, Akbari O, Berry GJ, Savage PB, Kronenberg M, Nakayama T, DeKruyff RH, Umetsu DT. Glycolipid activation of invariant T cell receptor<sup>+</sup> NKT cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4<sup>+</sup> T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;**103**: 2782-7.
  - Shinnakasu R, Yamashita M, Shinoda K, Endo Y, Hosokawa H, Hasegawa A, Ikemizu S, Nakayama T. Critical YxKxHxxxRP motif in the C-terminal region of GATA3 for its DNA binding and function. *J Immunol* 2006;**177**:5801-10.
  - Kaneko T, Hosokawa H, Yamashita M, Wang CR, Hasegawa A, Kimura YM, Kitajima M, Kimura F, Miyazaki M, Nakayama T. Chromatin remodeling at the Th2 cytokine

- gene loci in human type 2 helper T cells. *Mol Immunol* 2007;**44**:2249-56.
17. Yamashita M, Nakayama T. Progress in allergy signal research on mast cells: Regulation of allergic airway inflammation through toll-like receptor 4-mediated modification of mast cell function. *J Pharmacol Sci* 2008;**106**:332-5.
  18. Nakayama T, Yamashita M. Initiation and maintenance of Th2 cell identity. Truncated title: Regulation of Th2 responses. *Curr Opin Immunol* 2008;**20**:265-71.
  19. Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Yokote K, Saito Y, Nakayama T, Grusby JM, Iwamoto I, Nakajima H. Development and characterization of IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 2008;**205**:1369-79.
  20. Hirahara K, Yamashita M, Iwamura C, Shinoda K, Hasegawa A, Yoshizawa H, Koseki H, Gejyo F, Nakayama T. Repressor of GATA regulates T<sub>H</sub>2-driven allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:512-20.
  21. Hossain MB, Hosokawa H, Hasegawa A, Watarai H, Taniguchi M, Yamashita M, Nakayama T. Lymphoid enhancer factor interacts with GATA-3 and controls its function in T helper type 2 cells. *Immunology* 2008;**125**:377-86.
  22. Shinnakasu R, Yamashita M, Kuwahara M, Hosokawa H, Hasegawa A, Motohashi S, Nakayama T. Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. *J Biol Chem* 2008;**283**:28216-25.
  23. Terashima A, Watarai H, Inoue S, Sekine E, Nakagawa R, Hase K, Iwamura C, Nakajima H, Nakayama T, Taniguchi M. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J Exp Med* 2008;**205**:2727-33.
  24. Nakayama T, Yamashita M. Critical role of the Polycomb and Trithorax complexes in the maintenance of CD4 T cell memory. *Semin Immunol* (in press)
  25. Okubo K, Gotoh M. Inhibition of the antigen provoked nasal reaction by second-generation antihistamines in patients with Japanese cedar pollinosis. *Allergol Int* 2006;**55**:261-9.
  26. Okubo K, Ogino S, Nagakura T, Ishikawa T. Omalizumab is effective and safe in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int* 2006;**55**:379-86.
  27. Hashiguchi K, Tang H, Fujita T, Tsubaki S, Fujita M, Suematsu K, Gotoh M, Okubo K. Preliminary study on Japanese cedar pollinosis in an artificial exposure chamber (OHIO chamber). *Allergol Int* 2007;**56**:125-30.
  28. Nagakura T, Ogino S, Okubo K, Sato N, Takahashi M, Ishikawa T. Omalizumab is more effective than suplatast tosilate in the treatment of Japanese cedar pollen-induced seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2007;**38**:329-37.
  29. Okubo K, Baba K. Therapeutic effect of montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, on Japanese patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergol Int* 2008;**57**:247-55.
  30. Okubo K, Nakashima M, Miyake N, Komatsubara M, Okuda M. Dose-ranging study of fluticasone furoate nasal spray for Japanese patients with perennial allergic rhinitis. *Curr Med Res Opin* 2008;**24**:3393-403.
  31. Sakashita M, Yasuda K, Hirota T, Harada M, Okubo K, Osawa Y, Fujieda S, Nakamura S, Nakanishi K, Yoshimoto T, Tamari M. Association of serum IL-33 level and the IL-33 genetic variant with Japanese cedar pollinosis. *Clin Exp Allergy* 2008;**38**:1875-81.
  32. Okano M, Otsuki N, Azuma M, Fujiwara T, Kariya S, Sugata Y, Higaki T, Kino K, Tanimoto Y, Okubo K, Nishizaki K. Allergen-specific immunotherapy alters the expression of BTLA, a co-inhibitory molecule, in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2008;**38**:1891-900.
  33. Sashihara T, Ikegami S, Sueki N, Yamaji T, Kino K, Takemoto N, Gotoh M, Okubo K. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus gasseri* OLL2809 reduces cedar pollen antigen-induced peritoneal eosinophilia in mice. *Allergol Int* 2008;**57**:397-403.
  34. Okubo K, Nakashima M, Miyake N, Komatsubara M, Okuda M. Comparison of