

201023025A

厚生労働科学研究費補助金

免疫系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

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中江 進

平成 23 年 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

免疫系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

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中江 進

平成 23 年 (2011) 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	5
東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点 中江進	
III. 分担研究者報告	
i) マスト細胞由来の Treg 増幅因子の研究	21
東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点 中江進	
ii) マウス喘息モデルの Treg 移入による治療	25
国立成育医療研究センター研究所 斎藤博久	
iii) マスト細胞による Treg 増幅の最適化	29
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	
iv) IL-33 が喘息における気道炎症に及ぼす影響の検討	34
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	39
V. 研究成果の刊行物・別冊（主なもの）	45

1. 構成員名簿

平成 22 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

構成員名簿

	氏名	職名	所属	所属施設の所在地
代表	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	斎藤 博久	部長	国立成育医療研究センター研 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	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

II. 総括研究報告

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

研究代表者：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：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

斎藤 博久

国立成育医療研究センター研究所

副研究所長

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

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性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実現にある。

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

1. マスト細胞由来の Treg 増幅因子の研究

IL-3 によって樹立したマウス培養マスト細胞と、抗体磁気ビーズを用いたネガティブセレクションにより精製したマウス CD4 陽性細胞を IL-33 存在下に共培養し、各種の副刺激分子中和抗体またはアイソタイプコントロール抗体を加えた。7日後、FACSによってCD4+CD25+Foxp3+T細胞の含まれる割合を測定した。

ヒトマスト細胞について、IL-33によるマスト細胞のTreg誘導にIL-2が関与するかどうかを検討するために、ヒト末梢血由来マスト細胞とヒトCD4+T細胞をrhIL-33 100 ng/mL存在下に共培養し、抗IL-2抗体あるいはアイソタイプコントロール抗体を投与し3日後誘導されるCD4+CD25+Foxp3+T細胞の割合をFACSで解析した。(中江)

2. マウス喘息モデルの Treg 移入による治療

本年度はマウス喘息モデルのうち、植物アレルゲンである papain の吸入による気道炎症誘導および検出系構築を IL-33 欠損マウスを使用して行った。肺胞洗浄液評価系として Sysmex 社 XT1800iV、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用いた。

(斎藤)

3. マスト細胞による Treg 増幅の最適化

CD4 陽性細胞単独培養あるいはマウス培養マスト細胞と CD4 陽性細胞の共培養を抗 CD2/CD28 抗体による TCR 刺激ありなしの条件で培養し、さらに、IL-33、TGF- β 、IL-2 を加えて培養した。7日後に FACS によって CD4+CD25+Foxp3+T細胞の含まれる割合を測定

した。(奥村)

4. IL-33 が喘息における気道炎症に及ぼす影響の検討

マウスの OVA 感作および刺激を行い、IL-33、マスト細胞との共培養で得られた Treg を FR4 で磁気ビーズにより精製後マウスへ移入することにより、気道・肺局所の炎症への影響を調べた。(山口)

(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. マスト細胞由来の Treg 増幅因子の研究

FACS 解析の結果、抗 4-1 BBL 抗体投与時に僅かな Treg 増幅の低下が認められた。一方で、CD80, CD86, ICAM1, FasL に対する中和抗体には抑制効果が認められなかった。

ヒト末梢血由来マスト細胞とヒト CD4+T細胞の共培養による Treg 増幅では、アイソタイプコントロール抗体と比較して抗 IL-2 抗体投与によって CD4+CD25+Foxp3+T細胞の誘導が半分程度にまで抑制された。したがって、ヒトにおいても IL-33 によるマスト細胞の Treg 誘導には IL-2 が関与していることが示唆された。

