

200934038 A

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

新しい制御性 T 細胞体外増幅法による喘息治療法の開発：

ぜん息の治療法の開発及び確立に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 斎藤 博久

平成 22 年（2010）年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

新しい制御性 T 細胞体外増幅法による喘息治療法の開発：
ぜん息の治療法の開発及び確立に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 齋藤 博久

平成 22 年（2010）年 3 月

—目次—

I. 構成員名簿	4
II. 総括研究報告書	
新しい制御性T細胞体外増幅法による喘息治療法の開発： ぜん息の治療法の開発及び確立に関する研究	5
国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部 斎藤博久	
III. 分担研究者報告書	
i) 前臨床試験としての動物喘息モデルの喘息治療	19
国立成育医療センター研究所 斎藤博久	
ii) T r e gの増幅及び機能制御抗体の研究	23
順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター 奥村康	
iii) マスト細胞由来のT r e g増幅因子の研究	28
東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点 中江進	
iv) I L - 3 3が喘息における気道炎症に及ぼす影響の検討	31
帝京大学医学部内科学呼吸器・アレルギー 山口正雄	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	34
V. 研究成果の刊行物・別冊（主なもの）	40

平成 21 年度 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業
新しい制御性 T 細胞体外増幅法による喘息治療法の開発：
ぜん息の治療法の開発及び確立に関する研究

構成員名簿

	氏名	職名	所属	所属施設の所在地
代表	斎藤 博久	部長	国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1
分担	奥村 康	センター長	順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター	〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1
分担	中江 進	特任准教授	東京大学医科学研究所 フロンティア研究拠点 中江グループ	〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1
分担	山口 正雄	准教授	帝京大学医学部内科学 呼吸器・アレルギー	〒173-8605 東京都板橋区加賀 2-11-1

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

総括研究報告書

新しい制御性 T 細胞体外増幅法による喘息治療法の開発：
ぜん息の治療法の開発及び確立に関する研究

研究代表者：斎藤 博久 国立成育医療センター研究所 部長

研究要旨：喘息治療は、長年にわたり対症療法が主流であるが、完治を可能にする新しい治療法・方法論が待望される。喘息と同様に慢性炎症病態を示す自己免疫疾患や臓器移植等では炎症抑制のための新しい治療法として制御性 T 細胞 (Treg) の導入療法が試みられている。Treg 導入による炎症抑制法は喘息の有効な治療法としての期待も高い。実際、動物喘息モデルでは Treg 導入によって炎症と気道過敏性を抑制でき、さらに我々はアレルギー患者での血中 Treg 数の低下を報告している。しかしヒトの生体内で Treg を選択的に増幅することは難しく、加えて末梢血中の Treg 数は少ないため(1-2%)、体外増幅なくして自家移植治療用の十分な細胞量の確保は難しい。そのため、有効な体外 Treg 増幅法が求められる。Treg は胸腺や末梢リンパ組織で抗原提示細胞によって分化・増殖することが知られるが、我々は全く新しい Treg 増殖機構を発見した。すなわち、インターロイキン 33 (IL-33)により活性化されたマスト細胞が抗原・TCR 刺激非依存的に Treg 誘導能を発揮する機構である。この方法は *in vitro* でも、IL-33、培養マスト細胞、末梢血由来 T 細胞を共培養することにより再現される。さらにこの増幅系は抗原を必要としないことから *de novo* の Treg 分化機構ではなく、Treg 細胞を末梢組織でポリクローナルに増幅する機構であると考えられる。この機構を既存の方法と組み合わせることにより、マスト細胞を介した新しい機構に基づく効率的体外 Treg 誘導法の開発が可能となり、喘息、アレルギー治療のための新しい治療法の基盤の確立を行う。

研究分担者

奥村 康

順天堂大学大学院医学研究科

アトピー疾患研究センター

センター長

中江 進

東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点

特任准教授

山口 正雄

帝京大学医学部内科学呼吸器・アレルギー

准教授

A. 研究目的

喘息治療は、30年以上にわたり吸入 β -アドレナリン受容体選択的刺激薬や吸入ステロイドによる対症療法が主流となっている。これらの薬剤は長期的な投与を必要とするが、喘息そのものを完治させることはできない。われわれはこれら標準治療薬の長期使用にも拘わらず症状が持続する喘息患者の免疫能を同等の IgE、好酸球レベルを有する無症候対照群と比較したところ、制御性 T 細胞 (Treg) 数が一般的に低下していることを見いだした (J Allergy Clin Immunol. 2007.120.960)。喘息

