

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790830

研究課題名(和文)ステロイド抵抗性を示すT細胞の特性解析

研究課題名(英文)Analysis and characterization of corticoid-resistant t-cells

研究代表者

神山 智(Kouyama, Satoshi)

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)・その他部局等・研究員

研究者番号：20626783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：重症喘息を特徴付けるT細胞レベルのステロイド抵抗性のメカニズムを解析し、治療介入の前提となる前臨床研究を行う目的に、ステロイド抵抗性喘息モデルを樹立した。OVAで感作したマウスからT細胞を選択的に単離し、抗原刺激、限界希釈を行い、T細胞をクローニングした。in vitroにおけるT細胞クローンのステロイド感受性と、T細胞クローン移入マウスに抗原チャレンジを行うT細胞移入喘息モデルを用いて、in vivoでのステロイド感受性を評価した。さらに治療介入をめざして、costimulatory signal阻害薬、および、低分子量シグナル伝達阻害薬のステロイド抵抗性改善効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：The understanding of the steroid-resistant mechanism of the T-cell level to characterize severe asthma is important as a premise of the treatment intervention. For the purpose of performing a preclinical study, we established a steroid-resistant asthmatic model. Steroid sensitivity evaluation was done using the steroid sensitivity of the in vitro T-cell clone and T-cell clone transfer mice asthma model (in vivo). By the administration of dexamethasone (Dex), lymphocyte count and eosinophil count in BALF of mice transfected with steroid-sensitive clone, was reduced in a dose-dependent manner. On the other hand, there was no significant reduction in the case where it is transferred with steroid-resistant clones. Namely, it was able to confirm that steroid sensitivity and resistance in the culture system (in vitro) accorded with the sensitivity in the asthma model (in vivo).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患

### 1. 研究開始当初の背景

軽症ないし中等症喘息の予後、QOL は改善したものの、入手可能なすべての治療薬を併用してもなお重症な喘息患者に対する治療効果は、きわめて不十分な水準に留まっていることが、AIRJ、GOAL study 等で明らかになっている。治療抵抗性の機序を解明し、新たな治療法を確立できれば、年間数千人の喘息死を未然に防止するとともに、患者、家族のQOL を改善し、1 割の重症患者が喘息医療支出の過半を占める医療費の削減にもつながることが期待される。ステロイド薬(グルココルチコイド)は、世界で最も使用されている薬の1 つであり、喘息治療において最も効果的な抗炎症薬としてファーストチョイスに推奨されている。一方で、種々の要因により引き起こされると考えられている重症・難治性喘息の特徴の一つに、ステロイド薬に対する抵抗性が挙げられる。ステロイド抵抗性の分子生物学的機序については、依然不明な点も多い。

喘息の病因には、活性化された T 細胞の関与が指摘されており、T 細胞レベルでのステロイド抵抗性についての研究が多くなされている。ステロイド抵抗性の喘息患者から採取された末梢血 T 細胞は、ステロイド感受性の喘息患者の T 細胞と比べて、*in vitro* における T 細胞の増殖能がステロイドにより抑制されにくいことが明らかになっている。しかし、*in vitro* における T 細胞のステロイド抵抗性が、ステロイド抵抗性喘息に直接関与しているかについてはまだ明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

重症・難治性喘息における T 細胞レベルでのステロイド抵抗性の病因と機序の解明を目指す。ステロイド薬に対して抵抗性を示す T 細胞クローンと、感受性を示す T 細胞クローンの特性解析を行い、ステロイド抵抗性因子の同定をめざす。ステロイド抵抗性の解明は、ステロイド抵抗性喘息の発症機序の解明と新規治療ターゲットの開発のみならず、ステロイド抵抗性を共通にする他の難治性炎症疾患の解決にもつながるものと期待される。

