

201126002A・B

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

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23年度 総括・分担研究報告書

平成21-23年度 総合研究報告書

研究代表者 中江 進

平成24年(2012)年3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

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23年度 総括・分担研究報告書

平成21-23年度 総合研究報告書

研究代表者 中江 進

平成24年(2012)年3月

—目次—

平成23年度 総括・分担研究報告書	
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	7
中江 進 (東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点)	
Ⅲ. 分担研究者報告	
1) マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明	16
中江 進 (東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点)	
2) マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明	19
斎藤博久 (国立成育医療研究センター研究所)	
3) Treg 細胞の増幅誘導抗体の探索	22
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)	
4) マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明	26
山口正雄 (帝京大学医学部内科学呼吸器・アレルギー)	
Ⅳ. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
Ⅴ. 研究成果の刊行物・別冊 (主なもの)	32
平成21-23年度 総合研究報告書	
Ⅰ. 構成員名簿	169
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	172
中江 進 (東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点)	
Ⅲ. 分担研究者報告	
1) マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明	194
中江 進 (東京大学医科学研究所フロンティア研究拠点)	
2) マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明	200
斎藤博久 (国立成育医療研究センター研究所)	
3) Treg 細胞の増幅誘導抗体の探索	206
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)	
4) マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明	213
山口正雄 (帝京大学医学部内科学呼吸器・アレルギー)	
Ⅳ. 研究成果の刊行に関する一覧表	218
Ⅴ. 研究成果の刊行物・別冊 (主なもの)	227

平成23年度 総括・分担研究報告書

I. 構成員名簿

平成 23 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	副研究所長	国立成育医療研究センター研 究所	〒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	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 細胞）の導入療法が試みられている。Treg 細胞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 細胞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 細胞を選択的に増幅することは難しく、加えて末梢血中の Treg 細胞数は少ないため(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 細胞増幅法が求められる。Treg 細胞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 細胞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 細胞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 細胞分化機構ではなく、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 細胞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

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髓移植と同様、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

A. 研究目的

喘息治療は、30 年以上にわたり吸入 b-アドレナリン受容体選択的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) 数が全般的に低下していることを見いだした (J Allergy Clin

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の体外 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

1. マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明 (H21-23 年度)

マウスおよびヒトマスト細胞とマウスおよびヒト CD4⁺T 細胞を IL-33 の存在下で共培養を行い、3-4 日後に CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 細胞の存在比をフローサイトメトリーにて解析を行った。この際、IL-33 受容体や IL-2 などの遺伝子欠損マウスのマスト細胞や T 細胞を利用した他、IL-33 以外に IgE や LPS などの刺激因子、細胞間相互作用に関わる副シグナル分子などに対する中和抗体等を添加し、Treg 細胞の誘導効率の評価を行った (中江)。

野生型マウス、マスト細胞欠損マウス、野生型マウス、IL-33 受容体欠損マウスおよび IL-2 欠損マウスのマスト細胞を移入したマスト細胞欠損マウス (野生型マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス、IL-33 受容体マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス、および、IL-2 欠損マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス) に、一日一回、三日間連続、IL-33 あるいは生理食塩水を吸入させた。四日目に肺胞洗浄液中の好酸球数を血球計測装置にて、肺の所属リンパ節内の Treg 細胞の割合をフローサイトメトリーにて評価を行った (斎藤)。

Foxp3/eGFP マウスに PBS および IL-33 を一日一回、三日間連続吸入し、四日目に肺胞洗浄液と肺の所属リンパ節細胞を回収した。肺胞洗浄液内、および、肺の所属リンパ節細胞中の CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg 細胞の割合を EGFP の発現量を指標としてフローサイトメトリーによって解析した (山口)。

2. Treg 細胞の増幅誘導抗体の探索 (H21-23 年度)

IL-33 受容体に対する入手可能な抗体をマウスおよびヒト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。マウスの IL-33 受容体に対する抗体は、従来評価した市販のモノクローナル抗体 3 種 (clone 245707, 245714 及び DJ8) に加え、ドイツの研究者が作成したモノクローナル抗体 1 種 (3E10) および市販のポリクローナル抗体 1 種を使用した。ヒト IL-33 受容体に対する抗体は、市販のモノクローナル抗体 3 種 (clone 97203, D14L および 14J07) を使用した (奥村)。

(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. マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明

マスト細胞と T 細胞のどちらの IL-33 受容体および IL-2 が Treg 細胞の誘導に関わるのかを明確にするために、IL-33 の存在下で、野生型/遺伝子欠損マスト細胞と野生型/遺伝子欠損 T 細胞の共培養を行った結果、マスト細胞で IL-33 受容体発現を欠失すると Treg 細胞の誘導が起こらず、一方、T 細胞上の IL-33 受容体発現の欠失は Treg 細胞の誘導には影響しないことが明らかになった。IL-2 に関しては、IL-33 の作用によりマスト細胞から産生された IL-2 が T 細胞に作用した後、T 細胞自身から産生される IL-2 も Treg 細胞の誘導に必要であることが明らかになった。IL-10 欠損マウスや TGF- β 1 欠損マウスのマスト細胞を用いた場合は、Treg 細胞は正常に誘導され、マスト細胞から産生される IL-10 と TGF- β 1 は Treg 細胞の誘導には必須ではないことが分かった。マスト細胞の分化・活性化因子である IL-3 や SCF、IgE や LPS、その他、30 種類のサイトカインのうち、マウスではマスト細胞と T 細胞の共培養系で Treg 細胞を誘導できるものは IL-33 のみであり、その際、細胞間相互作用に関わる分子として、4-1BBL、ICAM-1 および CD86 が重要であることが明らかになった。ヒトの細胞においても、Treg 細胞の誘導に IL-2 が重要であることが明確になった。

