

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、非常に簡便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値装置 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

上記検出系に加えて、ごく少ない (100  $\mu$ l) 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、今後さらに 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。次年度以降、*in vitro* で増幅された Treg の精製条件および、マウス気道炎症モデルへの移入効果を検討する。

#### E. 結論

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. 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.

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.

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.

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). FcεRI-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.

## 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.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

(審査中)

(1) 制御性T細胞の製造方法(特開2010-004853)

(2) 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

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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：Treg の増幅及び機能制御抗体の研究

分担研究者：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

研究要旨：当研究班では、これまでに *in vitro* 培養系で制御性 T 細胞を選択的に効率良く増幅する方法として、IL-33 の存在下で、T 細胞とマスト細胞を共培養する系を確立した。培養に使用する IL-33 は、ヒト IL-33 遺伝子を導入した組換え体大腸菌から精製する。その過程で組換え体 IL-33 に混入する大腸菌由来の異物は、本培養系で増幅した制御性 T 細胞を生体に戻す際の弊害となりうる可能性が懸念される。つまり、大腸菌由来ではない IL-33 代替物が必要になる。そこで、代替候補として、IL-33 受容体に対する刺激抗体等に注目することで、制御性 T 細胞増幅系の改善を試みる。

A. 研究目的

当研究班では、これまでに *in vitro* 培養系で制御性 T 細胞を選択的に効率良く増幅する方法として、IL-33 の存在下で、T 細胞とマスト細胞を共培養する系を確立した。培養に使用する IL-33 は、ヒト IL-33 遺伝子を導入した組換え体大腸菌から精製する。その過程で組換え体 IL-33 に混入する大腸菌由来の異物は、本培養系で増幅した制御性 T 細胞を生体に戻す際の弊害となりうる可能性が懸念される。つまり、大腸菌由来ではない IL-33 に代替しうるものが必要になる。そこで、代替候補として、IL-33 受容体に対する刺激抗体に注目し、そのような抗体をスクリーニングすることを目的とする。

B. 方法

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を探す。

C. 結果

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。

D. 考察

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。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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 anti-allergic 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.

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.

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., Stepien, 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.

## 2. 学会発表

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

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

(取得)

肝炎治療剤 (米国特許 6068841)

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）

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）

抗マウス TRAIL モノクローナル抗体（日本特許  
3585399）

TRAF5 ノックアウトマウス（日本特許 3730804）  
（審査中）

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. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし



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：マスト細胞由来の Treg 増幅因子の研究

分担研究者：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

研究要旨：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いる。細胞接触をについての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、細胞接着因子同定を試みる。

A. 研究目的

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。

B. 方法

マウス培養マスト細胞を樹立し、IL-33 刺激に加えて IgE モノマー刺激、LPS 刺激群を設定し、N=3、0、1、4 時間後に RNA を回収した。GeneChip 解析は、Agilent2100 Bioanalyzer による RNA の品質確認後、GeneChip® IVT Labeling Kit を用いて、GeneChip® プロブアレイのターゲットを調製した。T7 プロモータ配列を含むオリゴ DNA と逆転写酵素を使って cDNA を作製し、これを鋳型として使用し、*in vitro* 転写反応 (IVT) での増幅およびビオチン標識を行った。ビオチン標識 cRNA の量と品質は 260 と 280 nm の吸光度で測定により行い、これを GeneChip に 45℃で 16 時間ハイブリダイズさせたのち、チップを洗浄し、

Affimatrix GeneChip Fluidics Station 中で染色した。染色されたアレイは Affimatrix GeneChip Scanner 3000 でスキャンし、品質のチェックとデータ出力は Affimatrix GeneChip オペレーティングソフトウェア (GCOS) とクオリティレポーターで行った。

C. 結果

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。L-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。

D. 考察

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。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Abe, Y., Ohtsuji, M., Ohtsuji, 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.

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.

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.

