

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21-23年度 総合研究報告書

## I . 構成員名簿

平成 21-23 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) 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

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.

A. 研究目的

喘息治療は、30年以上にわたり吸入 $\sigma$ -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



2006.442.997)。さらに研究分担者の中江らは接触皮膚炎におけるマスト細胞の炎症抑制能を明らかにした (Nat Immunol. 2007.8.1095)。申請者らは、気道炎症モデルにおいても、マスト細胞を介した炎症抑制メカニズムが存在することを見出している。この新しい Treg 増幅機構は IL-33、培養マスト細胞、CD4 陽性 T 細胞を共培養することにより再現される。さらにこの増幅系は抗原を必要としないことから de novo の Treg 分化機構ではなく、Treg を末梢組織でポリクローナルに増幅する機構であると考えられる。動物実験では Treg による気道炎症の抑制活性には抗原特異性が必須でないことが報告されており (J Immunol. 2009.183.1821)、ポリクローナルであっても炎症抑制活性を発揮しうることが示唆されている。この新しい Treg 増幅機構を既存の方法と組み合わせることにより、より効率の良い Treg 増幅法の開発が期待される。さらに本機構の分子メカニズムの探索は末梢組織における全く新しい炎症抑制機構を明らかにするだけでなく、新しい治療標的分子の発掘を可能にする。工業化の容易な有機化合物、組換えタンパク、天然物等は製薬企業による薬剤開発が可能であるのに対し、Treg 自家移植等の細胞療法は工業化に不適で基礎研究機関での研究開発が相応しい。本研究から得られる知見によって、マスト細胞を介した新しい機構に基づく効率的体外 Treg 誘導法の開発が可能となり、喘息、アレルギー治療のための新しい治療法基盤の確立を行う。本研究では、マスト細胞を介した Treg 誘導メカニズムを体外増幅法に応用し、単独または、これまでの増幅法との組み合わせによって、最も強力な Treg 増幅法の開発をめざす。本研究のアウトプットは、新しい Treg 体外増幅法の基盤を提供するだけでなく、Treg 誘導メカニズムの学術的理解にも寄与しう。申請者らのマウス・ヒト培養マスト細胞作成の豊富な経験に基づくノウハウの蓄積 (Nat. Protocol. 2006.1.2178) を利用して作出した新しい Treg 増幅法は、これまでに全く予想されていなかった要素 (培養マスト細胞、IL-33) の組み合わせからなる非常に独創性の高いアイデアに基づく。本研究の最終目標は、体外増幅した Treg を使った喘息アレルギー疾患治療法の開発にある。

本研究期間(H21-23年度)の具体的目的は、  
1. 申請者が発見したマスト細胞による Treg 増幅を利用した高効率 Treg 増幅法の確立、2.

その分子メカニズムの解明、3. 前臨床試験としての動物喘息モデルの喘息治療である。

## B. 研究方法

(1) マスト細胞による Treg 細胞増幅を利用した高効率 Treg 増幅法の確立  
マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-33 の存在下で 3-4 日間、共培養を行うことにより、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞を選択的に増幅させることができる。そこで、マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞の共培養により、選択的かつ効率的に Treg 細胞を誘導するような IL-33 以外の因子の探索や培養条件の検討を行うことを目的とした。(i) 大腸菌由来のリコンビナント IL-33 の代替として、IL-33 受容体に対する抗体のうち、マスト細胞を刺激しうる抗体の探索を試みた。(ii) マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-33 以外のマスト細胞刺激因子 (IgE、LPS、その他のサイトカインなど) の存在下で培養を行い、Treg 細胞の増幅の可否を評価した。(iii) 未感作 T 細胞を、固相化抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で刺激を行う際、IL-33 を添加することにより、Treg 細胞誘導の可否をフローサイトメトリーにより評価した。(iv) マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-33 の存在下で共培養を行うことにより Treg 細胞を誘導する際、さらに、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を添加し、T 細胞受容体および副シグナル経路の効果を検討した。

(2) マスト細胞による Treg 細胞増幅分子メカニズムの解明  
マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-33 の存在下で 3-4 日間、共培養を行うことにより、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞を選択的に増幅させることができる。この際、マスト細胞から産生される液性因子とマスト細胞と T 細胞間の細胞間相互作用が必須であることが明らかになっている。そこで、本系で Treg 細胞の誘導に必須な液性因子と細胞間相互作用に関わる因子の探索を行うことを目的とした。(i) IL-33 で刺激したマスト細胞から回収した RNA をもとに GeneChip を用いてマイクロアレイ解析を行った。IgE や LPS 刺激したマスト細胞の遺伝子発現プロファイルと比較し、IL-33 刺激により、特異的に発現が変化するような遺伝子の探索を試みた。(ii) IL-33 の存在下においてマスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を共培養する際、候補遺伝子の中和抗体を添加して、その候補遺伝子の Treg 細胞の誘導への関与を評価した。(iii) 候補遺伝子の欠損マウス由来のマスト細胞や T 細胞を利用し、それらを IL-33 の存在下で共培養を行うことにより、Treg 細胞の誘導への関与を評価した。(iv) 候補遺伝子の欠損マウス由来のマスト細胞をマスト細胞欠損マウスに移植し、IL-33 投与後の Treg 細胞の誘導効率を野生型マウスのマスト細胞を移植した群と比較することにより、当該遺伝子の重要性を個体レベルで