IL-33 吸入後、野生型マウスに比べて、マスト細胞欠損マウスでは、肺胞洗浄液中の好酸球数が増強し、肺所属リンパ節内の Foxp3⁺ Treg 細胞の割合が少なかった。肺胞洗浄液中の好酸球数と肺所属リンパ節内の Foxp3⁺ Treg 細胞の割合は、「野生型マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス」では野生型マウスと同等であった。一方、「IL-33 受容体マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス」と「IL-2 欠損マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス」では、マスト細胞欠損マウスと同様に、野生型マウスに比べて、肺胞洗浄液中の好酸球数が増強し、肺所属リンパ節内の Foxp3⁺ Treg 細胞の割合が少なかった。

PBS を吸入した Foxp3/eGFP マウスの肺胞洗浄液中においても EGFP 陽性 Treg 細胞が検出されたが、IL-33 を吸入させると、PBS 吸入群に比べて、肺胞洗浄液中と肺の所属リンパ節で EGFP 陽性 Treg 細胞数が増えていることがわかった。

1. Treg 細胞の増幅誘導抗体の探索

ドイツの研究者が作成した抗 IL-33 受容体抗

体 3E10 は、IL-33 受容体を発現する Th2 細胞を活性化し、サイトカイン産生を増強できる刺激抗体と報告されていたものであったが、マスト細胞に対しては、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。同様に、他のマウス IL-33 受容体に対するモノクローナル抗体 3 種およびポリクローナル抗体 1 種、ヒト IL-33 受容体に対するモノクローナル抗体 3 種についても、マウスおよびヒトマスト細胞を活性化するには至らなかった。ラット由来の受容体抗体 3E10 による Th2 細胞の活性化には、3E10 を細胞に添加後、抗ラット IgG 抗体をさらに加えて、3E10 を架橋することで効率が上がることが報告されている。同様に、マウスおよびヒトマスト細胞においても、各種抗 IL-33 受容体抗体に対する二次抗体を添加し、架橋による影響の評価をおこなったが、マスト細胞の活性化を誘導する条件は見いだせなかった。

D. 考察

1. マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明

IL-33 と同様に IgE や LPS の刺激もマスト細胞から IL-2 を誘導するものの、IL-33 とは異なりマスト細胞と T 細胞の共培養においては Treg 細胞の増殖を誘導できない。この違いをもたらす因子の同定が更なる Treg 細胞の誘導効率の向上に役立つものと思われる。

IL-33 によって刺激されたマスト細胞が産生する IL-2 が Treg 細胞の増殖を誘導することが *in vitro* だけでなく *in vivo* でも明らかになった。したがって、IL-33 は好酸球の浸潤を伴う気道炎症を誘導する一方で、マスト細胞を介した Treg 細胞を誘導することにより、気道炎症を抑制する働きも有すると言える。IL-33 による炎症誘導と抗炎症性作用のうち、抗炎症性作用を優先的に作動させるような仕組みを同定することにより、気道炎症の抑制効果が得られる可能性がある。

IL-33 吸入後、肺胞洗浄液中での Treg 細胞数の増加がみられ、マスト細胞は肺の炎症局所での Treg 細胞の増殖誘導に関わっている可能性が示唆された。その直接的な証明は、マスト細胞欠損マウスに Foxp3/eGFP マウスを交配して得られるマスト細胞欠損 Foxp3/eGFP レポーターマウスに IL-33 を吸入させ、野生型 Foxp3/eGFP マウスと比較検討する必要がある。

2. Treg 細胞の増幅誘導抗体の探索

入手しえた抗 IL-33 受容体抗体には、ヒトおよびマウスのマスト細胞を刺激しうるものはなく、この目的のための刺激抗体を新たに作製する、もしくは、組換え体 IL-33 を大腸菌で作製するの

ではなく、哺乳動物細胞株を使用して調製することにより、本課題の問題点である大腸菌由来の異物の混入を防ぐ方法といえる。

E. 結論

1. マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明

マウスの細胞培養系においては、遺伝子欠損マウス由来の細胞や中和抗体を利用することにより、IL-33 がマスト細胞上の IL-33 受容体を介してマスト細胞の活性化 (IL-2 産生および細胞間相互作用に関わる分子の発現亢進) を誘導し、マスト細胞由来の IL-2 が T 細胞に作用することで、Treg 細胞の増殖を促進しつつ、Treg 細胞上での細胞間相互作用に関わる分子の発現を促進する。その後、マスト細胞と Treg 細胞の細胞間相互作用により、Treg 細胞からも IL-2 が産生され、この T 細胞由来の IL-2 がさらに Treg 細胞自身の自己増殖促進に関わることが示唆された。

In vivo において、IL-33 は、マスト細胞からの IL-2 産生を促進し、Treg 細胞の増殖を誘導し、その Treg 細胞を介して気道炎症の抑制に関わることが明らかになった。

IL-33 吸入後、肺所属リンパ節細胞内の Treg 細胞の変動は、肺所属リンパ節細胞内の Treg 細胞の変動と相関することが明らかになった。

2. Treg 細胞の増幅誘導抗体の探索

使用した抗 IL-33 受容体抗体には、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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2011 Apr;3(2):81-8.