### 3. 研究の方法

(1) OVA 特異的 T 細胞クローンの細胞増殖アッセイ及びサイトカインアッセイ

卵白アルブミン(OVA) 特異的 T 細胞クローンを当研究室で確立し、無処置マウスに移入し、液性免疫を成立させていないマウス喘息モデルを用いた(図 1)。OVA 特異的 T 細胞クローンの維持は既報の方法で行った(Kaminuma, O. *et al. Am. J. respire. Cell Mol. Biol.* (1997) **16**, 448-454)。

*in vitro* アッセイとしては、OVA 特異的 T 細胞クローンを、30 Gy の X 線を照射して調整した脾臓由来の抗原提示細胞(APC)と OVA で刺激し、

96 ウェルプレートにて培養した。代表的なステロイド薬として知られるデキサメタゾン(DEX)を1、10、100、1000 nM の終濃度で添加した。48 時間培養上清の一部を回収してサンドイッチ ELISA 法により Th2 サイトカイン IL-4、IL-5、IL-13 と Th1 サイトカイン IFN- $\gamma$  の産生を特異的サンドイッチ ELISA により測定した。細胞の入ったウェルはトリチウム標識チミジンを追加して 17 時間後に細胞増殖をアッセイした。

*in vitro* における増殖応答のステロイド感受性によって、ステロイド感受性 T 細胞クローンと抵抗性 T 細胞クローンを選んだ。

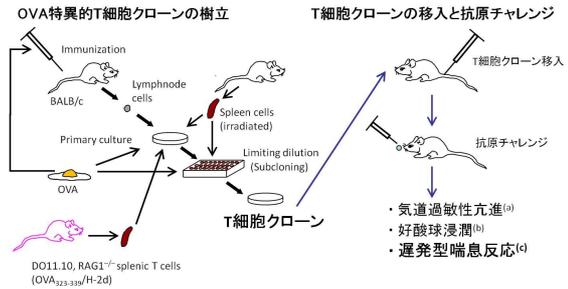


図 1 OVA 特異的 T 細胞クローンの確立と T 細胞クローン移入喘息モデルマウス

- Kaminuma, O., *et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16:448-454. Nakata, A., *et al. Br. J. Pharmacol.* 124:1425-1432.
- Nakata, A., *et al. Int. Immunol.* 13:329-339.
- Otomo, T. *et al. Int. Arch. Allergy Immunol.* 149 (suppl 1):2-6.

### (2) OVA 特異的 T 細胞クローン移入喘息モデルマウスを用いた解析

BALB/c マウスの脾臓細胞由来 APC と OVA による刺激を定期的に行い、IL-2 を培地中に添加することで T 細胞クローンを維持、増殖した。OVA 特異的 T 細胞クローンを用いた喘息モデルマウスのアッセイは、以下に示すスケジュールに沿って行った(図 2)。

- Day 1 T細胞クローン移入
- Day 2 OVAチャレンジ、DEX投与、Penh測定
- Day 3 DEX投与、Penh測定
- Day 4 BALFの回収

図 2 *in vivo* の実験の流れ

初日に抗原刺激のレストした T 細胞クローンを回収し、 $1 \times 10^7$  cells/head に調製して尾静脈から BALB/c マウスに移入した。翌日に OVA 経鼻チャレンジ、DEX 皮下投与(0, 1, 3 mg/kg)を行った。3 日目(抗原チャレンジから 48 時間後)に、無拘束全身プレチスモグラフ(BUXCO)により Penh 測定を行った。その後 BALF の回収を行い、BALF 中の単球・好中球・好酸球・好塩基球・リンパ球数を計測した。BALF 中のサイトカイン濃度は、サンドイッチ

ELISA 法にて測定した。さらに、肺・気管支組織を採取し、ギムザ染色により組織の好酸球浸潤について評価した。以上の呼吸機能の測定、肺・気管支の病理組織学的解析を、ステロイド感受性 T 細胞クローン (BF7, T6-2, T6-10)、ステロイド抵抗性 T 細胞クローン (T5-1, T6-4, T6-7) において行い、各 T 細胞クローンが惹起する喘息症状を把握するとともに、DEX 投与によりそれらの症状がどの程度抑制されるか評価した。

