

気管支喘息およびアレルギー性鼻炎における  
過敏性亢進発症機序に関する比較解析

西村 友枝

東京薬科大学博士学位論文

## 略語一覧

本学位論文で使用した略語を以下に示す。

Ig; Immunoglobulin  
BAL; Bronchoalveolar lavage  
BALF; Bronchoalveolar lavage fluid  
BHR; Bronchoalveolar hyperresponsiveness  
BSA; Bovine serum albumin  
DMEM; Dalbecco's modified eagle medium  
ELISA; Enzyme linked immune solvent assay  
EPO; Eosinophil peroxidase  
FBS; Fetal bovine serum  
GAPDH; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
GM-CSF; Granulocyte macrophage colony stimulating factor  
HV; High volume  
IFN; Interferon  
IL; Interleukin  
IN; Intranasal  
IT; Intratracheal  
LV; Low volume  
Mfsd10; Major facilitator super family domain containing 10  
NALF; Nasal lavage fluid  
NALT; Nasal associated lymphoid tissue  
N.D.; Not detectable  
NHR; Nasal hyperresponsiveness  
OVA; Ovalbumin  
PBS; Phosphate-buffered saline  
PBST; Phosphate-buffered saline with tween 20  
Tg; Transgenic  
TGF; Transforming growth factor  
WT; Wild type

# 目次

頁

|  |    |
|--|----|
| 背景   | 4  |
| 第一章 気管支喘息またはアレルギー性鼻炎を選択的に惹起するマウスモデルの構築             |    |
| 目的   | 6  |
| 材料と方法  | 7  |
| 結果   | 9  |
| 考察   | 14 |
| 第二章 気管支喘息における好酸球浸潤および BHR 亢進発症に対する抗 Mfsd10 抗体の抑制効果 |    |
| 目的   | 15 |
| 材料と方法  | 16 |
| 結果   | 18 |
| 考察   | 25 |
| 第三章 アレルギー性鼻炎における NHR 亢進発症に対する CD4 陽性 T 細胞の関与       |    |
| 目的   | 27 |
| 材料と方法  | 29 |
| 結果   | 32 |
| 考察   | 47 |

総括 . . . . . 49

謝辞 . . . . . 52

論文目録 . . . . . 53

引用文献 . . . . . 54

## 背景

アレルギー疾患とは「免疫反応に基づく生体に対する全身的または局所的な障害」と定義され、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎およびアトピー性皮膚炎など、全身にわたって発症し極めて多種多様な症状を呈する疾患群である。とりわけ、気管支喘息およびアレルギー性鼻炎は本邦でも有症率の高い疾患であり、厚生労働省の平成23年発表の報告によると、気管支喘息有症率は全体の5.4%、アレルギー性鼻炎では47.2%と高頻度で発症する。喘息は本邦においても未だに年間1000名程度の患者が死亡する疾患であり、国民病とも言われるスギ花粉症はその発症に伴う経済的損失が日本全体で1兆円に及ぶとの試算もあることから、これらの疾患の発症機序の解明と有効な治療法の開発が急務となっている。

気管支喘息およびアレルギー性鼻炎患者の中でも、より病態が進行した患者においては抗原非特異的な刺激にも反応するようになる「過敏性亢進」が発症している。それにより気管支喘息では気道狭窄など、アレルギー性鼻炎ではくしゃみ反応などが、塵や気温変化といった抗原非特異的な刺激にも対しても誘発されるようになるため、症状の起こる回数は劇的に増加し病態が重症化するとされる[1-3]。その発症機序は以下のように考えられている。気管支喘息患者の特異抗原はハウスダストやダニ、アレルギー性鼻炎患者ではスギ、ヒノキ、ブタクサ、シラカバなどの花粉やハウスダストであることが多くこれらの抗原を吸引することによりアレルギー反応を引き起こす。反復した抗原吸引により、抗原特異的 IgE 抗体などが産生され、T細胞が抗原特異的に反応するようになる抗原感作が起こる。感作された状態でさらに抗原を吸引すると、抗原特異的 IgE 抗体と結合したマスト細胞や好塩基球が脱顆粒して種々のケミカルメディエーターが遊離し、それらに反応して平滑筋収縮、血管透過性亢進、腺分泌亢進をきたす。その結果、気管支喘息患者では気道狭窄による呼吸困難など、アレルギー性鼻炎患者では鼻汁分泌やくしゃみ反応などが引き起こされる。一方、抗原を介した抗原提示細胞とTh2細胞との作用によりIL-4、IL-5 およびIL-13といったサイトカインなどが放出される。近年ではIFN- $\gamma$ を強く産生するTh1細胞やIL-17Aを強く産生するTh17細胞のアレルギー病態への関与も報告されている。これらT細胞などの放出するサイトカインなどに反応して好中球や好酸球といった炎症細胞が浸潤し、強い細胞傷害性を持つ塩基性タンパク質や活性酸素などを放出して炎症を起こす。以上の反応が繰り返されることにより、気管支喘息ではBHR亢進が、アレルギー性鼻炎ではNHR亢進がそれぞれ発症すると考えられている[1-3]。

これまでに過敏性亢進発症に直接的に影響する細胞や因子の解析は気管支喘息での研究が先行しており、好酸球および好酸球活性化サイトカイ

ン IL-5 [4-6]、T 細胞 [7, 8] および活性化 T 細胞の産生する IL-13 [9, 10] などの関与が示唆されている。一方、アレルギー性鼻炎では薬理的解析からステロイド系抗炎症薬 [11, 12] の治療効果が報告されたことから T 細胞の関与の可能性が間接的に示唆されるが、より直接的な手法によって検討した報告はほとんどない。その結果、いずれの疾患においても重症化に直結する過敏性亢進の発症機序の詳細はおろか責任細胞すら明らかにされていない。

BHR 亢進および NHR 亢進の発症機序の解析を困難にしている原因の一つに、互いの疾患の関連性の高さが考えられる。日本アレルギー学会発行「アレルギー疾患 診断・治療ガイドライン 2010」によると、我が国の気管支喘息患者でアレルギー性鼻炎を併発する頻度は成人で約 47.2 % 程度、アレルギー性鼻炎で気管支喘息を併発する頻度は約 25 % 程度と非常に高い割合となっている。さらに、アレルギー性鼻炎は気管支喘息のリスクファクターとしても認識されていることからこれらの疾患の強い関連性が示唆されている。その原因として二種類の疾患は発症機序に類似点が多く、加えて発症部位が解剖学的に連続した構造であるため、一方の疾患で起きた炎症が他方の疾患に比較的容易に影響を及ぼしあうと考えられてきた [13]。本来、疾患の病態形成機序の性格な解析は他の疾患が影響しない状態で行うことが必須である。しかしながら、臨床においては上述の通り合併率が非常に高く、動物を使った研究においては合併の有無にまで検証を行ったモデルが利用されてこなかった。

そこで本研究では、第一章で気管支喘息またはアレルギー性鼻炎を選択的に惹起する新規マウスモデルを構築した。そのモデルを利用し、第二章では気管支喘息における BHR 亢進発症に対する好酸球の影響について検討した。続く第三章ではアレルギー性鼻炎における NHR 亢進発症に影響を与える因子の解析を行った。本研究は目的の疾患を選択的に惹起したモデルを用いて病態の解析を行うため、従来 of 併発の有無が検証されていない状態の解析と比較してより正確な解析結果を得られる可能性が高い。加えて、BHR 亢進および NHR 亢進の発症機序を一連の研究にて解析した報告はほぼ前例がなく、二種類の疾患の病態形成機序を比較することにより新たな知見を付与し、新規治療法の開発に大きく貢献する可能性が考えられる。

## 第一章 気管支喘息またはアレルギー性鼻炎を選択的に惹起するマウスモデルの構築

### 目的

気管支喘息とアレルギー性鼻炎はいずれも気道上で発症するアレルギー性呼吸器疾患である。厚生労働省の報告によると、我が国の気管支喘息患者でアレルギー性鼻炎を併発する頻度は成人で約 48 % 程度、アレルギー性鼻炎で気管支喘息を併発する頻度は約 25 % 程度と非常に高い割合となっている。またアレルギー性鼻炎は気管支喘息におけるリスクファクターとして認識されている。これら二種類の疾患が深く関連する理由としては複数の仮説があるが、一般的には、発症機序に類似点が多いことに加え、鼻腔と下気道が解剖学的に連続した構造であることが挙げられる[13]。そのため、一方の疾患で起きた炎症が他方の疾患に比較的容易に影響を与えると考えられている。

しかし、発症機序を詳細に解析するためには、他方の疾患の影響なく、目的の疾患のみを選択的に惹起させることが必須となる。これまでに構築された気管支喘息を模したマウスモデルは、全身抗原感作後、麻酔下で大量の抗原溶液を鼻腔から注入し、誤飲によって下気道に到達させるものが多い[14, 15]。しかしながら、鼻腔を介した抗原投与方法ではアレルギー性鼻炎を併発する可能性が考えられるにも関わらず、その点を考慮した研究はほとんど見られない。また、アレルギー性鼻炎の研究においてはごく一部で気管支喘息の併発の有無を検証した報告もあるが、特定の領域での研究に限定されている[16]。

そこで第一章では、従来モデルを詳細に解析しその病態を評価した。さらに第二章および第三章にて気管支喘息およびアレルギー性鼻炎で発症する過敏性亢進について比較検討するため、これらの疾患を選択的に惹起しうる新規マウスモデルの構築に取り組んだ。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

6週齢の雌 Balb/c マウスは日本 SLC (Shizuoka, Japan)より購入した。すべての動物実験は東京都医学総合研究所の動物実験指針に従って行われた。

### 2. 全身抗原感作および抗原投与

実験スケジュールを Fig 1 に示す。具体的には、全身抗原感作は 20  $\mu$ g OVA (Sigma-Aldrich, MO, USA)、2.25 mg alum (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を 200  $\mu$ L 生理食塩水に懸濁し、マウスに腹腔内投与した。これを Day 0, 7, 14 および 21 に各日 1 回ずつ行った。抗原投与は下記のいずれかの方法により行い、ネガティブコントロールは生理食塩水を投与した。

#### 高容量点鼻投与(High-volume/intranasal (IN/HV))

5 % イソフルランでマウスを麻酔し、15 mg/mL OVA を 25  $\mu$ L 点鼻投与した。これを Day 35 から 38 まで、各日 1 回ずつ行った。

#### 低容量点鼻投与(Low-volume/intranasal (IN/LV))

マウスに無麻酔下で、15 mg/mL OVA を 5  $\mu$ L ずつ 4 回点鼻投与した。これを Day 35 から 38 まで、各日 1 回ずつ行った。

#### 下気道投与 (Intratracheal (IT))

5 % イソフルランでマウスを麻酔し、マイクロスプレーヤー (Penn-Century, Inc, PA, USA) を用いて 15 mg/mL OVA を 25  $\mu$ L、下気道に直接噴霧した。これを Day 35 から 37 まで、各日 1 回ずつ行った。

### 3. 血清採取

Day 0 および 28 にマウスの頬を 23G シリンジ(Terumo, Tokyo, Japan) で 2mm 程度刺して出血させ、ヘパリンをあらかじめ分注した 1.5 ml チューブに末梢血を回収した。遠心分離により上清を回収し血清を得た。

### 4. 血清中 OVA 特異的 IgE、total IgG および IgG サブクラスの検出

OVA 特異的 IgE、total IgG および IgG サブクラスの検出は ELISA 法にて行った。具体的には以下の方法で行った。96well プレート(Thermo Fisher Scientific) に 10  $\mu$ g/mL OVA を 50  $\mu$ L/well ずつ添加し、37 度で 2 時間インキュベートした。次いで PBST で 200 $\mu$ L/well ずつ 3 回洗浄後、PBST で 4 倍希釈したブロックエース(雪印メグミルク、Hokkaido, Japan) を 200 $\mu$ L/well ずつ添加し 4 度で一晩ブロッキングした。PBST で 3 回洗浄後、Can Get Solution 1 (TOYOBO, Osaka, Japan) で希釈した血清



(IgE 検出; 10 倍、IgG 検出; 500 倍、IgG サブクラス検出; 100 倍) を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ添加し 37 度で 2 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄後、Can Get Solution 2 (TOYOBO) で 4000 倍希釈した HRP 標識 ヤギ抗マウス IgE 抗体、IgG 抗体、IgG<sub>1</sub> 抗体、IgG<sub>2a</sub> 抗体、IgG<sub>2b</sub> 抗体および IgG 抗<sub>3</sub> 抗体 (Southern Biotech, AL, USA) を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ添加した。37 度で 2 時間インキュベートした後 PBST で洗浄し、テトラメチルベンジジン溶液を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ添加して暗所で発色させた。2N 硫酸を 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  ずつ添加して発色反応を停止させ、450nm の吸光度を測定した。

## 5. くしゃみ反応の計測

最終抗原投与直後から 5 分間、くしゃみ回数を計測した。

## 6. BALF および NALF の回収と細胞数の算出

最終抗原投与から 6 時間後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させて気道切開した。BALF はサーフローフラッシュを下気道に向けて挿入し、0.5 mL PBS を注入して直後に回収することを 3 回反復した。NALF は切開した箇所から鼻に向かって 200  $\mu\text{L}$  PBS を注入し、鼻腔から回収した。得られた BALF および NALF を 5000 rpm、4 度で 5 分間遠心して上清を除き BALF 中および NALF 中に含まれる細胞を単離した。細胞数を多項目自動血球計数装置 (pocH-100iV Diff; Sysmex, Shizuoka, Japan) により計測した後、サイトスピン (Thermo Fisher Scientific) に供して細胞標本を作製し Diff-Quick (Sysmex) にて染色した (Fig 2)。細胞標本を顕微鏡下で観察してリンパ球、好酸球、好中球およびマクロファージを計 200 個カウントした。それぞれの細胞分画の比率を算出し、これを細胞数に乗じることで各細胞分画の細胞数を算出した。

## 7. 下気道過敏性試験

最終抗原投与 72 時間後、ペントバルビタール麻酔したマウスの下気道に 19G カニューレを挿管して小動物用ベンチレーター (FlexiVent; SCIREQ, QC, Canada) と接続し、メサコリン刺激により誘発された非特異的下気道過敏性 (BHR) の亢進レベルを解析した。

## 8. 統計解析

得られた値は各群の平均値  $\pm$  標準誤差として示した。有意差検定は統計解析ソフト Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, CA, USA) で解析した。解析方法は t 検定を使用し、p 値が 0.05 未満を統計学的に有意であると示した。

## 結果

### 1. 血清中 OVA 特異的 IgE、total IgG および IgG サブクラスの評価

OVA で全身抗原感作したマウス血清中の OVA 特異的 IgE、total IgG および IgG サブクラスを ELISA 法により検出した。OVA 特異的 IgE レベルは全身抗原感作したマウスで naive マウスに比べて有意に高かった。OVA 特異的 total IgG および IgG サブクラスに関しては、全身抗原感作したマウスでのみ高いレベルとなり、naive マウスでは検出限界以下であった(Fig. 3)。以上より OVA/alum 腹腔内投与により OVA 全身抗原感作がなされたことが示された。

### 2. 好中球および好酸球数の評価

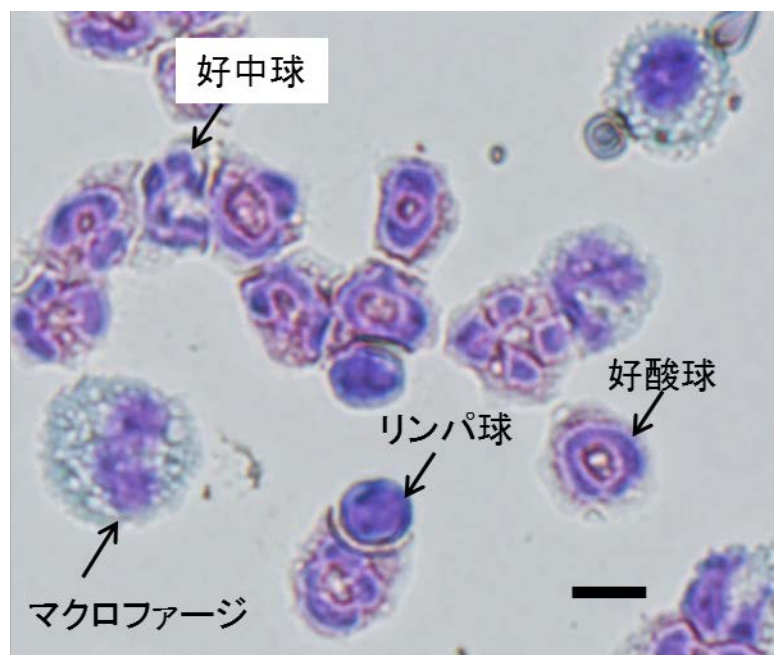
OVA で全身感作した Balb/c マウスに IN/HV 投与、IN/LV 投与および IT 投与により OVA を投与し炎症反応を比較した。IN/HV 投与では抗原投与により BALF 中好中球数がコントロールに比べ有意に増加し、BALF 中好酸球数、NALF 中好中球数および好酸球数のいずれも増加傾向にあった。IN/LV 投与では抗原投与により NALF 中好酸球数および好中球数がコントロールに比べ有意に増加したが、BALF 中からはこれらの細胞はほとんど検出されなかった。IT 投与では抗原投与により BALF 中好酸球数がコントロールに比べ有意に増加し好中球数も増加傾向にあったが、NALF 中からはこれらの細胞はほとんど検出されなかった(Fig.4 A, B)。

### 3. 鼻症状の評価

最終抗原投与直後、アレルギー性鼻炎特有の症状である抗原特異的くしゃみ反応回数を計測した。IN/HV 投与では抗原投与マウスに加え、コントロールマウスでもくしゃみ反応が誘発されたが、IN/LV 投与では抗原投与したマウスでのみくしゃみ反応が強く誘発された。IT 投与ではくしゃみ反応はほぼ誘発されなかった(Fig. 4C)。

