

201126015A

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

アレルギー疾患感受性遺伝子である  
ヒスタミンH<sub>1</sub>受容体遺伝子の発現抑制作用を  
持つ天然物を用いる治療戦略に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福井 裕行

平成24(2012)年 5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

アレルギー疾患感受性遺伝子である  
ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体遺伝子の発現抑制作用を  
持つ天然物を用いる治療戦略に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

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

アレルギー疾患感受性遺伝子であるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体遺伝子の  
発現抑制作用を持つ天然物を用いる治療戦略に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福井 裕行

平成24（2012）年 6月

## 目 次

I. 総括研究報告	
アレルギー疾患感受性遺伝子であるヒスタミンH <sub>1</sub> 受容体遺伝子の発現抑制作用を持つ天然物を用いる治療戦略に関する研究	5
福井裕行	
II. 分担研究報告	25
1. アレルギー疾患感受性遺伝子であるヒスタミンH <sub>1</sub> 受容体遺伝子の発現亢進分子機構解明、天然物由来ヒスタミンH <sub>1</sub> 受容体遺伝子発現抑制薬の同定、及び、その分子薬理機構解明に関する研究	26
福井裕行、武田憲昭、荻野 敏、水口博之、柏田良樹、根本尚夫	
2. マウス喘息モデルにおける苦参抽出物の作用に関する研究に関する研究	35
斎藤博久、大保木啓介、梶原直樹	
3. 苦参熱抽出物の細菌感染炎症への作用に関する研究に関する研究	40
中山勝文、小笠原康悦、川野光子	
4. 天然物による細胞分化抑制を介した治療戦略に関する研究に関する研究	44
有信洋二郎、出原賢治、白石裕士	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	50

## I. 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）  
アレルギー疾患感受性遺伝子であるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体遺伝子の  
発現抑制作用を持つ天然物を用いる治療戦略

研究代表者：福井 裕行	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
研究分担者：武田 憲昭	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
研究分担者：水口 博之	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	准教授
研究分担者：柏田 良樹	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	准教授
研究分担者：根本 尚夫	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	准教授
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
研究分担者：中山 勝文	東北大学・加齢医学研究所 生体防御学	助教
研究分担者：有信 洋二郎	九州大学病院 遺伝子・細胞療法部	助教
研究協力者：大保木啓介	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 研究員
研究協力者：梶原 直樹	順天堂大学 アトピー疾患研究センター	研究員
研究協力者：小笠原 康悦	東北大学・加齢医学研究所 生体防御学	教授
研究協力者：川野 光子	東北大学・加齢医学研究所 生体防御学	博士研究員
研究協力者：出原 賢治	佐賀大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野	教授
研究協力者：白石 裕士	佐賀大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野	助教

研究要旨： ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 (H<sub>1</sub>R) 遺伝子はアレルギー疾患感受性遺伝子であり、H<sub>1</sub>R 遺伝子発現抑制薬はアレルギー疾患治療薬となりうる。H<sub>1</sub>R 刺激による H<sub>1</sub>R 遺伝子発現亢進には、PKC $\delta$  シグナルの活性化が必須であり、PKC $\delta$  シグナルは抗ヒスタミン薬、天然物由来の (-)マールキアイン ((-)MKN) により抑制された。鼻過敏症モデルラットへの抗ヒスタミン薬投与により、H<sub>1</sub>R 遺伝子発現は完全に抑制されたが、鼻過敏症症状の改善は 60%に留まった。そこで、鼻過敏症モデルラットに抗ヒスタミン薬と抗アレルギー性天然物を併用投与することにより、高度の症状改善をもたらす天然物の検索を行った。その結果、抗アレルギー性天然物 A の同定に成功した。抗アレルギー性天然物は細胞内シグナル B 抑制活性を持ち、シグナル B 下流の疾患遺伝子 C の発現を抑制した。更に、天然物 A の有効成分の同定に成功した。

天然物由来 PKC $\delta$  シグナル抑制薬として同定した(-)MKN の標的分子として、HSP90 を同定した。HSP90 抑制薬である 17AAG は H1R 遺伝子発現を抑制し、HSP90 の鼻過敏症症状における重要性を示唆した。

(-)MKN が及ぼす影響について同様の OVA を用いたマウス喘息モデルを用いて検討した。(-)MKN は抗原チャレンジの直前から抗原投与中まで毎日 50  $\mu$ g を腹腔内投与した。(-)MKN の腹腔内投与によって、BALF 中への好酸球浸潤に有意な変化は対照と比較して認められなかった。BALF 中の IL-4、IL-5、IL-6、IL-13 濃度は、いずれも弱い減少傾向を認めた。一方で、BALF 中の IP-10、TNF、TARC、IL-25 濃度レベルに変化は認められなかった。総 IgE 及び OVA 特異的 IgE の産生は(-)MKN の投与群と、CMC 投与群（対照）との間に有意差はなかった。(-)MKN は苦参抽出物の作用と同様に、マウス喘息モデルにおいて、IL-4 などのアレルギー性炎症関連サイトカインの産生を抑制し、急性喘息の病態を軽減する可能性を有することが示唆された。(-)MKN の効果を明らかにするためには用量についての検討が必要と考えられた。

苦参熱水抽出物から新規 H1R/IL-4 遺伝子発現抑制物質として単離・同定された(-)MKN の菌体成分誘発性炎症の抑制効果について *in vitro* 解析した。LPS あるいは PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> といった細菌由来成分で刺激したマクロファージは IL-6 および TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインを産生するが、(-)MKN はそのサイトカイン産生を濃度依存的に抑制した。興味深いことに LPS によるサイトカイン産生は、抗ヒスタミン薬のクロルプロマジンあるいはロラタジンによっても部分的に抑制されたが、(-)MKN と抗ヒスタミン薬を併用しても(-)MKN 単独以上の抑制効果は認められなかった。この結果は、(-)MKN は MyD88 経路の抑制だけでなく LPS で分泌誘導されたヒスタミン/H1R 経路を抑制することにより、炎症性サイトカイン産生を抑制することを示唆する。本年度の研究成果から、マーキアインは MyD88 経路および H1R 経路の阻害を介して細菌感染性炎症に抑制効果を示す可能性があることが明らかとなった。