分子生物学的見地から T 細胞クローンのステロイド抵抗性の機序を明らかにするため、DNA マイクロアレイを用いて、ステロイド存在下における遺伝子発現の網羅的解析を行った。APC の影響を排除するため、各 T 細胞クローンを固相化抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体により活性化させ、DEX を終濃度 1000 nM となるように添加して培養した。培養開始 24 時間後に細胞を回収して、総 RNA の抽出を行い、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ステロイド抵抗性 T 細胞クローンと喘息モデルノ樹立

OVA 特異的 T 細胞クローンを複数樹立し、*in vitro*における増殖応答のステロイド感受性を評価した。T 細胞クローン BF7, T6-2, T6-10 は 100 nM の DEX 濃度で顕著に細胞増殖が抑制された (図 3)。T 細胞クローン T5-1, T6-4, T6-7 は 1000 nM の DEX 濃度において、50%以上の細胞増殖を維持した。この結果よりステロイド感受性 T 細胞クローン (BF7, T6-2, T6-10) と抵抗性 T 細胞クローン (T5-1, T6-4, T6-7) を選んだ。

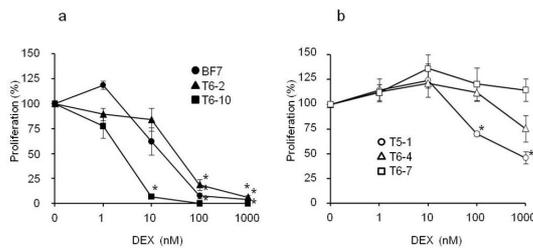


図 3 *in vitro*における T 細胞クローンの増殖

T 細胞クローンを APC、OVA とともに培養し、各濃度の DEX を添加した。培養 48 時間後にトリチウム標識チミジンを添加し、18 時間後にパルス測定をして細胞増殖能を評価した。\* $p < 0.05$ : DEX 無添加時の増殖を 100%として比較

- a. ステロイド感受性の T 細胞クローン BF7, T6-2, T6-10
- b. ステロイド抵抗性の T 細胞クローン T5-1, T6-4, T6-7

ELISA 法によりサイトカイン濃度を測定した。DEX 濃度 0 ~ 1000 nM 下の APC・抗原共刺激 T 細胞におけるサイトカイン産生量から  $IC_{50}$  を求め、*in vitro*における T 細胞クローンのステロイド感受性を評価した (図 4)。

ステロイド感受性クローン BF7 は、IL-4 を  $12.2 \times 10^3$  pg/ml 産生し、 $IC_{50}$  は 31.9 nM、IL-5 を  $17.3 \times 10^5$  pg/ml 産生し、 $IC_{50}$  は 28.9 nM、

IL-13 を  $48.5 \times 10^3$  pg/ml 産生し、 $IC_{50}$  は 6.3 nM だった。IFN- $\gamma$  は検出されなかった。T6-2 は、IL-13 を  $3.3 \times 10^3$  pg/ml、IFN- $\gamma$  を  $86.2 \times 10^3$  pg/ml 産生し、 $IC_{50}$  は 6.3 nM、13.1 nM だった。IL-4 及び IL-5 は検出されなかった。T6-10 は IL-5 を  $23.2 \times 10^3$  pg/ml、IL-13 を  $7.2 \times 10^3$  pg/ml 産生し、 $IC_{50}$  は 5.7 nM、3.8 nM だった。IL-4 及び IFN- $\gamma$  は検出されなかった。次いでステロイド抵抗性クローン T5-1 は、IL-13 を  $0.4 \times 10^3$  pg/ml、IFN- $\gamma$  を  $103.2 \times 10^3$  pg/ml 産生し、 $IC_{50}$  は 27.3 nM と 20.9 nM だった。IL-4、IL-5 は検出されなかった。T6-4 は、IL-13 を  $0.7 \times 10^3$  pg/ml、IFN- $\gamma$  を  $178.0 \times 10^3$  pg/ml 産生し、 $IC_{50}$  は 24.5 nM、114.6 nM だった。IL-4、IL-5 は検出されなかった。T6-7 は、IFN- $\gamma$  を  $137.2 \times 10^3$  pg/ml 産生し、 $IC_{50}$  は 43.3 nM だった。IL-4、IL-5、及び IL-13 は検出されなかった。ステロイド感受性 T 細胞クローン BF7, T6-10 は、Th2 サイトカイン IL-4、IL-5、及び IL-13 の産生が優位で、ステロイド抵抗性 T 細胞クローン T5-1, T6-4, T6-7 のいずれも、Th1 サイトカイン IFN- $\gamma$  の産生が優位だった。増殖反応がステロイド抵抗性を示すクローンも、サイトカイン産生はステロイド感受性であることが明らかになった (表 1)。