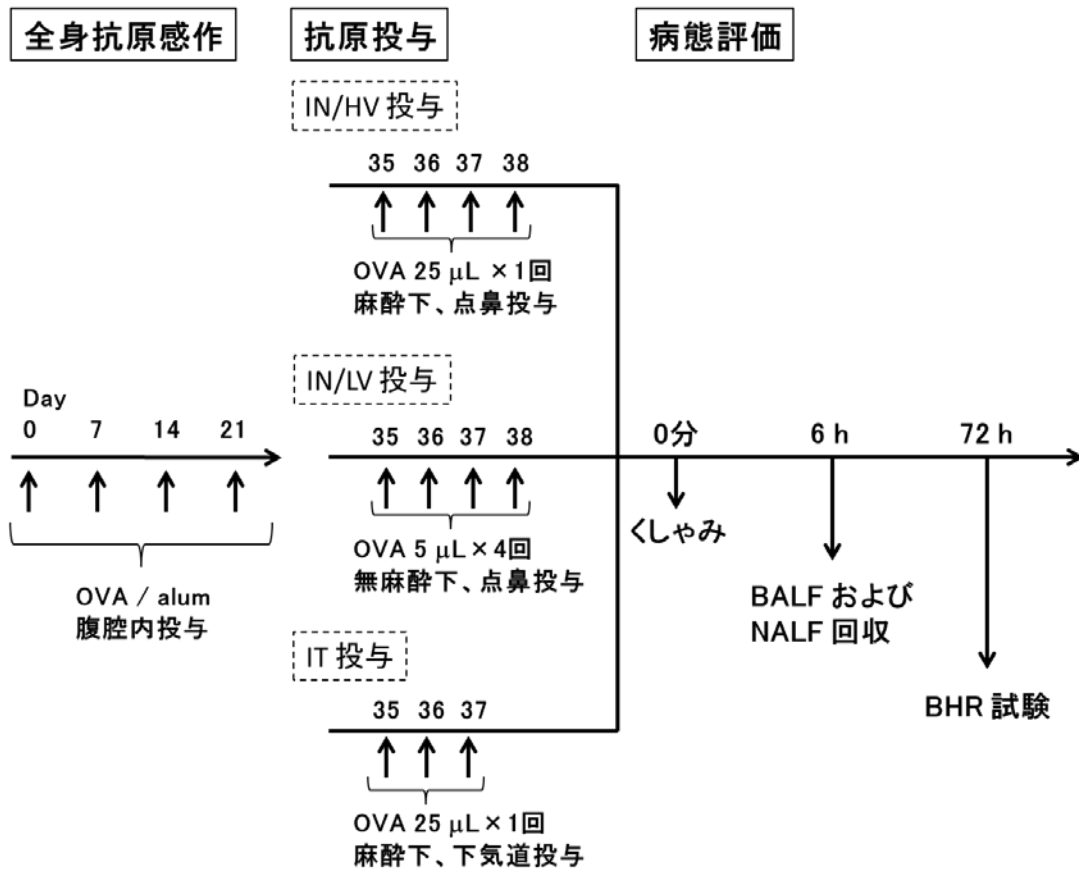
### 4. BHR 亢進の評価

最終抗原投与 72 時間後に、気管支喘息特有の症状である BHR 亢進について評価した。IN/HV 投与では抗原投与マウスでやや弱い NHR 亢進が見られた。IN/LV 投与ではいずれのマウスでも BHR は亢進していなかった。IT 投与では抗原投与したマウスでのみメサコリン濃度依存的な反応が誘発され、コントロールマウスと比べて有意に BHR が亢進していた(Fig. 4D)。



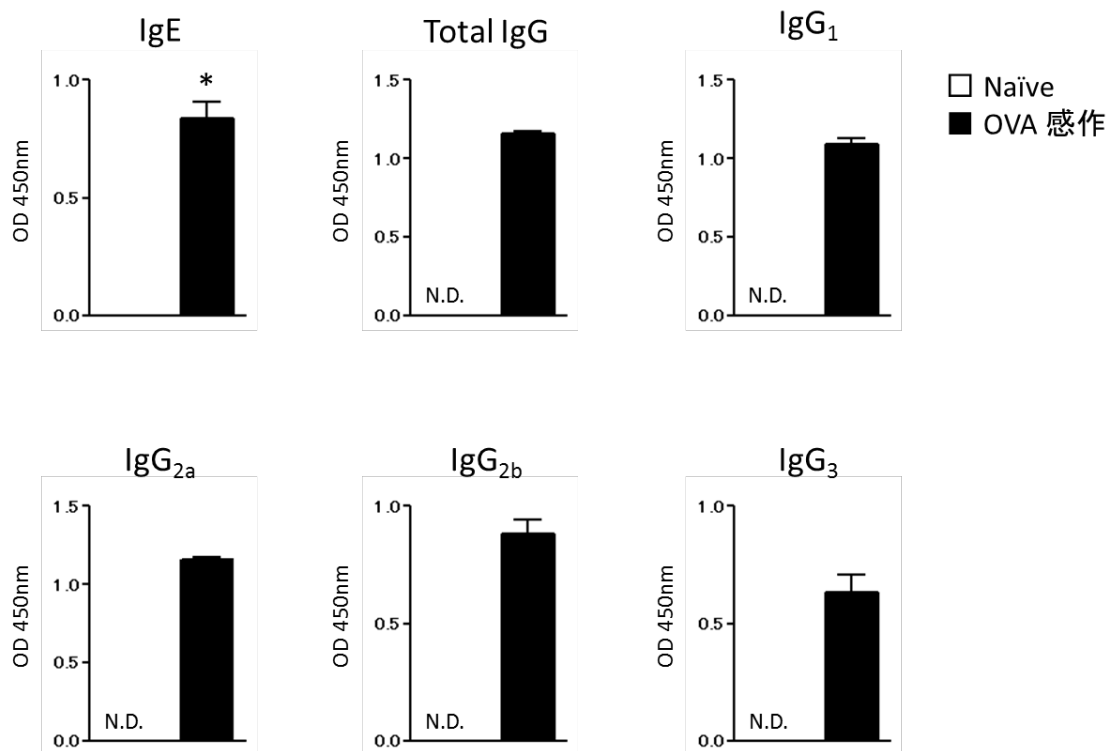
**Fig. 1** 炎症細胞サイトスピン標本

OVAで全身抗原感作しOVAを投与したマウスのBALFおよびNALFをサイトスピンに供しDiff-Quickにて染色した。図中バー；10  $\mu$ m



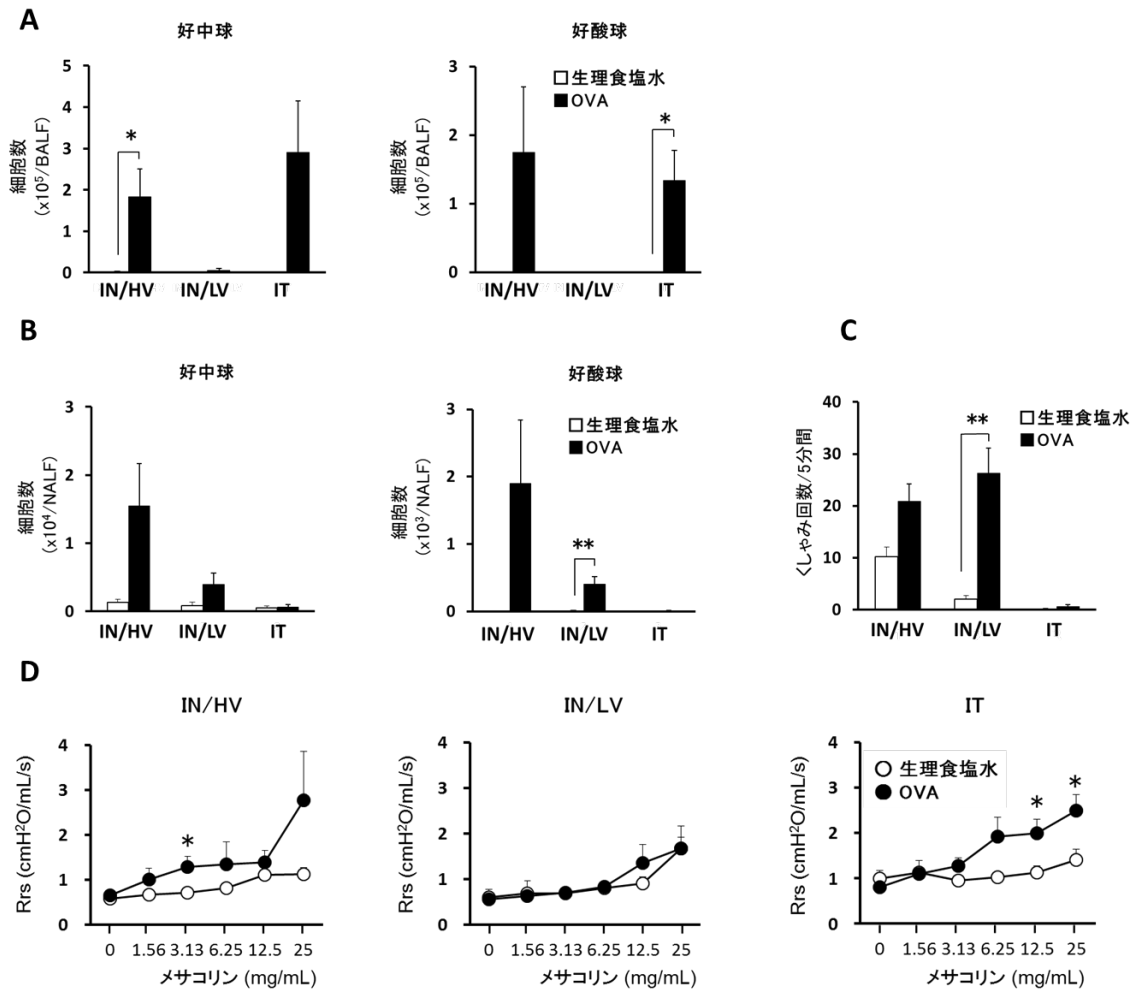
**Fig. 2** 疾患特異的マウスモデル構築および病態評価方法

Day 0, 7, 14 および 21 に Balb/c マウスに 20  $\mu$ g OVA、2.25 mg alum を腹腔内投与して全身抗原感作した。最終感作 2 週間後から、高容量点鼻投与 (IN/HV)、低容量点鼻投与 (IN/LV) または下気道投与 (IT) により OVA を投与した。最終抗原投与 0 分後にくしゃみ回数 の計測、6 時間後に BALF および NALF の回収および 72 時間後に BHR 試験をそれぞれ行い病態を評価した。



**Fig. 3 OVA 全身感作マウスの血清中 OVA 特異的 IgE, total IgG および IgG サブクラスの評価**

血清中 OVA 特異的 IgE、total IgG および IgG サブクラスを ELISA 法により検出した。データは一群あたり 4-8 匹のマウスから得られた測定値の平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$  ; Naïve マウス群との比較(t 検定)。



**Fig.4** 各種抗原投与方法により誘導された炎症反応の比較

IN/HV投与、IN/LV投与および IT 投与により誘導された病態を評価した。BALF中好中球数および好酸球数(A)、NALF中好中球数および好酸球数(B)、くしゃみ回数(C)およびBHR亢進反応(D)。データは一群あたり4-8匹のマウスから得られた測定値の平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ ；生理食塩水投与マウス群との比較(t検定)。

## 考察

気管支喘息とアレルギー性鼻炎は高い割合で併発し、影響を与え合うことが知られている。これまでにアレルギー性鼻炎患者がその発症時に BHR 亢進を併発して呼吸機能障害を起こすことは多数報告されてきた [17-19]。二種類の疾患が高い割合で併発する理由としては他方の炎症により放出されたメディエーターによる影響 [13] 以外にも、鼻・肺反射 [20, 21]、鼻閉による口呼吸回数の増加 [22, 23] など有力な仮説であるが、いずれも発症機序を十分に説明しうるものではない。本研究において、鼻腔を介して下気道に抗原を注入する IN/HV 投与では、鼻粘膜への炎症細胞浸潤およびくしゃみ反応の増加を特徴とするアレルギー性鼻炎様症状と、下気道への炎症細胞浸潤および BHR 亢進を発症する気管支喘息様症状が併発することが示された。このことから、より臨床状態に近い病態および二種類の疾患が併発する機序の解析に対し、IN/HV 投与が有用である可能性が示唆された。

一方、疾患の発症機序を詳細に解析するためには、いずれかの疾患を選択的に惹起しうるモデルの構築が必須となる。そこで抗原を目的の組織に直接投与し、かつ、目的外の組織への影響が少なくなるよう投与法を工夫し比較検討した。その結果、IT 投与ではアレルギー性鼻炎様症状の発症なしに抗原特異的に BHR 亢進発症と下気道への炎症細胞浸潤が発症し、IN/LV 投与では気管支喘息様症状の発症なしに抗原特異的にくしゃみ反応と鼻粘膜への炎症細胞浸潤が増加した。しかし、Hens らは動物モデルでの研究で鼻粘膜特異的な抗原投与を用いたにも関わらず BHR 亢進が発症したと報告している [24]。本研究と Hens らの報告の相違について詳細な理由は不明であるが、Hens らのモデルは 8 日間に及ぶ長期間の抗原投与方法であることが原因である可能性が考えられる。本研究での投与はこれに比べてより短期間であることが疾患特異的モデルの構築に寄与している可能性が示唆される。

以上より第一章において、従来の IN/HV 投与は気管支喘息のみならずアレルギー性鼻炎をも併発した病態を惹起させることを示した。加えて、新規に構築した IN/LV 投与ではアレルギー性鼻炎が、IT 投与では気管支喘息がそれぞれ選択的に惹起することを示した。このことから、第二章の気管支喘息の解析には IT 投与を用いたモデルを、第三章のアレルギー性鼻炎の解析には IN/LV 投与を用いたモデルをそれぞれ利用することとした。

## 第二章 気管支喘息における好酸球浸潤および BHR 亢進発症に対する抗 Mfsd10 抗体の抑制効果

### 目的

好酸球浸潤は Th2 型気管支喘息の特徴的な病態の一つである。気管支喘息患者では喀痰中の好酸球数が増加し[25]、慢性の患者では末梢血中および BALF 中好酸球数と病態の重症度との相関が強いことから[26]、好酸球が気管支喘息の病態形成に重要な役割を果たすことが示唆される。好酸球の機能は Th2 細胞などが産生する IL-3、IL-5 および GM-CSF などのサイトカインなどにより調節されているが[27]、特に IL-5 の影響により分化、炎症部位への浸潤および活性化し BHR 亢進の発症にも関与する可能性が考えられている。好酸球が分泌する物質のうち、強力な細胞障害性を持つ主要塩基性タンパク質、好酸球カチオン性タンパク質、および好酸球ペルオキシダーゼなどは気道上皮組織を傷害し[27, 28]、ロイコトリエンなどのケミカルメディエーターは気道平滑筋収縮や血管透過性亢進による浮腫を併発する[28]。これらが繰り返されることで BHR 亢進が発症すると考えられており、喘息の重症化に対する好酸球の強い関与が示唆される。

これまでも好酸球の検出および機能の中和を目的として好酸球に対する特異性の高い抗体が樹立されてきた。特に好酸球表面に特異的に発現する Siglec-F、CCR3 に対する抗体は炎症部位への好酸球浸潤を有意に抑制することが報告されている[29-31]。しかし、いずれの抗体も臨床研究において BHR の亢進を抑制するには至っておらず、有効な治療法の開発が急務となっている。

近年、マウス血球系細胞において、好酸球細胞表面に特異的に発現する分子、Mfsd10 が見いだされた[32]。この分子は Major facilitator super family に属し、インドメタシンなどの有機陰イオンの取り込みに関与することが報告されている[33, 34]。フローサイトメトリーによる細胞表面解析では、Mfsd10 に対するモノクローナル抗体、M2 は、BALF 中好酸球に選択的に反応することが示されたが[32]、Th2 型気管支喘息における好酸球浸潤や BHR 亢進発症に対する効果は不明である。そこで今回、抗原特異的 Th2 細胞移入と第一章にて有用性が示された IT 投与を利用して Th2 型気管支喘息を選択的に惹起したマウスモデルを利用し、気管支喘息の重症化に対する M2 の効果について検討した。



## 材料と方法

### 1. 実験動物

6週齢の雌 Balb/c マウスは日本 SLC より購入した。OVA 特異的 T 細胞受容体を恒常的に発現する DO11.10×Rag-2 欠損 マウスは東京都医学総合研究所花粉症プロジェクトにて管理・維持されているものを使用した。すべての動物実験は東京都医学総合研究所の動物実験指針に従って行われた。

### 2. 抗体

M2 の樹立は既報に従った[32]。ラット IgG モノクローナル抗体は Inter-Cell Technologies (FL, USA)、抗 Siglec-F モノクローナル抗体は R&D systems (MN, USA)より、それぞれ購入した。

### 3. DMEM-F12HAM コンプリートメディウムの調整

DMEM-F12HAM (Sigma-Aldrich) に 56 度で 30 分間非働化した FBS を 10 % (V/V) 添加し、さらに 55  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、20mM HEPES (Thermo Fisher Scientific)、1mM ピルビン酸、 $\times 1$  MEM 非必須アミノ酸溶液、 $\times 1$  ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク、Kyoto, Japan) となるようそれぞれ添加した。

### 4. In vitro での OVA 特異的 Th2 細胞の分化・増殖

頸椎脱臼により安楽死させた DO11.10×Rag-2 欠損マウスより脾臓を摘出し、DMEM-F12HAM コンプリートメディウム中にてすりつぶし、脾臓細胞懸濁液を得た。CD4 に対する抗体を結合した磁気ビーズ(Miltenyi、Bergisch Gladbach, Germany)を用いて、磁気細胞分離システム(Miltenyi)により、脾臓細胞懸濁液中から CD4 陽性ナイーブ T 細胞をポジティブセレクションした。ポジティブセレクション以外の画分は X 線照射により抗原提示細胞とした。CD4 陽性ナイーブ T 細胞が  $1 \times 10^5$  細胞/mL、抗原提示細胞が  $2 \times 10^5$  細胞/mL となるよう DMEM-F12HAM コンプリートメディウムで調整し、さらに 0.3  $\mu$ M OVA323-339 ペプチド、10 U/mL リコンビナント IL-2 (塩野義製薬、Osaka, Japan)、10 U/mL リコンビナント IL-4 (PeproTech, NJ, USA)、10  $\mu$ g/mL 抗 IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 (e-Bioscience, CA, USA)をそれぞれ添加し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37 度で培養した。培養 7 日後に遠心分離により上清を除き、細胞を回収した。