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.* 2011 May 1;186(9):5254-60.

Ohno T, Oboki K, Morita H, Kajiwara N, Arae K, Tanaka S, Ikeda M, Iikura M, Akiyama T, Inoue J, Matsumoto K, Sudo K, Azuma M, Okumura K, Kamradt T, Saito H, Nakae S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated

macrophage activation. *PLoS One.* 2011 Apr 11;6(4):e18404.

Shibui A, Nambu A, Shimura E, Yamaguchi S, Shiraishi C, Sato Y, Okumura K, Sugano S, Hozumi N, Nakae S. Alteration of immune responses by N-acetylglucosaminyltransferase V during allergic airway inflammation. *Allergol Int.* 2011 Sep;60(3):345-54.

Arae K, Oboki K, Ohno T, Hirata M, Nakae S, Taguchi H, Saito H, Nakajima T. Cimetidine enhances antigen-specific IgE and Th2 cytokine production. *Allergol Int.* 60(3):339-44, 2011.

Kamanaka M, Huber S, Zenewicz LA, Gagliani N, Rathinam C, O'Connor W Jr, Wan YY, Nakae S, Iwakura Y, Hao L, Flavell RA. Memory/effector (CD45RB(lo)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *J Exp Med.* 208(5):1027-40, 2011.

Shibui A, Doi J, Tolba ME, Shiraishi C, Sato Y, Ishikawa S, Watanabe J, Nogami S, Nakae S, Sugano S, Hozumi N. N-acetylglucosaminyltransferase V-deficiency increases susceptibility to murine malaria. *Exp Parasitol.* 129(3):318-21, 2011.

Itoh S, Kimura N, Axtell RC, Velotta JB, Gong Y, Wang X, Kajiwara N, Nambu A, Shimura E, Adachi H, Iwakura Y, Saito H, Okumura K, Sudo K, Steinman L, Robbins RC, Nakae S, Fischbein MP. Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. *Circulation.* 124(11 Suppl):S187-96, 2011.

Oshiro K, Kohama H, Umemura M, Uyttenhove C, Inagaki-Ohara K, Arakawa T, Harada M, Nakae S, Iwakura Y, Nishimaki T, Matsuzaki G. Interleukin-17A is involved in enhancement of tumor progression in murine intestine. *Immunobiology.* 217(1):54-60, 2012.

Otsuka A, Kubo M, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Tanizaki H, Kim B, Matsuoka S, Watanabe T, Nakae S, Miyachi Y, Kabashima K. Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. *PLoS One.* 6(9):e25538, 2011.

Kimura N, Itoh S, Nakae S, Axtell RC, Velotta JB, Bos EJ, Merk DR, Gong Y, Okamura H, Nagamine CM, Adachi H, Kornfeld H, Robbins RC, Fischbein MP. Interleukin-16 deficiency

suppresses the development of chronic rejection in murine cardiac transplantation model. *J Heart Lung Transplant.* 30(12):1409-17, 2011.

Sawaguchi M, Tanaka S, Nakatani Y, Harada Y, Mukai K, Matsunaga Y, Ishiwata K, Oboki K, Kambayashi T, Watanabe N, Karasuyama H, Nakae S, Inoue H, Kubo M. Role of Mast Cells and Basophils in IgE Responses and in Allergic Airway Hyperresponsiveness. *J Immunol.*188(4):1809-18, 2012.

Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreuzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemenz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, Löhning M, Pinschewer DD. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses. *Science* 335(6071):984-9, 2012.

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* 44(6):787-93, 2011.

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* 154(3):184-194, 2011.

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. Cluster analysis reveals four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 127(3):685-688.e8, 2011.

Ebata R, Abe J, Yasukawa K, Hamada H, Higashi K, Suwazono Y, Saito H, Terai M, Kohno Y. Increased Production of Vascular Endothelial Growth Factor-D and Lymphangiogenesis in Acute Kawasaki Disease. *Circ J.* 75(6):1455-62, 2011.

Iikura 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.* 155 Suppl 1:27-33, 2011.

Matsumoto K, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H. Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 155 Suppl 1:34-9, 2011.

Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Fumio Yamashita F, Asada T, Iwai N, Tomoike H, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. *PLoS Genet.* 7(7): e1002170, 2011.

Ohta K, Bousquet PJ, Aizawa H, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Ebisawa M, Tamura G, Nagai A, Nishima S, Fukuda T, Morikawa A, Okamoto Y, Kohno Y, Saito H, Takenaka H, Grouse L, Bousquet J. Prevalence and impact of rhinitis in asthma. SACRA, a cross-sectional nation-wide study in Japan. *Allergy* 66(10): 1287-1295, 2011.

Oboki K, Saito H. Proteases in allergy. In "Inflammation and Allergy Drug Design" ed. by Izuhara K, Holgate ST, Wills-Karp M. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. 2011 (in press)

Nakamura Y, Harama D, Shimokawa N, Hara M, Suzuki R, Tahara Y, Ishimaru K, Katoh R, Okumura K, Ogawa H, Shibata S, Nakao A. Circadian clock gene *Period2* regulates a time-of-day-dependent variation in cutaneous anaphylactic reaction. *J Allergy Clin Immunol.* 127(4):1038-45.e1-3, 2011.