評価を行った。

### (3) 前臨床試験としての動物喘息モデルの喘息治療

マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-33 の存在下で 3-4 日間、共培養を行うことにより、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞を選択的に増幅させることができる。この系で作製した Treg 細胞が喘息の治療に有効であるかどうか、マウスの喘息モデルを利用して評価を行うことを目的とする。(i) アジュバンド (alum) を利用した鶏卵白アルブミンを抗原とした喘息モデル、alum を使用しない鶏卵白アルブミンを抗原とした喘息モデル、ダニ粗抽出物を抗原とした喘息モデルを確立した。(ii) IL-33 およびシステインプロテアーゼであるパペインを点鼻吸入させることにより喘息様気道炎症を誘導するモデルを確立した。(iii) マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-33 の存在下で共培養して得られた Treg 細胞をマウスに移入し、鶏卵白アルブミン喘息モデルおよび IL-33 吸入喘息モデルにおける影響を評価した。

(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 細胞増幅を利用した高効率 Treg 増幅法の確立

(i) リコンビナント IL-33 とは異なり、使用した 4 種類の IL-33 受容体に対するモノクローナル抗体 (3E10, DJ8, 245707 及び 245714) は、マウスマスト細胞からのサイトカイン産生 (IL-6, IL-13 及び TNF) を誘導しなかった。同様に、ヒト IL-33 受容体に対するモノクローナル抗体 3 種 (97203, D14L および 14J07) についても、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 は、IL-33 受容体を発現する Th2 細胞を活性化することができる刺激抗体として報告されており、その際、3E10 を細胞に添加後、抗ラット IgG 抗体をさらに加えて、3E10 を架橋する必要があ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できる抗体は使用したものの中からは見いだせなかった。DJ8 と 245707 は、IL-33 と IL-33 受容体を介したマスト細胞の活性化を阻害する抗体であった。3E10 と 245714 は、マスト細胞においては、刺激および阻害の効果を持たないことが明らかになった。

(ii) マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IgE, LPS, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17F, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-31, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , IL-36Ra, LIGHT, SCF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 あるいは TSLP の存在下で培養を行い、3-4 日後に、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg 細胞の存在をフローサイトメトリーで評価を行ったところ、IL-33 のみが Treg 細胞を誘導した。(iii) 固相化抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体で T 細胞を刺激する際、TGF- $\beta$ 1 あるいは、IL-33 を添加することにより、Treg 細胞誘導の可否をフローサイトメトリーにより評価を行ったが、TGF- $\beta$ 1 では、Treg 細胞の分化誘導が認められたが、IL-33 では、そのような効果は認められなかった。(iv) マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-33 の存在下で共培養を行うことにより Treg 細胞を誘導する際、さらに、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を添加したが、Treg 細胞数は、抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体を添加により増強することにはなかった。

(2) マスト細胞による Treg 細胞増幅分子メカニズムの解明

(i) マウス培養マスト細胞の IL-33, IgE あるいは LPS 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)。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。IL-33, IgE あるいは LPS 刺激の比較により、IL-33 特異的に発現上昇する遺伝子として IL-2 が同定された。また、細胞間相互作用に関わる遺伝子も多数抽出された。(ii) IL-33 の存在下においてマスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を共培養する際、細胞間相互作用に関わる分子

(CD80, CD86, ICOSL, PD-L1, PD-L2, GITRL, TIM-3, FasL, 4-1BBL, OX40L, CD153, ICAM-1 あるいは LIGHT) に対する中和抗体を添加し、この系での Treg 細胞の誘導におけるこれら細胞間相互作用に関わる分子の影響の評価を行った結果、4-1BBL, CD86, ICAM-1 の重要性が明らかになった。(iii) IL-33 受容体欠損マウスのマスト細胞を IL-33 の存在下で野生型マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養を行った結果、Treg 細胞の誘導はほとんど認められなかった。一方、野生型マウスのマスト細胞を IL-33 の存在下で IL-33 受容体欠損マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養を行った場合は、野生型マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養を行った場合と同程度に Treg 細胞が誘導された。したがって、本系での Treg 細胞の誘導には、まず、マスト細胞が IL-33 によって活性化される必要があることが明らかになった。また、この際、IL-33 は T 細胞に直接的な作用をもたないことも明らかになった。IL-10 欠損マウス、IL-2 欠損マウス、TGF- $\beta$ 1 欠損マウス由来のマスト細胞を IL-33 の存在下で CD4<sup>+</sup>T 細胞と共培養を行った結果、

IL-10 欠損および TGF- $\beta$ 1 欠損マウス由来のマスト細胞は野生型マウスのマスト細胞の場合と同程度、Treg 細胞が誘導できるのに対し、IL-2 欠損マウス由来のマスト細胞では約 3 分の 1 に減少した。一方、IL-33 の存在下、野生型マウスのマスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞の共培養時に、抗 IL-2 抗体を添加した場合は、IL-2 欠損マウス由来のマスト細胞を用いた場合よりも、Treg 細胞の誘導が著しく阻害された。また、IL-33 の存在下、IL-2 欠損マウス由来のマスト細胞と IL-2 欠損マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞を共培養した場合は、先の抗 IL-2 抗体と同様な結果となったが、野生型マウスのマスト細胞と IL-2 欠損マウスの CD4<sup>+</sup>T 細胞を共培養した場合は、Treg 細胞の誘導に障害は認められなかった。したがって、IL-33 によってマスト細胞が産生する IL-2 が T 細胞に作用し、その後、T 細胞から産生される IL-2 との相乗的な作用により Treg 細胞の誘導が起きることが明らかになった。また、ヒトのマスト細胞と T 細胞を用いた系においても、IL-33 による Treg 細胞の誘導には IL-2 が重要であることが抗 IL-2 抗体を用いた実験により明らかになった。(iv) マウスに IL-33 を一日一回、三日間連続で点鼻吸入させることにより、肺に好酸球の強い浸潤を伴う気道炎症が誘導される。この際、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。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。