喘息モデルマウスにおける苦参の抗アレルギー作用が、好酸球の遊走能阻止を通じて発揮されている可能性を明らかにした。また、皮膚炎モデルマウスにおいても、苦参投与による皮膚炎の改善傾向を認め（有意差なし）、様々なアレルギー性炎症（鼻炎、喘息、皮膚炎）において、苦参は抗アレルギー活性を示す可能性が示唆された。

## A. 研究目的

アレルギー疾患の更なる症状改善のために、疾患感受性遺伝子発現亢進の抑制による治療戦略が高く期待される。多くの G タンパク共役型受容体 (GPCR) の刺激が受容体発現レベルを低下させるのに反し、ヒ

スタミン H<sub>1</sub> 受容体 (H1R) の刺激がプロテインキナーゼ C- $\delta$  (PKC $\delta$ ) シグナルを活性化させ、H1R 遺伝子発現亢進を介し、H1R アップレギュレーションを引き起こすことを見いだした。この知見を発展させ、H1R 遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子であることを明らかにした。しかし、PKC $\delta$  シ

グナルの抑制により、H1R 遺伝子発現は完全に抑制されるが、鼻過敏症症状は約 60% の改善に留まった。この結果から、鼻過敏症症状に関与するシグナルとして、PKC $\delta$  シグナル以外のシグナルの存在が考えられた。本研究において、(1) 鼻過敏症症状の 60% に関与する PKC $\delta$  活性化から H1R 遺伝子発現亢進に至るシグナルの解明を行い、(2) 天然物由来 PKC $\delta$  シグナル抑制薬である(-)MKN の分子薬理機構解明を進展させた。(3) H1R 遺伝子に加えて、ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子、IL-4 遺伝子、及び、IL-5 遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子群を形成することを示唆した。(4) 鼻過敏症症状に関与し、PKC $\delta$  シグナルと合わせて症状の約 90 以外の%に関与する細胞内シグナル B、シグナル B 抑制薬を含有する天然物 A の検索を行った。

スギ花粉症患者への予防的抗ヒスタミン薬投与によって IL-5 mRNA の発現が抑制され臨床症状も緩和されるが、喘息関連遺伝子として知られる IL-33 mRNA の発現が抑制されないこと (Acta Otolaryngol. 2012 ; 132 (4) :434-8.) が示され、人間の病態におけるヒスタミン経路抑制効果の選択的性質も明らかにされている。そこで苦参抽出物の(-)MKN が急性喘息の病態に及ぼす影響についてマウス喘息モデルを用いて検討した。

苦参熱水抽出物が LPS 刺激によるマクロファージ炎症性サイトカイン産生を抑制することを見出したが、更に、(-)MKN の炎症抑制作用について検討し、さらにその抑制メカニズムについて解析を行った。

(1) 喘息モデルマウスにおける苦参による好酸球性炎症抑制のメカニズムを明ら

かにする (2) 皮膚炎モデルマウスに与える苦参の効果を検証することを目的に実験を行った。

## B. 研究方法

### 1. 臨床研究

花粉症患者ボランティアの抗ヒスタミン薬による初期療法群 8 名、非初期療法群 17 名について、くしゃみと鼻漏を鼻アレルギーガイドライン 2009 の重症度分類に従ってスコア化した。また、ボランティア鼻粘膜を採取し、H1R、HDC、IL-4、及び、IL-5 に対する mRNA を測定した(Mizuguchi H et al. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 32 (10), 745-748, 2010.)。

### 2. 鼻過敏症モデルラット

6 週齢 Brown-Norway 系雄性ラットの鼻前庭に toluene 2,4-diisocyanate (TDI) により感作した。感作ラットを TDI により過敏症発作を誘発し、症状スコアの測定と mRNA 測定用鼻粘膜サンプルを採取した (Mizuguchi H et al. *J Pharmacol Sci* 108 (4), 480-486, 2008.)。

### 3. mRNA 測定

培養細胞、鼻過敏症モデルラット鼻粘膜、及び、花粉症患者鼻粘膜サンプルに含まれる mRNA 測定は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems)を用いて cDNA 合成を行い、Fast Start Universal Probe Master を含む試薬により、Sequence Detector (GeneAmp 7300 Sequence Detection System、Applied Biosystems) を用いて real-time PCR 反応による mRNA 測定を行った(Mizuguchi H et al. *J Pharmacol Sci* 108 (4), 480-486,



2008.)。

4. PKC $\delta$ -MEK-ERK-poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP) シグナル、H1R 遺伝子発現亢進、及び、(-)MKN の分子薬理学  
PKC $\delta$ 、及び、ERK のリン酸化はサンプルを SDS-PAGE で展開し、リン酸化 PKC $\delta$  (Tyr311) 抗体、及び、リン酸化 ERK 抗体による Western-blot 法により検出した。

PKC $\delta$  の細胞内移行は、免疫組織学的方法により、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

遺伝子転写調節因子の同定は、ゲルシフトアッセイ、スーパーシフトアッセイ他により行った。

キラルカラムにより、有機合成した ( $\pm$ )MKN から (-)MKN を分離した。HeLa 細胞から抽出した蛋白質を陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーで分画後、(-)MKN の存在により蛍光をクエンチングさせる蛋白質の検索により (-)MKN の標的分子の同定を行った。