と同様に慢性炎症病態を示す自己免疫疾患や臓器移植等では炎症抑制のための新しい治療法として Treg の導入療法が試みられており (Immunity 2009.30.65)、Treg 導入による炎症抑制法は難治性喘息の有効な治療法としての期待も高い。実際、動物喘息モデルでは Treg 導入によって炎症と気道過敏性を抑制できる (Immunity 2009.31.438)。Treg 移入による治療法は骨髄移植と同様、将来有効な治療法となる可能性が高く、実際さまざまな疾患で臨床試験中である。しかし、血中 Treg 数は少なく、自家移植のための効率的な体外増幅法が求められている (現在最高が7日で50倍/4週間で13000倍、Blood 2004.104.3)。Treg は胸腺や末梢リンパ組織で抗原提示細胞によって分化・増殖することが知られるが、我々は全く新しい Treg 増殖機構を発見した。すなわち、インターロイキン 33 (IL-33) により活性化されたマスト細胞が抗原・T細胞受容体 (TCR) 刺激非依存的に Treg 誘導能を発揮する機構である。一般にマスト細胞はアレルギー疾患の増悪化に加担する細胞であると考えられてきたが、最近の研究から移植片免疫寛容モデルでの炎症抑制機能が明らかになった (Nature. 2006.442.997)。さらに研究分担者の中江らは接触皮膚炎におけるマスト細胞の炎症抑制能を明らかにした (Nat Immunol. 2007.8.1095)。申請者らは、気道炎症モデルにおいても、マスト細胞を介した炎症抑制メカニズムが存在することを見出している。この新しい Treg 増幅機構は IL-33、培養マスト細胞、CD4 陽性 T 細胞を共培養することにより再現される。さらにこの増幅系は抗原を必要としないことから de novo の Treg 分化機構ではなく、Treg を末梢組織でポリクローナルに増幅する機構であると考えられる。動物実験では Treg による気道炎症の抑制活性には抗原特異性が必須でな

いことが報告されており (J Immunol. 2009.183.1821)、ポリクローナルであっても炎症抑制活性を発揮しうることが示唆されている。この新しい Treg 増幅機構を既存の方法と組み合わせることにより、より効率の良い Treg 増幅法の開発が期待される。さらに本機構の分子メカニズムの探索は末梢組織における全く新しい炎症抑制機構を明らかにするだけでなく、新しい治療標的分子の発掘を可能にする。工業化の容易な有機化合物、組換えタンパク、天然物等は製薬企業による薬剤開発が可能であるのに対し、Treg 自家移植等の細胞療法は工業化に不適で基礎研究機関での研究開発が相応しい。本研究から得られる知見によって、マスト細胞を介した新しい機構に基づく効率的体外 Treg 誘導法の開発が可能となり、喘息、アレルギー治療のための新しい治療法基盤の確立を行う。本研究では、マスト細胞を介した Treg 誘導メカニズムを体外増幅法に応用し、単独または、これまでの増幅法との組み合わせによって、最も強力な Treg 増幅法の開発をめざす。本研究のアウトプットは、新しい Treg 体外増幅法の基盤を提供するだけでなく、Treg 誘導メカニズムの学術的理解にも寄与しう。申請者らのマウス・ヒト培養マスト細胞作成の豊富な経験に基づくノウハウの蓄積 (Nat. Protocol. 2006.1.2178) を利用して作出した新しい Treg 増幅法は、これまでに全く予想されていなかった要素 (培養マスト細胞、IL-33) の組み合わせからなる非常に独創性の高いアイデアに基づく。本研究の最終目標は、体外増幅した Treg を使った喘息アレルギー疾患治療法の開発にある。

本研究期間(H21-23年度)の具体的目的は、
1. 申請者が発見したマスト細胞による Treg 増幅を利用した高効率 Treg 増幅法の確立、2. その分子メカニズムの解明、3. 前臨床試験と

しての動物喘息モデルの喘息治療である。

B. 研究方法

本研究は3ヵ年計画であり、以下の3項目に基づき高効率体外 Treg 増幅法の開発を行う。

1) マスト細胞を使った新奇的な体外 Treg 増幅法を利用した高効率 Treg 増幅法の開発

申請者らは、IL-33、培養マスト細胞、CD4+CD25+ T細胞を4日間共培養することで、CD4+CD25+Foxp3+ Tregを30-50倍に増幅することに成功している。特筆すべきは、TCR刺激を用いていないことであり、TCR刺激を行ったTregはさらに強い抑制活性を獲得するとの報告もある。ゆえに、TCR刺激による増幅法とIL-33+マスト細胞+T細胞による増幅法を組みあわせることで、高効率Treg増幅法の開発が可能である。本年度はマウス・ヒトTreg増幅プロトコルの探索および最適化の取り組みとして、IL-33受容体に対する市販のモノクローナル抗体をマウスの培養マスト細胞に作用させ、マスト細胞からのサイトカイン産生を促進できるような刺激抗体のスクリーニングを行った(奥村)。

2. マスト細胞による Treg 増幅分子メカニズムの解明 (H21-23 年度)

申請者らは、IL-33+培養マスト細胞によるTreg体外増幅共培養系において、細胞接触およびIL-2が必須であることを見出しており、この知見を精緻化し、cell-free Treg増幅系への布石とする。本年度は、細胞接触責任分子の探索のため、IL-33刺激マスト細胞のマイクロアレイ解析をGeneChipを用いて行った(斎藤、中江)。

3. 前臨床試験としての動物喘息モデルの喘息治療 (H21-23 年度)