2. マウス喘息モデルの Treg 移入による治療

マウスへの papain の吸入のみによって好酸

球優位の気道炎症が起きることを確認した。並行して我々は IL-33 欠損マウスの作製に成功し、OVA を抗原とする汎用喘息モデル、家ダニ抽出物吸入による喘息モデル、植物アレルゲンである papain 吸入による喘息モデルのいずれでも、好酸球性気道炎症の減弱を確認した (Proc Acad Natl Sci USA, 2010;107(43):18581-18586)。なかでも papain 吸入喘息モデルでの好酸球性炎症はほぼ完全に IL-33 に依存していた。Papain を熱処理し酵素活性を失活させた場合には炎症の誘導は見られないことから、この炎症は papain のプロテアーゼ活性に依存することが判明した。さらに OVA を抗原とする汎用喘息モデルでの気道抵抗値は IL-33 欠損マウスで低下していた。

3. マスト細胞による Treg 増幅の最適化

CD4 陽性 T 細胞のみへの単純なサイトカイン投与では IL-2 のみが Treg を増幅した。共培養を行わず TCR 刺激を行った場合には TGF- β との組み合わせが最も Treg を増幅し、IL-2 や IL-33 はほとんど増幅効果がなかった。共培養を行うと、TCR 刺激が無い場合 IL-33 が最も Treg を増幅でき IL-2 がこれに続いた。共培養で TCR 刺激がある場合、IL-33 が僅かに Treg を増幅したが他のサイトカインは増幅しなかった。全体では、マスト細胞と CD4 陽性 T 細胞の共培養に IL-33 を加えた培養系が最も Treg を増幅できたことから、IL-33 刺激による mast cells の役割が Treg 増幅には重要であった。

4. IL-33 が喘息における気道炎症に及ぼす影響の検討

OVA 喘息モデルでの FR4+ Treg の移入では、eosinophils の浸潤は抑制できなかった。しかしながら、BALF 中の IL-4 レベルは抑制された。

D. 考察

1. ヒト末梢血由来培養マスト細胞とヒト CD4 + T 細胞を用いた共培養からも Treg 増幅に IL-2 が必須であることが確認されたことから、ヒトにおけるエビデンスを強化できた。

僅かではあるが 4-1BBL の関与が伺われた。

Treg を誘導しうるマスト細胞由来細胞接着因子には単一ではなく複数の因子が同時並行的に関わる可能性も考えられた。Treg を誘導しうるマスト細胞由来細胞接着因子探索のため、共刺激分子阻害抗体の組み合わせ投与と、他の候補分子の阻害抗体による Treg 増幅効果への影響を検討する必要があると考えられる。また、次年度はヒト培養マスト細胞でも、その効果を確認する計画である。

2. IL-33 が喘息のエンドフェノタイプに関わらず見出される喘息関連遺伝子として注目を集めている。上記の papain 吸入による好酸球性気道炎症は IL-33 依存的であることを我々は見出した。さらに、OVA を抗原とする汎用喘息モデルでの観察結果から、IL-33 は気道病態生理学的にも重要な働きを有すると考えられた。

3. TCR-MHC に依存しないポリクローナルな Treg の増幅を行う場合にはマスト細胞との共培養が最も効率が良いことから、マスト細胞を介した IL-33 の効果が重要であると考えられた。高効率な Treg 増幅の最適化のために、これまでに報告のある薬剤の検討とヒト細胞による確認を行う必要がある。

4. OVA 喘息モデルでの FR4+ Treg の移入には部分的であるものの、何らかの抑制効果が期待できる。好酸球の浸潤が抑制できなかった理由は、FR4+ Treg の精製効率が磁気ビーズによるために低いためとも考えられる。次年度以降の改善点としては、EGFP-Foxp3 マウスを用

いてセルソーターで精製を行うことのほか、移入後の Treg の viability の調査 (EGFP-Foxp3 を移入後、in vivo での生存率をカウント)、移入するタイミング (吸入直前、吸入数日前など) の検討が必要である。

E. 結論

1. IL-33 と培養マスト細胞による Treg 体外増幅共培養系において IL-2 のほか 4-1BBL の部分的な関与が示唆された。複数の分子によるのか、他の分子によるのか、細胞接着因子についてはさらなる絞り込みとヒト培養マスト細胞を用いた確認が必要である。

2. 喘息のエンドフェノタイプによらない喘息関連遺伝子 IL-33 が植物アレルゲン papain の吸入による気道炎症に必須であることが判明した。

3. TCR-MHC-independent な Treg の増幅には IL-33 を加えたマスト細胞との共培養システムの効率が最も良い。

4. マウス OVA 喘息モデルにおいて、IL-33 とマスト細胞との共培養によって増幅された Treg の移入により、部分的ではあるもののその効果が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishii A, Oboki K, Nambu A, Morita H, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Sudo H, Okumura K, Saito H, Nakae S. Development of IL-17-mediated delayed-type hypersensitivity is not affected by

down-regulation of IL-25 expression. *Allergol Int.* 2010;59(4):399-408.