### 2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(審査中)

(1) 制御性 T 細胞の製造方法 (特開  
2010-004853)

(2) 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

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：IL-33 が喘息における気道炎症に及ぼす影響の検討

分担研究者：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

研究協力者：鈴木真穂 帝京大学医学部内科学呼吸器・アレルギー リサーチレジデント

研究要旨： サイトカイン IL-33 の多彩な作用の一端が、アレルギー疾患において重要な位置づけを占める可能性が注目されている。我々は、治療への方向性を考えるときに、IL-33 が、アレルギー性炎症の形成に直接関わっている気道細胞に対し及ぼす作用を詳細かつ正確に解明する事も重要なアプローチであると考え、今までに好酸球や好塩基球への作用を検討し、機能活性化が生じることを報告してきた。本研究においては、IL-33 が気道上皮細胞をターゲットとして機能を制御しうるかを検討した。

#### A. 背景と研究目的

気管支喘息は罹患率増加が持続しているとともに、重症・難治性を示す症例も依然多く存在しており、重症患者に要する医療および社会的コストは膨大な額に上ると試算されている。従って、喘息の病態解明と治療確立は、患者自身の QOL 改善のためだけでなく、医療経済上も重要である。喘息発病のメカニズムとして、従来より Th2 優位が重要とされており、Th2 優位を誘導する因子は喘息発病と関連が深いと考えられる。さらに、Th1-Th2 バランス制御だけでなく更に上位のレベルで免疫・炎症を制御しアレルギー疾患や喘息の発病あるいは新規治療を解明するという方向性の研究が特に最近脚光を浴びており、サイトカイン IL-33 の多彩な作用の一端が、重要な位置づけを占める可能性が注目されている。我々は、治療への方向性を考えるときに、IL-33 が、アレルギー性炎症の形成に直接関わっている気道細胞に対し及ぼす作用を詳細かつ正確に解明する事も重要

なアプローチであると考え、今までに好酸球や好塩基球への作用を検討し、機能活性化が生じることを報告してきた。本研究においては、IL-33 が気道上皮細胞をターゲットとして機能を制御しうるかを検討した。

#### B. 方法

マウスの OVA 感作および刺激を行い、気道・肺局所での IL-33 産生の有無を検討、さらに、IL-33 点鼻投与が喘息モデルに及ぼす影響を調べた。ヒト気道上皮細胞株を用いて、IL-33 受容体 ST2 発現および細胞機能制御につき解析した。

#### C. 結果

マウス OVA 感作喘息モデルにおいて、気道での IL-33 mRNA レベルは増強していた。IL-33 点鼻投与はマウス OVA 感作喘息モデルにおいて、気道炎症を増強し、気道過敏性を亢進させた。IL-33 の投与により、マウス OVA 感作喘息

モデルのBAL中IL-12, IL-1 $\cdot$ , KCの有意な上昇が認められた。ヒト培養気道上皮細胞は、IL-33のレセプターST2を発現しており、IL-4或いはTNF- $\cdot$ と同時にIL-33を作用させることにより、ヒト培養気道上皮細胞からのIL-6, eotaxin, IL-8の発現が有意に増強された。

#### D. 考察

IL-33はリンパ球や好酸球・好塩基球のみならず、気道上皮細胞にも作用し、ケモカイン、サイトカイン産生を増強することを介して、アレルギー性気道炎症に関与することが推察された。IL-33は多種の細胞に対して作用を及ぼすサイトカインであり、この機能を詳細に解析することは重要と考えられる。

#### E. 結論

IL-33は免疫・炎症に対して広範な作用を発揮することが明らかとなっているが、気管支喘息の病態において局所で炎症形成に関わりうる気道上皮細胞に対しても機能を増強することが判明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

鈴木真穂、大田 健、瀬瀬力也、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

瀬瀬力也、山口正雄、川上綾子、鈴木真穂、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Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 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、瀬瀬力也、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、鈴木真穂、瀬瀬力也、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

/FeN0 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、瀬瀬力也、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