### 5. サイトカイン濃度の測定

In vitro で樹立した Th2 細胞が  $1 \times 10^7$  細胞/mL、X 線照射した Balb/c

マウス脾臓細胞が  $2 \times 10^7$  細胞/mL となるよう DMEM-F12HAM コンブリー  
ートメディウムで調整した。さらに  $0.3 \mu\text{M}$  OVA323-339 ペプチドを添加  
し、 $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 、5%  $\text{CO}_2$  存在下、37 度で培養した。24 時間後に培養上  
清を回収し培養上清中に含まれるサイトカインの濃度をビーズサスペン  
ションアレイシステム (Bio-plex Pro Mouse Cytokine Assay ; Bio-Rad  
Laboratories、CA、USA) にて測定した。操作は付属の使用説明書に従っ  
て行った。

## 6. マウス気管支喘息モデル

### 全身抗原感作モデル

実験スケジュールを Fig 1A に示す。具体的には、第一章に記載した方  
法で Day 0, 7, 14 および 21 に OVA 全身抗原感作し、Day 35-37 に OVA  
を IT 投与した。抗体処置は Day 34 と Day 37 に各日 1 回行った。

### Th2 細胞移入モデル

実験スケジュールを Fig 1B に示す。細胞移入は Day 0 に in vitro で分  
化させた Th2 細胞を  $1 \times 10^8$  細胞/mL となるよう PBS に懸濁し、正常な  
Balb/c マウスに  $200 \mu\text{L}$  ずつ尾静脈注射した。Day 1 に OVA を 1 回 IT 投  
与した。抗体処置は Day 1-3 に各日 1 回行った。

抗体処置はいずれのモデルでも M2 は  $20 \text{ mg}/\text{kg}$ 、抗 Siglec-F モノクロー  
ナル抗体は  $4 \text{ mg}/\text{kg}$ 、ラット IgG モノクローナル抗体 (ネガティブコン  
トロール) は  $20 \text{ mg}/\text{kg}$  で尾静脈注射した。

## 7. 気管支喘息病態の評価

最終抗原投与から 72 時間後、第一章に記載した方法で下気道過敏性試  
験を行い、BALF 中炎症細胞数を計測した。

## 8. IL-5 濃度の測定

BALF 上清中の IL-5 濃度を ELISA 法にて測定した。操作は Mouse IL-5  
ELISA kit (eBioscience) 付属の使用説明書に従って行った。

## 9. 統計解析

得られた値は各群の平均値 $\pm$ 標準誤差として示した。有意差検定は統計  
解析ソフト Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software) で解析し、解析方  
法は一元配置分散分析および Dunnett's 多重比較検定を使用し、p 値が  
0.05 未満を統計学的に有意とした。

## 結果

### 1. OVA 特異的 Th2 細胞の評価

In vitro で樹立した OVA 特異的 Th2 細胞の分化レベルを評価するため、Th2 細胞のサイトカイン産生パターンを解析した。Th2 細胞と抗原提示細胞に抗原を加えて 24 時間培養した後に培養上清を回収し、上清中の各種サイトカイン濃度を測定した。その結果、抗原刺激した Th2 細胞では IL-4、IL-5、IL-13 が高濃度であったが、抗原刺激なしではこれらのサイトカインは検出されなかった。IL-17A は抗原刺激した Th2 細胞でのみ、極僅かに検出された。抗原刺激の有無に関わらず、IL-1 $\beta$  が僅かに検出されたが、IFN- $\gamma$  濃度は検出限界以下であった(Fig. 2)。

### 2. 全身抗原感作マウスにおける好酸球浸潤に対する M2 の効果

OVA で全身抗原投与して OVA を IT 投与したマウスに M2、および比較用コントロールとして抗 Silec-F モノクローナル抗体をそれぞれ投与し、BALF 中炎症細胞数を比較した。その結果、抗原投与により有意に増加した好酸球数は M2 処置により有意に減少したが、リンパ球数、好中球数およびマクロファージ数に影響はなかった。抗 Siglec-F モノクローナル抗体処置マウスでも好酸球数が有意に減少したが、好中球数に関しても、有意差はないもののやや減少傾向にあった(Fig. 3)。

### 3. Th2 細胞移入モデルにおける好酸球浸潤および BHR 亢進に対する M2 の効果

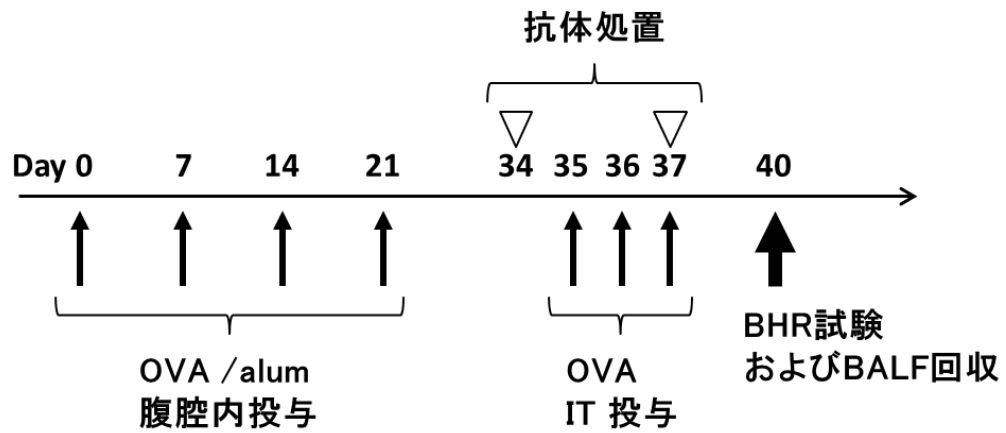
In vitro で樹立した OVA 特異的 Th2 細胞を移入して OVA を IT 投与したマウスに M2、および抗 Silec-F モノクローナル抗体をそれぞれ投与し、BALF 中炎症細胞数を比較した。その結果、抗原投与により有意に増加した好酸球数は M2 処置により有意に減少したが、リンパ球数、好中球数およびマクロファージ数に影響はなかった。抗 Siglec-F モノクローナル抗体処置マウスにおいても M2 処置と同程度に好酸球数が減少した(Fig. 4A)。また、抗原特異的 Th2 細胞を移入したマウスに抗原投与するとコントロールマウスと比較して BHR が有意に亢進したが、M2 処置により有意差はつかなかったものの、やや強い抑制傾向が見られた。一方、抗 Siglec-F 抗体処置による BHR の亢進抑制は見られなかった(Fig. 4B)。

### 4. IL-5 産生に対する M2 の影響

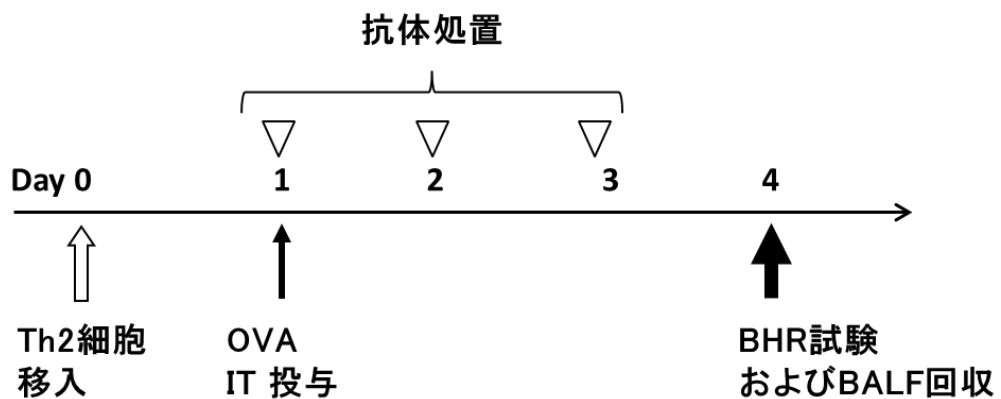
M2 による好酸球浸潤抑制および BHR の亢進抑制効果に対し、IL-5 が関与しているかを検討した。BALF 中の IL-5 濃度は、OVA 投与により生理食塩水投与と比較して強く上昇した。一方、M2 処置および抗 Siglec-F

モノクローナル抗体処置マウスではコントロール抗体処置マウスと比較して IL-5 濃度の顕著な変化は見られなかった(Fig. 5)。

A

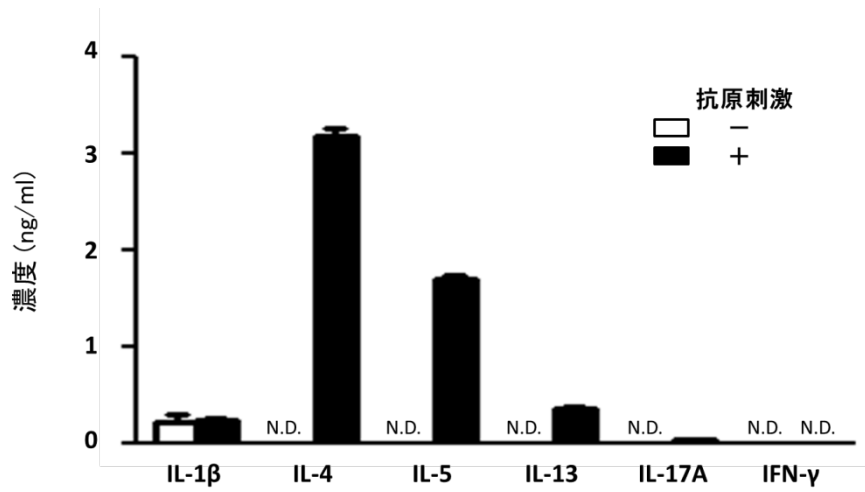


B



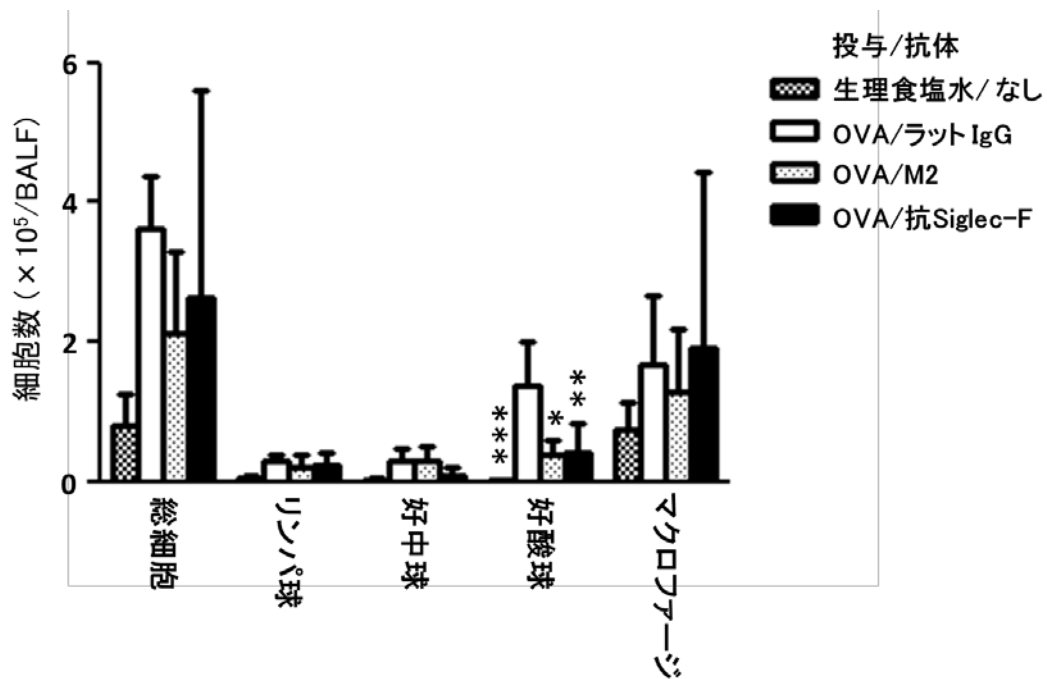
**Fig. 1** 気管支喘息の惹起、抗体投与および病態評価方法

Day 0, 7 14 および 21 に Balb/c マウスに 20  $\mu$ g OVA、2.25 mg alum を腹腔内投与し全身抗原感作した。Day 35-37 に OVA を IT 投与し、Day 34 と 37 に抗体処置した。Day 40 に BHR 試験および BALF を回収し、病態を評価した(A)。Day 0 に *in vitro* で樹立した OVA 特異的 Th2 細胞を Balb/c マウスに移入し、Day 1 に OVA を IT 投与した。Day 1-3 に抗体処置後、Day 4 に BHR 試験および BALF を回収し、病態を評価した(B)。

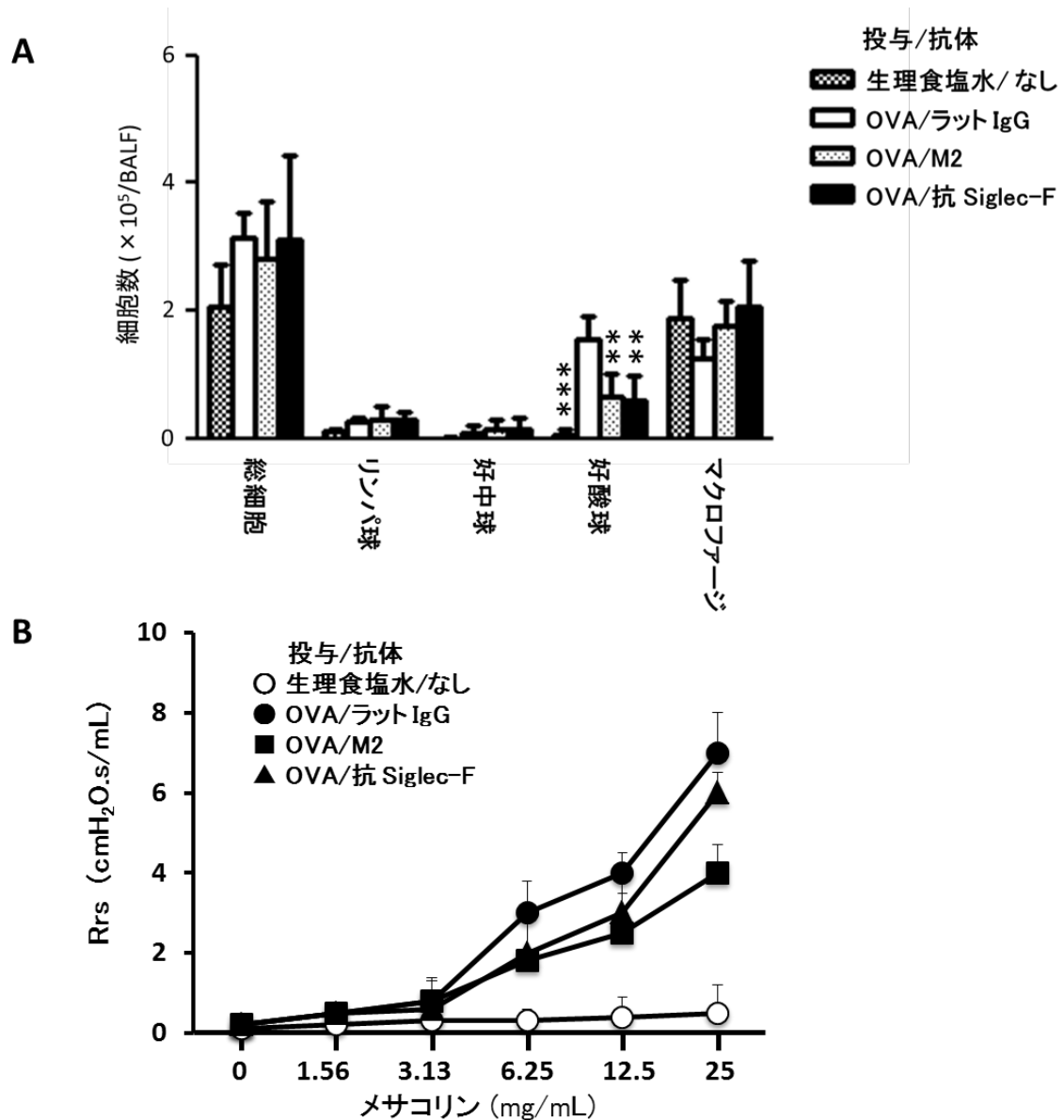


**Fig. 2 Th2 細胞によるサイトカイン産生**

In vitro で分化・増殖した OVA 特異的 Th2 細胞を OVA323-339 ペプチドで 24 時間刺激し、培養上清中の各種サイトカイン濃度をビーズサスペンションアレイシステムにて測定した。データは一群あたり 3 well の測定値の平均値±標準誤差で示した。



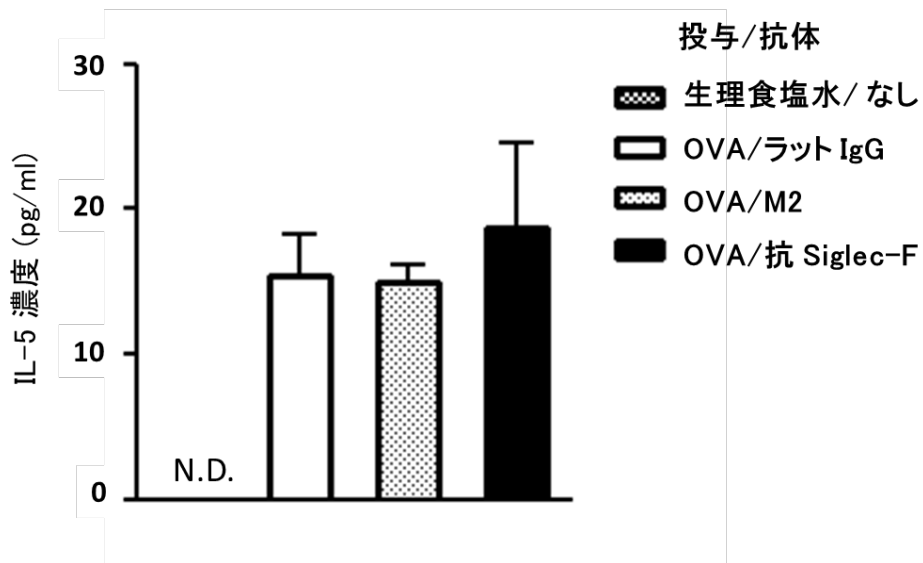
**Fig. 3** 全身抗原感作マウスにおける好酸球浸潤に対する M2 の効果  
 OVA 全身抗原感作マウスに、Day 35-37 に OVA を IT 投与した。Day 34 および Day 37 にそれぞれの抗体を静脈注射し、Day 40 に BALF 中炎症細胞数を評価した。データは一群あたり 4-8 匹のマウスから得られた測定値の平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  および \*\*\* $p < 0.001$  ; OVA 投与/ラット IgG 抗体処置マウス群との比較(Dunnett's 多重比較検定)。