5. 実験には C57BL/6J 雄マウスを使用した。卵白アルブミン (OVA 50  $\mu$ g : 水酸化アルミニウムゲル (1:1) 溶液を 0、8 日目に腹腔内投与することで感作を行い、16、18、20 日目に 200  $\mu$ g の OVA を経鼻吸入させることで急性喘息モデルを作成した。(-)MKN は感作開始後 15 から 20 日目まで毎日 0.5  $\mu$ g/100  $\mu$ l を腹腔内投与した。21 日目に安楽死させ、血清、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織をサンプリングした。喘息モデルの指標として、血清中の IgG1 及び IgE レベル、BALF 中の炎症細胞数 (Sysmex, XT1800iv) とサイトカイン濃度 (Luminex, ELISA) を評価した。

6. マウス骨髄由来マクロファージを LPS

(10 ng/ml) で刺激し、10~60 分後の NF- $\kappa$ B および MAPK 活性化をウェスタンブロット法により、12 時間後の炎症性サイトカインを ELISA 法により各々測定した。このとき、マーキアイン、クロルプロマジン、ロラタジンを 1 時間前処理することによりこれらの阻害効果を検討した。なお、これら薬剤について、マクロファージ細胞毒性を示さない濃度 [マーキアイン (100 mM)、クロルプロマジン (2 mM)、ロラタジン (2 mM)] を使用した。

7. in vitro での骨髄球系細胞分化

マウス骨髄から、multi-color FACS を用いて顆粒球・単球系前駆細胞 (granulocyte/monocyte progenitor; GMP)、好酸球前駆細胞 (eosinophil progenitor; EoP) を、脾臓から成熟好酸球をそれぞれ単離し、20%FCS+IMDM 培養液に以下のサイトカインを添加し培養を行った (骨髄球系細胞培養条件 ; SCF, IL-3, IL-11, GM-CSF, Epo, Tpo、好酸球培養条件 ; SCF, IL-5)。細胞の評価は、May-Gimsae 染色、flowcytometer にて行った。苦参抽出物が、細胞分化や細胞表面マーカーに与える影響を検討した。

8. 皮膚炎モデルマウス

Balb/c mouse または C57BL/6 mouse の耳介をテープストリッピング後、ダニ抽出物 (10 $\mu$ g/ml, 25 $\mu$ L) を Day0, 7, 14, 21, 28 に、各耳表裏に塗布し、作成した。Day0 から Day28 までの間の隔日に、苦参熱抽出物 (300mg/kg, 6mg/mouse) を腹腔内投与し、耳の腫れを計測して評価した。

C. 研究結果

## 1. 花粉症患者鼻粘膜アレルギーシグナル関連遺伝子 mRNA の測定

花粉症患者鼻粘膜の H1R mRNA、HDC mRNA、IL-4 mRNA、IL-5 mRNA、及び、IL-33 mRNA を測定した。HDC mRNA、及び、IL-5 mRNA レベルは H1R mRNA と非常に高い相関性を示し(図 1)、鼻過敏症症状スコアとも相関した。IL-4 mRNA は測定できなかった。IL-33 mRNA は H1R mRNA、HDC mRNA、IL-5 mRNA、及び、鼻過敏症症状スコアと相関性を示さなかった。

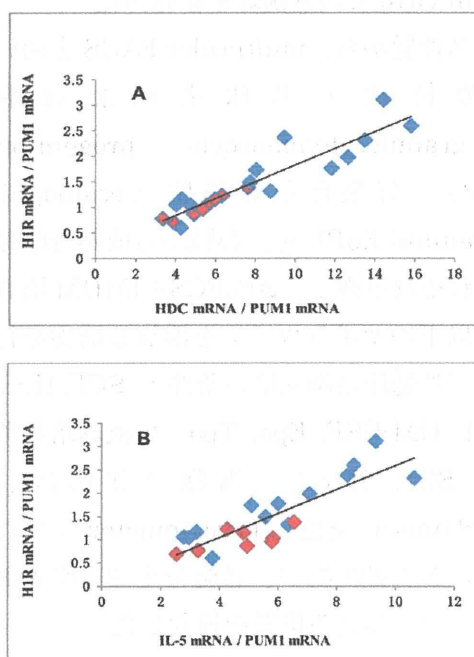


図 1. 花粉症患者鼻粘膜の H1R mRNA、HDC mRNA、及び、IL-5 mRNA レベルの相関性. A:  $r = 0.923$ ,  $p < 0.01$ , B:  $r = 0.788$ ,  $p < 0.01$ .

## 2. PKC $\delta$ 活性化シグナルによる H1R 遺伝子発現亢進機構

H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進は、PKC $\delta$  の活性化を介して引き起こされることを明らかにしている。H1R 刺激は、PKC $\delta$

と ERK のリン酸化を引き起こした。そして、MEK 阻害薬 (U0126)、及び、PARP 阻害薬 (DPQ) は H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進を抑制した。また、H1R 刺激により、PKC $\delta$  がゴルジ体に移行させること免疫組織学的に証明した。

H1R 遺伝子プロモーターのデレージョンミュータントのルシフェラーゼアッセイにより、転写調節部位が 2 か所に分かれることを見いだした。そして、PARP シグナルが上流の 2 ヶ所の AP-1 サイトと 1 ヶ所の Ets-1 サイトを介して、また、下流の Ku70/Ku85 転写調節蛋白を介して、H1R 遺伝子発現を亢進させることを明らかにした。

## 3. (-)MKN の分子薬理学

キラルカラム (Chiral Pack IC カラム, ダイセル化学工業) を用いて、有機合成した ( $\pm$ )MKN から (-)MKN を分離した。

HeLa 細胞から抽出した蛋白質溶液を陰イオン交換カラム (HiTrap Q FF, GE Healthcare) を用いる HPLC により分画し、(-)MKN の添加により蛋白質の蛍光が強ククエンチされる分画の SDS 電気泳動を行い、泳動ゲルから蛋白質を回収し、一次構造決定により蛋白質の同定を行い、(-)MKN の標的となる蛋白質の検索を行った。その結果、HSP90 が候補と考えられた。そして、(-)MKN を固定化した樹脂を作成し、(-)MKN と HSP90 の結合を証明した。