本年度は、種々のマウス喘息モデルでの気道炎症誘導および検出系についてのセットアップを行った。マウス喘息モデルは抗原タンパクをadjuvantと共に免疫し、抗原吸入により気道炎症を惹起する方法が一般に用いられる。しかし、adjuvantそのものの炎症誘導活性が無視できない。adjuvantを使ったモデルの場合、B細胞、マスト細胞、IgE、TNFなどの因子が無いマウスでも気道炎症を誘導することが可能となる。そのため、抗原(鶏卵アルブミン)の反復投与のみによって免疫し気道炎症を惹起する方法に加え、House dust mite粗抽出物の吸入のみによる気道炎症誘導の評価を行った。肺胞洗浄液評価系としてSysmex社XT1800iVを導入し、炎症細胞評価系構築を試みた。細気管支の気道抵抗測定のためBuxco社の侵襲的気道抵抗値測定を導入し、4基並列測定系構築を試みた。(斎藤)

(倫理面への配慮)

ヒト材料を用いた研究に関しては、各関連施設研究倫理規定に基づき各関連施設倫理委員会の審査・承認を受けて行われた。動物実験は、各関連機関動物実験実施規程に基づき各関連機関動物実験審査委員会の審査・承認を得て行われた。

C. 結果

1. マスト細胞を使った新奇的な体外 Treg 増幅法を利用した高効率 Treg 増幅法の開発

組換え体IL-33とは異なり、使用した3種類のIL-33受容体に対するモノクローナル抗体(clone 245707, 245714及びDJ8)は、マウスマスト細胞からIL-6及びIL-13産生を誘導しなかった。更なる検討の結果、DJ8と245707

は、IL-33 が IL-33 受容体に結合するのを阻害する抗体であり、245714 は、刺激抗体でも阻害抗体でもないことが明らかになった。

2. マスト細胞による Treg 増幅分子メカニズムの解明

マウス培養マスト細胞の IL-33 刺激時の包括的遺伝子発現プロファイルを GeneChip により得た (n=3, 0H, 1H, 4H)。比較対照として、IgE モノマー刺激、LPS 刺激を行い、同様に包括的遺伝子発現プロファイルを得た。IL-33 刺激により IL-13 などの炎症性サイトカインの増加が認められた。IL-33 刺激特異的に発現上昇すると考えられる遺伝子の抽出を行ったところ、これまでの観察と一致して IL-2 の上昇を認めた。IL-33 刺激により 2 倍以上増加するプローブセットは 7333 個であった。細胞接着関連因子として多種類の遺伝子が抽出されたが、これまでのところ Treg 増幅関連因子は抽出できていない。

3. 前臨床試験としての動物喘息モデルの喘息治療

抗原の反復投与のみによって免疫し気道炎症を惹起する方法、House dust mite 粗抽出物の反復吸入のみによる気道炎症誘導方法によって、いずれも好酸球優位の気道炎症が起きることを確認した。肺胞洗浄液評価系として、導入した Sysmex 社 XT1800iV では、非常に簡単に肺胞洗浄液中の炎症細胞プロファイル測定が可能であった。Buxco 社の侵襲的気道抵抗装置 4 基並列測定は可能となったが、機器およびソフトウェアが一部不安定であり改善を試みている。

D. 考察

1. ドイツの研究者が作成した抗 IL-33 受容体抗体 3E10 が、Th2 細胞の IL-33 受容体を介して Th2 細胞の活性化を誘導する刺激抗体として報告されている。現在、その研究者との共同研究として、その抗体の入手を進めている。抗体が入手でき次第、その有用性を上記方法により確認を行う。

2. Treg を誘導しうるマスト細胞由来細胞接着因子の絞り込みのため、ヒト培養マスト細胞を IL-33 で刺激し、GeneChip による包括的遺伝子プロファイルを取得する計画である。文献等から誘導分子候補があれば、該当分子の阻害抗体を作成あるいは購入し、IL-33+マスト細胞+T 細胞共培養系での効果を検討する。

3. 上記検出系に加えて、ごく少ないの検体量で多数のサイトカイン、免疫グロブリン等の測定を可能とするため、Luminex 等のサスペンションビーズアレイによる多項目同時測定システムによる測定系の検討を行う。今後、in vitro で増幅された Treg を磁気ビーズによる Kit のネガティブセレクションと CD4、FR4 によるポジティブセレクションを使い濃縮し、マウス気道炎症モデルへの移入効果を検討する。

E. 結論

1. 使用した市販の抗 IL-33 受容体モノクローナル抗体には、組換え体 IL-33 に代替できるようなマスト細胞を刺激できる至適な活性をもつものは現時点では見つからなかった。

2. GeneChip 解析から IL-33 刺激によってマウス培養マスト細胞から IL-2 が産生されることが確認された。細胞接着因子についてはさらなる絞り込みが必要である。

3. adjuvant を使用しないモデル、および House dust mite 粗抽出物の反復吸入による

気道炎症モデルが確立された。XT1800iV によって肺胞洗浄液中の炎症細胞プロファイル測定の簡素化を図った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Enomoto, Y., Orihara, K., Takamasu, T., Matsuda, A., Gon, Y., Saito, H., Ra, C., and Okayama, Y. (2009). Tissue remodeling induced by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway after an acute asthma attack. *J Allergy Clin Immunol* 124, 913-920 e911-917.