**Fig. 4** Th2 細胞移入モデルにおける好酸球浸潤および BHR 亢進に対する M2 の効果

Day 0 に OVA 特異的 Th2 細胞をマウスに移入し、Day1 に OVA を IT 投与した。IT 投与 2 時間前、24 時間後および 48 時間後にそれぞれの抗体を静脈注射した。Day 4 に BALF 中炎症細胞数を計測し(A)、BHR 試験を行った (B)。データは一群あたり 4-8 匹のマウスから得られた測定値の平均値±標準誤差で示した。\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$  ; OVA 投与/ラット IgG 抗体処置マウス群との比較(Dunnett's 多重比較検定)。





**Fig. 5 Th2 細胞移入モデルマウスの下気道における IL-5 産生**  
 OVA 特異的 Th2 細胞移入モデルマウスの BALF 中 IL-5 濃度を ELISA 法にて測定した。データは一群あたり 4-8 匹のマウスから得られた測定値の平均値±標準誤差で示した。

## 考察

好酸球は気管支喘息において病態形成に重要な役割を担う可能性が示唆されており、これまでも好酸球特異的な抗体の樹立および抗体を用いた治療効果の検討がなされている[29-31, 35]。近年、マウス血球系細胞を対象とした解析から Mfsd10 が好酸球表面に特異的に発現することが示され、Mfsd10 に対するモノクローナル抗体、M2 は喘息モデルマウスの BALF 中好酸球を選択的に認識した[32]。そこで本研究では M2 を用い、気管支喘息の BHR 亢進発症における好酸球の役割について検討した。その結果、M2 投与により、好酸球浸潤の減弱を伴った BHR 亢進の抑制が示され、BHR 亢進の発症に好酸球の関与が示唆された。BHR 亢進発症に対する好酸球の関与の可能性は、好酸球欠損マウスを用いた研究[36]および好酸球浸潤抑制などを目的とした抗 IL-5 抗体投与[4]でも報告されている。好酸球欠損マウスを用いた研究では抑制効果が得られなかった報告も一部あり[37]その評価は分かれるが、抗 IL-5 抗体に関しては臨床研究においても奏効した報告もあることから[5]、BHR 亢進に好酸球が深く関与する可能性が示唆される。

M2 は下気道に浸潤した好酸球を選択的に反応し、リンパ球、好中球およびマクロファージにはほとんど影響を及ぼさなかった。この結果は、Mfsd10 の mRNA が好酸球において非常に高レベルで発現し、B 細胞、T 細胞、マクロファージ、好中球、好塩基球および樹状細胞ではほとんど発現していなかった既報の結果と合致する[32]。以上から M2 は生体内においても好酸球表面に発現する Mfsd10 分子を選択的に認識して結合し、好酸球機能を阻害することで BHR 亢進を抑制する可能性が考えられる。

IL-5 は活性化 Th2 細胞などで産生され、好酸球の分化、成熟、浸潤、生存延長およびエフェクター機能などを促進するサイトカインである[27, 28]。本研究では M2 および抗 Siglec-F モノクローナル抗体投与によっても BALF 中 IL-5 濃度は変化しなかった。このことから、好酸球浸潤および BHR 亢進の抑制は抗体投与による IL-5 産生阻害によるものではないと考えた。Siglec-F のオーソログであるヒト Siglec-8 に対する抗体は、好酸球に対してカスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導する[38, 39]。一方、牛島らの報告では、Mfsd10 は有機陰イオンの取り込みに関与するトランスポーターとして機能するが[34]、M2 が気管支喘息病態において好酸球浸潤および BHR 亢進発症を抑制する機序は不明であり、今後の解析が必要である。

抗 Siglec-F モノクローナル抗体は M2 と同程度に好酸球浸潤を抑制したが、好中球に対しても抑制効果を示す傾向が見られた。Siglec-F 分子は好酸球のみならず、好中球表面にも発現することが以前の報告でも示されており [32, 40] 本研究結果はこれらを反映している可能性が考えられる。一方、Song らの報告では抗 Siglec-F モノクローナル抗体による好中球浸潤の抑制効果は限定的であったとの報告もある [29]。これらの結果の相違についてはより詳細な検討が必要とされるが、抗 Siglec-F モノクローナル抗体が好酸球のみならず好中球に対しても反応した結果および BHR 亢進の抑制効果の比較から、抗 Siglec-F モノクローナル抗体に対する M2 の優位性が示された。

以上、第二章では気管支喘息における BHR 発症機序に対し好酸球の関与が示された。

### 第三章 アレルギー性鼻炎における NHR 亢進発症に対する CD4 陽性 T 細胞の関与

#### 目的

アレルギー性鼻炎患者では特異抗原の吸入によりくしゃみ反応、鼻閉および鼻汁分泌といった即時性の症状が誘発される。これらの症状はマスト細胞などにより放出されるヒスタミンなどのメディエーターを介した反応であると理解されてきた。それゆえ、IgE を結合したマスト細胞の抗原特異的な脱顆粒反応は鼻症状の誘発に必須であるとされている[41, 42]。さらに、アレルギー性鼻炎では他のアレルギー疾患同様、好酸球や T 細胞などの炎症細胞浸潤を伴った鼻粘膜上での遅発性の炎症も誘発する二相性の病態形成機序となっている[41, 43]。

くしゃみ反応は鼻粘膜上への物理的または化学的刺激に対して誘発される反応である。重症化したアレルギー性鼻炎患者では、抗原非特異的な刺激によってもくしゃみ反応が誘発されることが知られる。そのため、ヒスタミン刺激によるくしゃみ反応誘発試験では、アレルギー性鼻炎患者は健常人よりも有意に低い濃度のヒスタミンでもくしゃみ反応を示し、そのヒスタミン感受性と病態の重篤度が相関することが知られている[44-46]。またスギ花粉症などの季節性アレルギー性鼻炎患者では、花粉飛散期におけるヒスタミン誘発くしゃみ反応は非飛散期と比較して増強することも報告されている[47]。

鼻粘膜上での反復したアレルギー性炎症は NHR 亢進を発症させ、その結果、抗原非特異的な刺激にも反応するようになり病態の重症化につながる。しかし、アレルギー性鼻炎患者のくしゃみ反応の増加と NHR 亢進発症との関連性については未知な部分が多い。既報では、アレルギー性鼻炎患者のくしゃみ反応に対するヒスタミン感受性の増強は NALF 中好中球数および好酸球数の増加と相関すること[48]、アレルギー性鼻炎の治療に用いられるステロイドの一種、ベクロメタゾンの処置では、好酸球浸潤の抑制を伴ったヒスタミン感受性の減弱が報告されているが[11]、好中球および好酸球と NHR 亢進発症の関連の詳細もほとんどが不明である。

アレルギー性鼻炎病態では IgE/マスト細胞系依存的にくしゃみなどの鼻症状が誘発されることだけでなく、CD4 陽性 T 細胞が鼻粘膜上でのアレルギー性炎症に対して重要な役割を果たすことも報告されている。アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜や NALF 中では活性化 CD4 陽性 T 細胞や T 細胞

に関連したサイトカインが検出される[49-51]。またこれらの反応は特異的な抗原刺激により増強し[52, 53]、ステロイドや特異抗原に対する免疫治療により鼻症状とともに緩和される[49-51, 54-57]。

アレルギー性鼻炎の病態形成機序、とりわけ NHR 亢進発症に対する CD4 陽性 T 細胞の影響に関する報告はこれまでにほとんど例がない。そこで本研究は複数の手法を用い NHR 亢進発症に対する CD4 陽性 T 細胞の関与について解析した。その中で、全身抗原感作および抗原投与したマウスでは抗原非特異的な刺激に対してもくしゃみ反応が増強する NHR 亢進が発症することを見出した。さらに各種遺伝子改変マウス（マスト細胞欠損マウス、好酸球欠損マウスおよび抗 OVA 特異的 IgE Tg マウス）、抗体処置による CD4 陽性 T 細胞除去および抗原特異的 T 細胞移入などの手法を用い、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞が NHR 亢進発症に対して必須である可能性を示した。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

6週齢の雌 Balb/c マウスは日本 SLC より購入した。OVA 特異的 T 細胞受容体を恒常的に発現する DO11.10×Rag-2 欠損マウス、マスト細胞欠損マウス(W/W<sup>v</sup>)、好酸球欠損マウス ( $\Delta$ dblGATA) および抗 OVA-IgE Tg マウスは東京都医学総合研究所花粉症プロジェクトにて管理・維持されているものを使用した。すべての動物実験は東京都医学総合研究所の動物実験指針に従って行われた。

### 2. In vitro での OVA 特異的 T 細胞の分化・増殖

T 細胞の分化・増殖は既報に従って行った[58, 59]。第二章に記載した方法で CD4 陽性 T 細胞と抗原提示細胞を DMEM-F12HAM コンプリートメディアウムで調整し、さらに Th1 細胞への分化には 10 U/mL リコンビナントマウス IL-12 (Peprotech) および 10  $\mu$ g/mL 抗 IL-4 モノクローナル抗体 (Peprotech) をそれぞれ添加した。Th17 細胞への分化には 10 ng/mL IL-1 $\beta$ 、20 ng/mL IL-6、1 ng/mL TGF- $\beta$  (Peprotech)、10 ng/mL IL-23 (R&D systems)、10  $\mu$ g/mL 抗 IL-4 モノクローナル抗体 (Peprotech) および 10  $\mu$ g/mL 抗 IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 (e-Bioscience) をそれぞれ添加した。Th2 細胞への分化は第二章に記載した方法で行った。すべての T 細胞サブセットは 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37 度で 7 日間培養し、遠心して培養上清を除いた後に以降の実験に使用した。

### 3. 樹立した細胞のサイトカイン産生の解析

In vitro で樹立した OVA 特異的 Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞を評価した。細胞内 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10 および IL-17A レベルの測定は既報に従い 5 nM PMA および 1  $\mu$ M イオノマイシンで 6 時間刺激後、抗体で染色してフローサイトメトリーで解析した[59]。培養上清中のサイトカイン濃度の測定は第二章に記載した方法で行った。

### 4. 全身抗原感作および IN/LV 投与

OVA 全身抗原感作は第一章に記載した方法で Day 0, 7, 14 および 21 に行った。Day 35-38 (一部は Day 5-38 および 41-43) に各日 1 回、30 mg/mL OVA、BSA およびカゼイン(Sigma-Aldrich) を IN/LV 投与した。

### 5. T 細胞移入および IN/LV 投与

In vitro で樹立した OVA 特異的 Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞の移入は、第二章に記載した方法で行った。T 細胞移入 24 時間後、4 日連

続で各日 1 回、30 mg/mL OVA を IN/LV 投与した。

#### 6. 鼻粘膜過敏性試験

最終抗原投与 6 時間後、30 mg/mL OVA、BSA および 100 mM ヒスタミンを点鼻し、くしゃみの回数を 5 分間計測した。

#### 7. 鼻粘膜炎症の評価

最終抗原投与 6 時間後、NALF 中炎症細胞の解析を第一章に記載した方法で行った。病理組織学的解析は、マウスを 4% パラホルムアルデヒドで固定後に鼻組織を採取して脱灰し、パラフィン包埋後、厚さ 5  $\mu\text{m}$  に薄切してヘマトキシリン・エオシン染色にて行った。好酸球については、40 倍の対物レンズで左右鼻甲介を 6-10 視野観察し、1  $\text{mm}^2$  あたりの細胞数を計測した。鼻粘膜上皮傷害は好酸球と同様の範囲で観察し、Ponikau らの方法 [60] を改変したスコアで評価した。傷害スコアを Table 1 に示す。

#### 8. 血清中 OVA 特異的 IgE、total IgG および IgG サブクラスの検出

血清採取および血清中 OVA 特異的 IgE および IgG の検出は第一章に記載した方法で行った。

#### 9. T 細胞集積の確認

NALF 細胞および NALT 細胞に抗 DO11.10-TCR-PE 抗体 (BD Bioscience、CA、USA) および抗 CD4-APCeFluor780 抗体 (eBioscience) をそれぞれ加えて 1 時間 4 度で染色し、フローサイトメーター (FACS Canto2; BD Bioscience) にて解析した。

#### 10. 抗体処置による CD4 陽性 T 細胞除去

最終抗原投与の 9 および 6 日前に、抗 CD4 モノクローナル抗体 (GK1.5; eBioscience) を 50 mg/kg、ラット IgG モノクローナル抗体 (ネガティブコントロール) を 50 mg/kg で尾静脈注射した。抗体処置の効果を確かめるため、マウス脾臓細胞に抗 CD3-PECy7 抗体 (BioLegend、CA、USA) および抗 CD4-APCeFluor780 抗体 (eBioscience) をそれぞれ加えて 1 時間 4 度で染色し、フローサイトメーターにて解析した。

#### 11. mRNA 発現レベルの解析

最終抗原投与 6 時間後、マウス鼻組織を回収し ISOGEN (ニッポンジェーン、Tokyo、Japan) 中で懸濁した。得られた懸濁液から、ISOGEN 添付のプロトコルに従って mRNA を抽出し、ランダムプライマー (Toyobo) と SuperScript 3 逆転写酵素 (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写

し、反応産物と IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17A、EPO および GAPDH のプローブ (TaqMan MGBprobe; Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ用いて CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, USA) にて解析した。

## 12. 統計解析

得られた値は各群の平均値 $\pm$ 標準誤差として示した。有意差検定は統計解析ソフト Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software) で解析し、2 群間の比較は Mann-Whitney U test、多群間の比較は Kruskal-Wallis test および Dunn's 多重比較検定を使用し、p 値が 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。



## 結果

### 1. 全身感作マウスにおける抗原誘発 NHR 亢進の発症

OVA で全身抗原感作し、OVA を 7 回投与した Balb/c マウスでは、8 回目の OVA 投与直後に強いくしゃみ反応が誘発された(Fig. 1A, B)。生理食塩水および非特異抗原である BSA を 8 回投与したマウスではくしゃみ反応は誘発されなかった。そこで OVA を 7 回投与したマウスに BSA を投与すると、OVA のみを投与したマウスと同程度のくしゃみ反応が誘発された(Fig. 1B)。詳細に解析すると、抗原非特異的なタンパクである BSA 投与により誘発されるくしゃみ反応の増加は 2 回の抗原投与により既に確認され、同様の反応は代表的なくしゃみ誘因物質であるヒスタミンの投与でも誘発された(Fig. 1C)。また BSA 同様、抗原非特異的なタンパク質であるカゼイン投与でもくしゃみ反応は誘発された(Fig. 1D)。抗原投与後のマウスに対するヒスタミン誘発くしゃみ反応の増加は、ヒスタミン濃度依存的に誘発された(Fig. 1E)。以上の結果より、全身抗原感作したマウスに特異抗原を投与すると NHR 亢進が発症し、抗原非特異的な刺激にも反応してくしゃみ反応が増加するようになることが示された。4 回抗原投与したマウスの NHR 亢進反応の経時変化を追うと、最終抗原投与 3 時後には強く NHR が亢進して 6 時間後にピークを迎え、48 時間後にはほぼ消失した(Fig. 1F)。以上の結果から、以降の実験における NHR 亢進の評価（鼻粘膜過敏性試験）は、抗原投与 6 時間後にヒスタミン誘発くしゃみ反応を計測することで行うこととした。

### 2. 全身感作マウスにおける抗原誘発鼻粘膜炎症の評価

OVA で全身感作し、OVA を 4 回投与した Balb/c マウスでは、リンパ球、好中球および好酸球といった炎症細胞数が生理食塩水投与したマウスと比較して有意に増加した(Fig. 2A)。このマウスの鼻組織を回収し mRNA の発現レベルを比較すると、IL-4、IL-5、IL-13 および EPO がコントロールマウスと比較して有意に高かったが、IFN- $\gamma$  および IL-17 はほとんど差はなかった(Fig. 2B)。病理組織学的解析では、OVA 投与マウスの鼻粘膜で好酸球の増加と鼻粘膜上皮傷害の増強が観察された(Fig. 2C, D)。

### 3. マスト細胞の関与

NHR 亢進発症に対するマスト細胞の関与について解析するため、マスト細胞欠損マウス(W/W<sup>v</sup>)を用いて解析した。OVA で全身抗原感作し、8 回 OVA 投与した W/W<sup>v</sup> マウスでは生理食塩水投与マウスと比較して有意に NHR が亢進していたが、抗原投与した同腹の野生型マウス(+/+) も同程度に NHR が亢進していた(Fig. 3A)。同様に W/W<sup>v</sup> マウスおよび +/+ マ

ウスのいずれも抗原特異的にNALF中リンパ球数、好中球数および好酸球数(Fig. 3B)、血清中の抗原特異的IgEレベル(Fig. 3C)が増強したが、W/W<sup>v</sup>マウスと+/+マウスとではほとんど差はなかった。これらの結果から、NHR亢進発症に対するマスト細胞の関与は比較的小さい可能性が示唆された。

#### 4. 好酸球の関与

次にNHR亢進発症に対する好酸球の関与について解析した。OVAで全身抗原感作し、8回OVA投与した $\Delta$ dblGATAマウスでは生理食塩水投与マウスと比較して有意にNHRが亢進していたが、抗原投与した同腹のWTマウスも同程度にNHRが亢進していた(Fig. 4A)。同様に $\Delta$ dblGATAマウスおよびWTマウスのいずれも抗原特異的にNALF中リンパ球数および好中球数(Fig. 4B)、血清中の抗原特異的IgEレベル(Fig. 4C)が増強したが、 $\Delta$ dblGATAマウスとWTマウスとではほとんど差はなかった。好酸球数の増加は抗原投与したWTマウスでのみ確認された(Fig. 4B)。これらの結果から、NHR亢進発症に対する好酸球の関与は比較的小さい可能性が示唆された。