### (3) 前臨床試験としての動物喘息モデルの喘息治療

(i) アジュバンド (alum) を利用した鶏卵白アルブミンを抗原とした喘息モデル、alum を使用しない鶏卵白アルブミンを抗原とした喘息モデル、ダニ粗抽出物を抗原とした喘息モデルを確立し、いずれも肺胞洗浄液中および肺の病理所見より、好酸球の浸潤を伴う気道炎症が惹起されていることを確認した。IL-33 欠損マウスを作製し、このマウスでは、これらの喘息モデルで見られる気道への好酸球の浸潤が顕著に抑制されることが

明らかになった。(ii) IL-33 およびパピンを一日一回、三日間連続点鼻吸入させることにより喘息様気道炎症を誘導するモデルを確立した。この IL-33 およびパピンによる気道炎症は、T・B 細胞を欠損する Rag-2 欠損マウスおよび LPS の受容体である TLR4 欠損マウスでも誘導されることが確認され、TLR 非依存的な自然免疫系の活性化を介した気道炎症モデルであることが明らかになった。野生型マウスにパピンを吸入させると、肺で IL-33 mRNA 発現が上昇することを確認した。また、パピンによる気道への好酸球の浸潤は IL-33 欠損マウスでは顕著に抑制されることが明らかになった。(iii) 野生型マウスに IL-33 を吸入させると、好酸球の浸潤を伴う気道炎症とともに、肺の所属リンパ節では Treg 細胞が増加する。一方で、マスト細胞欠損マウスでは野生型マウスに比べて、IL-33 による気道炎症は重症化し、その際、所属リンパ節での Treg 細胞数が少ないことをすでに述べた ((2)-(iv)参照)。このマスト細胞欠損マウスでの異状な所見は、マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-33 の存在下で共培養して得られた Treg 細胞をあらかじめ移入しておくことにより、野生型マウスと同レベルにまで正常化できた。鶏卵白アルブミン喘息モデルでは、鶏卵白アルブミンを alum とともに感作した野生型マウスに、鶏卵白アルブミンを吸入させる前に、マスト細胞と CD4<sup>+</sup>T 細胞を IL-33 の存在下で共培養して得られた Treg 細胞を移植した。その条件下では、Treg 細胞を移植していない群と比較して、肺胞洗浄液中の好酸球の数には変化が認められなかったものの、肺胞洗浄液中の IL-4 レベルは顕著に減少しており、Treg 細胞の移入の効果がわずかに認められた。

## D. 考察

(1) マスト細胞による Treg 細胞増幅を利用した高効率 Treg 増幅法の確立  
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するものではなく、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。通常、体外での Treg 細胞の増幅は、未感作 T 細胞を TGF- $\beta$ 1 の存在下で、固相化抗 CD3 抗体 (プラス抗 CD28 抗体) といった T 細胞受容体からの刺激を与えることによって行われる。しかしながら、この方法では CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg 細胞よりも、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3-negative 活性化 T 細胞が多く存在し、選択的な Treg 細胞の誘導法という点では改良すべき課題が残されている。一方、IL-33 は、TGF- $\beta$ 1 とは異なり、未感作 T 細胞を固相化抗 CD3 抗体 (プラス抗 CD28 抗体) 刺激した場合には Treg 細胞を誘導することはできないが、

マスト細胞と T 細胞の共培養系では、活性化 T 細胞は誘導せず、Treg 細胞のみを選択的に誘導できる特異性の高さの確認がされ、本系の有用性が期待された。

## (2) マスト細胞による Treg 細胞増幅分子メカニズムの解明

IL-33 の存在下、マスト細胞と CD4<sup>+</sup> 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。また、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。

## (3) 前臨床試験としての動物喘息モデルの喘息治療

マウスに IL-33 を吸入させて誘導した気道炎症は、あらかじめ、IL-33 の存在下で、マスト細胞と CD4<sup>+</sup> T 細胞の共培養によって誘導した Treg 細胞を移植しておくことで、抑制することができた。一方、鶏卵白アルブミン喘息モデルでは、抗原感作成立後、抗原吸入前に、Treg 細胞を移入しても、劇的な炎症抑制効果は認められなかった。前者は、IL-33 を三日間連続吸入で惹起する気道炎症であるのに対し、後者は抗原感作と惹起を通して一ヶ月の期間で行われる。そのため、後者で劇的な炎症の寛解が認められなかった可能性として、Treg 細胞の移入するタイミング（吸入直前、吸入数日前など）が至適ではなかった可能性が挙げられる。あるいは、IL-33 の吸入による気道炎症モデルは T・B 細胞といった獲得免疫細胞の非存在下でもおこる自然免疫型炎症であるのに対し、鶏卵白アルブミン喘息モデルは獲得免疫細胞が必須である。したがって、IL-33 の存在下、マスト細胞と CD4<sup>+</sup> T 細胞の共培養によって誘導した Treg 細胞の移植による炎症抑制効果は、前者のような自然免疫型気道炎症に有効であり、後者の獲得免疫型気道炎症には大きな効果が得られない可能性も考えられる。