Io H, Matsumoto M, Okumura K, Sato M, Masuda A, Furukawa M, Nohara N, Tanimoto M, Kodama F, Hagiwara S, Gohda T, Shimizu Y, and Tomino Y. Predictive factors associated with left ventricular hypertrophy at baseline and in the follow-up period in non-diabetic hemodialysis patients. *Semin Dial.* 24:349-54, 2011.

Wang X, Ikejima K, Kon K, Arai K, Aoyama T,

- Okumura K, Abe W, Sato N, and Watanabe S. Ursolic acid ameliorates hepatic fibrosis in the rat by specific induction of apoptosis in hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 55:379-87. 2011.
- 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, and Nakano H. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J Allergy Clin Immunol*, 127: 1267-76 e6, 2011
- Suzuki K, Kaminuma O, Yang L, Takai T, Mori A, Umezu-Goto M, Ohtomo T, Ohmachi Y, Noda Y, Hirose S, Okumura K, Ogawa H, Takada K, Hirasawa M, Hiroi T, and Takaiwa F. Prevention of allergic asthma by vaccination with transgenic rice seed expressing mite allergen: induction of allergen-specific oral tolerance without bystander suppression. *Plant Biotechnol J*, 9:982-90, 2011
- Potaczek D, Pieculewicz M, Mazur M, Branicka A, Nishiyama C, Okumura K, and 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 Cardiology*, 147:e13-15, 2011
- Potaczek D P, Nastalek M, Wajjas-Pelc A, Okumura K, Undas A, and Nishiyama C. Naturally occurring *FCERIA* N222K mutation – its ethnicity-dependent distribution and a role in atopic dermatitis. *Mol Immunol*, 48:979-980, 2011.
- Potaczek D P, Nastalek M, Okumura K, Wojas-Pelc A, Undas A, and Nishiyama C. An association of *TLR2*-16934A>T polymorphism and severity/phenotype of atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 25:715-21, 2011
- Nishida C, Tomita T, Nishiyama M, Suzuki R, Hara M, Itoh Y, Ogawa H, Okumura K, and Nishiyama C. B-transferase with Pro234Ser substitution acquires AB-transferase activity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75:1570-5, 2011
- Nakano N, Nishiyama C, Yagita H, Koyanagi A, Ogawa H, and Okumura K. Notch1-mediated signaling induces MHC class II expression through activation of class II transactivator promoter III in mast cells. *J Biol Chem*, 86:12042-12048, 2011
- Le TA, Takai, T, Vu AT, Kinoshita H, Chen X, Ikeda S, Ogawa H, and Okumura K. Flagellin induces the expression of thymic stromal lymphopoietin in human keratinocytes via Toll-like receptor 5. *Int Arch Allergy Immunol*, 155:31-37, 2011
- Kawasaki J, Ushio H, Kinoshita H, Fukai T, Niyonsaba F, Takai T, Ogawa H, Okumura K, and Ikeda S. Viral infection induces Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in human keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 62: 131-4, 2011
- Kanada S, Nishiyama C, Nakano N, Suzuki R, Maeda K, Hara M, Kitamura N, Ogawa H, and Okumura K. Critical role of transcription factor PU.1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells. *Blood*, 117:2211-2222, 2011
- Ma J, Usui Y, Takeda K, Harada N, Yagita H, Okumura K, and Akiba H. TIM-1 signaling in B cells regulates antibody production. *Biochem Biophys Res Commun*, 406:223-8. 2011
- Piao JH, Hasegawa M, Heissig B, Hattori K, Takeda K, Iwakura Y, Okumura K, Inohara N, and 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*, 286:17879-88. 2011
- Kawamoto T, Abe Y, Ito J, Makino F, Kojima Y, Usui Y, Ma J, Morimoto S, Yagita H, Okumura K, Takasaki Y, Akiba H. Anti-T cell immunoglobulin and mucin domain-2 monoclonal antibody exacerbates collagen-induced arthritis by stimulating B cells. *Arthritis Res Ther*, 22:R47, 2011
- Takeda K, Nakayama M, Sakaki M, Hayakawa Y, Imawari M, Ogasawara K, Okumura K, and Smyth MJ: IFN-g production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J Leukoc Biol*, 90:777-85, 2011
- Ito J, Harada N, Nagashima O, Makino F, Usui Y, Yagita H, Okumura K, Dorscheid DR, Atsuta R, Akiba H, and Takahashi K. Wound-induced TGF-b1 and TGFb2 enhance airway epithelial repair via HB-EGF and TGF-a. *Biochem Biophys Res Commun*, 412:109-14, 2011
- Hoq MI, Niyonsaba F, Ushio H, Aung G, Okumura K, and Ogawa H. Human catestatin

enhances migration and proliferation of normal human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 64:108-18, 2011

Watanabe T, Kanamaru Y, Liu C, Suzuki Y, Tada N, Okumura K, Horikoshi S, and Tomino Y. Negative regulation of inflammatory responses by immunoglobulin A receptor (FcaRI) inhibits the development of Toll-like receptor-9 signalling-accelerated glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol*, 166: 235-50, 2011

Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Kajiwara N, Saito H, Ikeda S, Ogawa H, and Okumura K. Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology*, 132: 527-39, 2011

Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Ikeda S, Okumura K, and Ogawa H. Elafin and secretory leukocyte protease inhibitor stimulate the production of cytokines and chemokines by human keratinocytes via MAPK/ERK and NF-kappaB activation. *J Dermatol Sci*, 63: 128-131, 2011

Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Hoq MI, Ikeda S, Ogawa H, and Okumura K. A neuroendocrine antimicrobial peptide, catestatin, stimulates interleukin-8 production from human keratinocytes via activation of mitogen-activated protein kinases. *J Dermatol Sci*, 61: 142-4, 2011

Kawamura T, Ogawa Y, Shimozato O, Ando T, Nakao A, Kobata T, Okumura K, Yagita H, Shimada S. CD70 is selectively expressed on Th1 but not on Th2 cells and is required for Th1-type immune responses. *J Invest Dermatol*. 131(6):1252-61, 2011.

Takeda K, Nakayama M, Sakaki M, Hayakawa Y, Imawari M, Ogasawara K, Okumura K, Smyth MJ. IFN- γ production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J Leukoc Biol*. 90(4):777-85, 2011.

Vu AT, Chen X, Xie Y, Kamijo S, Ushio H, Kawasaki J, Hara M, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H, Takai T. Extracellular double-stranded RNA induces TSLP via an endosomal acidification- and NF- κ B-dependent pathway in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 131(11):2205-12, 2011.

Potaczek DP, Kamijo M, Hara M, Okumura K,

Undas A, Nishiyama C. A comparative search for human Fc ϵ RI α gene (FCER1A) 3'-UTR polymorphisms in Japanese and Polish populations. *Mol Biol Rep*. 2011 Jul 3.

shihara M, Nishida C, Tashiro Y, Gritli I, Rosenkvist J, Koizumi M, Okaji Y, Yamamoto R, Yagita H, Okumura K, Nishikori M, Wanaka K, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. Plasmin inhibitor reduces T-cell lymphoid tumor growth by suppressing matrix metalloproteinase-9-dependent CD11b⁺/F4/80⁺ myeloid cell recruitment. *Leukemia*. 26(2):332-9, 2012

Kojima Y, Nakayama M, Nishina T, Nakano H, Koyanagi M, Takeda K, Okumura K, Yagita H. Importin β 1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *J Biol Chem*. 286(50):43383-93, 2011

Kitamura N, Yokoyama H, Yashiro T, Nakano N, Nishiyama M, Kanada S, Fukai T, Hara M, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K, Nishiyama C. Role of PU.1 in MHC class II expression through transcriptional regulation of class II transactivator pI in dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Nov 21.

Nishina T, Komazawa-Sakon S, Yanaka S, Piao X, Zheng DM, Piao JH, Kojima Y, Yamashina S, Sano E, Putoczki T, Doi T, Ueno T, Ezaki J, Ushio H, Ernst M, Tsumoto K, Okumura K, Nakano H. Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci Signal*. 5(207):ra5., 2012.

Ritprajak P, Hashiguchi M, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Azuma M. Antibodies Against B7-DC with Differential Binding Properties Exert Opposite Effects. *Hybridoma (Larchmt)*. 31(1):40-7, 2012.

Sugiyama M, Nakato G, Jinnohara T, Akiba H, Okumura K, Ohno H, Yoshida H. Expression pattern changes and function of RANKL during mouse lymph node microarchitecture development. *Int Immunol*. 2012 Feb 21.

Ohta K, Yamaguchi M, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Takahashi K, Nishimuta T, Morikawa A, Nishima S. Japanese guideline for adult asthma. *Allergol Int* 60:115-45, 2011.

Han K, Suzukawa M, Yamaguchi M, Sugimoto N, Nakase Y, Toda T, Nagase H, Ohta K. The in vitro effects of advanced glycation end products on basophil functions. *Int Arch Allergy Immunol* 155(suppl 1):64-70, 2011.

2. 学会発表

中江 進、「IL-17 と皮膚炎」(シンポジウム)、第 41 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会 (山梨)、2011 年 7 月 16 日

中江 進、「接触性皮膚炎とサイトカイン Up-to-date」(講演)、第 10 回(社)日本化学工業協会 LRI 研究報告会(東京)、2011 年 8 月 26 日

中江 進、「IL-33 と炎症」(シンポジウム)、第 84 回日本生化学会大会(京都)、2011 年 9 月 21 日

中江 進、「IL-33 と炎症応答」(講演)、第 88 回発生病学・疾患モデル研究会(東京)、2011 年 9 月 28 日

Nakae S. "IL-17 family cytokines in allergy" Karolinska Institute (Sweden), Oct 20, 2011.

Nakae S. "IL-33 in allergy" Uppsala University (Sweden), Oct 21, 2011.

中江 進、「IL-33 とアレルギー」(シンポジウム)、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京)、2011 年 11 月 10 日

Nakae S. "Role of IL-33 in allergy" (シンポジウム)、第 40 回日本免疫学会学術集会(千葉)、2011 年 11 月 29 日

Nakae S. "Roles of IL-25 and IL-33 in allergic airway inflammation" 6th Chiba University G-COE Symposium, Chiba, Japan, Nov. 30, 2011.

Nakae S, "IL-33", 22th World Allergy Congress, Mexico, Dec 5, 2011.