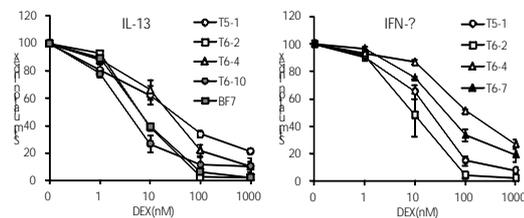


図 4 *in vitro*における T 細胞クローンのサイトカイン産生

T 細胞クローンを APC、OVA とともに培養し、各濃度の DEX を添加した。培養 48 時間後に培養上清を回収し、ELISA アッセイより評価した。

表 1 . T 細胞クローンの細胞増殖とサイトカイン産生に対する DEX の効果

		BF7	T6-2	T6-10	T5-1	T6-4	T6-7
Proliferative responses	$IC_{50}$ (nM)	27.2	32.3	2.4	664.5	>1000	>1000
	$IC_{50}$ (%)	92	95	100	67	43	31
	$IC_{50}$ (%)	90	-	-	-	-	-
IL-4 <sup>a</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	12.2	ND	ND	ND	ND	ND
	$IC_{50}$ (nM)	31.9	-	-	-	-	-
	$IC_{50}$ (%)	90	-	-	-	-	-
IL-5 <sup>a</sup>	$\times 10^5$ pg/ml	17.3	ND	23.2	ND	ND	ND
	$IC_{50}$ (nM)	28.9	-	5.7	-	-	-
	$IC_{50}$ (%)	91	-	98	-	-	-
IL-13 <sup>a</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	48.5	3.3	7.2	0.4	0.7	ND
	$IC_{50}$ (nM)	6.3	6.3	3.8	27.3	24.5	-
	$IC_{50}$ (%)	98	98	89	79	90	-
IFN- $\gamma$ <sup>a</sup>	$\times 10^3$ pg/ml	ND	86.2	ND	103.2	178.0	137.2
	$IC_{50}$ (nM)	-	13.1	-	20.9	114.6	43.3
	$IC_{50}$ (%)	-	98	-	92	73	80

また、*in vivo*におけるサイトカイン産生を調べるため、T 細胞クローン移入喘息モデルマウスより採取した BALF 中の好酸球数を計測し、サイトカイン濃度を測定した (図 5, 表 2)。

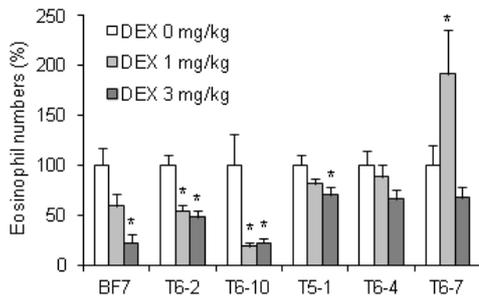


図5 T細胞クローン移入マウスから採取したBALF中の好酸球数

T細胞クローンをマウスに移入し、OVAチャレンジ、DEX皮下投与(0, 1, 3 mg/kg)を行った。BALFを採取し、好酸球数を計測した。\* $p < 0.05$ : DEX 0 mg/kg時の好酸球数を100%として比較