## E. 結論

(1) マスト細胞による Treg 細胞増幅を利用した高効率 Treg 増幅法の確立  
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。

## (2) マスト細胞による Treg 細胞増幅分子メカニズムの解明

T 細胞受容体刺激非依存的な Treg 細胞の増幅には IL-33 存在下、マスト細胞と T 細胞の共培養系が最も効率が良い。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明らかになった。

## (3) 前臨床試験としての動物喘息モデルの喘息治療

鶏卵白アルブミンを抗原とした喘息モデル、ダニ粗抽出物を抗原とした喘息モデル、IL-33 およびパパインによる喘息様気道炎症モデルを確立した。このうち、IL-33 の存在下、マスト細胞と T 細胞の共培養によって誘導した Treg 細胞の移入により、IL-33 による気道炎症モデルの抑制が確認され、また、鶏卵白アルブミンを抗原とした喘息モデルでの部分的な抑制効果が観察された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

中江 進

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.* 2009 Jun;10(6):603-9.

Abe, Y., Ohtsuji, M., Ohtsuji, N., Lin, Q., Tsurui, H., Nakae, S., Shirai, T., Sudo, K. and Hirose, S. Ankylosing enthestis associated with up-regulated IFN- $\gamma$  and IL-17 production in (BXSB x NZB) F1 male mice; a new mouse model. *Mod Rheumatol.* 2009;19(3):316-22.

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.* 2009

Jun 8;206(6):1351-64.

Takanashi, M., Oikawa, K., Sudo, K., Tanaka, M., Fujita, K., Ishikawa, A., Nakae, S., Kaspar, R.L., Matsuzaki, M., Kudo, M. and Kuroda, M. Therapeutic silencing of an endogenous gene by siRNA cream in an arthritis model mouse. *Gene Ther.* 2009 Aug;16(8):982-9.

Orihara, K., Morita, H., Yagami, A., Kajiwara, N., Nakae, S., Matsumoto, K., Nagasaki, H., Saito, Y., Saito, H. and Mastuda, A.  $T_H2$  cytokines potently induce an orexigenic peptide, melanin-concentrating hormone, in human vascular endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Sep;124(3):612-4

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.* 2009 Dec 1;183(11):7523-30.

Ohno, T., Oboki, T., 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.* 2009 Dec 15;183(12):7890-7.

Itoh, S., Nakae, S., Axtell, R.C., Velotta, J.B., Kimura, N., Kajiwara, N., Iwakura, Y., Saito, H., Adachi, H., Steinman, L., Robbins, R.C. and Fischbein, M.P. IL-17 contributes to the development of chronic rejection in a murine heart transplant model. *J Clin Immunol.* 2010 Mar;30(2):235-40.

Itoh, S., Nakae, S., Velotta, J.B., Kosuge, H., Connolly, A., Tsai, M., Adachi, H., Galli, S.J., Robbins, R.C. and Fischbein, M.P. The role of recipient mast cells in acute and chronic cardiac allograft rejection in C57BL/6-*Kit<sup>W<sup>sh</sup>/W<sup>sh</sup></sup>* mice. *J Heart Lung Transplant.* 2010 Apr;29(4):401-9.

Okamoto-Yoshida, Y., Umemura, M., Yahagi, A., O'Brien, R.L., Ikuta, K., Kishihara, K., Hara, H., Nakae, S., Iwakura, Y. and Matsuzaki, G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol.* 2010 Apr 15;184(8):4414-22.

Suzukawa, M., Yamaguchi, M., Iikura, M., Koketsu, R., Komiyama, A., Nagase, H., Nakae, S., Matsumoto, K., Saito, H., Matsushima, K.,

Yamamoto, K. and Ohta, K. IL-33-induced activation of human basophils and eosinophils via ST2. *Inflammation and Regeneration*, 2010 May; 30, 181-185.

Nambu, A. and Nakae, S. IL-1 and allergy. *Allergol Int.* 2010 Jun;59(2):125-35.

Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Saito, H. and Nakae, S. IL-33 and IL-33 receptors in host defense and diseases. *Allergol Int.* 2010 Jun;59(2):143-60.

Kajiwara, N., Oboki, K., Ohno, T., Ishii, A., Sunnarborg, S.W., Okumura, K., Saito, H. and Nakae, S. Amphiregulin is not essential for ovalbumin-induced acute airway inflammation in mice. *Allergol Int.* 2010 Jun;59(2):207-11.

Yagami, A., Kajiwara, N., Oboki, O., Ohno, N., Morita, H., Sunnarborg, S.W., Okumura, K., Ogawa, H., Saito, H. and Nakae, S. Amphiregulin is dispensable for induction of contact hypersensitivity. *Allergol Int.* 2010 Sep;59(3):277-84.

Oh, I., Ozaki, K., Meguro, A., Kadowaki, M., Matsu, H., Hatanaka, K., Tatara, R., Sato, K., Iwakura, Y., Nakae, S., Sudo, K., Teshima, T., Leonard, W. J. and Ozawa, K. Altered effector CD4<sup>+</sup> T cell function in IL-21R<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cell-mediated graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2010 Aug 1;185(3):1920-6.