H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進は、HSP90 抑制薬、17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) により抑制された。

## 4. 鼻過敏症症状に関与する細胞内シグナルと疾患感受性遺伝子の検索

鼻過敏症モデルラットの症状は抗ヒスタミン薬投与により約 60%が改善された。そこで、鼻過敏症モデルラットに抗ヒスタミン薬と抗アレルギー性天然物抽出液の併用投与を行い、症状の高度な改善を引き起こす抗アレルギー性天然物の検索を行った。その結果、抗ヒスタミン薬と天然物 A 抽出液の併用投与により、症状の 90%が改善されることを見いだした。そこで、H1R 遺伝子、HDC 遺伝子、IL-4 遺伝子、及び、IL-5 遺伝子などの PKC $\delta$  シグナル下流の疾患感受性遺伝子以外で、天然物 A 抽出液の投与により発現亢進が抑制される遺伝子の検索を行い、遺伝子 C を同定した。次いで、培養細胞を用いて、遺伝子 C の発現亢進機構を調べ、細胞内シグナル B により調節されることを明らかにした。そして、遺伝子 C の発現亢進に対する抑制活性を指標に、天然物 A に含有される活性物質の同定に成功した。

#### 5. 喘息モデルマウスに対する(-)MKN の改善作用

感作したマウスに OVA を吸入させることによって、BALF 中への好酸球を中心とする炎症細胞の増加が認められた。血清中の総 IgE 及び OVA 特異的 IgE レベルは OVA 吸入によって増加した。総 IgG1 レベルは変化せず、OVA 特異的 IgG1 レベルは増加した。OVA 特異的 IgE の産生は(-)MKN の投与によって僅かに抑制傾向が見られたものの、PBS 投与 (対照) との間に統計的有意差はなく、総 IgE、総 IgG1 および OVA 特異的 IgG1 の産生は不変であった。

(-)MKN の腹腔内投与によって、BALF 中への好酸球浸潤の減少を認めなかった。BALF 中のサイトカインのうち、統計的有

意差はないものの、アレルギー疾患における炎症に関連するサイトカインである IL-4 (p=0.34)、IL-5 (p=0.16)、IL-6 (p=0.14)、IL-13 (p=0.20) についての減少傾向を認めた。さらに、他のサイトカイン、ケモカインについて検討したところ、統計的有意差はないものの、IL-1 $\beta$  (p=0.08)、IL-2 (p=0.20)、IL-17 (p=0.13)、RANTES/CCL5 (p=0.12) についての減少傾向を認め、KC/CXCL1 については統計的に有意な減少を認めた (p=0.04)。一方で、BALF 中の IP-10、TNF、TARC、IL-25 濃度レベルに変化は認められなかった。

#### 6. Toll-like receptor シグナルに対する (-)MKN の抑制作用

Toll-like receptor 4 (TLR4) リガンドとして知られるグラム陰性菌由来 LPS あるいは TLR1/2 リガンドとして知られるグラム陽性菌由来リポペプチド合成産物 PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> でマクロファージを刺激すると顕著な IL-6 産生が認められたが、この産生は(-)MKN によって濃度依存的に抑制された。一方、TLR3 および MDA5 リガンドとして知られるウイルス由来二本鎖 RNA 合成産物 polyI:C 刺激による IL-6 産生は(-)MKN によって抑制されなかった。これらの結果は、(-)MKN が MyD88 経路を抑制する可能性を示唆する。しかしながら LPS 刺激 30 分後に認められるマクロファージの I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解および MAPK のリン酸化に対しては (-)MKN の抑制効果が弱かったことから、別の経路にも作用することが示唆された。最近、マクロファージにおいて LPS 刺激により分泌誘導されたヒスタミンがオートクライン的に TLR4 シグナルを増強させるという報告がされていることから、(-)MKN は H1R のシグナル阻害を介して、サイトカイン産生を抑制する可能性が考えられた。この仮説を検証するために、抗ヒスタミン

薬のクロルプロマジンあるいはロラタジンと(-)MKN との併用試験を行った。その結果、LPS 刺激によるマクロファージの IL-6 産生は(-)MKN、クロルプロマジン、ロラタジン単独で各々60%、25%、30%抑制し、(-)MKN にクロルプロマジンあるいはロラタジンを併用しても 60%以上の抑制効果は認められなかった。これらの結果から、(-)MKN は MyD88 経路を阻害するだけでなく、H1R 経路を阻害することによって、ヒスタミンによる TLR4 炎症応答の増強作用を抑制することが示唆された。

さらに我々はヒトにおける(-)MKN の炎症抑制効果について検討を行った。LPS 刺激した PBMC からの TNF- $\alpha$  産生量には個人差が認められた。予試験結果ではあるが、TNF- $\alpha$  産生量の高い検体には(-)MKN の抑制作用が認められ、TNF- $\alpha$  産生量の低い検体にはその作用が認められなかった。この結果に関してはさらに検体数を増やして解析する必要がある。

#### 7. *in vitro* での骨髄球系細胞分化に対する苦参の効果

苦参は、骨髄球系細胞培養条件における GMP からの顆粒球・単球への分化、好酸球培養条件における GMP からの好酸球への分化に影響を与えなかった。一方、GMP から好酸球への分化過程にておける CCR3 の発現を、苦参は抑制した。成熟し終えた好酸球に苦参を投与しても、CCR3 の発現は抑制されないことから、苦参は好酸球への分化過程での CCR3 の発現増強を特異的に阻害する可能性が示唆された。