Saito H. Invited Lecture: The mast cell and basophil transcriptome. EMBRN/COST International Mast Cell and Basophil Meeting. Southampton, UK. Nov. 23-25, 2011.

Saito H. Intorduction. Breakfast Symposium: "Milk Induced Disorders". 22th World Allergy

Organization Congress. Cancun, Mexico. Dec.4-8, 2011.

Saito H. Pros. Debate Sympsiium: "Are Basophils Important in Allergy?". 22th World Allergy Organization Congress. Cancun, Mexico. Dec.4-8, 2011.

Saito H. Invited Lecture: Barrier tissue-derived molecules and allergic diseases. UK-Japan Workshop on Personalised Medicine. British Embassy Tokyo, Japan. Feb. 13-16, 2012.

奥村 康、「寛容誘導モデルとしての移植免疫」第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京)、2011 年 11 月 10 日

山口正雄、鈴川真穂、中瀬裕子、杉本直也、戸田貴子、神山麻恵、吉原久直、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、額瀨力也、川上綾子、小宮明子、飯倉元保、長瀬洋之、鈴木直仁、山本一彦、大田 健。薬物によるアナフィラキシー症例に対する、omalizumab を用いた IgE 関与証明の試み。第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会(千葉)。2011 年 5 月 14 日。

山口正雄、長瀬洋之、倉持美知雄、田下浩之、新井秀宜、一ノ瀬正和、足立 満、相澤久道、棟方 充、永田 眞、大田 健。気管支喘息患者に対する効果的指導に影響する因子の解析およびコントロール評価法の検討。第 23 回日本アレルギー学会春季臨床大会(千葉)。2011 年 5 月 14 日。

長瀬洋之、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、鈴木直仁、山口正雄、大田 健。気道可逆性試験陰性症例における Imlulse Oscillometry (IOS) 所見。第 21 回国際喘息学会日本・北アジア部会(岐阜)。2011 年 7 月 1 日。

H. 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

Ⅲ. 分担研究報告

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）
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
分担研究項目：マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明

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：これまでに、IL-33 の存在下でマスト細胞と T 細胞を共培養することにより、Treg 細胞を選択的に増殖誘導できる系を確立した。その際、IL-33 の刺激によってマスト細胞から産生される液性因子とマスト細胞と T 細胞の細胞間相互作用が Treg 細胞の誘導に必要であることが明らかになっている。この系における Treg 細胞の誘導に必須な液性因子と細胞間相互作用にかかわる分子の同定を目的とした。その結果、IL-33 の存在下、マスト細胞と CD4⁺ T 細胞の共培養による Treg 細胞の誘導には、IL-33 刺激によるマスト細胞からの IL-2 と、CD86、4-1BBL、ICAM-1 を介したマスト細胞と T 細胞の細胞間相互作用が重要であることが示された。同時に、Treg 細胞を誘導する細胞間相互作用分子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示唆された。

A. 研究目的

これまでに、IL-33 の存在下でマスト細胞と T 細胞を共培養することにより、Treg 細胞を選択的に増殖誘導できる系を確立した。この Treg 細胞の誘導には IL-2 と両細胞間の細胞間相互作用が重要であり、細胞間相互作用に関わる分子として 4-1BB/4-1BBL の部分的な関与が明らかになっている。この系での Treg 細胞の誘導効率の向上には、IL-33 による IL-2 の産生機構および細胞間相互作用に関わる分子の同定及び機能解析が必要である。そこで、本研究では、この点を踏まえて、本系での Treg 細胞増殖誘導の分子機構の解明を目的とする。

B. 方法

マウスおよびヒトマスト細胞とマウスおよびヒト CD4⁺T 細胞を IL-33 の存在下で共培養を行い、3-4 日後に CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 細胞の存在比をフローサイトメトリーにて解析を行った。この際、IL-33 受容体や IL-2 などの遺伝子欠損マウスのマスト細胞や T 細胞を利用した他、IL-33 以外に IgE や LPS などの刺激因子、細胞間相互作用に関わる副シグナル分子などに対する中和抗体等を添加し、Treg 細胞の誘導効率の評価を行った。

C. 結果

マスト細胞と T 細胞のどちらの IL-33 受容体および IL-2 が Treg 細胞の誘導に関わるのかを明確にするために、IL-33 の存在下で、野生型/遺伝子欠損マスト細胞と野生型/遺伝子欠損 T 細胞の共培養を行った結果、マスト細胞で IL-33 受容

体発現を欠失すると Treg 細胞の誘導が起こらず、一方、T 細胞上の IL-33 受容体発現の欠失は Treg 細胞の誘導には影響しないことが明らかになった。IL-2 に関しては、IL-33 の作用によりマスト細胞から産生された IL-2 が T 細胞に作用した後、T 細胞自身から産生される IL-2 も Treg 細胞の誘導に必要であることが明らかになった。IL-10 欠損マウスや TGF-β1 欠損マウスのマスト細胞を用いた場合は、Treg 細胞は正常に誘導され、マスト細胞から産生される IL-10 と TGF-β1 は Treg 細胞の誘導には必須ではないことが分かった。マスト細胞の分化・活性化因子である IL-3 や SCF、IgE や LPS、その他、30 種類のサイトカインのうち、マウスではマスト細胞と T 細胞の共培養系で Treg 細胞を誘導できるものは IL-33 のみであり、その際、細胞間相互作用に関わる分子として、4-1BBL、ICAM-1 および CD86 が重要であることが明らかになった。ヒトの細胞においても、Treg 細胞の誘導に IL-2 が重要であることが明確になった。