Fukagawa, K., Okada, N., Fujishima, H., Nakajima, T., Takano, Y., Tanaka, M., Dogru, M., Satake, Y., Tsubota, K., and Saito, H. (2009). Corneal and conjunctival fibroblasts are major sources of eosinophil-recruiting chemokines. *Allergol Int* 58, 499-508.

Kashiwakura, J., Kawakami, Y., Yuki, K., Zajonc, D.M., Hasegawa, S., Tomimori, Y., Caplan, B., Saito, H., Furue, M., Oettgen, H.C., Okayama, Y., and Kawakami, T. (2009). Polyclonal IgE induces mast cell survival and cytokine production. *Allergol Int* 58, 411-419.

Kato, A., Chustz, R.T., Ogasawara, T., Kulka, M., Saito, H., Schleimer, R.P., and Matsumoto, K. (2009). Dexamethasone and FK506 inhibit expression of distinct subsets of chemokines in

human mast cells. *J Immunol* 182, 7233-7243.

Matsumoto, K., Fukuda, S., Nakamura, Y., and Saito, H. (2009). Amphiregulin production by human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 149 Suppl 1, 39-44.

Morisawa, Y., Kitamura, A., Ujihara, T., Zushi, N., Kuzume, K., Shimanouchi, Y., Tamura, S., Wakiguchi, H., Saito, H., and Matsumoto, K. (2009). Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins. *Clin Exp Allergy* 39, 918-925.

Okayama, Y., Okumura, S., Sagara, H., Yuki, K., Sasaki, T., Watanabe, N., Fueki, M., Sugiyama, K., Takeda, K., Fukuda, T., Saito, H., and Ra, C. (2009). FcepsilonRI-mediated thymic stromal lymphopoietin production by interleukin-4-primed human mast cells. *Eur Respir J* 34, 425-435.

Okumura, S., Yuki, K., Kobayashi, R., Okamura, S., Ohmori, K., Saito, H., Ra, C., and Okayama, Y. (2009). Hyperexpression of NOD2 in intestinal mast cells of Crohn's disease patients: preferential expression of inflammatory cell-recruiting molecules via NOD2 in mast cells. *Clin Immunol* 130, 175-185.

Orihara, K., Morita, H., Yagami, A., Kajiwara, N., Nakae, S., Matsumoto, K., Nagasaki, H., Saito, Y., Saito, H., and Matsuda, A. (2009). TH2 cytokines potently induce an appetite-stimulating peptide, melanin-concentrating hormone, in human vascular endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 124, 612-614, 614 e611-612.

Saito, H. (2009). Essentials for starting a pediatric clinical study (2): Role of environment and immunity in the development of childhood allergic and immunologic disorders. *J Toxicol Sci* 34 Suppl 2, SP313-319.

Takahashi, N., Matsumoto, K., Saito, H., Nanki, T., Miyasaka, N., Kobata, T., Azuma, M., Lee, S.K., Mizutani, S., and Morio, T. (2009). Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients. *J Immunol* 182, 5515-5527.

Yagami, A., Inaba, Y., Kuno, Y., Suzuki, K., Tanaka, A., Sjolander, S., Saito, H., and Matsunaga, K. (2009). Two cases of pollen-food allergy syndrome to soy milk diagnosed by skin prick test, specific serum immunoglobulin E and microarray analysis. *J Dermatol* 36, 50-55.

Yagami, A., Suzuki, K., Saito, H., and Matsunaga, K. (2009). Hev B 6.02 is the most important allergen in health care workers sensitized occupationally by natural rubber latex gloves. *Allergol Int* 58, 347-355.

Cheuk, A.T., Wells, J.W., Chan, L., Westwood, N.B., Berger, S.A., Yagita, H., Okumura, K., Farzaneh, F., Mufti, G.J., and Guinn, B.A. (2009). Anti-tumor immunity in a model of acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 50, 447-454.

Fukai, T., Nishiyama, C., Kanada, S., Nakano, N., Hara, M., Tokura, T., Ikeda, S., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). Involvement of PU.1 in the transcriptional regulation of TNF-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 102-106.

Ichikawa, S., Takai, T., Yashiki, T., Takahashi, S., Okumura, K., Ogawa, H., Kohda, D., and Hatanaka, H. (2009). Lipopolysaccharide binding of the mite allergen Der f 2. *Genes Cells* 14, 1055-1065.

Ishikawa, Y., Tokura, T., Ushio, H., Niyonsaba, F., Yamamoto, Y., Tadokoro, T., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). Lipid-soluble components of honeybee-collected pollen exert antiallergic effect by inhibiting IgE-mediated mast cell activation in vivo. *Phytother Res* 23, 1581-1586.