#### 8. 皮膚炎モデルマウスに対する苦参の効果

Balb/c mouse 耳介に対するダニ抽出物の繰り返し塗布により、局所への炎症細胞浸

潤、表皮肥厚、線維化、及び血清 IgE 値の上昇などの皮膚炎症状を認めた。苦参投与により改善傾向を認めたが、有意差を見出すことはできなかった。

#### D. 考察

花粉症患者の鼻過敏症症状スコアと鼻粘膜 H1R mRNA、HDC mRNA、及び、IL-5 mRNA の相関性を証明した。また、H1R mRNA、HDC mRNA、及び、IL-5 mRNA はそれぞれ間で、非常に高い相関性を示した。以上の結果は、H1R 遺伝子、HDC 遺伝子、及び、IL-5 遺伝子が疾患感受性遺伝子群を形成することを示唆する。花粉症患者鼻粘膜の IL-4 mRNA は測定できなかった。採取した鼻粘膜サンプルの中には IL-4 産生細胞が含まれなかった可能性が考えられる。しかし、鼻過敏症モデルラットにおいて、H1R mRNA と IL-4 mRNA は非常に高い相関性を示すことから、H1R 遺伝子、HDC 遺伝子、及び、IL-5 遺伝子に加えて、IL-4 遺伝子も同じ疾患感受性遺伝子群に属することが考えられる。一方、近年アレルギー疾患に関与することが示されている IL-33 の mRNA レベルは花粉症患者の症状スコアと相関が見られず、H1R mRNA レベルとも相関しなかった。IL-33 遺伝子発現と相関する症状は、H1R 遺伝子とはアレルギー疾患に対して異なる病理機構に属することが考えられる。

H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構において、PKC $\delta$  は H1R 刺激によりリン酸化とゴルジ体への移行が引き起こされ、MEK、ERK、PARP にシグナルが伝達され、

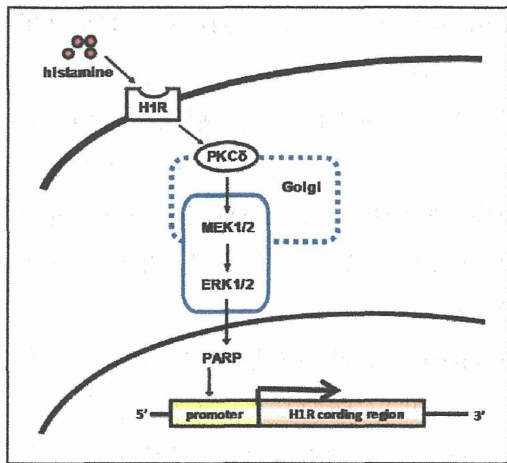


図 2. H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構

H1R 遺伝子発現を亢進させることが明らかとなった(図 2)。H1R 遺伝子プロモーターは 2ヶ所の調節部位に分かれ、PARP は両部位の活性化に関与することが示唆された。上流の領域には転写調節因子として、2ヶ所の AP-1、1ヶ所の Ets-1 が同定された。そして、下流の領域には Ku70、及び、Ku86 が同定された。

「苦参」に含有される PKCδ シグナル抑制薬、(-)MKN の標的分子として、ヒートショック蛋白-90 (HSP90) の同定に成功した。HSP90 は PKCδ と複合体を形成することが知られている。(-)MKN は HSP90 と結合することにより PKCδ と HSP90 複合体のゴルジ体への移行を阻害すると考えられる (図 3)。HSP90 の抑制薬、17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamyacin (17AAG) は、H1R 遺伝子発現亢進を抑制することから、HSP90 は鼻過敏症症状発現に重要な役割を持つことが考えられる。

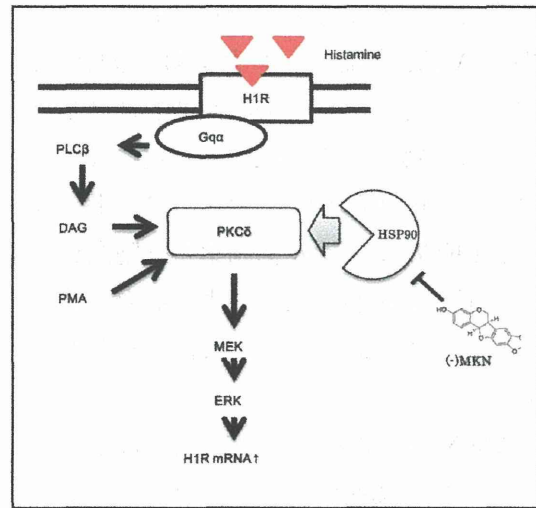


図 3. (-)MKN の分子薬理機構

鼻過敏症モデルラットの症状、及び、鼻粘膜 H1R 遺伝子発現亢進に対する「苦参」抽出液、及び、(-)MKN の抑制プロフィールは抗ヒスタミン薬による抑制プロフィールと類似した。H1R シグナルが PKCδ シグナルを介して H1R 遺伝子を含む疾患感受性遺伝子群の発現亢進を引き起こして、鼻過敏症症状を引き起こすという病理機構に対して、抗ヒスタミン薬、及び、(-)MKN の両者は作用点がシグナルの上流、或いは、下流と言う違いあるものの、同じ病理シグナル機構に対して薬効を発現していることが考えられる。

花粉症患者において、鼻粘膜 H1R mRNA レベルが低いにも関わらず症状の改善が見られないケースがあり、また、鼻過敏症モデルラットの症状スコアが H1R mRNA レベルをコントロールラットのレベルにまで低下させても症状スコアは 40%までしか低下しなかった。そこで、鼻過敏症モデルラットに抗ヒスタミン薬と併用投与することにより症状を高度に改善できる天然物の

検索を行い、天然物 A の発見に成功した。天然物 A は、細胞内シグナル B を抑制し、疾患感受性遺伝子 C の発現亢進を抑制した。更に、天然物 A の有効成分の同定に成功した（特許出願準備中）。抗ヒスタミン薬、或いは、PKC $\delta$  シグナル抑制薬と細胞内シグナル B 抑制薬の併用投与による鼻過敏症治療戦略は、本疾患を高度に改善できると考えられる。