表2 . T細胞クローン移入マウスから採取したBALF中のサイトカイン産生

	DEX	BF7	T6-2	T6-10	T5-1	T6-4	T6-7
IFN- $\gamma$	0mg/kg	19.2 $\pm 1.3$	302.2 $\pm 173.6$	29.6 $\pm 2.3$	35.3 $\pm 3.6$	387.7 $\pm 117.4$	38 $\pm 2.7$
	1mg/kg	25.1 $\pm 2.1$	322.2 $\pm 257.8$	53.1 $\pm 4.5$	44.1 $\pm 3.4$	415.3 $\pm 150.6$	75.9 $\pm 9.1$
	3mg/kg	20.6 $\pm 2.8$	102.7 $\pm 36.5$	43.8 $\pm 3.8$	44.8 $\pm 3.0$	213.3 $\pm 57.4$	42 $\pm 5.6$
IL-4	0mg/kg	173.2 $\pm 80.9$	20.3 $\pm 3.6$	51.3 $\pm 5.6$	52.6 $\pm 10.9$	27 $\pm 5.2$	19.7 $\pm 1.4$
	1mg/kg	141.8 $\pm 20.1$	39.5 $\pm 5.3$	109.2 $\pm 6.8$	88.5 $\pm 11.8$	43.4 $\pm 6.0$	61.1 $\pm 1.6$
	3mg/kg	103.7 $\pm 27.3$	41.3 $\pm 8.9$	89.5 $\pm 7.6$	96.1 $\pm 13.3$	40.5 $\pm 6.1$	51.1 $\pm 5.9$
IL-5	0mg/kg	663.3 $\pm 222.9$	32 $\pm 8.0$	116.8 $\pm 12.2$	105.8 $\pm 25.5$	50.4 $\pm 12.8$	34 $\pm 4.0$
	1mg/kg	1173.8 $\pm 282.6$	17.9 $\pm 13.9$	168.1 $\pm 15.6$	126.2 $\pm 24.1$	19.7 $\pm 13.2$	69.8 $\pm 1.7$
	3mg/kg	598.3 $\pm 227.3$	22 $\pm 17.8$	131.2 $\pm 15.7$	133.3 $\pm 36.5$	17.9 $\pm 12.1$	42.2 $\pm 11.5$
IL-13	0mg/kg	99.9 $\pm 26.4$	40 $\pm 3.9$	80.1 $\pm 6.8$	72.8 $\pm 12.7$	45.4 $\pm 6.5$	38.9 $\pm 1.8$
	1mg/kg	143.2 $\pm 17.0$	48.4 $\pm 13.8$	217 $\pm 18.8$	186.8 $\pm 28.9$	66.7 $\pm 14.2$	115.9 $\pm 0.9$
	3mg/kg	83.5 $\pm 17.4$	54.6 $\pm 22.2$	163.8 $\pm 19.4$	201.8 $\pm 43.4$	68.9 $\pm 14.0$	97.8 $\pm 15.1$

T細胞クローンをマウスに移入し、OVAチャレンジ、DEX皮下投与(0, 1, 3 mg/kg)を行った。BALFを採取し、ELISA法よりアッセイした。

*in vitro*実験でステロイド感受性を示すT細胞クローンを移入したマウスでは、*in vivo*実験において、DEXの容量依存的に肺気道組織へ浸潤する好酸球の数が有意に減少した(図5)。しかし、ステロイド抵抗性を示すT細胞クローンを移入したマウスにおいて、有意な好酸球数の減少は見られなかった(図5)。無処置BALB/cマウスに各T細胞クローンを移入し、OVAチャレンジとDEXの皮下投与(0, 1, 3 mg/kg)を行った。気管支肺胞洗浄はOVAチャレンジの48時間後に行い、BALFに含まれるマクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球数を計測した(図6、7)。*in vitro*の実験においてステロイド感受性T細胞クローンに分類されたBF7、T6-2、T6-10を移入した場合では、BALF中の好酸球数とリンパ球数は、投与したDEXの用量依存的に減少した。それに対して、ステロイド抵抗性T細胞クローンのT6-4、T6-7を移入した場合は、BALF中の好酸球数とリンパ球数は有意には減少しなかった。T5-1を移入した場合は、3 mg/kg