Nakajima, A., Matsuki, T., Komine, M., Asahina, A., Horai, R., Nakae, S., Ishigame, H., Kakuta, S., Saijo, S., and Iwakura, Y. TNF, but not IL-6 and IL-17, is crucial for the development of T cell-independent psoriasis-like dermatitis in IL1rn<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol.* 2010 Aug 1;185(3):1887-93.

Ishii, A., Oboki, K., Nambu, A., Morita, H., Ohno, T., Kajiwara, N., Arae, K., Sudo, H., Okumura, K., Saito, H. and Nakae, S. Development of IL-17-mediated delayed-type hypersensitivity is not affected by down-regulation of IL-25 expression. *Allergol Int.* 2010 Dec;59(4):399-408.

Jin, S.-L.C., Goya, S., Nakae, S., Wang, D., Bruss, M., Umetsu, D. and Conti, M. Phosphodiesterase 4B is essential for Th2 cell function and development of airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Dec;126(6):1252-1259.

- Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, K., Arae, K., Morita, H., Ishii, A., Nambu, A., Abe, T., Kiyonari, H., Sudo, K., Okumura, K., Saito, H. and Nakae, S. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 26;107(43):18581-6.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. and Nakae, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*. 2011 Feb 25;34(2):149-62.
- 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. and Nakae, S. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. *PLoS One*. 2011 Apr 11;6(4):e18404
- Oboki, K., Nakae, S., Matsumoto, K. and Saito, H. IL-33 and airway inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011 April;3(2):81-88
- Suzukawa, M., Nagase, H., Ogahara, I., Han, K., Tashimo, H., Shibui, A., Koketsu, R., Nakae, S., Yamaguchi, M. and Ohta, K. Leptin enhances survival and induces migration, degranulation and cytokine synthesis of human basophils. *J Immunol*. 2011 May 1;186(9):5254-5260
- Meguro, A., Ozaki, K., Hatanaka, K., Oh, I., Sudo, K., Ohmori, T., Matsu, H., Tatara, R., Sato, K., Sakata, Y., Nakae, S., Leonard, W.J., Ozawa, K. Lack of IL-21 signal attenuates graft-versus-leukemia effect in the absence of CD8 T-cells. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Dec;46(12):1557-65.
- Shibui, A., Nambu, A., Shimura, E., Yamaguchi, S., Shiraishi, C., Sato, Y., Okumura, K., Sugano, S., Hozumi, N and 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, T., Saito, H. and Nakajima, T. Cimetidine Enhances Antigen-Specific IgE and Th2 Cytokine Production. *Allergol Int*. 2011 Sep;60(3):339-44.
- Kamanaka, M., Zenewicz, L.A., Huber, S., Gagliani, N., Rathinam, C., O'Connor W Jr., Wang, Y.Y., Nakae, S., Iwakura, Y., Hao, L. and Flavell, R.A. Memory/effector (CD45RB<sup>lo</sup>) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22 dependent intestinal pathology. *J Exp Med*. 2011 May 9;208(5):1027-40.
- Itoh, S., Kimura, N., Axtell, R.C., Velotta, J.B., Gong, Y., Wang, X., Kajiwara, N., Nambu, A., Shimura, E., Adachi, H., Iwakura, Y., Saito, H., Okumura, K., Sudo, K., Steinman, L., Robbins, R.C., Nakae, S. and Fischbein, M.P. Interleukin-17 accelerates allograft rejection by suppressing regulatory T cell expansion. *Circulation*. 2011 Sep 13;124(11 Suppl):S187-96.
- Shibui, A., Doi, J., Tolba, M.E.M., Shiraishi, C., Sato, Y., Ishikawa, S., Watanabe, J., Nogami, S., Nakae, S., Sugano, S. and Hozumi, N. N-acetylglucosaminyltransferase V-deficiency increases susceptibility to murine malaria. *Exp Parasitol*. 2011 Nov;129(3):318-21
- Kimura, N., Itoh, S., Nakae, S., Axtell, R.C., Velotta, J.B., Bos, E.J., Merk, D.R., Gong, Y., Okamura, H., Nagamine, C.M., Adachi, H., Cruikshank, W.W., Kornfeld, H., Robbins, R.C. and Fischbein, M.P. Interleukin-16 deficiency suppresses the development of chronic rejection in murine cardiac transplantation model. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Dec;30(12):1409-17
- Otsuka, A., Kubo, M., Honda, T., Egawa, G., Nakajima, S., Tanizaki, H., Kim, B., Matsuoka, S., Watanabe, T., Nakae, S., Miyachi, Y., and Kabashima, K. Requirement of interaction between mast cells and skin dendritic cells to establish contact hypersensitivity. *PLoS One*. 2011;6(9):e25538.
- Oshiro, K., Kohama, H., Umemura, M., Uyttenhove, C., Inagaki-Ohara, K., Arakawa, T., Harada, M., Nakae, S., Iwakura, Y., Nishimaki, T. and Matsuzaki, G. Interleukin-17A is involved in enhancement of tumor progression in murine intestine. *Immunobiology*. 2012 Jan;217(1):54-60.
- 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. and Kubo, M. Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. *J Immunol*. 2012 Feb 15;188(4):1809-18
- 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<sup>+</sup> T cell responses. *Science* 2012 Feb; 335(6071):984-9.