Ito, T., Nishiyama, C., Nakano, N., Nishiyama, M., Usui, Y., Takeda, K., Kanada, S., Fukuyama, K., Akiba, H., Tokura, T., Hara, M., Tsuboi, R., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). Roles of PU.1 in monocyte- and mast cell-specific gene regulation: PU.1 transactivates CIITA pIV in cooperation with IFN-gamma. *Int Immunol* 21, 803-816.

Kamijo, S., Takai, T., Kuhara, T., Tokura, T., Ushio, H., Ota, M., Harada, N., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). Cupressaceae pollen grains modulate dendritic cell response and exhibit IgE-inducing adjuvant activity in vivo. *J Immunol* 183, 6087-6094.

Kawamura, T., Takeda, K., Kaneda, H., Matsumoto, H., Hayakawa, Y., Raulet, D.H., Ikarashi, Y., Kronenberg, M., Yagita, H., Kinoshita, K., Abo, T., Okumura, K., and Smyth, M.J. (2009). NKG2A inhibits invariant NKT cell activation in hepatic injury. *J Immunol* 182, 250-258.

Kinoshita, H., Takai, T., Le, T.A., Kamijo, S.,

- Wang, X.L., Ushio, H., Hara, M., Kawasaki, J., Vu, A.T., Ogawa, T., Gunawan, H., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2009). Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *J Allergy Clin Immunol* 123, 179-186.
- Miyata, M., Nakamura, Y., Shimokawa, N., Ohnuma, Y., Katoh, R., Matsuoka, S., Okumura, K., Ogawa, H., Masuyama, K., and Nakao, A. (2009). Thymic stromal lymphopoietin is a critical mediator of IL-13-driven allergic inflammation. *Eur J Immunol* 39, 3078-3083.
- Nakamura, Y., Miyata, M., Ando, T., Shimokawa, N., Ohnuma, Y., Katoh, R., Ogawa, H., Okumura, K., and Nakao, A. (2009). The latent form of transforming growth factor-beta administered orally is activated by gastric acid in mice. *J Nutr* 139, 1463-1468.
- Nakamura, Y., Miyata, M., Shimokawa, N., Ohnuma, Y., Katoh, R., Ogawa, H., Okumura, K., and Nakao, A. (2009). House dust mite allergen Der f 1 can induce the activation of latent TGF-beta via its protease activity. *FEBS Lett* 583, 2088-2092.
- Nakano, N., Nishiyama, C., Yagita, H., Koyanagi, A., Akiba, H., Chiba, S., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells. *J Allergy Clin Immunol* 123, 74-81 e71.
- Nakayama, M., Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Hashiguchi, M., Azuma, M., Yagita, H., and Okumura, K. (2009). Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* 113, 3821-3830.
- Ng, W., Nishiyama, C., Mizoguchi, M., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2009). Human umbilical cord epithelial cells express Notch ligands Delta1 and Jagged1. *J Dermatol Sci* 54, 131-134.
- Niyonsaba, F., Nagaoka, I., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). Multifunctional antimicrobial proteins and peptides: natural activators of immune systems. *Curr Pharm Des* 15, 2393-2413.
- Poonia, B., Salvato, M.S., Yagita, H., Maeda, T., Okumura, K., and Pauza, C.D. (2009). Treatment with anti-FasL antibody preserves memory lymphocytes and virus-specific cellular immunity in macaques challenged with simian immunodeficiency virus. *Blood* 114, 1196-1204.
- Potaczek, D.P., Maeda, K., Wang, Q.H., Nakano, N., Kanada, S., Stepień, E., Branicka, A., Fukai, T., Hara, M., Tokura, T., Ogawa, H., Undas, A., Okumura, K., and Nishiyama, C. (2009). FcepsilonRIalpha gene -18483A>C polymorphism affects transcriptional activity through YY1 binding. *Immunogenetics* 61, 649-655.
- Potaczek, D.P., Nishiyama, C., Sanak, M., Szczeklik, A., and Okumura, K. (2009). Genetic variability of the high-affinity IgE receptor alpha-subunit (FcepsilonRIalpha). *Immunol Res* 45, 75-84.
- Potaczek, D.P., Nishiyama, C., Undas, A., and

Okumura, K. (2009). Tissue factor genetic polymorphisms and haplotypes in Japanese population. *Atherosclerosis* 207, 344-345.

Potaczek, D.P., Pieculewicz, M., Mazur, M., Branicka, A., Nishiyama, C., Okumura, K., Podolec, P., and Undas, A. (2009). Tissue factor +5466A>G polymorphism predicts plasma TF levels in subjects with cryptogenic ischaemic stroke. *Thromb Haemost* 102, 173-175.

Potaczek, D.P., Pieculewicz, M., Mazur, M., Branicka, A., Nishiyama, C., Okumura, K., and Undas, A. (2009). Very rare minor homozygous GG genotype of tissue factor +5466A>G mutation in a patient with two cryptogenic cerebrovascular ischemic events. *Int J Cardiol*.

Sekine, C., Moriyama, Y., Koyanagi, A., Koyama, N., Ogata, H., Okumura, K., and Yagita, H. (2009). Differential regulation of splenic CD8⁺ dendritic cells and marginal zone B cells by Notch ligands. *Int Immunol* 21, 295-301.