のDEX投与によりBALF中の好酸球数が30%減少した。

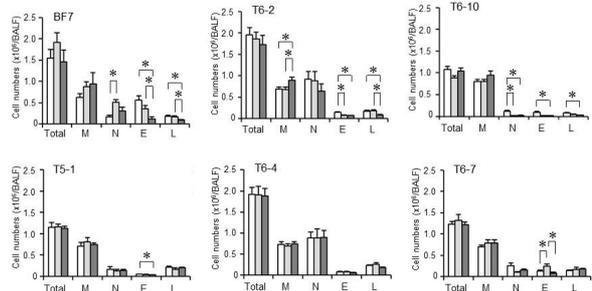


図6 . T細胞クローン移入モデルBALF中の炎症細胞数

T細胞クローンを無処置BALB/cマウスに移入し、OVAチャレンジ、DEXの皮下投与を行った。チャレンジ48時間後にBALFを回収し、BALF中の炎症細胞を計測した。図中、DEX 0 mg/kg:白、DEX 1 mg/kg:薄グレー、DEX 3 mg/kg:濃グレー、Total:総細胞数、M:マクロファージ、N:好中球、E:好酸球、L:リンパ球、とした。用いたマウス数は、BF7 (n=6)、T6-2 (n=7-11)、T6-10 (n=6-9)、T5-1 (n=6)、T6-4 (n=10-12)、T6-7 (n=5-13)である。\* $p < 0.05$

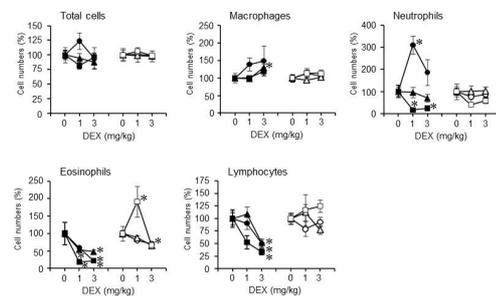


図7 . T細胞クローン移入マウスから採取したBALF中の炎症細胞数の相対変化

T細胞クローンを無処置BALB/cマウスに移入し、OVAチャレンジ、DEXの皮下投与を行った。チャレンジ48時間後にBALFを回収し、BALF中の炎症細胞を計測した。DEX 0 mg/kgの時の細胞数を100%とした相対値で表した。用いたマウス数は、BF7 (n=6)、T6-2 (n=7-11)、T6-10 (n=6-9)、T5-1 (n=6)、T6-4 (n=10-12)、T6-7 (n=5-13)である。\* $p < 0.05$ : Dex 0 mg/kgの時の細胞数と比較

以上の結果から、*in vitro*でのステロイド感受性解析によりステロイド感受性とステロイド抵抗性に分類されたT細胞クローンが、*in vivo*におけるステロイド感受性解析においても、ステロイド感受性のT細胞クローンを移入したマウスはステロイド感受性であり、一方でステロイド抵抗性のT細胞クローンを移入したマウスはステロイドに対して抵抗性を示すことがわかった。すなわち、*in vitro*で解析されたT細胞クローンのステロイド感受性は、*in vivo*におけるT細胞クローン移入喘息モデルのステロイド感受性と一対一で対応し得るものであった(図8)。