Itoh S, Nakae S, Axtell RC, Velotta JB, Kimura N, Kajiwara N, Iwakura Y, Saito H, Adachi H, Steinman L, Robbins RC, Fischbein MP. IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model. *J Clin Immunol.* 2010;30(2):235-240.

Itoh S, Nakae S, Velotta JB, Kosuge H, Connolly A, Tsai M, Adachi H, Galli SJ, Robbins RC, Fischbein MP. The role of recipient mast cells in acute and chronic cardiac allograft rejection in C57BL/6-KitW-sh/W-sh mice. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29(4):401-409.

Jin SL, Goya S, Nakae S, Wang D, Bruss M, Hou C, Umetsu D, Conti M. Phosphodiesterase 4B is essential for T(H)2-cell function and development of airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(6):1252-1259 e1212.

Kajiwara N, Oboki K, Ohno T, Ishii A, Sunnarborg SW, Okumura K, Saito H, Nakae S. Amphiregulin is not essential for ovalbumin-induced acute airway inflammation in mice. *Allergol Int.* 2010;59(2):207-211.

Nakajima A, Matsuki T, Komine M, Asahina A, Horai R, Nakae S, Ishigame H, Kakuta S, Saijo S, Iwakura Y. TNF, but not IL-6 and IL-17, is crucial for the development of T cell-independent psoriasis-like dermatitis in Il1rn^{-/-} mice. *J Immunol.* 2010;185(3):1887-1893.

- Nambu A, Nakae S. IL-1 and Allergy. *Allergol Int.* 2010;59(2):125-135.
- Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011;3(2):81-88.
- Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(43):18581-18586.
- Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Saito H, Nakae S. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol Int.* 2010;59(2):143-160.
- Oh I, Ozaki K, Meguro A, Hatanaka K, Kadowaki M, Matsu H, Tataru R, Sato K, Iwakura Y, Nakae S, Sudo K, Teshima T, Leonard WJ, Ozawa K. Altered effector CD4+ T cell function in IL-21R-/- CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2010;185(3):1920-1926.
- Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol.* 2010;184(8):4414-4422.
- Yagami A, Kajiwara N, Oboki K, Ohno T, Morita H, Sunnarborg SW, Okumura K, Ogawa H, Saito H, Nakae S. Amphiregulin is not essential for induction of contact hypersensitivity. *Allergol Int.* 2010;59(3):277-284.
- Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity.* 2011;34(2):149-162.
- Meguro A, Ozaki K, Hatanaka K, Oh I, Sudo K, Ohmori T, Matsu H, Tataru R, Sato K, Sakata Y, Nakae S, Leonard WJ, Ozawa K. Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. *Bone Marrow Transplant.* 2011.
- Iwakura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, Saito H, Matsumoto K. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; Accepted.
- Matsumoto K, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H. Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2011; Accepted.
- Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011;3(2):81-88.
- Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, Kasamatsu J, Iwabuchi K, Matsumoto K, Saito H, Taniguchi T, Matsumoto M, Seya T. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J Exp Med.* 2010;207(12):2675-2687.
- Fukui T, Nomura I, Horimukai K, Manki A,

Masuko I, Futamura M, Narita M, Ohzeki T, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Proactive treatment appears to decrease serum immunoglobulin-E levels in patients with severe atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2010;163(5):1127-1129.

Futamura K, Orihara K, Hashimoto N, Morita H, Fukuda S, Sagara H, Matsumoto K, Tomita Y, Saito H, Matsuda A. beta2-Adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;152(4):353-361.

Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. TSLP Promoter Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Bronchial Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010. Jul 23. [Epub ahead of print]

Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, Saito H, Ra C, Okayama Y. Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):1137-1145 e1136.

Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the

mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol.* 2010;223(3):695-702.

Matsumoto K, Terakawa M, Fukuda S, Saito H. Analysis of signal transduction pathways involved in anti-CD30 mAb-induced human eosinophil apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;152 Suppl 1:2-8.

Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, Matsumoto K, Saito H, Tsuji K, Sekiya I. Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(6):R206.

Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, Matsumoto K, Ogawa Y, Futamura K, Kaminuma O, Hashimoto N, Shimoyama Y, Saito H, Tomita Y. Overexpression of LEDGF/DFS70 induces IL-6 via p38 activation in HaCaT cells, similar to that seen in the psoriatic condition. *J Invest Dermatol.* 2010;130(12):2760-2767.

Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling. *Curr Med Chem.* 2010;17(28):3245-3252.

Tsubota A, Matsumoto K, Mogushi K, Nariai K, Namiki Y, Hoshina S, Hano H, Tanaka H, Saito H, Tada N. IQGAP1 and vimentin are key regulator genes in naturally occurring hepatotumorigenesis induced by oxidative stress. *Carcinogenesis.* 2010;31(3):504-511.

- Uesugi H, Sonoo M, Stalberg E, Matsumoto K, Higashihara M, Murashima H, Ugawa Y, Nagashima Y, Shimizu T, Saito H, Kanazawa I. "Clustering Index method": A new technique for differentiation between neurogenic and myopathic changes using surface EMG. *Clin Neurophysiol*. 2010.
- Yagami A, Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, Matsumoto K, Saito H, Matsuda A. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. *J Immunol*. 2010;185(10):5743-5750.
- Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Kajiwara N, Saito H, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology*. 2011;132(4):527-539.
- Nomura I, Morita H, Hosokawa S, Hoshina H, Fukuie T, Watanabe M, Ohtsuka Y, Shoda T, Terada A, Takamasu T, Arai K, Ito Y, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(3):685-688 e688.
- Yamada Y, Matsumoto K, Hashimoto N, Saikusa M, Homma T, Yoshihara S, Saito H. Effect of Th1/Th2 Cytokine Pretreatment on RSV-Induced Gene Expression in Airway Epithelial Cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;154(3):185-194.
- Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Hoq MI, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. A neuroendocrine antimicrobial peptide, catestatin, stimulates interleukin-8 production from human keratinocytes via activation of mitogen-activated protein kinases. *J Dermatol Sci*. 2011;61(2):142-144.
- Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Kajiwara N, Saito H, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology*. 2011;132(4):527-539.
- Fujimura J, Takeda K, Kaduka Y, Saito M, Akiba H, Yagita H, Yamashiro Y, Shimizu T, Okumura K. Contribution of B7RP-1/ICOS co-stimulation to lethal acute GVHD. *Pediatr Transplant*. 2010;14(4):540-548.
- Hirasawa Y, Takai T, Nakamura T, Mitsuishi K, Gunawan H, Suto H, Ogawa T, Wang XL, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. Staphylococcus aureus extracellular protease causes epidermal barrier dysfunction. *J Invest Dermatol*. 2010;130(2):614-617.
- Kanada S, Nishiyama C, Nakano N, Suzuki R, Maeda K, Hara M, Kitamura N, Ogawa H, Okumura K. Critical role of transcription factor PU.1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells. *Blood*. 2011;117(7):2211-2222.
- Le TA, Takai T, Vu AT, Kinoshita H, Chen X, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Flagellin Induces the Expression of Thymic Stromal Lymphopoietin in Human Keratinocytes via Toll-Like Receptor 5.

Int Arch Allergy Immunol. 2010;155(1):31-37.

Le TA, Takai T, Vu AT, Kinoshita H, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Glucocorticoids inhibit double-stranded RNA-induced thymic stromal lymphopoietin release from keratinocytes in an atopic cytokine milieu more effectively than tacrolimus. Int Arch Allergy Immunol. 2010;153(1):27-34.