#### 5. CD4陽性T細胞の関与

CD4陽性T細胞の関与について解析するため、抗CD4抗体処置によるT細胞除去実験を行った。OVAで全身抗原感作し4回OVA投与したBalb/cマウスに抗CD4抗体処置すると、抹消のCD3陽性/CD4陽性細胞はほぼ消失した(Fig. 5A)。NHRは抗原投与により生理食塩水投与マウスと比較して有意に亢進したが、抗体処置により強く抑制された(Fig. 5B)。NALF中リンパ球数、好中球数および好酸球数も同様に抗体処置により有意に減少した(Fig. 5C)。これらの結果から、NHR亢進発症に対するCD4陽性T細胞の強い関与が示唆された。

#### 6. 樹立した抗原特異的Th1細胞、Th2細胞およびTh17細胞の評価

NHR亢進発症に対する抗原特異的T細胞のサブセット間での比較解析を行うため、OVA特異的Th1細胞、Th2細胞およびTh17細胞をin vitroで分化・増殖し、得られた細胞の分化レベルを評価した。細胞内サイトカインを解析すると、抗原刺激によりTh1細胞は主にIFN- $\gamma$ を、Th2細胞は主にIL-4を、Th17細胞は主にIL-17をそれぞれ強く産生していた(Fig. 6A)。培養上清中のサイトカイン量についても、抗原刺激により細胞内サイトカインと同様のパターンを示した(Fig. 6B)。以上、それぞれのT細胞サブセットに特徴的なサイトカインが抗原特異的に産生されたことから、それぞれのT細胞サブセットへの分化がなされたことが確認された。

## 7. 抗原特異的 T 細胞の関与と T 細胞サブセット間の比較

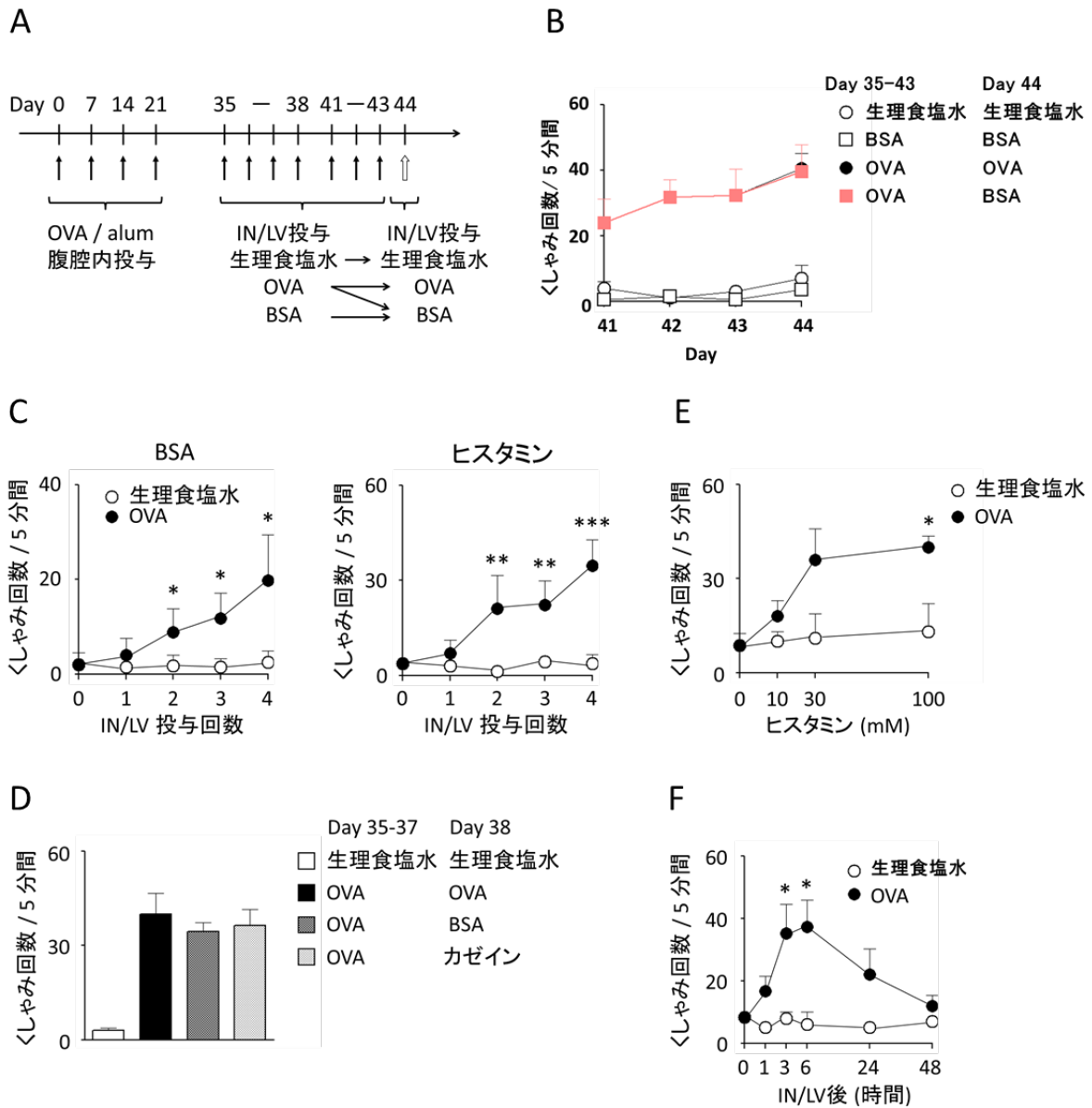
NHR 亢進発症に対する CD4 陽性 T 細胞の関与が細胞除去実験により示唆されたため、次にいずれの抗原特異的 T 細胞サブセットが NHR 亢進を発症しうるか検討した。OVA 特異的 Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞を正常な Balb/c マウスに移入して OVA を投与すると、いずれの T 細胞サブセットにおいてもヒスタミン誘発くしゃみ反応および BSA 誘発くしゃみ反応がそれぞれ増加し、NHR 亢進の発症が確認された (Fig 7A)。NALF 中細胞数の比較では、抗原投与した Th2 細胞移入マウスは好酸球数が有意に増加した一方、抗原投与した Th1 細胞および Th17 細胞移入マウスでは好中球数が有意に増加した (Fig 7B)。NALF および NALT 細胞を解析するといずれも OVA 投与したマウスでのみ DO11.10 陽性/CD4 陽性細胞の割合が生理食塩水投与マウスと比較して増加していた (Fig 7C)。鼻組織におけるサイトカインの mRNA 発現レベルを解析すると、Th1 細胞移入および抗原投与マウスでは主に IFN- $\gamma$ 、Th2 細胞移入および抗原投与マウスは主に IL-4、Th17 細胞移入および抗原投与マウスは主に IL-17 の発現レベルがそれぞれ高かった (Fig.7D)。Naïve な T 細胞を移入したマウスでは OVA 投与しても NHR 亢進の発症、炎症細胞の浸潤および鼻組織でのサイトカイン産生はいずれも誘導されなかった (Fig.7)。

## 8. IgE の関与

NHR 亢進発症に対するマスト細胞の関与は比較的小さい可能性が示唆されたが、抗原特異的 IgE はマスト細胞や好塩基球と結合してアレルギー反応を惹起する。そこで、NHR 亢進の発症に対する抗原特異的 IgE の関与について検討するため、未感作の抗 OVA-IgE Tg マウスと OVA 特異的 T 細胞移入マウスおよび OVA 全身抗原感作マウスとの比較解析を行った。血清中 OVA 特異的 IgE レベルは抗 OVA-IgE Tg マウスおよび OVA 全身抗原感作マウスで高いレベルであったが、OVA 特異的 T 細胞移入マウスでは非常に低いレベルであった (Fig. 8A)。Total IgG およびそのサブクラスは全身抗原感作マウスでのみ高いレベルで検出された。次にヒスタミン誘発くしゃみ反応はについて全身抗原感作マウスと抗 OVA-IgE Tg マウスを比較した。抗原投与により全身抗原感作マウスではくしゃみ反応が有意に増加したが、抗 OVA-IgE Tg マウスでは生理食塩水投与マウスと同程度にしかくしゃみ反応が計測されなかった (Fig. 8B)。同様に、NALF 中炎症細胞も全身抗原感作マウスでのみ抗原特異的に増加した (Fig. 8C)。これらの結果から、NHR 亢進発症に対する抗原特異的 IgE の関与は比較的小さい可能性が示唆された。

**Table 1. 鼻粘膜上皮の傷害スコア**

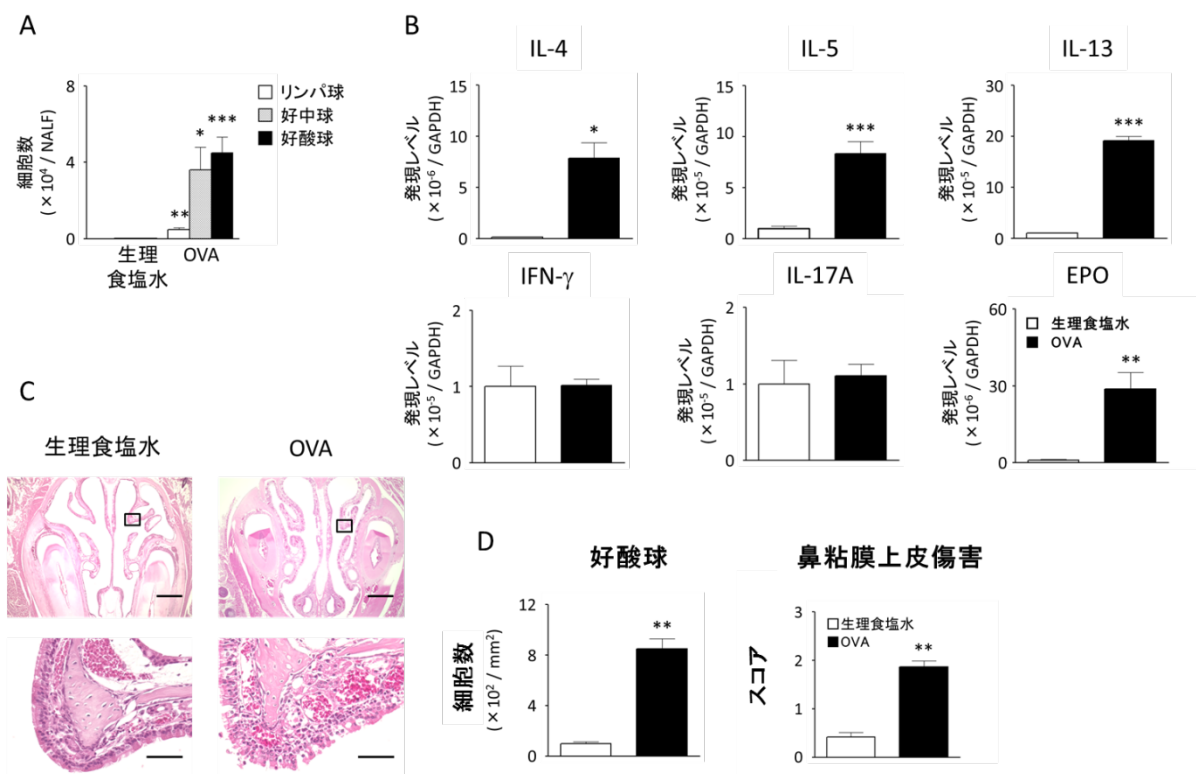
| スコア | 傷害レベル      |
|-----|------------|
| 0   | 正常         |
| 1   | 上皮細胞の線毛脱離  |
| 2   | 粘膜上皮の一部浸食  |
| 3   | 粘膜上皮の完全な浸食 |



**Fig. 1 抗原誘発 NHR 亢進の発症**

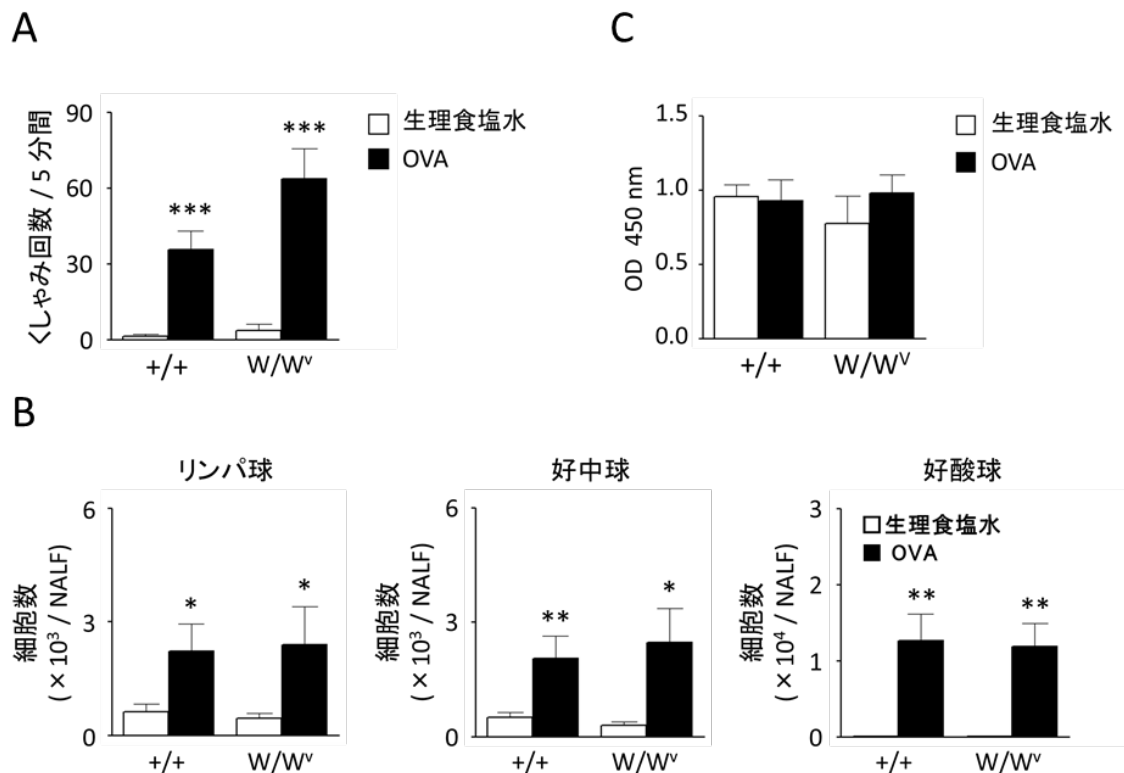
Day 0, 7 14 および21にBalb/cマウスに20  $\mu$ g OVA、2.25 mg alumを腹腔内投与し全身抗原感作した。Day 35-38およびDay 41-43に、OVA、BSAおよび生理食塩水をIN/LV投与し、Day 44にも図に示した組み合わせで投与した (A)。Day 41-43に投与直後のくしゃみ回数を計測した(B)。Day 34 (0)-38 (4) 各日の OVA 投与 6 時間後にBSAおよびヒスタミンを点鼻して誘発したくしゃみ回数を計測した(C)。Day 35-37にOVA投与したマウスに対し、Day 38にOVA、BSAおよびカゼインを投与し、直後のくしゃみ回数を計測した(D)。くしゃみ反応におけるヒスタミン濃度依存性(E)。

Day 35-38 にOVAを投与したマウスに対するヒスタミン誘発くしゃみ反応の経時変化(F)。データは一群あたり4-8匹のマウスから得られた測定値の平均値±標準誤差で示した。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$  および  $***p < 0.001$ ；生理食塩水投与マウス群との比較(t検定)。



**Fig. 2** 抗原誘発鼻粘膜炎症反応

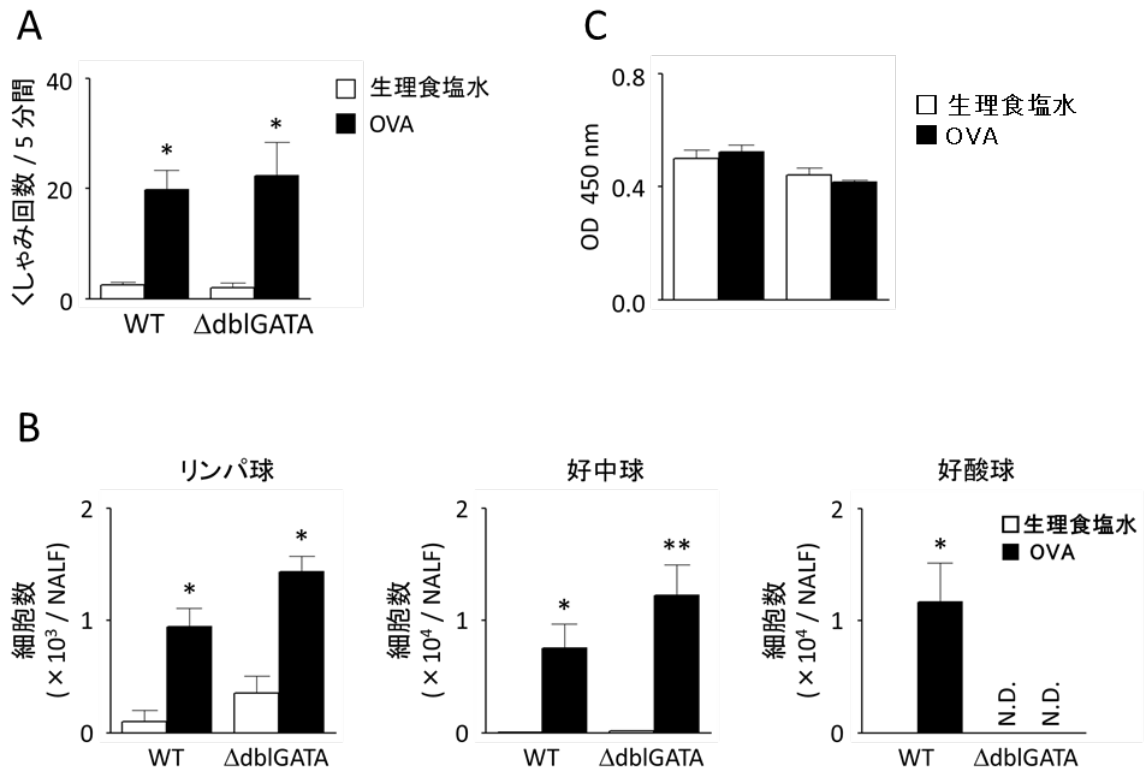
Day 0, 7 14 および 21 に OVA で全身抗原感作したマウスに、Day 35-38 に OVA を IN/LV 投与した。最終抗原投与 6 時間後に NALF 中リンパ球数、好中球数および好酸球数を計測し(A)、鼻組織での IL-4、IL-5、IL-13、IFN- $\gamma$ 、IL-17A および EPO の mRNA 発現レベルを測定した(B)。病理組織学的解析は鼻組織をパラフィン包埋後に薄切し、ヘマトキシリン・エオシンで染色した。下段は上段画像中に四角で示した位置の拡大画像。図中バー；上段 500  $\mu$ m、下段；50  $\mu$ m (C)。病理学的解析により評価した好酸球数および鼻粘膜上皮傷害レベル(D)。データは一群あたり 4-8 匹のマウスから得られた測定値の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  および \*\*\* $p < 0.001$ ；生理食塩水投与マウス群との比較(t 検定)。