(-)MKN が肺組織における IL-4 などアレルギー疾患に関連するサイトカインおよびケモカインの産生を抑制する傾向にあるという本年度の研究成果は、福井らが報告したアレルギー性鼻炎ラットモデルの結果および昨年度の本分担研究結果と一致する。また、(-)MKN の投与によって IL-4 のみならず、多くのアレルギー疾患の炎症に関連するサイトカイン、ケモカインが減少傾向にあることから、2 型ヘルパー T 細胞の分化や機能の抑制だけではなく、気道構成細胞やマクロファージなどにも (-)MKN は作用しうると考えられる。しかしながら、本年度得られた (-)MKN の効果は苦参抽出物と比べて限定的である。この原因の一つに用量の不足が考えられる。有機合成 (-)MKN を用いた、高用量での効果について検討することで、引き続き天然物由来成分が急性喘息の病態にどのような影響を及ぼすのかについて検討する予定である。

(-)MKN が TLR 刺激したマウス骨髄由来マクロファージからの IL-6 および TNF- $\alpha$  産生を抑制することが明らかとなった。この抑制機構の一部は、本研究班代表者（福井）らによって見出された H1R シグナル抑制作用に依存することが判明した。ヒトにおいては、LPS 刺激した PBMC からの

TNF- $\alpha$  産生量ならびに (-)MKN の抑制効果について個人差が認められたが、これはヒスタミン産生量の個人差に起因するかも知れない。今後、菌体成分誘導性ヒスタミンの炎症増強作用および (-)MKN の炎症抑制作用の関連についてより詳細に解析する予定である。

*in vitro* 骨髄球系細胞分化に対する苦参の効果について検討した。苦参の投与により、GMP から成熟好酸球への分化過程における CCR3 発現が特異的に抑制された。喘息モデルマウスにおける抗炎症作用は、末梢の炎症局所への好酸球の遊走阻止により発揮されている可能性が示唆された。

皮膚炎モデルマウスに対する苦参の効果。ダニ抽出物誘導性皮膚炎モデルマウスにおいて、今回の条件では、苦参投与による有意差を持った効果は見られなかったが改善傾向は認められた。今後、苦参の投与量や投与方法の変更により、現状より大きな抗アレルギー効果を発揮するかについての検討が必要である。

## E. 結論

鼻過敏症症状に関与する主要シグナルは H1R-PKC $\delta$ -HSP90-ERK-PARP-疾患感受性遺伝子発現亢進に至るシグナルであることが明らかとなった。H1R 遺伝子に加えて、HDC、IL-4、及び、IL-5 の遺伝子が疾患感受性遺伝子群を形成することが示唆された。そして、このシグナルに対して、抗ヒスタミン薬は H1R を標的として、また、(-)MKN は HSP90 を標的として、薬効を発現することが示唆された。しかし、この主要シグナルの抑制では、鼻過敏症の症状を

完全に抑制することは出来ないことが明らかとなった。鼻過敏症症状は、PKC $\delta$  シグナル下流の疾患感受性遺伝子発現亢進に加えて、第2の細胞内シグナルとその下流の疾患感受性遺伝子を明らかにすることに成功した。

(-)MKN は苦参抽出物の作用と同様に、マウス喘息モデルにおいて、IL-4 などのアレルギー性炎症関連サイトカインや KC/CXCL1 などのケモカインの産生を抑制し、急性喘息の病態を軽減する可能性を有することが示唆された。

苦参由来生理活性物質(-)MKN は LPS 刺激のマクロファージによる炎症性サイトカイン産生を抑制するが、そのメカニズムの一部として、H1R 経路の阻害によることが明らかとなった。

苦参は、分化過程における好酸球上への CCR3 発現を抑制した。また、ダニ抽出物誘導性皮膚炎の炎症も改善する可能性が示唆された。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

論文

1) Dev S, Mizuguchi H, Das AK, Baba Y, Fukui H. Proteomic Microarray analysis reveals suppression of histamine signaling by *Kujin* alleviates allergic symptoms by inhibition of NF- $\kappa$ B activation through down-regulation of

FAT10 mRNA expression. *Int Immunopharmacol* **11** (10), 1504-1509, 2011.

2) Mizuguchi H, Terao T, Kitai M, Ikeda M, Yoshimura Y, Das AK, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Involvement of PKC $\delta$ /ERK/Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) signaling pathway in histamine-induced up-regulation of histamine H<sub>1</sub> receptor gene expression in HeLa cells. *J Biol Chem* **286** (35), 30542-30551, 2011.

3) Nurul IM, Mizuguchi H, Shahriar M, Venkatesh P, Maeyama K, Mukherjee PK, Hattori M, Choudhuri MS, Takeda N, Fukui H. *Albizia lebbek* suppresses histamine signaling by the inhibition of histamine H<sub>1</sub> receptor and histidine decarboxylase gene transcriptions. *Int Immunopharmacol* **11** (11), 1766-1772, 2011.

4) Mizuguchi H, Ono S, Hattori M, Fukui H. Inverse agonistic activity of antihistamines and suppression of histamine H<sub>1</sub> receptor gene expression. *J Pharmacol Sci* **118** (1), 117-121, 2012.

5) Kitamura Y, Mizuguchi H, Ogishi H, Kuroda W, Hattori M, Fukui H, Takeda N. Pre-seasonal prophylactic treatment with antihistamines suppresses IL-5, but not IL-33 mRNA expression in the nasal mucosa of patients with seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen. *Acta Otolaryngol*, **132**(4), 434-438, 2012.