D. 考察

IL-33 と同様に IgE や LPS の刺激もマスト細胞から IL-2 を誘導するものの、IL-33 とは異なりマスト細胞と T 細胞の共培養においては Treg 細胞の増殖を誘導できない。この違いをもたらす因子の同定が更なる Treg 細胞の誘導効率の向上に役立つものと思われる。

E. 結論

マウスの細胞培養系においては、遺伝子欠損マウス由来の細胞や中和抗体を利用することにより、IL-33 がマスト細胞上の IL-33 受容体を介し

てマスト細胞の活性化 (IL-2 産生および細胞間相互作用に関わる分子の発現亢進) を誘導し、マスト細胞由来の IL-2 が T 細胞に作用することで、Treg 細胞の増殖を促進しつつ、Treg 細胞上での細胞間相互作用に関わる分子の発現を促進する。その後、マスト細胞と Treg 細胞の細胞間相互作用により、Treg 細胞からも IL-2 が産生され、この T 細胞由来の IL-2 がさらに Treg 細胞自身の自己増殖促進に関わることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and Airway Inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res.* 3(2):81-8, 2011.

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.* 186(9):5254-60, 2011.

Ohno T, Oboki K, Morita H, Kajiwara N, Arae K, Tanaka S, Ikeda M, Iikura M, Akiyama T, Inoue J, Matsumoto K, Sudo K, Azuma M, Okumura K, Kamradt T, Saito H, Nakae S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS One.* 2011 Apr 11;6(4):e18404.

Shibui A, Nambu A, Shimura E, Yamaguchi S, Shiraishi C, Sato Y, Okumura K, Sugano S, Hozumi N, Nakae S. Alteration of immune responses by N-acetylglucosaminyltransferase V during allergic airway inflammation. *Allergol Int.* 2011 Sep;60(3):345-54.

Arae K, Oboki K, Ohno T, Hirata M, Nakae S, Taguchi H, Saito H, Nakajima T. Cimetidine enhances antigen-specific IgE and Th2 cytokine production. *Allergol Int.* 60(3):339-44, 2011.

Kamanaka M, Huber S, Zenewicz LA, Gagliani N, Rathinam C, O'Connor W Jr, Wan YY, Nakae S, Iwakura Y, Hao L, Flavell RA. Memory/effector (CD45RB(lo)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *J Exp Med.* 208(5):1027-40, 2011.

Shibui A, Doi J, Tolba ME, Shiraishi C, Sato Y, Ishikawa S, Watanabe J, Nogami S, Nakae S, Sugano S, Hozumi N.

N-acetylglucosaminyltransferase V-deficiency increases susceptibility to murine malaria. *Exp Parasitol.* 129(3):318-21, 2011.

Itoh S, Kimura N, Axtell RC, Velotta JB, Gong Y, Wang X, Kajiwara N, Nambu A, Shimura E, Adachi H, Iwakura Y, Saito H, Okumura K, Sudo K, Steinman L, Robbins RC, Nakae S, Fischbein MP. Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. *Circulation.* 124(11 Suppl):S187-96, 2011.

Oshiro K, Kohama H, Umemura M, Uyttenhove C, Inagaki-Ohara K, Arakawa T, Harada M, Nakae S, Iwakura Y, Nishimaki T, Matsuzaki G. Interleukin-17A is involved in enhancement of tumor progression in murine intestine. *Immunobiology.* 217(1):54-60, 2012.

Otsuka A, Kubo M, Honda T, Egawa G, Nakajima S, Tanizaki H, Kim B, Matsuoka S, Watanabe T, Nakae S, Miyachi Y, Kabashima K. Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. *PLoS One.* 6(9):e25538, 2011.

Kimura N, Itoh S, Nakae S, Axtell RC, Velotta JB, Bos EJ, Merk DR, Gong Y, Okamura H, Nagamine CM, Adachi H, Kornfeld H, Robbins RC, Fischbein MP. Interleukin-16 deficiency suppresses the development of chronic rejection in murine cardiac transplantation model. *J Heart Lung Transplant.* 30(12):1409-17, 2011.

Sawaguchi M, Tanaka S, Nakatani Y, Harada Y, Mukai K, Matsunaga Y, Ishiwata K, Oboki K, Kambayashi T, Watanabe N, Karasuyama H, Nakae S, Inoue H, Kubo M. Role of Mast Cells and Basophils in IgE Responses and in Allergic Airway Hyperresponsiveness. *J Immunol.* 188(4):1809-18, 2012.

Bonilla WV, Fröhlich A, Senn K, Kallert S, Fernandez M, Johnson S, Kreutzfeldt M, Hegazy AN, Schrick C, Fallon PG, Klemenz R, Nakae S, Adler H, Merkler D, Löhning M, Pinschewer DD. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses. *Science* 335(6071):984-9, 2012.

2. 学会発表

中江 進、「IL-17 と皮膚炎」(シンポジウム)、第 41 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会(山梨)、2011 年 7 月 16 日

中江 進、「接触性皮膚炎とサイトカイン Up-to-date」(講演)、第10回(社)日本化学工業協会 LRI 研究報告会(東京)、2011年8月26日

中江 進、「IL-33と炎症」(シンポジウム)、第84回日本生化学会大会(京都)、2011年9月21日

中江 進、「IL-33と炎症応答」(講演)、第88回発生工学・疾患モデル研究会(東京)、2011年9月28日

Nakae S. “IL-17 family cytokines in allergy” Karolinska Institute (Sweden), Oct 20, 2011.