Ma J, Usui Y, Takeda K, Harada N, Yagita H, Okumura K, Akiba H. TIM-1 signaling in B cells regulates antibody production. Biochem Biophys Res Commun. 2011;406(2):223-228.

Maeda K, Nishiyama C, Ogawa H, Okumura K. GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells. J Immunol. 2010;185(7):4252-4260.

Nakano N, Nishiyama C, Yagita H, Koyanagi A, Ogawa H, Okumura K. Notch1-mediated signaling induces MHC class II expression through the activation of class II transactivator promoter III in mast cells. J Biol Chem. 2011.

Nishida C, Nishiyama C, Satoh K, Hara M, Itoh Y, Ogawa H, Okumura K. Establishment of a simple detection system for blood group ABO-specific transferase activity in DNA-transfected cells. Leg Med (Tokyo). 2010;12(4):172-176.

Niwa Y, Potaczek DP, Kanada S, Takagi A, Shimokawa N, Ito T, Mitsuishi K, Okubo Y, Tajima M, Hobo A, Ng W, Tsuboi R, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama C. FcepsilonRIalpha gene (FCERIA) promoter

polymorphisms and total serum IgE levels in Japanese atopic dermatitis patients. Int J Immunogenet. 2010;37(2):139-141.

Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Tominaga M, Takamori K, Kajiwara N, Saito H, Nagaoka I, Ogawa H, Okumura K. Antimicrobial peptides human beta-defensins and cathelicidin LL-37 induce the secretion of a pruritogenic cytokine IL-31 by human mast cells. J Immunol. 2010;184(7):3526-3534.

Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Heissig B, Hattori K. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. Blood. 2010;115(21):4302-4312.

Ouyang Y, Miyata M, Hatsushika K, Ohnuma Y, Katoh R, Ogawa H, Okumura K, Masuyama K, Nakao A. TGF-beta signaling may play a role in the development of goblet cell hyperplasia in a mouse model of allergic rhinitis. Allergol Int. 2010;59(3):313-319.

Piao JH, Hasegawa M, Heissig B, Hattori K, Takeda K, Iwakura Y, Okumura K, Inohara N, Nakano H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (Traf)2 controls homeostasis of the colon to prevent spontaneous development of murine inflammatory bowel disease. J Biol Chem. 2011.

Potaczek DP, Kwasny-Krochin B, Nishiyama C,

- Okumura K, Gluszko P, Undas A. Tissue factor +5466A>G and -1208D>I genetic polymorphisms and severity of rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med.* 2010;48(3):423-425.
- Potaczek DP, Nastalek M, Okumura K, Wojas-Pelc A, Undas A, Nishiyama C. An association of TLR2-16934A>T polymorphism and severity/phenotype of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010.
- Potaczek DP, Nastalek M, Wojas-Pelc A, Okumura K, Undas A, Nishiyama C. Naturally occurring FCER1A N222K mutation - Its ethnicity-dependent distribution and a role in atopic dermatitis. *Mol Immunol.* 2011;48(8):979-980.
- Potaczek DP, Owczarek D, Cibor D, Nishiyama C, Okumura K, Mach T, Undas A. Tissue factor -1208D>I polymorphism is associated with D-dimer levels in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(7):1095-1096.
- Potaczek DP, Owczarek D, Okumura K, Mach T, Undas A, Nishiyama C. An association between functional FcεRIα polymorphisms and total serum IgE levels in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45(6):766-767.
- Potaczek DP, Pieculewicz M, Mazur M, Branicka A, Nishiyama C, Okumura K, Undas A. Very rare minor homozygous GG genotype of tissue factor +5466A>G mutation in a patient with two cryptogenic cerebrovascular ischemic events. *Int J Cardiol.* 2011;147(1):e13-15.
- Shimokawa N, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Suzuki R, Hara M, Fukai T, Tokura T, Miyajima H, Nakao A, Ogawa H, Okumura K. Suppressive effects of transcription factor GATA-1 on cell type-specific gene expression in dendritic cells. *Immunogenetics.* 2010;62(7):421-429.
- Takamura T, Harama D, Matsuoka S, Shimokawa N, Nakamura Y, Okumura K, Ogawa H, Kitamura M, Nakao A. Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Immunol Cell Biol.* 2010;88(6):685-689.
- Takeda K, Kojima Y, Uno T, Hayakawa Y, Teng MW, Yoshizawa H, Yagita H, Gejyo F, Okumura K, Smyth MJ. Combination therapy of established tumors by antibodies targeting immune activating and suppressing molecules. *J Immunol.* 2010;184(10):5493-5501.
- Takenaka H, Ushio H, Niyonsaba F, Jayawardana ST, Hajime S, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Synergistic augmentation of inflammatory cytokine productions from murine mast cells by monomeric IgE and toll-like receptor ligands. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(1):471-476.
- Ushio H, Ueno T, Kojima Y, Komatsu M, Tanaka S, Yamamoto A, Ichimura Y, Ezaki J, Nishida K, Komazawa-Sakon S, Niyonsaba F, Ishii T, Yanagawa T, Kominami E, Ogawa H, Okumura K, Nakano H. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J Allergy Clin*