齋藤博久

Okayama Y, Okumura S, Sagara H, Yuki K, Sasaki T, Watanabe N, Fueki M, Sugiyama K, Takeda K, Fukuda T, Saito H, Ra C. FcεRI-mediated thymic stromal lymphopoietin production by IL-4-primed human mast cells. *Eur Respir J* 2009 Aug;34(2):425-435.

Nagumo H, Abe J, Kano H, Taki S, Yamazaki K, Yamazaki T, Kobayashi N, Koike K, Sugane K, Saito H, Agematsu K. Distinct response in maintenance of human naive and memory B cells via IL-21 receptor and TCL1/Akt pathways. *Cell Immunol* 2009;256(1-2):56-63.

Imada Y, Fujimoto M, Hirata K, Hirota T, Suzuki Y, Saito H, Matsumoto K, Akazawa A, Katsunuma T, Yoshihara S, Ebisawa M, Shibasaki M, Arinami T, Tamari M, Noguchi E. Large scale genotyping study for asthma in the Japanese population. *BMC Res Notes* 2009 Mar 31;2(1):54.

Morisawa Y, Kitamura A, Ujihara T, Zushi N, Kuzume K, Shimanouchi Y, Tamura S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K. Effect of heat treatment and enzymatic digestion on the B cell epitopes of cow's milk proteins. *Clin Exp Allergy* 2009 Jun;39(6):918-925.

Sugiura K, Muro Y, Futamura K, Matsumoto K, Hashimoto N, Nishizawa Y, Nagasaka T, Saito H, Tomita Y, Usukura J. The Unfolded Protein Response Is Activated in Differentiating Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2009 Sep;129(9):2126-2135.

Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E. Intraarticular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* 2009 Apr 6;27(4):878-887.

Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Azuma M, Lee SK,

Mizutani S, Morio T. Impaired CD4 and CD8 T-cell effector function and decreased memory T-cell population in ICOS-deficient patients. *J Immunol* 2009 May 1;182(9):5515-5527.

Matsumoto K, Fukuda S, Nakamura Y, Saito H. Amphiregulin production by human eosinophil. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149(suppl 1):39-44.

Kato A, Chustz RT, Ogasawara T, Kulka M, Saito H, Schleimer RP, Matsumoto K. Dexamethasone and FK506 inhibit distinct subsets of chemokines in human mast cells after cross-linking of FcεRI. *J Immunol* 2009 Jun 1;182(11): 7233-7243.

Nishida K, Hasegawa A, Nakae S, Oboki K, Saito H, Yamasaki S, 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* 2009 Jun 8;206(6):1351-1364.

Orihara K, Morita H, Yagami A, Kajiwara N, Nakae S, Matsumoto K, Nagasaki H, Saito Y, Saito H, Matsuda A. TH2 cytokines potently induce an appetite-stimulating peptide, melanin-concentrating hormone, in human vascular endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009 Sep; 124(3):612-614.

Makino H, Toyoda M, Matsumoto K, Saito H, Nishino K, Fukawatase Y, Machida M, Akutsu H, Uyama T, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Fujino T, Ishikawa Y, Nakamura T, Umezawa A\*. Mesenchymal to embryonic incomplete transition of human cells by chimeric OCT4/3 (POU5F1) with physiological co-activator EWS. *Exp Cell Res* 2009 Oct 1;315(16):2727-2740.

Kashiwakura JI, Kawakami Y, Yuki K, Zajonc DM, Hasegawa S, Tomimori Y, Caplan B, Saito H, Furue M, Oettgen HC, Okayama Y, Kawakami T. Polyclonal IgE Induces Mast Cell Survival and Cytokine Production. *Allergol Int* 2009 Sep;58(3):411-419.

Takahashi H, Toyoda M, Birumachi JI, Horie A, Uyama T, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Shortening of human cell life span by induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta. *J Cell Physiol* 2009 Nov;221(2):335-342.

Fukagawa K, Okada N, Fujishima H, Nakajima T, Takano Y, Tanaka M, Dogru M, Satake Y,