Seto, T., Takai, T., Ebihara, N., Matsuoka, H., Wang, X.L., Ishii, A., Ogawa, H., Murakami, A., and Okumura, K. (2009). SLPI prevents cytokine release in mite protease-exposed conjunctival epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 681-685.

Suzuki, K., Kaminuma, O., Yang, L., Motoi, Y., Takai, T., Ichikawa, S., Okumura, K., Ogawa, H., Mori, A., Takaiwa, F., and Hiroi, T. (2009). Development of transgenic rice expressing mite antigen for a new concept of immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 149 Suppl 1, 21-24.

Takai, T., Kato, T., Hatanaka, H., Inui, K., Nakazawa, T., Ichikawa, S., Mitsuishi, K., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). Modulation of allergenicity of major house dust mite allergens Der f 1 and Der p 1 by interaction with an endogenous ligand. *J Immunol* 183, 7958-7965.

Takai, T., Ochiai, Y., Ichikawa, S., Sato, E., Ogawa, T., Tokura, T., Kuhara, T., Kawai, H., Hatanaka, H., Takahashi, S., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). Enzyme-linked immunosorbent assays with high sensitivity for antigen-specific and total murine IgE: a useful tool for the study of allergies in mouse models. *Allergol Int* 58, 225-235.

Totsuka, T., Kanai, T., Nemoto, Y., Tomita, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Sakamoto, N., Akiba, H., Okumura, K., Yagita, H., and Watanabe, M. (2009). RANK-RANKL signaling pathway is critically involved in the function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in chronic colitis. *J Immunol* 182, 6079-6087.

Usui, Y., Takeuchi, M., Hattori, T., Okunuki, Y., Nagasawa, K., Kezuka, T., Okumura, K., Yagita, H., Akiba, H., and Goto, H. (2009). Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by regulatory dendritic cells in mice. *Arch Ophthalmol* 127, 514-519.

Wang, X.L., Takai, T., Kamijo, S., Gunawan, H., Ogawa, H., and Okumura, K. (2009). NADPH oxidase activity in allergenic pollen grains of different plant species. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 430-434.

Abe, Y., Ohtsui, M., Ohtsui, N., Lin, Q., Tsurui, H., Nakae, S., Shirai, T., Sudo, K., and Hirose, S. (2009). Ankylosing enthesitis associated with up-regulated IFN-gamma and IL-17 production in (BXSb x NZB) F(1) male mice: a new mouse model. *Mod Rheumatol* 19, 316-322.

Ishigame, H., Kakuta, S., Nagai, T., Kadoki, M., Nambu, A., Komiyama, Y., Fujikado, N., Tanahashi, Y., Akitsu, A., Kotaki, H., Sudo, K., Nakae, S., Sasakawa, C., and Iwakura, Y. (2009). Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoc epithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30, 108-119.

Nishida, K., Hasegawa, A., Nakae, S., Oboki, K., Saito, H., Yamasaki, S., and Hirano, T. (2009). Zinc transporter *Znt5/Slc30a5* is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction. *J Exp Med* 206, 1351-1364.

O'Connor, W., Jr., Kamanaka, M., Booth, C.J., Town, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Kolls, J.K., and Flavell, R.A. (2009). A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 10, 603-609.

Ohno, T., Oboki, K., Kajiwara, N., Morii, E., Aozasa, K., Flavell, R.A., Okumura, K., Saito, H., and Nakae, S. (2009). Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *J Immunol* 183, 7890-7897.

Takanashi, M., Oikawa, K., Sudo, K., Tanaka, M., Fujita, K., Ishikawa, A., Nakae, S., Kaspar, R.L.,

Matsuzaki, M., Kudo, M., and Kuroda, M. (2009). Therapeutic silencing of an endogenous gene by siRNA cream in an arthritis model mouse. *Gene Ther* 16, 982-989.

Tanaka, S., Yoshimoto, T., Naka, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Cua, D., and Kubo, M. (2009). Natural occurring IL-17 producing T cells regulate the initial phase of neutrophil mediated airway responses. *J Immunol* 183, 7523-7530.

Fujisawa, T., Nagao, M., Hiraguchi, Y., Hosoki, K., Tokuda, R., Usui, S., Masuda, S., Shinoda, M., Hashiguchi, A., and Yamaguchi, M. (2009). Biomarkers for allergen immunotherapy in cedar pollinosis. *Allergol Int* 58, 163-170.

Yamaguchi, M., Koketsu, R., Suzukawa, M., Kawakami, A., and Iikura, M. (2009). Human basophils and cytokines/chemokines. *Allergol Int* 58, 1-10.

2. 学会発表

Saito H. Plenary Lecture: How to achieve primary prevention of asthma in childhood. 19th Congress of Interasma Japan/North Asia. Tokyo, Japan (K. Dobashi). Jul. 10-11, 2009.

Saito H. Comparison of molecule-targeted drugs and traditional medicines for treating allergic diseases. 12th International Symposium on Traditional Medicine. Toyama, Japan (Makoto Kadowaki). Nov. 26-27, 2009.