6) Sarkar L, Bhuvaneshwari N, Samanta SK, Islam NM, Sen T, Fukui H,

- Mizuguchi H, Karmakar S. A report on anti-oedemogenic activity of Byttneria herbacea roots - possible involvement of histamine receptor (Type I). *J Ethnopharmacol* **140**(2), 443-446, 2012.
- 7) Matsuda A, Morita H, Unno H, Saito H, Matsumoto K, Hirao Y, Munechika K, Abe J. Anti-inflammatory effects of high-dose IgG on TNF- $\alpha$ -activated human coronary artery endothelial cells. *Eur J Immunol*, 2012 [Epub ahead of print]
- 8) Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, Matsumoto K, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C. Omalizumab inhibits acceleration of Fc $\epsilon$ RI-mediated responsiveness of immature human mast cells by immunoglobulin E. *Ann Allergy Asthma Immunol* **108**(3), 188-94, 2012.
- 9) 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.
- 10) 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, Yamashita F, Asada T, 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..
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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* **6**(4), e18404, 2011.
- 15) 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.
- 16) 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
- 17) Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwarana N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae S. ST2 Requires Th2-, but Not Th17-, Type Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen-Sensitized Mice. *Allergol Int*, 2012. [Epub ahead of print]
- 18) 大保木啓介、松本健治、斎藤博久. 疾患オミックス研究. 日本耳鼻咽喉科学会会報 **114**(2), 51-59, 2011.
- 19) 大保木啓介、松本健治、斎藤博久. 多層的疾患オミックス研究. 医療 **65**(3), 135-145, 2011.
- 20) 大保木啓介、岡田直子、小島令嗣、松本健治、斎藤博久. 喘息表現型の多様性／病態・治療 — 小児. *Allergy From the Nose to the Lung* **9**(3), 9-14, 2011.
- 21) Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 18360-18365, 2011.
- 22) Kojima Y, Nakayama M, Nishina T, Nakano H, Koyanagi M, Takeda K, Okumura K, Yagita H. Importin  $\alpha$ 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**, 43383-43393, 2011.
- 23) Takeda K, Nakayama M, Sakaki M, Hayakawa Y, Imawari M, Ogasawara K, Okumura K, Smyth MJ. IFN- $\gamma$  production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *J Leukoc Biol* **90**, 777-785, 2011.
- 24) Sugita K, Kabashima K, Sawada Y, Haruyama S, Yoshioka M, Mori T, Kobayashi M, Ogasawara K, Tokura Y. Blocking of CTLA-4 on lymphocytes improves the sensitivity of lymphocyte transformation test in a patient with nickel allergy. *Eur J Dermatol*, In press
- 25) Matsutani T, Fujii Y, Kitaura K, Suzuki S, Tsuruta Y, Takasaki T, Ogasawara K, Nishimoto N, Kurane I, Suzuki R. Increased positive selection pressure within the complementarily determining regions of the T-cell receptor b gene in New World monkeys. *Am J Primatol* **73**, 1082-1092, 2011.
- 26) Matsumoto K, Nishiya T, Maekawa S, Horinouchi T, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S. The ECS(SPSB) E3 ubiquitin ligase is the master regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase

- Biochem Biophys Res Commun* **409**, 46-51, 2011.
- 27) Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Horinouchi T, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S. Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. *J Biol Chem* **286**, 9009-9019, 2011.
- 28) Yamamoto T, Horiuchi T, Miyahara H, Yoshizawa S, Maehara J, Shono E, Takamura K, Machida H, Tsujioka K, Kaneko T, Uemura N, Suzawa K, Inagaki N, Umegaki N, Kasamatsu Y, Hara A, Arinobu Y, Inoue Y, Niuro H, Kashiwagai Y, Harashima SI, Tahira T, Tsukamoto H, Akashi K. Hereditary angioedema in Japan: genetic analysis of 13 unrelated cases. *Am J Medical Sci* **343**, 210-214, 2012.
- 29) Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, Akashi K. CIN85 is required for Cbi-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. *Blood* **119**, 2263- 3372, 2012.
- 30) 有信 洋二郎、新納 宏昭、堀内 孝彦. Aicardi-Goutieres syndrome(AGS)の遺伝子異常とその phenotype-SLE の病因にせまれるか?・リウマチ科, Vol.45 No.4, 416- 421, 2011.
- 31) 有信 洋二郎、赤司 浩一. 造血幹細胞からの骨髓球系細胞の分化. アレルギー, Vol.60 No.7, 817- 822, 2011.
- 32) Fujimoto K, Kawaguchi T, Nakashima O, Ono J, Ohta S, Kawaguchi A, Tonan T, Ohshima K, Yano H, Hayabuchi N, Izuhara K, Sata M. Periostin, a matrix protein, has potential as a novel serodiagnostic marker for cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* **25**, 1211-1216, 2011.
- 33) Okamoto M, Hoshino T, Kitasato Y, Sakazaki Y, Kawayama T, Fujimoto K, Ohshima K, Shiraishi H, Uchida M, Ono J, Ohta S, Kato S, Izuhara K, Aizawa H. Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* **37**, 1119-1127, 2011.
- 34) Yoshida S, Ishikawa K, Asato R, Arima M, Sassa Y, Yoshida A, Yoshikawa H, Narukawa K, Obika S, Ono J, Ohta S, Izuhara K, Kono T, Ishibashi T. Increased expression of periostin in vitreous and fibrovascular membranes obtained from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 5670-5678, 2011.
- 35) Taniguchi K, Yamamoto S, Aoki S, Izuhara K, Hamasaki Y. Epigen is induced during the interleukin-13-stimulated cell proliferation in murine primary airway epithelial cells. *Exp Lung Res* **37**, 461-470, 2011.
- 36) Nofziger C, Dossena S, Suzuki S, Izuhara K, Paulmichl M. Pendrin function in airway epithelia. *Cell*