Immunol. 2011. in press

Vu AT, Baba T, Chen X, Le TA, Kinoshita H, Xie Y, Kamijo S, Hiramatsu K, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Takai T. Staphylococcus aureus membrane and diacylated lipopeptide induce thymic stromal lymphopoietin in keratinocytes through the Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 pathway. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;126(5):985-993, 993 e981-983.

Wang QH, Nishiyama C, Nakano N, Kanada S, Hara M, Kitamura N, Shimokawa N, Lu CL, Ogawa H, Okumura K. Opposite effects of Trichostatin A on activation of mast cells by different stimulants. *FEBS Lett.* 2010;584(11):2315-2320.

Yamanishi Y, Kitaura J, Izawa K, Kaitani A, Komeno Y, Nakamura M, Yamazaki S, Enomoto Y, Oki T, Akiba H, Abe T, Komori T, Morikawa Y, Kiyonari H, Takai T, Okumura K, Kitamura T. TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. *J Exp Med.* 2010;207(7):1501-1511.

Sano Y, Yamada H, Ogawa C, Yamaguchi M. Some asthmatics show elevation of the peripheral venous oxygen pressure (PvO₂). *Allergol Int.* 2011;60(1):109-110.

Toda T, Yamaguchi M, Nakase Y, Sugimoto N, Suzukawa M, Nagase H, Ohta K. A case of anaphylactic reaction following matsutake mushroom ingestion: demonstration of histamine release reaction of basophils. *Allergol Int.*

2010;59(4):417-419.

Suzukawa M, Nagase H, Ogahara I, Han K, Tashimo H, Shibui A, Koketsu R, Nakae S, Yamaguchi M, Ohta K. Leptin enhances survival and induces migration, degranulation and cytokine synthesis of human basophils. *J Immunol*, in press.

Han K, Suzukawa M, Yamaguchi M, Sugimoto N, Nakase Y, Toda T, Nagase H, Ohta K. The in vitro effects of advanced glycation endproducts (AGEs) on basophil functions. *Int Arch Allergy Immunol*, in press.

2. 学会発表

中江 進、「アレルギー疾患におけるサイトカイン Up-to-date」(特別講演)、第2回順天堂眼アレルギー研究会(東京)、2011年2月23日

中江 進、「IL-33とアレルギー」(特別講演)、第19回関東アレルギークラブ(東京)、2011年2月12日

中江 進、「皮膚炎におけるサイトカイン Up-to-date」(特別講演)、第1回皮膚科最新医療研究会(名古屋)、2010年10月15日

中江 進、「IL-33/マスト細胞」(シンポジウム)、第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会(北九州市)、2010年6月25日

中江 進、「肺および皮膚免疫におけるIL-17の役割の解析」(受賞講演)、第12回花王研究奨励賞(東京)、2010年6月11日

Itoh S, Kimura N, Nakae S, Axtell RC, Velotta JB, Wang X, Iwakura Y, Steinman L, Robbins RC, Fischbein MP. "IL-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion." American Heart Association Scientific Sessions (Chicago, IL, USA), Nov 13, 2010

Sawaguchi M, Tanaka S, Mukai K, Ishikawa K, Oboki K, Nakae S, Kambayashi T, Watanabe N, Karasuyama H, Kubo M. "Basophils and mast cells differently regulate allergic response; in vivo demonstration by diphtheria toxin based deletion system" 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan), Aug 24, 2010.