Nakae S. “IL-33 in allergy” Uppsala University (Sweden), Oct 21, 2011.

中江 進、「IL-33とアレルギー」(シンポジウム)、第61回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京)、2011年11月10日

Nakae S. “Role of IL-33 in allergy” (シンポジウム)、第40回日本免疫学会学術集会(千葉)、2011年11月29日

Nakae S. “Roles of IL-25 and IL-33 in allergic airway inflammation” 6th Chiba University G-COE Symposium, Chiba, Japan, Nov. 30, 2011.

Nakae S, “IL-33”, XXIIth World Allergy Congress, Mexico, Dec 5, 2011.

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

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
分担研究項目：マスト細胞による Treg 細胞増幅誘導機構の解明

研究代表者：斎藤 博久 国立成育医療研究センター研究所 副研究所長

研究要旨：マウスに IL-33 を点鼻吸入することにより、肺に好酸球の強い浸潤を伴う気道炎症が誘導される。その際、肺の所属リンパ節では、Treg 細胞の増加が認められる。一方、マスト細胞欠損マウスでは、この IL-33 による気道炎症が重症化し、リンパ節での Treg 細胞の増加が認められない。In vitro の解析結果により、IL-33 の刺激によってマスト細胞から産生される IL-2 が Treg 細胞の誘導に必須であることがわかっている。マスト細胞欠損マウスに野生型マウスのマスト細胞、IL-33 欠損マウスのマスト細胞、あるいは、IL-2 欠損マウスのマスト細胞をあらかじめ移入しておき、これらマウスに IL-33 による気道炎症を誘導すると、野生型マウスのマスト細胞を移入した群では、気道炎症とリンパ節内の Treg 細胞数は正常化するのに対し、IL-33 欠損マウスのマスト細胞、あるいは、IL-2 欠損マウスのマスト細胞を移入した群では、気道炎症は重症化したままであり、リンパ節での Treg 細胞数も少ないままであった。したがって、IL-33 による Treg 細胞の誘導には、マスト細胞上の IL-33 受容体を介した IL-2 産生が重要であることが個体レベルでも明らかになり、Treg 細胞数のバランスと気道炎症の重症度の相関が明確に認められた。

A. 研究目的

マウスに IL-33 を点鼻吸入すると、好酸球の浸潤を伴う気道炎症が誘導される。その際、肺の所属リンパ節では、Treg 細胞が増殖することが分かっている。一方、マスト細胞欠損マウスでは、IL-33 吸入後、野生型マウスよりも、肺所属リンパ節での Treg 細胞が著明に少ないため、気道炎症が重症化する。したがって、肺胞洗浄液中の好酸球の数と肺所属リンパ節内の Treg 細胞数は逆相関関係にある。In vitro では、IL-33 の存在下でマスト細胞と T 細胞を共培養することにより、Treg 細胞が選択的に増殖誘導される。この際、IL-33 は T 細胞には作用せず、マスト細胞に作用してマスト細胞から IL-2 産生を誘導し、その IL-2 が Treg 細胞の増殖を促進することが明らかになっている。本研究では、この in vitro での知見が、in vivo でも再現されるかどうか検討を行う。

B. 研究方法

野生型マウス、マスト細胞欠損マウス、野生型マウス、IL-33 受容体欠損マウスおよび IL-2 欠損マウスのマスト細胞を移入したマスト細胞欠損マウス（野生型マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス、IL-33 受容体マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス、および、IL-2 欠損マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス）に、一日一回、三日間連続、IL-33 あるいは生理食塩水を吸入させた。四日目に肺胞洗浄液中の好酸球数を血球計測装置にて、肺の所属リンパ節内の Treg 細胞の割合をフローサイトメトリーにて評価を行った。

C. 結果

IL-33 吸入後、野生型マウスに比べて、マスト細胞欠損マウスでは、肺胞洗浄液中の好酸球数が増強し、肺所属リンパ節内の Foxp3⁺ Treg 細胞の割合が少なかった。肺胞洗浄液中の好酸球数と肺所属リンパ節内の Foxp3⁺ Treg 細胞の割合は、「野生型マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス」では野生型マウスと同等であった。一方、「IL-33 受容体マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス」と「IL-2 欠損マスト細胞 → マスト細胞欠損マウス」では、マスト細胞欠損マウスと同様に、野生型マウスに比べて、肺胞洗浄液中の好酸球数が増強し、肺所属リンパ節内の Foxp3⁺ Treg 細胞の割合が少なかった。

D. 考察

IL-33 によって刺激されたマスト細胞が産生する IL-2 が Treg 細胞の増殖を誘導することが in vitro だけでなく in vivo でも明らかになった。したがって、IL-33 は好酸球の浸潤を伴う気道炎症を誘導する一方で、マスト細胞を介した Treg 細胞を誘導することにより、気道炎症を抑制する働きも有すると言える。IL-33 による炎症誘導と抗炎症性作用のうち、抗炎症性作用を優先的に作動させるような仕組みを同定することにより、気道炎症の抑制効果が得られる可能性がある。

E. 結論

In vivo において、IL-33 は、マスト細胞からの