斎藤博久. 講演 アレルギー疾患関連遺伝子網羅的解析研究の成果. 第17回関東アレルギークラブ 東京 (大田健) 3月7日, 2009.

斎藤博久. アレルギーはなぜおこるか? どうしたら防げるのか? 第 40 回大阪皮膚科医学会大阪 (山田秀和) 6 月 13 日, 2009.

斎藤博久. アレルギーはどうしたら予防できるのか? 第 2 回岐阜免疫・感染・川崎病研究会 岐阜 (近藤直実) 7 月 16 日, 2009.

斎藤博久. アレルギーはなぜおこるか? どうしたら防げるのか? 第 25 回多摩小児アレルギー臨床懇話会 多摩 9 月 26 日, 2009.

斎藤博久. アレルギー疾患の発症予防・総論 (食物アレルギー・アトピー性皮膚炎など). シンポジウム 5 「アレルギー疾患の発症予防はどこまで可能か」. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 秋田 (荏原順一) 10 月 29-31 日, 2009.

Saito H. Yoji Iikura Memorial Lecture. Cells and Molecules Necessary to Acquire Non-Allergic Predisposition. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会 秋田 (荏原順一) 10 月 29-31 日, 2009.

奥村康 加齢と免疫—消化器疾患との関わり— 第 12 回日本高齢消化器病学会 東京 2009 年 7 月 11 日

奥村康 臓器移植と免疫寛容 第 45 回日本移植学会総会 東京 2009 年 9 月 18 日

Nakae S., "Roles of IL-17 and IL-17F in the pathogenesis of allergic and autoimmune diseases" College of Medicine, Hanyang University. June 10, 2009

Nakae S., "Role of IL-17 in allergic airway inflammation", Sungkyunkwan University, June 9, 2009

Nakae S., "Role of IL-17 in allergic airway inflammation" Pohang University of Science & Technology. June 8, 2009.

Nakae S., "Role of IL-17 in allergic airway inflammation", Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University of Medicine and Science. June 4, 2009.

Nakae S., "Role of IL-17 in allergic airway inflammation", Gachon University Gil Hospital. June 3, 2009.

Nakae S., "Role of IL-17 in allergic airway inflammation", St. Mary's Hospital, Catholic University of Korea. June 2, 2009.

中江 進、「好中球性アレルギー疾患と IL-17」、第五回自己免疫疾患研究会、東京、2009 年 7 月 11 日

中江 進、「IL-17 とアレルギー」、第五回箱根カンファレンス、東京、2009 年 8 月 22 日

中江 進、「IL-17 ファミリーサイトカインとアレルギー」、第 12 回 Forum on Allergy in Nagoya、名古屋、2009 年 10 月 10 日

中江 進、「非アトピー性ぜんそくモデルの作成と解析」、平成 21 年度 日本実験動物学会維持会員懇談会、東京、2009 年 11 月 18 日

鈴川真穂、大田 健、瀬藤力也、川上綾子、山口正雄、山本一彦、木村美和子、二藤隆春、小宮明子 喉頭ファイバーで誘発されたアナフィラキシー症例の検討。第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会、岐阜、平成 21 年 6 月 4～6 日

瀬藤力也、山口正雄、川上綾子、鈴川真穂、小宮明子、関谷 剛、飯倉元保、長瀬洋之、山田浩和、松本健治、斎藤博久、羅 智晴、山本一彦、大田 健 低濃度抗 FcεRIα 抗体によるヒト好塩基球・マスト細胞の活性化制御。第 19 回国際喘息学会日本北アジア部会、東京、平成 21 年 7 月 10～11 日

山口正雄、長瀬洋之、川畑仁人、神田浩子、瀬藤力也、小宮明子、山本一彦、大田 健 自己免疫疾患に伴う著明な閉塞性呼吸機能障害：抗コリン薬吸入の持続的効果。第 46 回日本臨床生理学会総会、盛岡、平成 21 年 10 月 22～23 日

山口正雄 シンポジウム アレルギー疾患の治療最前線と将来展望 IgE 抗体療法を含めた抗体療法。第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会、秋田、平成 21 年 10 月 29～30 日

山口正雄、鈴川真穂、瀬藤力也、長瀬洋之、大田 健 臨床・研究のための技術・技能プラクティカルセミナー3 ヒト好塩基球の分離と機能評価の実際。第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会、秋田、平成 21 年 10 月 29～30 日

原 麻恵、長瀬洋之、小島康弘、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、鈴木直仁、工藤宏一郎、小林信之、大田 健 喘息治療ステップダウン成功予測因子としての呼気凝縮液

/FeNO の検討。第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会、秋田、平成 21 年 10 月 29～30 日

山口正雄、瀬藤力也、鈴川真穂、川上綾子、小宮明子、山田浩和、長瀬洋之、山本一彦、大田 健 病院スタッフを対象としたアナフィラキシー講習会：参加者アンケートの結果。第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会、秋田、平成 21 年 10 月 29～30 日