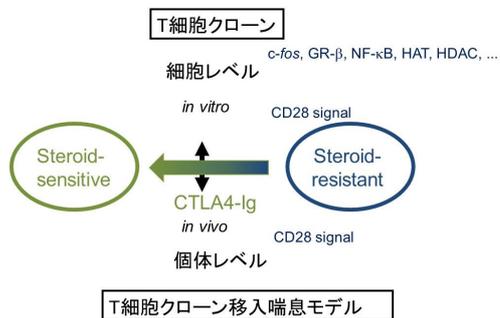


図8 . 細胞レベル *in vitro* と個体レベル *in vivo* でのステロイド感受性が一致する

好酸球自体は、ステロイドに対して感受性が高いことは良く知られているが、*in vivo* における好酸球浸潤は、T細胞由来のサイトカインや様々な接着分子シグナルの影響を受けるため、ステロイド感受性/抵抗性Thクローン移入モデルで、ステロイド反応性が異なるものと考えられる。さらに詳細なメカニズムを解析することに興味を持たれる。

ステロイド抵抗性の喘息患者から採取された末梢血T細胞は、ステロイド感受性が極めて低く、DEXに対する $IC_{50}$ は1000 nM以上であり、ステロイド感受性の喘息患者の約100倍であると見積もられている。我々のT細胞クローンのステロイド感受性解析では、ステロイド感受性のT細胞クローンとステロイド抵抗性のT細胞クローンのDEXに対する $IC_{50}$ は、20倍から500倍の差となった。ステロイド感受性が大変低いという点において、ステロイド抵抗性T細胞クローンとステロイド抵抗性の喘息患者から採取された末梢血T細胞は大変類似しており、我々のステロイド抵抗性T細胞クローンはステロイド抵抗性喘息のT細胞の性質を表していると言える。今回の結果は、ステロイド抵抗性T細胞クローンの移入によるステロイド抵抗性喘息モデルを構築したものと考えられる。

DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析ではステロイド抵抗性に関連する候補遺伝子が複数挙げられたものの、ステロイド抵抗性の機序となる原因遺伝子については未だ特定できていない(現在解析中)。結論として、本研究課題において、ステロイド感受性T細胞クローンとステロイド抵抗性T細胞クローンについて、*in vivo* と *in vitro* 両面から特性解析できた。ステロイドが主要な喘息の治療薬であり、T細胞の活性化が喘息反応の機序の一部として示唆される以上、T細胞のステロイドに対する感受性と抵抗性の研究は重要である。本喘息モデルは、ヒト以外ではじめてステロイド抵抗性喘息病態を解析できる実験系であり、今後種々の治療介入実験を行うことで、既存の治療薬の効果に限界のある重症・難治症例の治療法開発に向けて、病態解析、治療薬効果解析の両面で大いに役立つものと期待される。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

1. Abe, A., Koyama, S., Ohtomo, T., Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. 2012. Murine T cell-derived contractile activity for bronchial smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 158 (Suppl 1):7-10.

2. Koyama, S., Ohtomo-Abe, A., Kitamura, N., Kaminuma, O., and Mori, A. 2013. A contraction assay system using primary cultured mouse bronchial smooth muscle cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161 (Suppl 1):93-97.

[学会発表](計 14件)

1. Mori, A., Abe, A., Koyama, S., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Taniguchi, M., Ohtomo, M., Maeda, Y., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., and Kaminuma, K. 2012. Treatment for steroid-resistant asthma model. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2012. Programme p.56 (Geneva) 2012/06/16-20

2. Mori, A., Abe, A., Koyama, S., Yamaguchi, M., Enoki, M., Iijima, Y., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Taniguchi, M., Ohtomo, M., Maeda, Y., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., and Kaminuma, K. 2012. Blocking costimulatory signal for treating steroid-resistant asthma model. European Respiratory Society 2012 Annual Congress. Final programme p.292 (Vienna) 2012/09/1-5