**Fig. 3** マスト細胞欠損マウスにおける NHR 亢進の発症

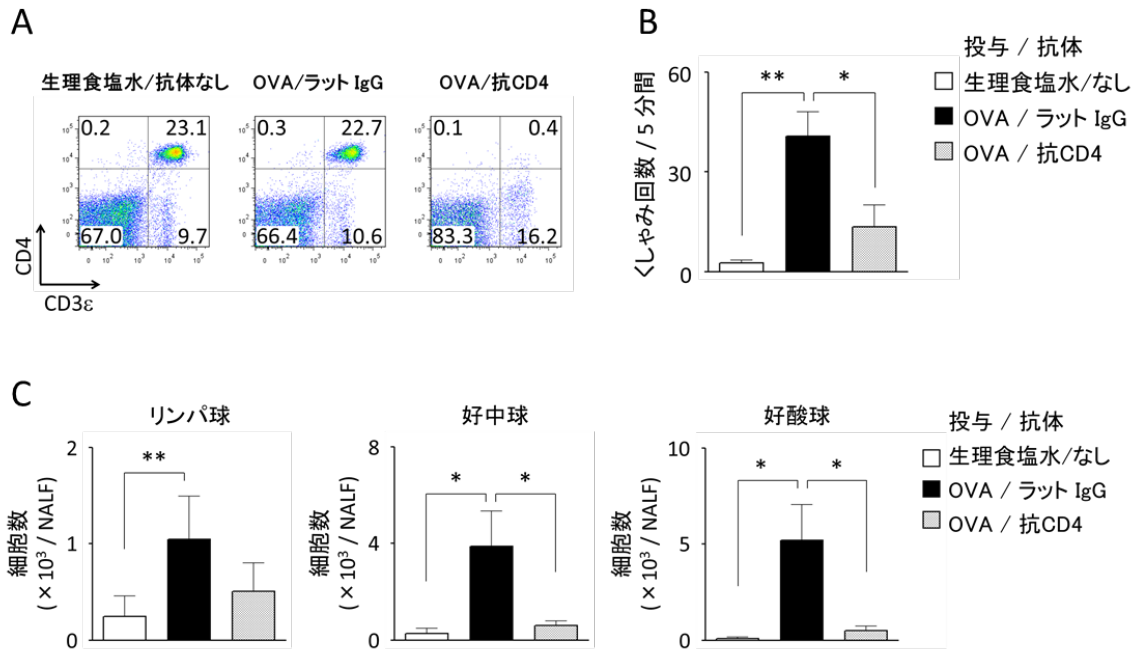
Day 0, 7 14 および 21 に OVA で全身抗原感作した W/W<sup>v</sup> マウスまたは +/+マウスに、Day 35-38 および Day41-44 に OVA を IN/LV 投与した。最終抗原投与 6 時間後、NHR 亢進レベル (A)、NALF 中リンパ球数、好中球数および好酸球数 (B)および血清中抗原特異的 IgE レベル(C)を評価した。データは一群あたり 4-8 匹のマウスから得られた測定値の平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  および \*\*\* $p < 0.001$  ; 生理食塩水投与マウス群との比較(Dunn's 多重比較検定)。





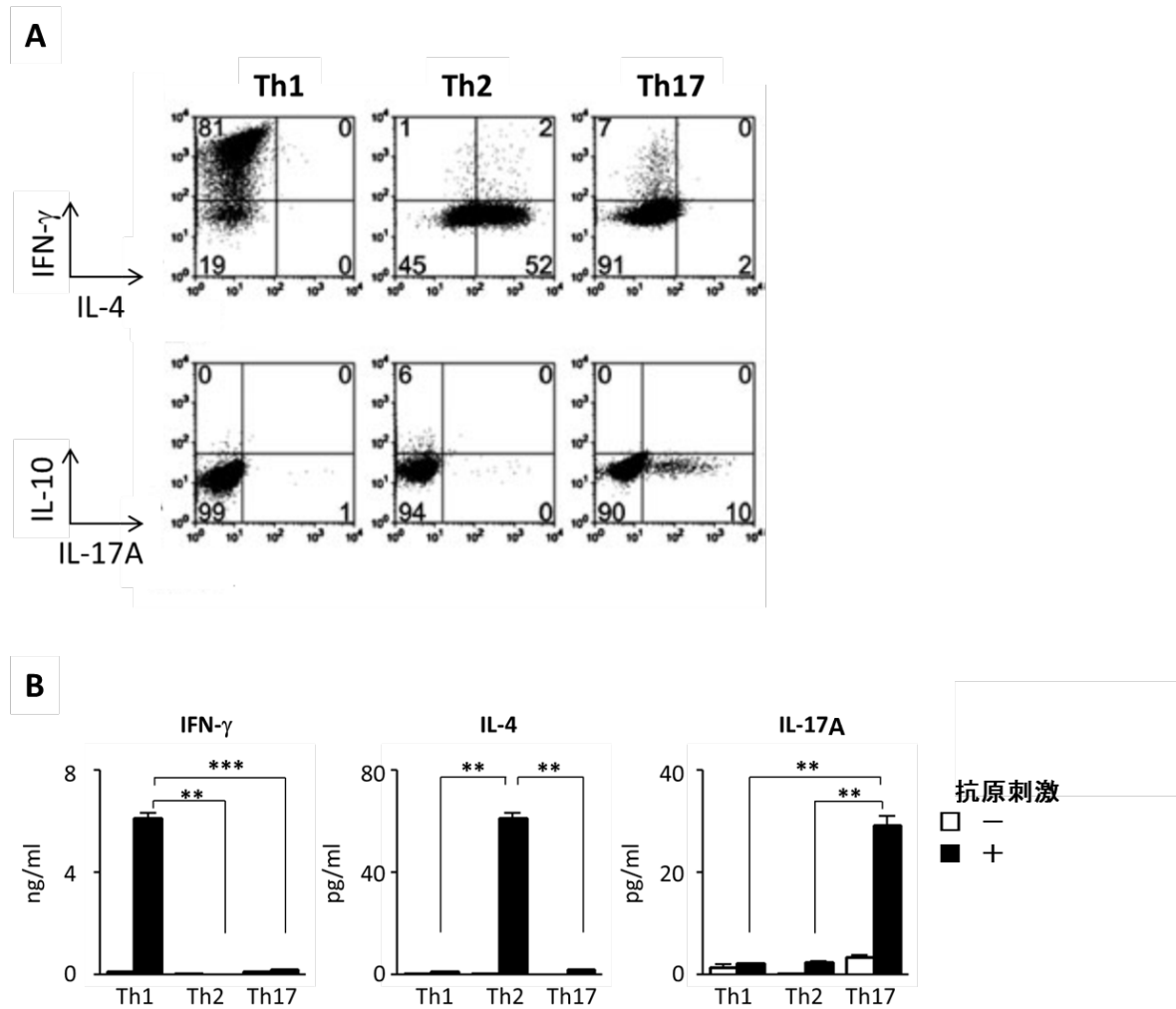
**Fig. 4 好酸球欠損マウスにおける NHR 亢進の発症**

Day 0, 7 14 および 21 に OVA で全身抗原感作した $\Delta$ dblGATA マウスまたは WT マウスに、Day 35-38 および Day41-44 に OVA を IN/LV 投与した。最終抗原投与 6 時間後、NHR 亢進レベル (A)、NALF 中リンパ球数、好中球数および好酸球数 (B) および血清中抗原特異的 IgE レベル (C) を評価した。 $*p < 0.05$  および  $**p < 0.01$ ; 生理食塩水投与マウス群との比較 (Dunn's 多重比較検定)。



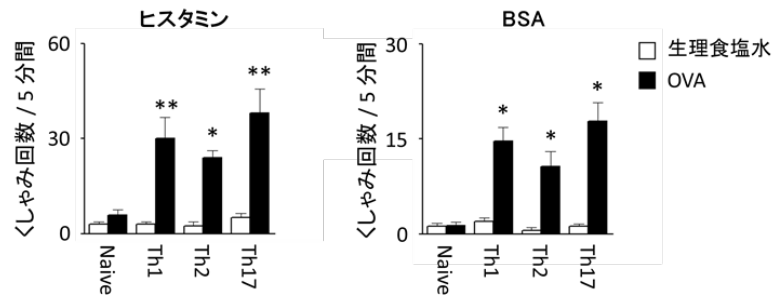
**Fig. 5 NHR 亢進発症に対する抗 CD4 抗体の効果**

Day 0, 7 14 および 21 に OVA で全身抗原感作したマウスに、Day 35-38 に OVA を IN/LV 投与した。最終抗原投与 9 および 6 日前に抗 CD4 抗体 およびラット IgG 抗体をそれぞれ静脈注射した。最終抗原投与 6 時間後に脾臓中 CD3 陽性/CD4 陽性細胞をフローサイトメトリーで検出し(A)、NHR 亢進レベルを計測後(B)、NALF 中リンパ球数、好中球数および好酸球数を計測した(C)。データは一群あたり 4-8 匹のマウスから得られた測定値の平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$  および\*\* $p < 0.01$  ; OVA 投与/ラット IgG 抗体投与マウス群との比較(Dunn's 多重比較検定)。

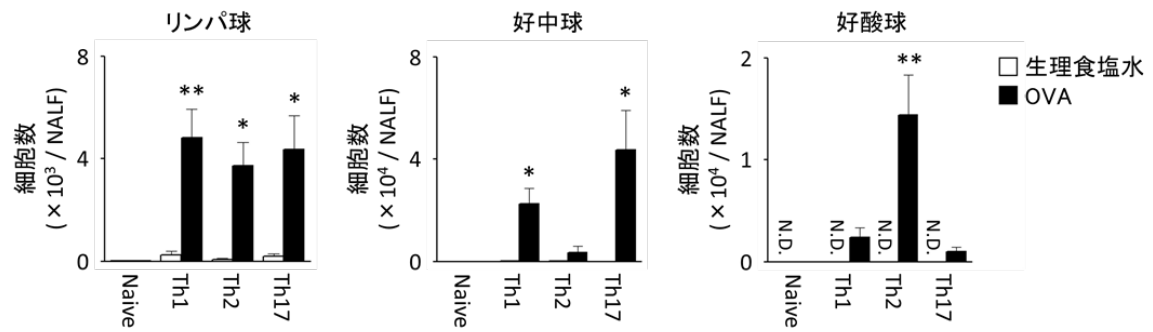


**Fig. 6 Th1細胞、Th2細胞およびTh17細胞によるサイトカイン産生**  
 In vitro で樹立した OVA 特異的 Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞のサイトカイン産生パターンを評価した。5 nM PMA および 1 μM イオノマイシンで 6 時間刺激し、細胞内 IFN-γ、IL-4、IL-10 および IL-17A をそれぞれ染色してフローサイトメトリーで測定した(A)。OVA323-339 ペプチドで 24 時間刺激し、培養上清中の IFN-γ、IL-4 および IL-17A 濃度を ELISA 法により測定した(B)。データは一群あたり 3 well の測定値の平均値±標準誤差で示した。\*\*p < 0.01 および \*\*\*p < 0.001 ; OVA 刺激した他の T 細胞サブセットとの比較(Dunn's 多重比較検定)。

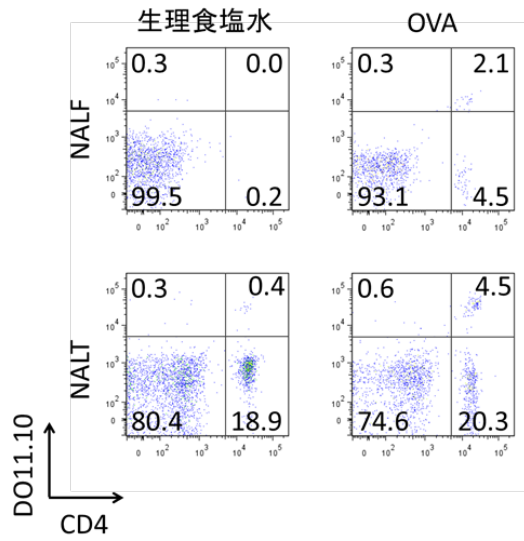
A



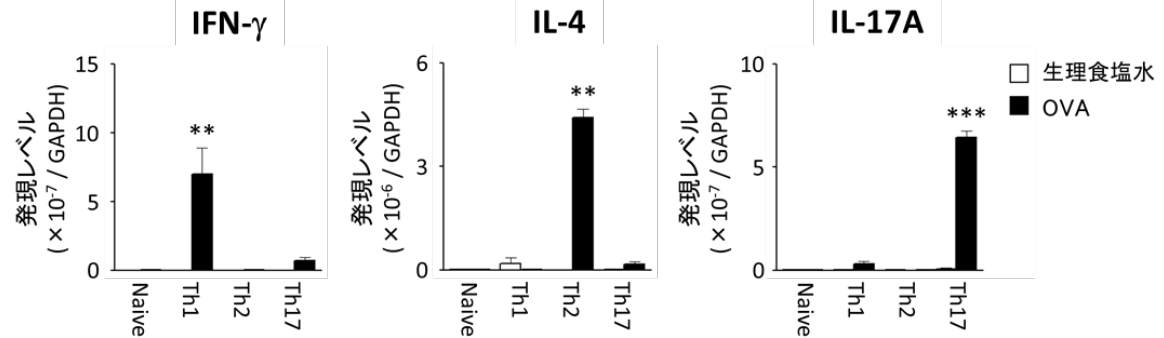
B



C



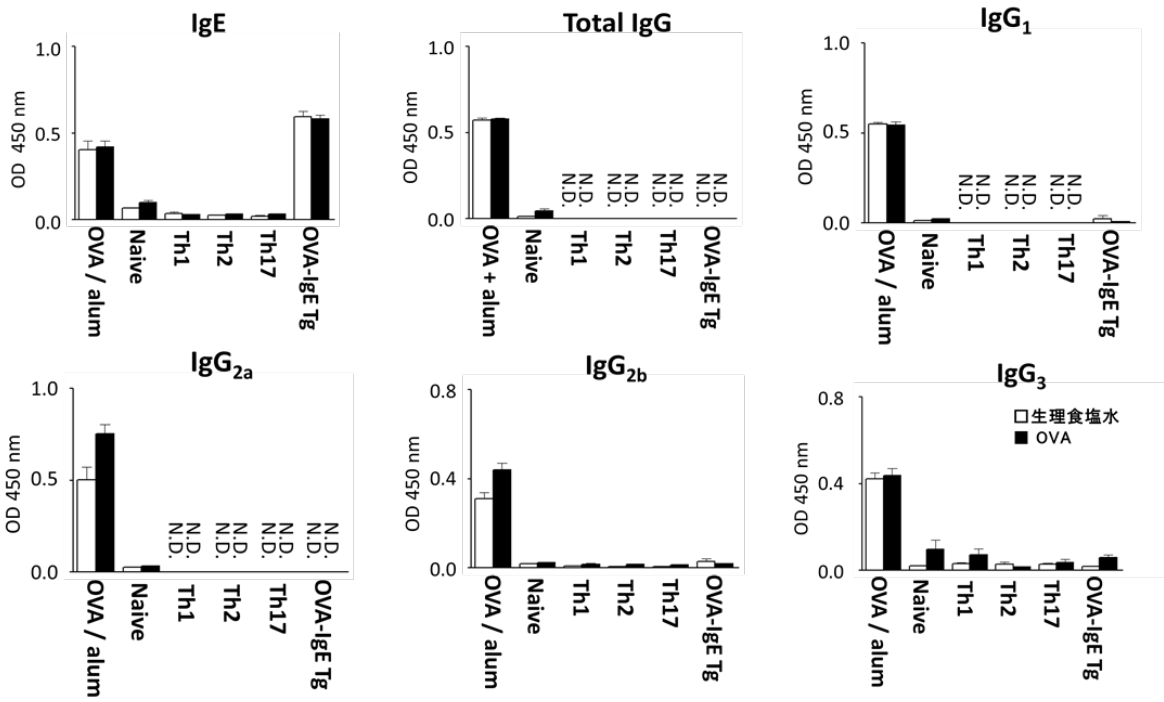
D



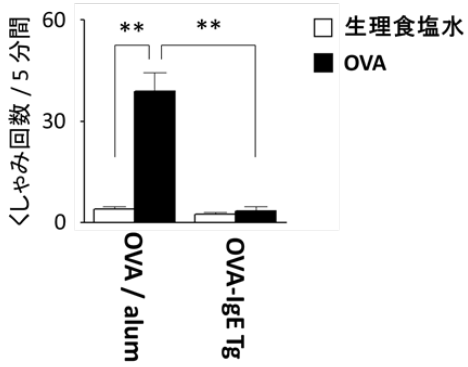
**Fig. 7 T 細胞移入マウスにおける NHR 亢進の発症**

In vitro で樹立した OVA 特異的 Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞を正常マウスに移入した。移入 24 時間後から 1 日 1 回、3 日間、OVA を IN/LV 投与し、最終抗原投与 6 時間後に NHR 亢進レベル (A)、NALF 中リンパ球数、好中球数および好酸球数(B)、Th2 細胞移入マウスの NALF および NALT 中に集積した DO11.10-TCR 陽性/CD4 陽性細胞(C)および鼻組織中 IFN- $\gamma$ 、IL-4 および IL-17A mRNA 発現レベル(D)を評価した。データは一群あたり 4-8 匹のマウスから得られた測定値の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  および \*\*\* $p < 0.001$  ; Naïve T 細胞移入/OVA 投与マウス群との比較 (Dunn's 多重比較検定)。