- Tsubota K, Saito H. Corneal and conjunctival fibroblasts are major sources of eosinophil-recruiting chemokines. *Allergol Int* 2009 Dec;58(4):499-508.
- Enomoto Y, Orihara K, Takamasu T, Matsuda A, Gon Y, Saito H, Ra C, Okayama Y. Tissue remodeling induced by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway following an acute asthma attack. *J Allergy Clin Immunol* 2009 Nov; 124(5):913-920. e1-7.
- Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Morii E, Aozasa K, Flavell RA, Okumura K, Saito H, Nakae S. Caspase-1, caspase-8 and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *J Immunol* 2009 Dec 1; 183(11):7890-7897.
- 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 Mar;31(3):504-511.
- Matsumoto Y, Imai Y, Sugita Y, Tanaka T, Tsujimoto G, Saito H, Oshida T. CCDC132 is highly expressed in atopic dermatitis T cells. *Mol Med Rep* 2010; 3(1): 83-87.
- 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 Mar;30(2):235-240.
- 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 Jun;223(3):695-702.
- Futamura K, Orihara K, Hashimoto N, Morita H, Fukuda S, Sagara H, Matsumoto K, Tomita Y, Saito H, Matsuda A. 2-adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2010 Jul;152(4):353-361.
- 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 Apr 1;184(7):3526-3534.
- Kajiwara N, Sasaki T, Cruse G, Bradding P, Ohmori K, Saito H, Ra C, Okayama Y. Activation of human lung mast cells through platelet activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2010 May;125(5):1137-1145.e6.
- 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 Jun;59(2):207-211.
- 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.
- 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 Sep;59(3):277-284.
- Fukuie T, Nomura I, Horimukai K, Futamura M, Narita M, Ohzeki T, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Proactive treatment appears to decrease serum IgE levels in patients with severe atopic dermatitis. *Brit J Dermatol* 2010 Nov;163(5):1127-1129.
- 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 Dec;130(12):2760-2767.
- 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 Dec;59(4):399-408.
- 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 Nov 15; 185(10): 5743-5750.
- Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. IL-33 is a crucial amplifier for innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 Oct 26; 107(43): 18581-18586.
- 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 Nov 5;12(6):R206.
- Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, Kasamatsu J, Iwabuchi K, Matsumoto K, Saito H, Taniguchi T, Matsumoto M, Seya T. Identification of INAM, a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J Exp Med* 2010 Nov 22; 207(12): 2675-2687.
- 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* 2011 Jun; 44(6):787-93.
- 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 Feb;154(3):184-194.
- 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 Apr;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. 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* 2011 Mar; 127(3): 685-688.e8.
- 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.
- 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* 2011 May 25;75(6):1455-62.
- Arae K, Oboki K, Ohno T, Hirata M, Nakae S, Taguchi T, Saito H, and Nakajima T. Cimetidine Enhances Antigen-Specific IgE and Th2 Cytokine Production. *Allergol Int.* 2011 Sep;60(3):339-44.
- 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* 2011; 155 Suppl 1:27-33.
- Matsumoto K, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H. Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155 Suppl 1:34-9.
- 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* 2011; 7(7):

e1002170.

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* 2011 Oct;66(10):1287-1295.

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* 2011 Sep 13;124(11 Suppl):S187-96.

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

Saito H. Mast cell-specific genes as new drug targets. In "Allergy Frontiers: Future Perspectives" (p.323) ed. by Pawankar R, Holgate ST and Rosenwasser L. Springer, Tokyo, 2010: 179-190.

Suzukawa M, Yamaguchi M, Iikura M, Koketsu R, Komiya A, Nagase H, Nakae S, Matsumoto K, Saito H, Matsushima K, Yamamoto K, Ohta K. IL-33-induced activation of human basophils and eosinophils. *Inflammation and Regeneration* 2010 May; 30(5):181-185.

Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Saito H, Nakae S. IL-33 and IL-33 Receptors in Host Defense and Diseases. *Allergol Int* 2010 Jun;59(2):143-160.

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.

Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. IL-33 and airway inflammation. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011 April;3(2):81-88.

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)

奥村 康

Niyonsaba F, Suzuki A, Ushio H, Nagaoka I, Ogawa H, and Okumura K. The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes. *Br J Dermatol*, 160(2):243-9. 2009

Kinoshita H, Takai T, Le TA, Kamijo S, Wang XL, Ushio H, Hara M, Kawasaki J, Vu AT, 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*, 123:179-86. 2009

Seto T, Takai T, Ebihara N, Matsuoka H, Wang XL, Ishii A, Ogawa H, Murakami A, and Okumura K. SLPI prevents cytokine release in mite protease-exposed conjunctival epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 379:681-5, 2009

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.e1, 2009

Shimokawa N, Nishiyama C, Hirota T, Tamari M, Hara M, Ikeda S, Okumura K, and Ogawa H. Functional analysis of a polymorphism in the promoter region of the IL-12/23p40 gene. *Clin Exp Allergy*, 39:228-35,2009

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

Aoyama T, Ikejima K, Kon K, Okumura K, Arai K, and Watanabe S. Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure after partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A(y) mice. *Hepatology*. 49:1636-44, 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*, 113:3821-30, 2009

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.