- Physiology and Biochemistry* 28, 571-578, 2011.
- 37) Ohta S, Shibata R, Nakao Y, Azuma Y, Taniguchi K, Arima K, Suzuki S, Shiraishi H, Iwasaka T, Izuhara K. The usefulness of combined measurements of squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in diagnosing atopic dermatitis. *Ann Clin Biochem* 49, 277-284, 2012.
- 38) Uchida M, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Taniguchi K, Suzuki S, Okamoto M, Ahlfeld SK, Ohshima K, Kato S, Toda S, Sagara H, Aizawa H, Hoshino T, Conway SJ, Hayashi S, Izuhara K. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46, 677-686, 2012.
- 39) Ohtsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H, Serada S, Ohta S, Tanemura A, Yang L, Fujimoto M, Arima K, Suzuki S, Murota H, Toda S, Kudo A, Conway SJ, Narisawa Y, Katayama I, Izuhara K, Naka T. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 21, 331-336, 2012.
- 40) Ohta N, Kurakami K, Ishida A, Furukawa T, Saito F, Kakehata S, Izuhara K. Clinical and pathological characteristics of IgG4-related sclerosing sialadenitis. *The Laryngoscope* 122, 572-577, 2012.
- 41) Nishizawa H, Matsubara A, Nakagawa T, Ohta N, Izuhara K, Shinkawa H. The role of periostin in eosinophilic otitis media. *Acata Oto-Laryngologica*, in press.
- 42) Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Aoki S, Toda S, Inagaki N, Kurihara Y, Hayashida S, Takeuchi S, Koike K, Ono J, Noshiro H, Furue M, Conway SJ, Narisawa Y, Izuhara K. Periostin, a downstream molecule of Th2 cytokines, leads to chronicity of allergic inflammation. *J Clin Invest*, in press.
- 43) Shiraishi H, Masuoka M, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Taniguchi K, Aoki S, Toda S, Yoshimoto T, Inagaki N, Conway SJ, Narisawa Y, Izuhara K. Periostin contributes to the pathogenesis of atopic dermatitis by inducing TSLP production from keratinocytes. *Allergology Int*, in press.
- 44) 増岡美穂、出原賢治. アトピー性皮膚炎「アトピー性皮膚炎のモデルマウス」. アレルギー・免疫 18, 332-339, 2011.
- 45) 出原賢治、太田昭一郎、白石裕士、有馬和彦、鈴木章一. 間質性肺炎の血清マーカーとしてのペリオスチン. 検査と技術 40, 157-160, 2012.
- 46) 出原賢治、有馬和彦、鈴木章一、白石裕士、太田昭一郎. 気管支喘息におけるサイトカイン研究の最近の話題. 呼吸と循環 60, 179-187, 2012.
- 47) 出原賢治、有馬和彦、白石裕士、鈴木章一、太田昭一郎. ペリオスチンによる気管支喘息の病態形成機序. 臨床免疫・アレルギー科 57, 104-110, 2012.
- 48) 出原賢治. IFCC 教育委員会活動報告—我ら国境なき臨床化学者たち—. 臨床化学

41, 101-103, 2012.

## 書籍

1) 20. Fukui H, Mizuguchi H. Chapter 12, Histamine H<sub>1</sub> Receptor Gene Expression Mechanism as a Novel Therapeutic Target of Allergy. In, Biomedical aspects of histamine; new perspectives. Eds., Shahid M, Khardri N, Khan RA, Tripathi T. Springer, 2010.

2) 水口博之、北村嘉章、近藤勇人、黒田若奈、吉田陽香、宮本裕子、服部将史、武田憲昭、福井裕行. ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体遺伝子発現機構のアレルギー疾患における病理学的意義. YAKUGAKU ZASSHI 131 (2), 171-178, 2011.

3) 川野光子、小笠原康悦. 金属アレルギーの免疫学 Up-to-date Visual Dermatology 2011 年 11 月号 学研メディカル秀潤社

4) Izuhara K, Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S. Interleukin 4, interleukin 13, and interleukin 9. (Inflammation and allergy drug design) Wiley-Blackwell: 175-185, 2011.

5) Izuhara K, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Suzuki S. The roles of Th2-type cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. (Atopic Dermatitis - Disease Etiology and Clinical Management) InTech: 39-50, 2012.

## 2. 学会発表

1) 水口博之、福井裕行. PKC $\alpha$  as a target molecule of natural resources-derived anti-allergic compounds that suppress up-regulation of allergic diseases

sensitive gene expression. シンポジウム「難治性疾患におけるプロテインキナーゼ C サブタイプの治療薬標的分子としての意義」、第 84 回日本薬理学会年会 (パシフィコ横浜、横浜市), 2011.

2) 水口博之、寺尾拓馬、坂本典子、吉村好之、山脇洋輔、藤本勝巳、福井裕行. Ku86 represses PMA-induced up-regulation of histamine H<sub>1</sub> receptor gene expression in HeLa cells. 第 84 回日本薬理学会年会 (パシフィコ横浜、横浜市), 2011.

3) 福井裕行. 抗ヒスタミン薬のアレルギー疾患感受性遺伝子発現抑制作用. ランチョンセミナー. 日本薬学会第 131 年会 (静岡県立大学、静岡県コンベンションアーツセンター「グランシップ」、ツインメッセ静岡、静岡市), 2011.

4) 成相祐希、水口博之、金山知代、加藤周平、柏田良樹、根本尚夫、高石喜久、武田憲昭、福井裕行. 苦参から見出された新規抗アレルギー成分 maackiain の単離・同定およびその性質について (Isolation and characterization of new anti-allergenic compound, maackiain from Kujin). 日本薬学会第 131 年会 (静岡県立大学、静岡県コンベンションアーツセンター「グランシップ」、ツインメッセ静岡、静岡市), 2011.

5) 成相祐希、水口博之、金山知代、加藤周平、永井浩章、柏田良樹、根本尚夫、高石喜久、武田憲昭、福井裕行. 苦参から見出された新規抗アレルギー成分 maackiain の単離・同定およびその性質について. 第 15 回活性アミンに関するワークショップ (徳島文理大学、徳島市), 2011.

6) 福井裕行、金山知代、加藤周平、成相祐希、馬場祐子、水口博之、柏田良樹、根本