Nakae S. "IL-17 & Allergy" The 17th East Asian Joint Symposium (Taiwan), July 1, 2010.

Kimura N, Itoh S, Vellota JB, Palmer OP, Kosuge H, Bos EJ, Lijkwan M, Kornfeld H, Nakae S, Robbins RC, Fischbein MP. "Anti-apoptotic role of IL-16 associated with attenuation of acute and chronic cardiac rejection." 30th anniversary annual meeting and scientific sessions, The International Society for Heart & Lung Transplantation (Chicago, IL, USA), Apr 21, 2010

大保木啓介、大野建州、梶原直樹、新江 賢、森田英明、石井明奈、南部あや、阿部高也、清成 寛、松本健治、須藤カツ子、奥村 康、斎藤博久、中江 進「IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity」第20回東京免疫フォーラム（東京）、2011年2月22日

小島令嗣、大野建州、飯倉元保、仁木敏朗、平島光臣、松原修、松本健治、斎藤博久、中江 進「ガレクチン9はLPS刺激によるマスト細胞

からのサイトカイン産生を増強する」第60回日本アレルギー学会秋季学術大会（東京）、2010年11月25日

Yoon J, Lee H, Kang Y, Park H, Deng C, Sudo K, Nakae S, Matsumoto I, Sumida T, Kim O, Oh B, Mamura M. "TGF- β signaling through Smad4 suppresses CD8⁺ cytotoxic T cells by down-regulating Eomesodermin in contact hypersensitivity" 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan), Aug 23, 2010.

Lee H, Yoon J, Kang Y, Park H, Festing M, Weinstein M, Deng C, Sudo K, Nakae S, Matsumoto I, Sumida T, Kim O, Oh B, Mamura M. "Opposing role of Smad2 and Smad3 in Th17 differentiation in the pathogenesis of collagen-induced arthritis" 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan), Aug 23, 2010.

Umemura M, Yoshida-Okamoto Y, Yahagi A, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. "Essential role of interleukin-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung" 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan), Aug 27, 2010.

Mizuguchi J, Takeda E, Sudo K, Nakae S, Hata K, Furuhashi M. "regulation of OVA-induced asthma through activation of JNK2" 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan), Aug 28, 2010.

Saito H. Invited Lecture: Role of environment and immunity in the development of childhood allergic diseases. WPAO (West Pacific Allergy

Organization) Jinan Forum 2011: Better Environment for Atopic Dermatitis. Jinan, Korea. Jan. 28-29, 2011.

戸田貴子、原 麻恵、小島康弘、竹澤智湖、山村浩一、鈴木真穂、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、中野純一、長瀬洋之、山口正雄、鈴木直仁、大田 健。マツタケによりアナフィラキシー症状を呈し、prick to prick test と好塩基球脱顆粒試験で陽性を示した1例。第22回日本アレルギー学会春季臨床大会。平成22年5月8～9日。

山口正雄。シンポジウム3。気管支喘息の病態の新知見。新規生物学的治療の最前線。第50回日本呼吸器学会学術講演会。平成22年4月23～25日。

長瀬洋之、小島康弘、戸田貴子、原 麻恵、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、鈴木直仁、大田 健。帝京大学内科における非小細胞肺癌症例の治療成績。第107回日本内科学会総会・講演会。平成22年4月9～11日。

戸田貴子、長瀬洋之、原 麻恵、鈴木真穂、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、鈴木直仁、大田 健。呼気一酸化窒素濃度 (FeNO)の疾患特異性の検証。第20回国際喘息学会日本・北アジア部会。平成22年7月2～3日。