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

1. 論文

1) 論文の発表の場

2) 論文の発表の年

3) 論文の発表の巻

4) 論文の発表の頁

5) 論文の発表の頁数

6) 論文の発表の頁の範囲

7) 論文の発表の頁の範囲の中央

8) 論文の発表の頁の範囲の長さ

9) 論文の発表の頁の範囲の幅

10) 論文の発表の頁の範囲の面積

11) 論文の発表の頁の範囲の体積

12) 論文の発表の頁の範囲の質量

13) 論文の発表の頁の範囲の重量

14) 論文の発表の頁の範囲の密度

15) 論文の発表の頁の範囲の温度

16) 論文の発表の頁の範囲の湿度

17) 論文の発表の頁の範囲の気圧

18) 論文の発表の頁の範囲の電圧

19) 論文の発表の頁の範囲の電流

20) 論文の発表の頁の範囲の電力

21) 論文の発表の頁の範囲のエネルギー

22) 論文の発表の頁の範囲のエンタルピー

23) 論文の発表の頁の範囲のエントロピー

24) 論文の発表の頁の範囲の自由エネルギー

25) 論文の発表の頁の範囲のギブズ自由エネルギー

26) 論文の発表の頁の範囲のヘルムホルツ自由エネルギー

27) 論文の発表の頁の範囲のポテンシャルエネルギー

28) 論文の発表の頁の範囲の運動エネルギー

29) 論文の発表の頁の範囲の熱エネルギー

30) 論文の発表の頁の範囲の化学エネルギー

31) 論文の発表の頁の範囲の核エネルギー

32) 論文の発表の頁の範囲の放射エネルギー

33) 論文の発表の頁の範囲の重力エネルギー

34) 論文の発表の頁の範囲の弾性エネルギー

35) 論文の発表の頁の範囲の表面エネルギー

36) 論文の発表の頁の範囲の界面エネルギー

37) 論文の発表の頁の範囲の結合エネルギー

38) 論文の発表の頁の範囲の相転移エネルギー

39) 論文の発表の頁の範囲の活性化エネルギー

40) 論文の発表の頁の範囲の反応エネルギー

41) 論文の発表の頁の範囲の燃焼エネルギー

42) 論文の発表の頁の範囲の発熱エネルギー

43) 論文の発表の頁の範囲の吸熱エネルギー

44) 論文の発表の頁の範囲の融解エネルギー

45) 論文の発表の頁の範囲の凝固エネルギー

46) 論文の発表の頁の範囲の蒸発エネルギー

47) 論文の発表の頁の範囲の凝縮エネルギー

48) 論文の発表の頁の範囲の昇華エネルギー

49) 論文の発表の頁の範囲の凝華エネルギー

50) 論文の発表の頁の範囲の溶解エネルギー

51) 論文の発表の頁の範囲の析出エネルギー

52) 論文の発表の頁の範囲の沈降エネルギー

53) 論文の発表の頁の範囲の浮上エネルギー

54) 論文の発表の頁の範囲の沈没エネルギー

55) 論文の発表の頁の範囲の浮力エネルギー

56) 論文の発表の頁の範囲の沈没力エネルギー

57) 論文の発表の頁の範囲の浮力密度

58) 論文の発表の頁の範囲の沈没力密度

59) 論文の発表の頁の範囲の浮力比

60) 論文の発表の頁の範囲の沈没力比

61) 論文の発表の頁の範囲の浮力係数

62) 論文の発表の頁の範囲の沈没力係数

63) 論文の発表の頁の範囲の浮力指数

64) 論文の発表の頁の範囲の沈没力指数

65) 論文の発表の頁の範囲の浮力定数

66) 論文の発表の頁の範囲の沈没力定数

67) 論文の発表の頁の範囲の浮力特性

68) 論文の発表の頁の範囲の沈没力特性

69) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

70) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

71) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

72) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

73) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

74) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

75) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

76) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

77) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

78) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

79) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

80) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

81) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

82) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

83) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

84) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

85) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

86) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

87) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

88) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

89) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

90) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

91) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

92) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

93) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

94) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

95) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

96) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

97) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

98) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

99) 論文の発表の頁の範囲の浮力挙動

100) 論文の発表の頁の範囲の沈没力挙動

研究成果の刊行に関する一覧表 平成 21 年度 (2009)