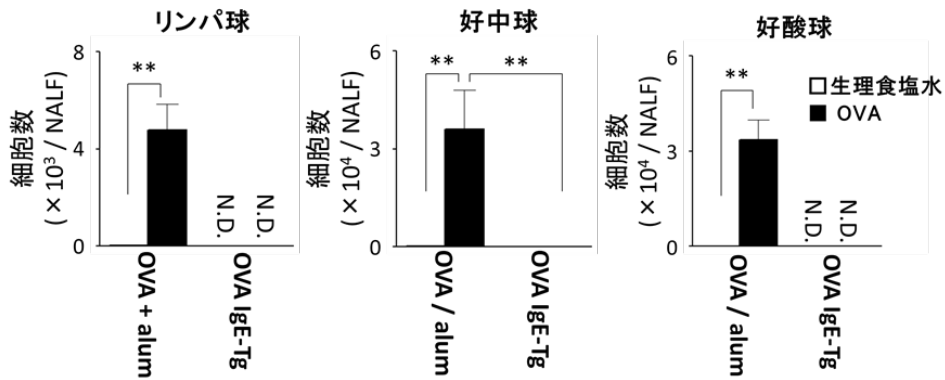
**A**



**B**



**C**



**Fig. 8 抗 OVA-IgE Tg マウス、全身抗原感作マウスおよび T 細胞移入マウスにおける NHR 亢進発症の比較**

Day 0, 7 14 および 21 に OVA で全身抗原感作した Balb/c マウス、in vitro で樹立した OVA 特異的 Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞を移入した正常マウスおよび未感作の抗 OVA-IgE Tg マウスに 1 日 1 回、3 日間、OVA を IN/LV 投与した。最終抗原投与 6 時間後に血清中 OVA 特異的 IgE、total IgG および IgG サブクラス(A)、NHR 亢進レベル(B) および NALF 中リンパ球数、好中球数および好酸球数(C)を評価した。データは一群あたり 4-8 匹のマウスから得られた測定値の平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$  ; OVA 全身感作/OVA 投与マウス群との比較 (Dunn's 多重比較検定)。

## 考察

本研究において、全身抗原感作および抗原投与したマウスで誘導される NHR 亢進の発症は CD4 陽性 T 細胞依存的であり、IgE/マスト細胞系および好酸球の関与は比較的小さい可能性が示された。特に CD4 陽性 T 細胞の中でも、それぞれのサブセットに分化した抗原特異的 T 細胞の重要性が示唆された。

IgE/マスト細胞系はアレルギー性鼻炎の病態形成に極めて重要な役割を果たす[11, 41, 42, 61]。好塩基球も抗原刺激を受けると活性化しアレルギー病態に関与することが近年多く報告されているが[62, 63]、本研究では好塩基球に対する検討は行っていない。しかしながら、マスト細胞同様に IgE 依存的に活性化する好塩基球も、少なくとも本研究の実験系においては NHR を発症させる可能性は低いと考えられる。加えて既報では抗原特異的 IgE 単独ではアレルギー性鼻炎病態へ与える影響が小さいことが報告されている[64]。以上より、IgE/マスト細胞系および好塩基球の関与は比較的小さい可能性が示唆された。

鼻粘膜に浸潤する炎症細胞のうち好酸球は NHR 亢進発症への関与が小さいことが欠損マウスでの実験の結果から示唆されたが、好中球に関しては欠損マウスや中和抗体が樹立されておらず、今回検討することができなかった。しかしながら、抗原投与した Th2 細胞移入マウスで確認されたごくわずかな好中球が NHR 亢進発症に強く関与する可能性は低いと考えられ、NHR 亢進の発症には好中球の関与は小さい可能性が考えられる。

本研究では、全身抗原感作モデル、CD4 陽性 T 細胞除去実験および抗原特異的 T 細胞移入モデルを利用して、CD4 陽性 T 細胞依存的に NHR 亢進が発症することを示した。アレルギー性鼻炎症状を模したマウスモデルはこれまでも報告されており、全身抗原感作し抗原投与したマウスではくしゃみ反応と鼻かき反応が鼻粘膜上への炎症細胞浸潤を伴って誘発され[65-68]、抗原特異的にくしゃみ反応の増加が誘導された[69, 70]。しかしながら、抗原非特異的な刺激によってもくしゃみ反応が誘発されるようになる NHR 亢進の発症に関するような研究はほとんど前例がない。

本研究のアレルギー性鼻炎の重症化の過程に CD4 陽性 T 細胞が直接的に関与するという結果は、臨床における薬理的解析とも合致する。主に T 細胞をターゲットとした薬剤であるベクロメタゾン、アレルギー性鼻炎患者の NHR 亢進と鼻炎症状を抑制した[11]。マウスモデルにおいても、T 細胞活性を抑制するタクロリムス投与によって抗原誘発炎症反応が抑制されており[12]、これらの結果は本研究結果を支持している。

臨床における一般的なアレルギー性鼻炎の病態は、IL-4 および IL-5 などのサイトカインが強く産生され、好中球に比べて好酸球が強く浸潤する



Th2 型であるとされてきた[71, 72]。Alum のアジュバンド効果を利用した動物モデルにおける抗原全身感作は主に Th2 型優位なアレルギー病態を誘導するが、一部 Th1 型および Th17 型様病態をも併発する非特異的な抗原感作とされる[73, 74]。本研究でも、Alum を用いた全身感作では鼻粘膜上での IL-4、IL-5 および IL-13 といった Th2 型に特徴的なサイトカイン産生と好酸球優位な細胞浸潤が、NHR 亢進発症を伴って抗原特異的に誘発された。それは抗原特異的 Th2 細胞移入モデルにおいても同様であった。一方、抗原特異的 Th1 細胞移入モデルでは IFN- $\gamma$  の産生が、抗原特異的 Th17 細胞移入モデルでは IL-17A の産生が抗原特異的にそれぞれ増強し、いずれも好中球優位な細胞浸潤パターンを示した。この結果はこれまでの Th1 細胞および Th17 細胞の研究結果とよく合致している[59]。本研究では Th2 細胞のみならず Th1 細胞と Th17 細胞も抗原特異的に NHR 亢進を発症したことから、NHR 亢進発症機序にはこれら T 細胞サブセット間で共通して産生される因子が関与する可能性が考えられる。

以上より、第三章では、アレルギー性鼻炎における BHR 亢進の発症に対し抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の強い関与が示された。

## 総括

気管支喘息とアレルギー性鼻炎はいずれも気道上で発症するアレルギー性疾患である。これらの疾患は病態の進行に伴って過敏性亢進を発症し、その結果、抗原非特異的な様々な刺激にも反応して症状が劇的に増強され病態が重症化する。気管支喘息は未だに死に至る可能性のある疾患であり、アレルギー性鼻炎は本邦ではスギ花粉症に代表される国民病とも言われていることから、これら疾患の重症化に対する研究は急務となっている。

本研究では気管支喘息とアレルギー性鼻炎に共通して発症し、病態の重症化を引き起こす過敏性亢進に影響する因子について解析した。これまで BHR 亢進発症に対しては動物モデルなどの研究から好酸球や T 細胞の関与が考えられてきたが[4-8]、臨床で奏功する治療法の開発には繋がっていない。一方、NHR 亢進の発症に対しては薬理的解析などを用い、T 細胞の関与を間接的に示唆した報告はあるが[11, 12]、遺伝子改変マウスなどを用いたより直接的な報告はほとんど見られない。

これら二種類の疾患は発症機序の類似性や炎症組織の解剖学的な連続性によりそれぞれの疾患が容易に影響しあう可能性が指摘されており[20]、実際、臨床での合併率は非常に高いことが知られている。本来、疾患の病態形成機序の正確な解析は他の疾患が影響しない状態で行うことが必須であるが、臨床においては合併率が高いこと、また動物を使った従来の研究においては合併の有無にまで検証を行ったモデルが稀有であったことが正確な解析を困難にしている原因の一つであると考えた。そこで第一章は気管支喘息またはアレルギー性鼻炎を選択的に惹起する抗原投与方法を検討し、他方の疾患の影響なしに正しく病態を評価できる新規マウスモデルを構築した。このモデルを以降の実験に用い、第二章は BHR 亢進発症に対する好酸球の関与について検討した。続く第三章は NHR 亢進発症に対する因子を探索した。

第一章では気管支喘息またはアレルギー性鼻炎を選択的に発症する新規マウスモデルを構築した。これまでに多用されてきた IN/HV 投与モデルマウスを解析すると、BHR 亢進の発症、くしゃみ反応の増加、下気道および鼻粘膜への炎症細胞浸潤が誘発され、気管支喘息とアレルギー性鼻炎が併発した状態であることが示された。その原因として、IN/HV 投与は鼻腔から下気道に多量の抗原を注入するためいずれの部位においてもアレルギー反応が誘発されたと考えた。そこで特異抗原を目的組織にのみ投与できるよう改良し、マイクロスプレイヤーを用いて下気道に直接抗原投与する IT 投与および少量の抗原を点鼻する LV/IN 投与を試みた。その結果、IT 投与では BHR 亢進の発症と下気道への炎症細胞浸潤が特徴的に誘発される気管支喘息が、IN/LV 投与では NHR 亢進の発症と鼻粘膜への炎症細胞

胞浸潤が特徴的に誘発されるアレルギー性鼻炎が、それぞれ選択的に惹起することが示された。以上より、第一章では IT 投与または IN/LV 投与を用い、疾患を選択的に惹起する新規マウスモデルを構築した。

第二章では、好酸球表面分子 Mfsd10 に対する新規モノクローナル抗体、M2 を用いて、好酸球が BHR 亢進発症に与える影響を検討した。Mfsd10 は近年の白血球系細胞の比較解析の結果、好酸球に特異的に発現することが明らかとなった分子である。IT 投与により気管支喘息を選択的に惹起したマウスに M2 処置すると下気道への好酸球浸潤が強力に抑制され、BHR 亢進発症に対しても抑制傾向を示した。以上から、BHR 亢進発症に対する好酸球の関与が示唆された。

第三章では NHR 亢進発症に関与する因子を複数の手法を用いて解析した。アレルギー性鼻炎を選択的に惹起したモデルの詳細な解析により、このマウスでは抗原非特異的な刺激によってもくしゃみ反応を増強する NHR 亢進が抗原特異的に発症していることが見いだされた。くしゃみ反応そのものはマスト細胞/IgE 系が強く関与するとされているが、マスト細胞欠損マウスおよび抗原特異的 IgE Tg マウスを用いた解析では、NHR 亢進の発症に伴うくしゃみ反応の増加にマスト細胞/IgE 系の関与は少ない可能性が示唆された。また、NHR 亢進の発症に伴って鼻粘膜中への好酸球浸潤が強誘発されていたが、好酸球欠損マウスの解析では NHR 亢進発症に対して好酸球の関与も限定的であることが示された。一方、CD4 陽性 T 細胞を末梢から除去すると NHR 亢進発症は抑制され、各種抗原特異的 T 細胞サブセット(Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞) 移入と抗原投与により NHR 亢進が強発症した。以上から、NHR 亢進発症に CD4 陽性 T 細胞の強い関与が示された。

本研究では、気管支喘息における BHR 亢進発症には好酸球の、アレルギー性鼻炎における NHR 亢進発症には CD4 陽性 T 細胞の強い関与をそれぞれ示した。この二種類の疾患はこれまで類似性や関連性が強調されてきたが、本研究にて過敏性亢進発症機序に相違点が存在する可能性が示唆されたことは非常に興味深い。その原因の一つとして考えられるのが、臨床における抗原の性情の違いである。本来の気管支喘息の主要抗原である Der p1 はシステインプロテアーゼ活性、アレルギー性鼻炎の主要抗原である Cry j1 はペクチン酸リアーゼ活性と酵素活性の差異があり、安定性や免疫原性なども抗原タンパク質により異なっている [75, 76]。その結果として、鼻腔と下気道におけるアレルギー反応性には元々相違点がある可能性が考えられる。さらに、気管支喘息とアレルギー性鼻炎では発症部位の構造や過敏性亢進発症により増強される症状の違いもあり、今後、本来の抗原タンパク質を用いた解析や症状ごとの検討など、過敏性亢進の発症機序の解明により詳細な解析が必須である。

過敏性亢進発症機序に対する好酸球およびCD4陽性T細胞のより詳細な影響については、いくつかの報告がある。活性化好酸球は強い細胞障害性を持つ主要塩基性タンパク質、好酸球陽イオン性タンパク質および好酸球ペルオキシダーゼなどを放出し、下気道上皮を傷害する。それにより知覚神経が露出し、刺激に対して過敏に反応するようになる[27, 28]。また、同じく好酸球が放出するロイコトリエンなどのメディエーターは平滑筋収縮や血管透過性亢進による浮腫を誘発する[28]。これらが反復することによりBHR亢進が発症に至る可能性がある。一方、CD4陽性T細胞は抗原特異的にサブスタンスPなどのニューロペプチドを産生し細胞外に放出することが近年示されている[77-79]。ラットやモルモットを用いた薬理的解析では、ニューロペプチド受容体に対する阻害剤は鼻閉および粘液の過剰分泌に効果を示した[65, 80, 81]。NHR亢進発症によるくしゃみ反応の増加に対するニューロペプチドの影響は不明だが、今後、CD4陽性T細胞が産生するニューロペプチドの効果について検討が求められる。

以上、本研究において病態の重症化のきっかけとなる過敏性亢進の発症に対し、気管支喘息では好酸球が、アレルギー性鼻炎ではCD4陽性T細胞が、それぞれ関与する可能性が示された。加えて、気管支喘息およびアレルギー性鼻炎いずれの解析も疾患を選択的に惹起した新規マウスモデルを利用したことから、一方の疾患の過敏性亢進は他方の疾患の影響なしでも独立的に発症しうる可能性が示唆された。BHR亢進およびNHR亢進の発症については一連の研究で機序の解明に取り組んだ報告はほとんど例がないが、本研究は類似性が強調されてきた二種類の疾患の発症機序を比較することにより相違点の存在する可能性を示した。さらに、本結果は新規モデルマウスの利用により従来解析に比べより正確な機序の解明がなされている可能性が高い。このことにより過敏性亢進発症の抑制に対する治療法の選択がより明確になるなどの利点が考えられる。本研究の結果が複雑なアレルギー性疾患病態の解明とその治療法の開発に大きく貢献するものと期待される。

## 謝辞

本学位論文の作成にあたり、発表の機会を与えて頂き、終始御懇切なるご指導、ご鞭撻、有益なご助言を賜りました東京薬科大学 生命科学部 分子生物化学研究室 井上英史教授に謹んで感謝いたします。

また、本研究の機会を恵与され、さらに遂行にあたり終始ご助言、ご指導、ご協力いただきました公益財団法人東京都医学総合研究所 花粉症プロジェクト 廣井隆親チームリーダー、佐伯真弓先生、北村紀子先生、山梨大学 総合分析実験センター 資源開発分野 神沼修准教授に心よりの感謝の意を表します。

また、共同研究の機会を頂戴しました独立行政法人国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 先端技術開発研究部 森晶夫先生、東京大学医科学研究所 感染・免疫大部門 感染遺伝学分野 本井祐二先生、公益財団法人東京都医学総合研究所 遺伝子改変動物室 米川博通先生、哺乳類遺伝プロジェクト 松岡邦枝先生には大変お世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、忙しい研究生活を支えてくれた家族に感謝いたします。

## 論文目録

本博士学位申請論文は、以下の論文およびその未発表結果の内容を総括したものである。

### 第一章

Antigen-induced mixed and separated inflammation in murine upper and lower airways. Saeki M, Nishimura T, Mori A, Kaminuma O and Hiroi T. *Allergol Int.* 2014;**63**:59-61.

### 第二章

Selective suppression of th2 cell-mediated lung eosinophilic inflammation by anti-major facilitator super family domain containing 10 monoclonal antibody. Nishimura T, Saeki M, Motoi Y, Kitamura N, Mori A, Kaminuma O and Hiroi T. *Allergol Int.* 2014;**63**:29-35.

### 第三章

Existence of antigen-specific immunoglobulin E is not sufficient for allergic nasal eosinophil infiltration in mice. Nishimura T, Saeki M, Kaminuma O, Matsuoka K, Yonekawa H, Mori A and Hiroi T. *Int Arch Allergy Immunol.* 2013;**161**:125-8.

Essential contribution of CD4<sup>+</sup> T cells to antigen-Induced nasal hyperresponsiveness in experimental allergic rhinitis. Nishimura T, Kaminuma O, Saeki M, Kitamura N, Matsuoka K, Yonekawa H, Mori A and Hiroi T. *PLOS ONE.* 2016;**11**:e0146686.