3. Mori, A., Abe, A., Koyama, S., Yamaguchi, M., Enoki, M., Iijima, Y., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Taniguchi, M., Ohtomo, M., Maeda, Y., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., and Kaminuma, K. 2012. Steroid responsiveness of peripheral blood T cells derived from steroid sensitive, steroid dependent, and steroid resistant asthmatics, and induction of steroid resistance by costimulatory signal. European Respiratory Society 2012 Annual Congress. Programme p.14 (Gothenburg) 2012/10/11-13

4. Mori, A., Koyama, S., Abe, A., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., and Kaminuma, O. 2013. T cell-induced late phase asthmatic response in mice. 2013 American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual meeting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2):128 (San Antonio) 2013/2/22-2/26

5. Mori, A., Koyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Itoh, J., Saito, N., Minami,

- T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., Ohtomo, T., and Kaminuma, O. 2013. Adoptive transfer of Th clones confer late-phase asthmatic response in mice. European Academy of Allergy and Clinical Immunology-World Allergy Organization World Allergy & Asthma Congress 2013, Final program p.58 (Milan) 2013/6/22-26
6. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Abe, A., Ohtomo, T., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2013. Broncho-constriction mediated by T cells - an adoptive transfer model. 2013 Asia Pacific Congress of Allergy and Clinical Immunology, Allergy 68 (Suppl 98):15 (Taipei) 2013/11/14-17
7. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2014. Establishment and treatment of a steroid resistant asthma model by adoptive transfer of helper T cell clones. 2014 American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology Annual meeting. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2):128 (San Diego) 2014/2/28-3/4
8. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Abe, A., Ohtomo, T., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2014. Broncho-constriction mediated by activated T cells in humans and mice. *Airway Vista* 2014. *Respirology* 19 (Suppl. 1):18 (Seoul) 2014/3/28-29
9. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Abe, A., Ohtomo, T., Fukuhara, M., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2014. Study on T cell-induced bronchoconstriction in vivo and in vitro. 2014 World Asthma COPD Forum 2014 (New York) 2014/4/26-29
10. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Abe, A., Ohtomo, T., Fukuhara, M., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2014. Airflow limitation caused by activated T cells. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2014, Final program p. (Copenhagen) 2014/6/7-11
11. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Abe, A., Ohtomo, T., Fukuhara, M., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2014. T cell induced-bronchoconstriction *in vitro* and *in vivo*. Collegium Internationale Allergologicum 2014 Meeting Final program p. (Petersberg) 2014/9/13-18
12. Mori, A., Kouyama, S., Yamaguchi, M., Iijima, Y., Abe, A., Ohtomo, T., Fukuhara, M., Itoh, J., Hayashi, H., Minami, T., Watarai, K., Mitsui, C., Oshikata, C., Tanimoto, H., Fukutomi, Y., Sekiya, K., Tsuburai, T., Taniguchi, M., Maeda, Y., Ohtomo, M., Hasegawa, M., Akiyama, K., and Kaminuma, O. 2014. Analysis of T cell-dependent bronchoconstriction. Asian Pacific Society of Respirology 2014 Congress Final program p. (Bali) 2014/11/13-16
13. 神山 智、安部暁美、山口美也子、飯島 葉、榎 美香、大友隆之、神沼 修、森 晶夫：培養マウス気管支平滑筋細胞ゲルを用いたT細胞クローン由来気管支収縮活性の評価、アレルギー・好酸球研究会 2012、抄録集 p.22、2012.6.23 (東京)
14. 神山 智、大友暁美、大友隆之、山口美也子、飯島 葉、森 晶夫：非アトピー型喘息のマウスモデル作成と解析、日本職業・環境アレルギー学会 2013、抄録集 p.41、2013.7.5-6 (相模原)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

神山 智 (Kouyama Satoshi)  
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 先端技術開発研究室  
研究員

研究者番号：20626783

### (2)研究分担者

森 晶夫 (Mori Akio)  
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長

研究者番号：80251247

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：