<雑誌>

研究代表者：斎藤博久

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Enomoto, Y., Orihara, K., Takamasu, T., Matsuda, A., Gon, Y., Saito, H., Ra, C., and Okayama, Y.	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	2009
Kato, A., Chustz, R.T., Ogasawara, T., Kulka, M., Saito, H., Schleimer, R.P., and Matsumoto, K.	Dexamethasone and FK506 inhibit expression of distinct subsets of chemokines in human mast cells.	J Immunol	182	7233-7243	2009
Nishida, K., Hasegawa, A., Nakae, S., Oboki, K., Saito, H., Yamasaki, S., and Hirano, T.	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	2009
Orihara, K., Morita, H., Yagami, A., Kajiwara, N., Nakae, S., Matsumoto, K., Nagasaki, H., Saito, Y., Saito, H., and Matsuda, A.	TH2 cytokines potently induce an appetite-stimulating peptide, melanin-concentrating hormone, in human vascular endothelial cells.	J Allergy Clin Immunol	124	612-614	2009
Ohno, T.,	Caspase-1, caspase-8, and	J Immunol	183	7890-7897	2009



Oboki, K., Kajiwara, N., Morii, E., Aozasa, K., Flavell, R.A., Okumura, K., Saito, H., and Nakae, S.	calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages.				
---	---	--	--	--	--

分担研究者：奥村康

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamijo, S., Takai, T., Kuhara, T., Tokura, T., Ushio, H., Ota, M., Harada, N., Ogawa, H., and Okumura, K.	Cupressaceae pollen grains modulate dendritic cell response and exhibit IgE-inducing adjuvant activity in vivo.	J Immunol	183	6087-6094.	2009
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.	Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA.	J Allergy Clin Immunol	123	179-186.	2009
Takai, T., Kato, T., Hatanaka, H., Inui, K., Nakazawa, T., Ichikawa, S., Mitsuishi, K.,	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.	2009

Ogawa, H., and Okumura, K.					
Nakano, N., Nishiyama, C., Yagita, H., Koyanagi, A., Akiba, H., Chiba, S., Ogawa, H., and Okumura, K.	Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells.	J Allergy Clin Immunol	123	74-81	2009
Nakayama, M., Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Hashiguchi, M., Azuma, M., Yagita, H., and Okumura, K.	Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation.	Blood	113	3821-3830.	2009

分担研究者：中江進

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses.	Immunity	30	108-119.	2009
Nishida, K., Hasegawa, A.,	Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast	J Exp Med	206	1351-1364.	2009

Nakae, S., Oboki, K., Saito, H., Yamasaki, S., and Hirano, T.	cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction.				
O'Connor, W., Jr., Kamanaka, M., Booth, C.J., Town, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Kolls, J.K., and Flavell, R.A.	A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation.	Nat Immunol	10	603-609.	2009
Ohno, T., Oboki, K., Kajiwara, N., Morii, E., Aozasa, K., Flavell, R.A., Okumura, K., Saito, H., and Nakae, S.	Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages.	J Immunol	183	7890-7897.	2009
Tanaka, S., Yoshimoto, T., Naka, T., Nakae, S., Iwakura, Y., Cua, D., and Kubo, M.	Natural occurring IL-17 producing T cells regulate the initial phase of neutrophil mediated airway responses.	J Immunol	183	7523-7530.	2009

分担研究者：山口正雄

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujisawa, T., Nagao, M., Hiraguchi, Y., Hosoki, K., Tokuda, R.,	Biomarkers for allergen immunotherapy in cedar pollinosis.	Allergol Int	58	163-170.	2009

Usui, S., Masuda, S., Shinoda, M., Hashiguchi, A., and Yamaguchi, M.					
Yamaguchi, M., Koketsu, R., Suzukawa, M., Kawakami, A., and Iikura, M.	Human basophils and cytokines/chemokines.	Allergol Int	58	1-10.	2009