## 引用文献

1. ST Holgate, R Polosa: **Treatment strategies for allergy and asthma.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:218-30.
2. SJ Galli, M Tsai, AM Piliponsky: **The development of allergic inflammation.** *Nature* 2008, **454**:445-54.
3. ST Holgate, D Broide: **New targets for allergic rhinitis--a disease of civilization.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**:902-14.
4. G Garcia, C Taille, P Laveneziana, A Bourdin, P Chanez, M Humbert: **Anti-interleukin-5 therapy in severe asthma.** *Eur Respir Rev* 2013, **22**:251-7.
5. MJ Leckie, A ten Brinke, J Khan, Z Diamant, BJ O'Connor, CM Walls, AK Mathur, HC Cowley, KF Chung, R Djukanovic, et al: **Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response.** *Lancet* 2000, **356**:2144-8.
6. AA Humbles, CM Lloyd, SJ McMillan, DS Friend, G Xanthou, EE McKenna, S Ghiran, NP Gerard, C Yu, SH Orkin, et al: **A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling.** *Science* 2004, **305**:1776-9.
7. M Wills-Karp: **Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness.** *Annu Rev Immunol* 1999, **17**:255-81.
8. EW Gelfand: **Essential role of T lymphocytes in the development of allergen-driven airway hyperresponsiveness.** *Allergy Asthma Proc* 1998, **19**:365-9.
9. M Wills-Karp, J Luyimbazi, X Xu, B Schofield, TY Neben, CL Karp, DD Donaldson: **Interleukin-13: central mediator of allergic asthma.** *Science* 1998, **282**:2258-61.
10. R Venkayya, M Lam, M Willkom, G Grunig, DB Corry, DJ Erle: **The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, **26**:202-8.
11. FM Baroody, AA Cruz, LM Lichtenstein, A Kagey-Sobotka, D Proud, RM Naclerio: **Intranasal beclomethasone inhibits antigen-induced nasal hyperresponsiveness to histamine.** *J Allergy Clin Immunol* 1992, **90**:373-6.
12. JH Shin, HR Park, SW Kim, CS Park, JH Cho, YJ Park: **The effect of topical FK506 (tacrolimus) in a mouse model of allergic rhinitis.** *Am J Rhinol Allergy* 2012, **26**:e71-5.
13. SM Brugman, GL Larsen, PM Henson, J Honor, CG Irvin: **Increased lower airways responsiveness associated with sinusitis in a rabbit model.** *Am Rev Respir Dis* 1993, **147**:314-20.
14. AT Nials, S Uddin: **Mouse models of allergic asthma: acute and chronic**

- allergen challenge.** *Dis Model Mech* 2008, 1:213-20.
15. D Olmez, A Babayigit, G Erbil, O Karaman, A Bagriyanik, O Yilmaz, N Uzuner: **Histopathologic changes in two mouse models of asthma.** *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009, **19**:132-8.
  16. S Miyahara, N Miyahara, K Takeda, A Joetham, EW Gelfand: **Physiologic assessment of allergic rhinitis in mice: role of the high-affinity IgE receptor (FcεpsilonRI).** *J Allergy Clin Immunol* 2005, **116**:1020-7.
  17. J Corren, AD Adinoff, CG Irvin: **Changes in bronchial responsiveness following nasal provocation with allergen.** *J Allergy Clin Immunol* 1992, **89**:611-8.
  18. E Madonini, G Briatico-Vangosa, A Pappacoda, G Maccagni, A Cardani, F Saporiti: **Seasonal increase of bronchial reactivity in allergic rhinitis.** *J Allergy Clin Immunol* 1987, **79**:358-63.
  19. EH Ramsdale, MM Morris, RS Roberts, FE Hargreave: **Asymptomatic bronchial hyperresponsiveness in rhinitis.** *J Allergy Clin Immunol* 1985, **75**:573-7.
  20. J Kaufman, GW Wright: **The effect of nasal and nasopharyngeal irritation on airway resistance in man.** *Am Rev Respir Dis* 1969, **100**:626-30.
  21. J Kaufman, JC Chen, GW Wright: **The effect of trigeminal resection on reflex bronchoconstriction after nasal and nasopharyngeal irritation in man.** *Am Rev Respir Dis* 1970, **101**:768-9.
  22. R Shturman-Ellstein, RJ Zeballos, JM Buckley, JF Souhrada: **The beneficial effect of nasal breathing on exercise-induced bronchoconstriction.** *Am Rev Respir Dis* 1978, **118**:65-73.
  23. MP Griffin, ER McFadden, Jr., RH Ingram, Jr.: **Airway cooling in asthmatic and nonasthmatic subjects during nasal and oral breathing.** *J Allergy Clin Immunol* 1982, **69**:354-9.
  24. G Hens, U Raap, J Vanoirbeek, I Meyts, I Callebaut, B Verbinnen, BM Vanaudenaerde, P Cadot, B Nemery, DM Bullens, et al: **Selective nasal allergen provocation induces substance P-mediated bronchial hyperresponsiveness.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, **44**:517-23.
  25. PG Woodruff, R Khashayar, SC Lazarus, S Janson, P Avila, HA Boushey, M Segal, JV Fahy: **Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma.** *J Allergy Clin Immunol* 2001, **108**:753-8.
  26. J Bousquet, P Chanez, JY Lacoste, G Barneon, N Ghavanian, I Enander, P Venge, S Ahlstedt, J Simony-Lafontaine, P Godard, et al: **Eosinophilic inflammation in asthma.** *N Engl J Med* 1990, **323**:1033-9.



27. PD Collins, S Marleau, DA Griffiths-Johnson, PJ Jose, TJ Williams: **Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo.** *J Exp Med* 1995, **182**:1169-74.
28. ME Rothenberg, SP Hogan: **The eosinophil.** *Annu Rev Immunol* 2006, **24**:147-74.
29. DJ Song, JY Cho, SY Lee, M Miller, P Rosenthal, P Soroosh, M Croft, M Zhang, A Varki, DH Broide: **Anti-Siglec-F antibody reduces allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling.** *J Immunol* 2009, **183**:5333-41.
30. N Zimmermann, ML McBride, Y Yamada, SA Hudson, C Jones, KD Cromie, PR Crocker, ME Rothenberg, BS Bochner: **Siglec-F antibody administration to mice selectively reduces blood and tissue eosinophils.** *Allergy* 2008, **63**:1156-63.
31. S Senechal, O Fahy, T Gentina, H Vorng, M Capron, AF Walls, AR McEuen, MG Buckley, Q Hamid, B Wallaert, et al: **CCR3-blocking antibody inhibits allergen-induced eosinophil recruitment in human skin xenografts from allergic patients.** *Lab Invest* 2002, **82**:929-39.
32. Y Motoi, M Saeki, T Nishimura, K Katayama, N Kitamura, H Ichikawa, H Miyoshi, O Kaminuma, T Hiroi: **Establishment of monoclonal antibodies against a novel eosinophil-specific cell surface molecule, major facilitator super family domain containing 10.** *Immunol Lett* 2012, **147**:80-4.
33. S Mima, H Ushijima, HJ Hwang, S Tsutsumi, M Makise, Y Yamaguchi, T Tsuchiya, H Mizushima, T Mizushima: **Identification of the TPO1 gene in yeast, and its human orthologue TETRAN, which cause resistance to NSAIDs.** *FEBS Lett* 2007, **581**:1457-63.
34. H Ushijima, M Hiasa, T Namba, HJ Hwang, T Hoshino, S Mima, T Tsuchiya, Y Moriyama, T Mizushima: **Expression and function of TETRAN, a new type of membrane transporter.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **374**:325-30.
35. H Tateno, PR Crocker, JC Paulson: **Mouse Siglec-F and human Siglec-8 are functionally convergent paralogs that are selectively expressed on eosinophils and recognize 6'-sulfo-sialyl Lewis X as a preferred glycan ligand.** *Glycobiology* 2005, **15**:1125-35.
36. PS Foster, SP Hogan, AJ Ramsay, KI Matthaei, IG Young: **Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model.** *J Exp Med* 1996, **183**:195-201.
37. AB Kay: **The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma.** *Trends Mol Med* 2005, **11**:148-52.
38. E Nutku, H Aizawa, SA Hudson, BS Bochner: **Ligation of Siglec-8: a selective**

- mechanism for induction of human eosinophil apoptosis.** *Blood* 2003, **101**:5014-20.
39. E Nutku, SA Hudson, BS Bochner: **Mechanism of Siglec-8-induced human eosinophil apoptosis: role of caspases and mitochondrial injury.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **336**:918-24.
  40. M Zhang, T Angata, JY Cho, M Miller, DH Broide, A Varki: **Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils.** *Blood* 2007, **109**:4280-7.
  41. JN Baraniuk: **Mechanisms of allergic rhinitis.** *Curr Allergy Asthma Rep* 2001, **1**:207-17.
  42. SA Parikh, SH Cho, CK Oh: **Preformed enzymes in mast cell granules and their potential role in allergic rhinitis.** *Curr Allergy Asthma Rep* 2003, **3**:266-72.
  43. B Sin, A Togias: **Pathophysiology of allergic and nonallergic rhinitis.** *Proc Am Thorac Soc* 2011, **8**:106-14.
  44. S Kanthawatana, W Maturim, S Fooanant, M Manorot, M Trakultivakorn: **Evaluation of threshold criteria for the nasal histamine challenge test in perennial allergic rhinitis.** *Asian Pac J Allergy Immunol* 1997, **15**:65-9.
  45. AM Sanico, VE Koliatsos, AM Stanisiz, J Bienenstock, A Togias: **Neural hyperresponsiveness and nerve growth factor in allergic rhinitis.** *Int Arch Allergy Immunol* 1999, **118**:154-8.
  46. R Gerth Van Wijk, PH Dieges: **Comparison of nasal responsiveness to histamine, methacholine and phentolamine in allergic rhinitis patients and controls.** *Clin Allergy* 1987, **17**:563-70.
  47. A Konno, K Togawa, S Nishihira: **Seasonal variation of sensitivity of nasal mucosa in pollinosis.** *Arch Otorhinolaryngol* 1981, **232**:253-61.
  48. SM Walden, D Proud, LM Lichtenstein, A Kagey-Sobotka, RM Naclerio: **Antigen-provoked increase in histamine reactivity. Observations on mechanisms.** *Am Rev Respir Dis* 1991, **144**:642-8.
  49. P Bradding, IH Feather, S Wilson, ST Holgate, PH Howarth: **Cytokine immunoreactivity in seasonal rhinitis: regulation by a topical corticosteroid.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **151**:1900-6.
  50. K Masuyama, SJ Till, MR Jacobson, A Kamil, L Cameron, S Juliusson, O Lowhagen, AB Kay, QA Hamid, SR Durham: **Nasal eosinophilia and IL-5 mRNA expression in seasonal allergic rhinitis induced by natural allergen exposure: effect of topical corticosteroids.** *J Allergy Clin Immunol* 1998, **102**:610-7.
  51. O Ghaffar, S Laberge, MR Jacobson, O Lowhagen, S Rak, SR Durham, Q

- Hamid: **IL-13 mRNA and immunoreactivity in allergen-induced rhinitis: comparison with IL-4 expression and modulation by topical glucocorticoid therapy.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, **17**:17-24.
52. L Cameron, Q Hamid, E Wright, Y Nakamura, P Christodoulopoulos, S Muro, S Frenkiel, F Lavigne, S Durham, H Gould: **Local synthesis of epsilon germline gene transcripts, IL-4, and IL-13 in allergic nasal mucosa after ex vivo allergen exposure.** *J Allergy Clin Immunol* 2000, **106**:46-52.
53. KT Nouri-Aria, F O'Brien, W Noble, MR Jacobson, K Rajakulasingham, SR Durham: **Cytokine expression during allergen-induced late nasal responses: IL-4 and IL-5 mRNA is expressed early (at 6 h) predominantly by eosinophils.** *Clin Exp Allergy* 2000, **30**:1709-16.
54. SR Durham, S Ying, VA Varney, MR Jacobson, RM Sudderick, IS Mackay, AB Kay, QA Hamid: **Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma.** *J Allergy Clin Immunol* 1996, **97**:1356-65.
55. K Masuyama, MR Jacobson, S Rak, Q Meng, RM Sudderick, AB Kay, O Lowhagen, Q Hamid, SR Durham: **Topical glucocorticosteroid (fluticasone propionate) inhibits cells expressing cytokine mRNA for interleukin-4 in the nasal mucosa in allergen-induced rhinitis.** *Immunology* 1994, **82**:192-9.
56. VA Varney, QA Hamid, M Gaga, S Ying, M Jacobson, AJ Frew, AB Kay, SR Durham: **Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses.** *J Clin Invest* 1993, **92**:644-51.
57. SR Durham, AB Kay, Q Hamid: **Changes in allergic inflammation associated with successful immunotherapy.** *Int Arch Allergy Immunol* 1995, **107**:282-4.
58. A Mori, K Ogawa, K Someya, Y Kunori, D Nagakubo, O Yoshie, F Kitamura, T Hiroi, O Kaminuma: **Selective suppression of Th2-mediated airway eosinophil infiltration by low-molecular weight CCR3 antagonists.** *Int Immunol* 2007, **19**:913-21.
59. O Kaminuma, T Ohtomo, A Mori, D Nagakubo, K Hieshima, Y Ohmachi, Y Noda, K Katayama, K Suzuki, Y Motoi, et al: **Selective down-regulation of Th2 cell-mediated airway inflammation in mice by pharmacological intervention of CCR4.** *Clin Exp Allergy* 2012, **42**:315-25.
60. JU Ponikau, DA Sherris, GM Kephart, EB Kern, TA Gaffey, JE Tarara, H Kita: **Features of airway remodeling and eosinophilic inflammation in chronic rhinosinusitis: is the histopathology similar to asthma?** *J Allergy Clin Immunol* 2003, **112**:877-82.

61. G Di Lorenzo, P Mansueto, ML Pacor, N Martinelli, M Rizzo, V Ditta, MS Leto-Barone, A D'Alcamo, D Politi, I Pepe, et al: **Clinical importance of eosinophil count in nasal fluid in patients with allergic and non-allergic rhinitis.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009, **22**:1077-87.
62. MC Siracusa, BS Kim, JM Spergel, D Artis: **Basophils and allergic inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2013, **132**:789-801; quiz 788.
63. H Karasuyama, K Obata, T Wada, Y Tsujimura, K Mukai: **Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity.** *Allergy* 2011, **66**:1133-41.
64. T Nishimura, M Saeki, O Kaminuma, K Matsuoka, H Yonekawa, A Mori, T Hiroi: **Existence of antigen-specific immunoglobulin E is not sufficient for allergic nasal eosinophil infiltration in mice.** *Int Arch Allergy Immunol* 2013, **161 Suppl 2**:125-8.
65. R Long, Y Zhou, J Huang, L Peng, L Meng, S Zhu, J Li: **Bencycloquidium bromide inhibits nasal hypersecretion in a rat model of allergic rhinitis.** *Inflamm Res* 2015, **64**:213-23.
66. Y Wakasa, H Takagi, S Hirose, L Yang, M Saeki, T Nishimura, O Kaminuma, T Hiroi, F Takaiwa: **Oral immunotherapy with transgenic rice seed containing destructed Japanese cedar pollen allergens, Cry j 1 and Cry j 2, against Japanese cedar pollinosis.** *Plant Biotechnol J* 2013, **11**:66-76.
67. M Saeki, T Nishimura, A Mori, O Kaminuma, T Hiroi: **Antigen-induced mixed and separated inflammation in murine upper and lower airways.** *Allergol Int* 2014, **63 Suppl 1**:59-61.
68. Y Haenuki, K Matsushita, S Futatsugi-Yumikura, KJ Ishii, T Kawagoe, Y Imoto, S Fujieda, M Yasuda, Y Hisa, S Akira, et al: **A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis.** *J Allergy Clin Immunol* 2012, **130**:184-94 e11.
69. H Saito, K Howie, J Wattie, A Denburg, R Ellis, MD Inman, JA Denburg: **Allergen-induced murine upper airway inflammation: local and systemic changes in murine experimental allergic rhinitis.** *Immunology* 2001, **104**:226-34.
70. Q Zhang, K Lai, J Xie, G Chen, N Zhong: **Does unrestrained single-chamber plethysmography provide a valid assessment of airway responsiveness in allergic BALB/c mice?** *Respir Res* 2009, **10**:61.
71. T Takenaka, K Kuribayashi, H Nakamine, M Tsujimoto, Y Fukuhara, J Maeda, M Mihara, Y Uchiyama, Y Ohsugi: **Regulation by cytokines of eosinophilopoiesis and immunoglobulin E production in mice.** *Immunology* 1993, **78**:541-6.
72. K Robinson, T Bellaby, D Wakelin: **Vaccination against the nematode**

- Trichinella spiralis** in high- and low-responder mice. Effects of different adjuvants upon protective immunity and immune responsiveness. *Immunology* 1994, **82**:261-7.
73. S Nakae, C Lunderius, LH Ho, B Schafer, M Tsai, SJ Galli: **TNF can contribute to multiple features of ovalbumin-induced allergic inflammation of the airways in mice.** *J Allergy Clin Immunol* 2007, **119**:680-6.
74. CA Da Silva, P Pochard, CG Lee, JA Elias: **Chitin particles are multifaceted immune adjuvants.** *Am J Respir Crit Care Med* 2010, **182**:1482-91.
75. H Yasueda, Y Yui, T Shimizu, T Shida: **Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen.** *J Allergy Clin Immunol* 1983, **71**:77-86.
76. Y Ino, T Ando, M Haida, K Nakamura, M Iwaki, H Okudaira, T Miyamoto: **Characterization of the proteases in the crude mite extract.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989, **89**:321-6.
77. L Cantalupo, C Cioni, P Annunziata: **Expression of preprotachykinin-A mRNA isoforms and substance P production in T lymphocytes of human healthy subjects.** *Neurosci Lett* 2008, **434**:191-4.
78. JP Lai, SD Douglas, WZ Ho: **Human lymphocytes express substance P and its receptor.** *J Neuroimmunol* 1998, **86**:80-6.
79. A Blum, T Setiawan, L Hang, K Stoyanoff, JV Weinstock: **Interleukin-12 (IL-12) and IL-23 induction of substance p synthesis in murine T cells and macrophages is subject to IL-10 and transforming growth factor beta regulation.** *Infect Immun* 2008, **76**:3651-6.
80. S Sugahara, T Nabe, N Mizutani, H Takenaka, S Kohno: **Kinins are involved in the development of allergic nasal hyperresponsiveness in guinea pigs.** *Eur J Pharmacol* 2003, **476**:229-37.
81. T Nabe, N Tsuzuike, Y Ohtani, N Mizutani, S Watanabe, M Fujii, M Yoshimura, M Nagasawa, S Kohno: **Important roles of tachykinins in the development of allergic nasal hyperresponsiveness in guinea-pigs.** *Clin Exp Allergy* 2009, **39**:138-46.