戸田貴子、長瀬洋之、鈴川真穂、原 麻恵、小島康弘、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、大田 健 Th17 系サイトカインが好酸球からのサイトカイン放出に及ぼす影響。第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会、秋田、平成 21 年 10 月 29～30 日

大田 健、山口正雄 シンポジウム IgE を介した即時型反応の意義 再考 抗 IgE 抗体療法により解明されたこと-小児への可能性も含めて-。第 46 回日本小児アレルギー学会、福岡、平成 21 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(取得)

- 1) 肝炎治療剤 (米国特許 6068841)
- 2) Fas リガンドに特異的に反応するヒト型化免疫グロブリンもしくはその活性フラグメント並びに Fas リガンドに由来するヒト型化免疫グロブリンアポトーシス誘導領域 (豪国特許 725329)
- 3) Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその製造方法 (日本特許 3451092、英独仏特許 0874288、豪国特許 716731、米国特許 6946255)
- 4) 抗マウス TRAIL モノクローナル抗体 (日本特

許 3585399)

5) TRAF5 ノックアウトマウス (日本特許
3730804)

(審査中)

1) TRAF ファミリー分子、その分子をコードするポリヌクレオチド及びその分子に対する抗体(米国出願 09/138277、欧州出願 97903599.5)

2) 制御性T細胞の製造方法(特開 2010-004853)

3) アトピー素因判定マーカー、アレルギー性皮膚疾患素因判定マーカー及びそれらの使用方法【出願人】財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団【整理番号】C0090213【提出日】平成21年3月12日

4) Methods for screening for modulators of CCRL2 出願国：USA 出願人：Stanford University Office of Technology Licensing
出願日：13 August 2009 出願番号：PCT/US2009/053769

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 分担研究報告

この報告は、分担研究の進捗状況を報告するものである。研究の目的、方法、結果、および今後の予定について詳しく説明する。また、研究の意義や社会的貢献についても触れる。報告の構成は以下の通りである。

1. 研究の目的と意義
2. 研究方法
3. 研究結果
4. 今後の予定
5. 結論

分担研究報告書

2024年10月

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）

分担研究報告書

新しい制御性 T 細胞体外増幅法による喘息治療法の開発：

ぜん息の治療法の開発及び確立に関する研究

分担研究項目：前臨床試験としての動物喘息モデルの喘息治療

研究代表者：斎藤 博久 国立成育医療センター研究所免疫アレルギー研究部 部長

研究要旨：動物喘息モデルでは Treg 導入によって炎症と気道過敏性を抑制でき、抗原特異性は必須でないとされる。我々が見出した IL-33 により活性化されたマスト細胞が抗原・TCR 刺激非依存的に Treg をポリクローナルに増幅する機構によって ex vivo で Treg を増幅し、マウス気道炎症モデル治療を試みる。マウス喘息モデルは抗原タンパクを水酸化アルミニウム (Alum) 等の adjuvant と共に免疫し、抗原吸入により気道炎症を惹起する方法が一般に用いられる。しかし、Alum 等の adjuvant が inflammasome を活性化することが明らかとなり、adjuvant そのものの炎症誘導活性が無視できないため、adjuvant-free のマウス気道炎症モデル系、および評価系を構築し、新しい方法で制御性 T 細胞体外増幅した Treg による動物喘息モデル治療を試みる。

A. 研究目的

動物喘息モデルでは Treg 導入によって炎症と気道過敏性を抑制でき (Immunity 2009. 31. 438)、抗原特異性は必須でないとされる (J Immunol. 2009. 183. 1821)。我々が見出した IL-33 により活性化されたマスト細胞が抗原・TCR 刺激非依存的に Treg をポリクローナルに増幅する機構によって ex vivo で Treg を増幅し、マウス気道炎症モデル治療を試みる。マウス喘息モデルは抗原タンパクを水酸化アルミニウム (Alum) 等の adjuvant と共に免疫し、抗原吸入により気道炎症を惹起する方法が一般に用いられる。しかし、Alum 等の adjuvant が inflammasome を活性化することが明らかとなり (Nature 2008. 453. 1122)、adjuvant そのものの炎症誘導活性が無視できないため、adjuvant-free のマウス気道炎症モデル系、および評価系を構築する。

B. 研究方法

本年度は、種々のマウス喘息モデルでの気道炎症誘導および検出系についてのセットアップを行った。adjuvant に Alum を使ったモデルの場合、B 細胞、マスト細胞、IgE、TNF などの因子が無いマウスでも気道炎症を誘導することが可能となる。そのため、抗原 (鶏卵アルブミン) のみによって免疫し気道炎症を惹起する方法に加え、House dust mite 粗抽出物の吸入のみによる気道炎症誘導の評価を行った。肺胞洗浄液評価系として Sysmex 社 XT1800iV を導入し、炎症細胞評価系構築を試みた。細気管支の気道抵抗測定のため Buxco 社の侵襲的気道抵抗値測定を導入し、4 基並列測定系構築を試みた。

C. 結果

抗原の反復投与のみによって免疫し気道炎症を惹起する方法、House dust mite 粗抽出物