戸田貴子、山口正雄、中瀬裕子、杉本直也、原麻恵、小島康弘、吉原久直、竹澤智湖、山村浩一、鈴木真穂、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、中野純一、長瀬洋之、鈴木直仁、大田 健。マツタケによりアナフィラキシー症状を呈し、prick-to-prick test と好塩基球ヒスタミン遊離試

験で陽性が確認された1例。第41回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会。平成22年7月16～17日。

鈴木真穂、Han Kaiyu、山口正雄、杉本直也、中瀬裕子、戸田貴子、原 麻恵、小島康弘、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、長瀬洋之、鈴木直仁、大田 健。ミニワークショップ。Advanced glycation endproducts(AGEs)がヒト好塩基球に及ぼす作用の解析。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会。平成22年11月25～27日。

長瀬洋之、戸田貴子、杉本直也、中瀬裕子、神山麻恵、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、山口正雄、鈴木直仁、大田 健。ミニワークショップ。JGL2009、GINA、EPR3喘息コントロールテスト(ACT)における喘息コントロール評価の比較。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会。平成22年11月25～27日。

戸田貴子、長瀬洋之、神山麻恵、中瀬裕子、杉本直也、鈴木真穂、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、中野純一、山口正雄、鈴木直仁、大田 健。非喘息性呼吸器疾患における呼気一酸化窒素濃度 (FeNO)測定の意義。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会。平成22年11月25～27日。

山口正雄、佐渡賢太、中瀬裕子、杉本直也、戸田貴子、原 麻恵、小島康弘、竹澤智湖、吉原久直、鈴木真穂、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、長瀬洋之、鈴木直仁、大田 健。手術開始時にアナフィラキシーショックを発症し、即時型皮膚反応検査を施行した一例。第60回日本アレルギー学会秋季学術大会。平成22年11月25～27日。

Yamaguchi M, Koketsu R, Suzukawa M, Kawakami A, Komiya A, Iikura M, Nagase H, Matsumoto K, Saito H, Ra C, Yamamoto K, Hirai K, Ohta K. Priming of human basophils by low levels of anti-FcεRI α-chain mAb. CIA Symposium (Collegium International Allergologicum 28th Symposium) April 25-30, 2010.

Koketsu R, Suzukawa M, Kawakami A, Komiya A, Iikura M, Nagase H, Matsumoto K, Saito H, Ra C, Hirai K, Yamamoto K, Ohta K, Yamaguchi M. Priming of human basophils by low levels of anti-FcεRIα-chain mAb. 14th International Congress of Immunology, August 22-27, 2010 Kobe.

Nakase Y, Sugimoto N, Toda T, Kuramochi M, Tashimo H, Nagase H, Yamamoto A, Takeshita K, Yamaguchi M, Ohta K. A case of toxocariasis who presented abnormal tubular structures in lung fields. Joint Meeting combining The3rd meeting of the Japanese Society of Pulmonary Functional Imaging and 5th International Workshop for Pulmonary Functional Imaging. January 28-30, 2011 Awaji Island, Japan.

Toda T, Yamaguchi M, Nakase Y, Sugimoto N, Suzukawa M, Kamiyama A, Yoshihara H, Kuramochi M, Tashimo H, Arai H, Nagase H, Ohta K. Matsutake Mushroom-induced anaphylactic reaction: The patient's nonreleasing basophils showed antigen-induced histamine release after

3-day treatment with IL-3. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology (AAAAI) annual meeting-March 12 - 18, 2011.

Suzukawa M, Yamaguchi M, Han K, Toda T, Nagase H, Ohta K. The role of advanced glycation endproducts (AGEs) on basophil functions. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology (AAAAI) annual meeting-March 12 - 18, 2011.

Nagase H, Toda T, Kamiyama A, Nakase Y, Sugimoto N, Yoshihara H, Kuramochi M, Tashimo H, Arai H, Yamaguchi M, Suzuki N, Ohta K. Usefulness of measuring the level of fractional exhaled nitric oxide (FeNO) in various respiratory diseases. American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology (AAAAI) annual meeting-March 12 - 18, 2011.

H. 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