- 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*, 58:225-35, 2009
- Ishikawa Y, Tokura T, Ushio H, Niyonsaba F, Yamamoto Y, Tadokoro T, Ogawa H, and Okumura K. Lipid-soluble components of honeybee-collected pollen exert antiallergic effect by inhibiting IgE-mediated mast cell activation in vivo. *Phytother Res*, 23:1581-6, 2009
- Le TA, Takai T, Kinoshita H, Suto H, Ikeda S, Okumura K, and Ogawa H. Inhibition of double-stranded RNA-induced TSLP in human keratinocytes by glucocorticoids. *Allergy*, 64:1231-2, 2009
- Kato T, Takai T, Fujimura T, Matsuoka H, Ogawa T, Murayama K, Ishii A, Ikeda S, Okumura K, and Ogawa H. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. *Allergy*, 64:1366-74, 2009
- 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. Roles of PU.1 in monocyte- and mast cell-specific gene regulation: PU.1 transactivates CIITA pIV in cooperation with IFN- $\gamma$ . *Int Immunol*, 21:803-16, 2009
- Wang XL, Takai T, Kamiyo S, Gunawan H, Ogawa H, and Okumura K. NADPH oxidase activity in allergenic pollen grains of different plant species. *Biochem Biophys Res Commun*, 387:430-4, 2009
- Niyonsaba F, Nagaoka I, Ogawa H, and Okumura K. Multifunctional antimicrobial proteins and peptides: natural activators of immune systems. *Curr Pharm Des*, 15:2393-413, 2009
- Fukai T, Nishiyama C, Kanada S, Nakano N, Hara M, Tokura T, Ikeda S, Ogawa H, and Okumura K. Involvement of PU.1 in the transcriptional regulation of TNF- $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun*, 388:102-6, 2009
- Kamiyo 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*, 183:6087-94, 2009
- Takenaka H, Ushio H, Niyonsaba F, Jayawardana ST, Hajime S, Ikeda S, Ogawa H, and Okumura K. Synergistic augmentation of inflammatory cytokine productions from murine mast cells by monomeric IgE and toll-like receptor ligands. *Biochem Biophys Res Commun*. 391:471-6, 2010
- Potaczek DP, Maeda K, Wang QH, Nakano N, Kanada S, Stepien E, Branicka A, Fukai T, Hara M, Tokura T, Ogawa H, Undas A, Okumura K, and Nishiyama C. FcepsilonRIalpha gene -18483A>C polymorphism affects transcriptional activity through YY1 binding. *Immunogenetics*, 61:649-55, 2009
- Potaczek DP, Wang QH, Sanak M, Tokura T, Matsuda H, Dziedzina S, Nakano N, Hara M, Ogawa H, Szczeklik A, Okumura K, and Nishiyama C. Interaction of functional FCER2 promoter polymorphism and phenotype-associated haplotypes. *Tissue Antigens*, 74:534-8, 2009
- Takai T, Kato T, Hatanaka H, Inui K, Nakazawa T, Ichikawa S, Mitsuishi K, Ogawa H, and Okumura 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*, 183:7958-65, 2009
- Potaczek DP, Kwasny-Krochin B, Nishiyama C, Okumura K, Gluszko P, and Undas A. Tissue factor +5466A>G and -1208D>I genetic polymorphisms and severity of rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med*, 48:423-5, 2010
- Fujimura J, Takeda K, Kaduka Y, Saito M, Akiba H, Yagita H, Yamashiro Y, Shimizu T, and Okumura K. Contribution of B7RP-1/ICOS co-stimulation to lethal acute GVHD. *Pediatr Transplant*, 14(4):540-8, 2010
- 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, and Nishiyama C. FcepsilonRIalpha gene (FCER1A) promoter polymorphisms and total serum IgE levels in Japanese atopic dermatitis patients. *Int J Immunogenet*, 37:139-41, 2010
- Niyonsaba F, Ushio H, Hara M, Yokoi H, Tominaga M, Takamori K, Kajiwara N, Saito H, Nagaoka I, Ogawa H, and 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*, 184:3526-34. 2010.
- Le TA, Takai T, Vu AT, Kinoshita H, Ikeda S, Ogawa H, and 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*. 153:27-34, 2010
- Wang QH, Nishiyama C, Nakano N, Kanada S, Hara M, Kitamura N, Shimokawa N, Lu CL, Ogawa H, and Okumura K. Opposite effects of Trichostatin A on activation of mast cells by different stimulants. *FEBS Lett*, 584:2315-20, 2010
- Takeda K, Kojima Y, Uno T, Hayakawa Y, Teng MW, Yoshizawa H, Yagita H, Gejyo F, Okumura K, and Smyth MJ. Combination therapy of established tumors by antibodies targeting immune activating and suppressing molecules. *J Immunol*, 184(10):5493-501. 2010
- Shimokawa N, Nishiyama C, Nakano N, Maeda K, Suzuki R, Hara M, Fukai T, Tokura T, Miyajima H, Nakao A, Ogawa H, and Okumura K. Suppressive effects of transcription factor GATA-1 on cell type-specific gene expression in dendritic cells. *Immunogenetics*, 62:421-9. 2010
- Kon K, Ikejima K, Okumura K, Arai K, Aoyama T, and Watanabe S. Diabetic KK-A(y) mice are highly susceptible to oxidative hepatocellular damage induced by acetaminophen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299:G329-37. 2010
- Bashuda H, Shimizu A, Uchiyama M, and Okumura K. Prolongation of renal allograft survival by anergic cells: advantages and limitations. *Clin Transplant*, 24 Suppl 22:6-10. 2010.
- Maeda K, Nishiyama C, Ogawa H, and Okumura K. GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells. *J Immunol*. 185:4252-60, 2010
- 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 TSLP in keratinocytes via the TLR2-TLR6 pathway. *J Allergy Clin Immunol*, 126:985-993.e1-3, 2010
- Takenaka H, Ushio H, Niyonsaba F, Jayawardana ST, Hajime S, Ikeda S, Ogawa H, and Okumura K. Synergistic augmentation of inflammatory cytokine productions from murine mast cells by monomeric IgE and toll-like receptor ligands. *Biochem Biophys Res Commun*, 391: 471-6, 2010
- Hirasawa Y, Takai T, Nakamura T, Mitsuishi K, Gunawan H, Suto H, Ogawa T, Wang XL, Ikeda S, Okumura K, and Ogawa H. *Staphylococcus aureus* extracellular protease causes epidermal barrier dysfunction. *J Invest Dermatol* 130:614-617, 2010
- 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- $\kappa$ B-dependent pathway in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 131:2205-12, 2011
- 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.
- 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.
- 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