

学 位 論 文  
Doctor's Thesis

論文題名 : 喘息患者末梢血リンパ球の気道組織への浸潤  
—SCID マウスへの移植気管支での検討—

(T cells of atopic asthmatics preferentially infiltrate into human  
bronchial xenografts in SCID mice)

著者名 : 津守 香里  
Kaori Tsumori

指導教官名 : 内科学第一担当教授  
佐々木 裕

審査員名

免疫学担当教授	阪口 薫雄
細胞病理学担当教授	竹屋 元裕
免疫識別学担当教授	西村 泰治
エイズ学研究センター予防開発分野担当教授	岡田 誠治

2003年度

## 目 次

1. 要旨	1
2. 発表論文リスト	5
3. 謝辞	6
4. 略語一覧	7
5. 研究の目的と背景	8
5-(1) 気管支喘息とリンパ球	8
5-(2) リンパ球と臓器特異性	9
5-(3) 動物モデル	10
5-(4) C.B.-17 SCID マウスを用いた疾患モデル	10
5-(5) 本研究の目的	11
6. 実験方法	12
6-(1) ヒト気管支組織の採取及び処理	12
6-(2) ヒト PBMC 採取及び処理	12
6-(3) SCID マウス	13
6-(4) 気管支移植	13
6-(5) ヒト PBMC 移植	13
6-(6) 組織の回収	13
6-(7) Flowcytometry	14
6-(8) 免疫組織化学染色	14

6-(9)	組織の定量、評価法	15
6-(10)	RT-PCR	15
6-(11)	統計学的解析	15
7.	実験結果	16
7-(1)	気管支喘息患者、健常者、アトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者の PBMC の表面抗原のプロフィール	16
7-(2)	気管支喘息患者、健常者の PBMC 及び移植前気管支のサイトカイン mRNA の発現	16
7-(3)	PBMC を移植したマウス末梢血有核細胞中に占めるヒト CD3 陽性細胞の割合	16
7-(4)	ヒト気管支 xenograft の生着	16
7-(5)	マウス末梢臓器内のヒト CD3 陽性細胞	17
7-(6)	ヒト気管支 xenograft の CD3、CD4、CD8 陽性細胞	17
7-(7)	ヒト気管支 xenograft の CD45RO、CD25、CD103 陽性細胞	17
7-(8)	気管支 xenograft のサイトカイン mRNA の発現	18
8.	考察	19
9.	結語	22
10.	図表及びその説明	23
11.	参考文献	32

## 1. 要旨

気管支喘息は多くの炎症細胞や細胞成分が関与した慢性的な気道の炎症性疾患と考えられている。そうした慢性炎症は、気道の過敏性の亢進、気流制限、分泌物の増加などの臨床所見と深く関与している。喘息患者の気道組織の種々の炎症細胞のうち、特に T 細胞は気管支喘息の病態において重要な役割を果たしている。我々は以前、抗原に誘導された肥満細胞の活性化によってヒト気管支血管内皮上の ICAM-1、VCAM-1、E-selectin といった接着分子が発現することを報告している。これらの所見は IgE によってアレルギー反応が誘導され、肥満細胞が気管支粘膜へのリンパ球、好酸球、好中球の浸潤の準備をすることを示唆する。他の臓器では消化管、皮膚、リンパ節などにおいて T 細胞を移動させる臓器特異的な接着分子、ケモカイン、レセプターが特定されつつある。こうした報告にもかかわらず喘息のようなアレルギー疾患においてどのように T 細胞が再循環するかということについては未だ不明な点が多い。一方、機能的 T 細胞、B 細胞を欠失した SCID マウスは異種の移植片を拒絶しにくいため、種々のヒトの組織を用いて異種間の移植モデルが作製されてきた。そこで気管支と喘息患者の T リンパ球との相互作用について検討するために、SCID マウスにヒト気管支と PBMC を移植したモデルを作製した。我々は SCID マウスの皮下にヒトの気管支を移植したモデルの腹腔内に、喘息患者、アトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者、健常者の PBMC を移植して、気管支 xenograft 内への T 細胞の浸潤について検討を行った。移植前の末梢血 PBMC における CD3、CD4、CD8、CD25、CD45RO、CD103、CLA 抗原陽性細胞の比率は、喘息患者、アトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者、健常者において有意差は認められなかった。気管支 xenograft への CD3、CD4、CD8 陽性細胞の浸潤は、喘息患者群でアトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者、健常者に比較して有意に増加しており、他の疾患群では健常者と有意差はみられなかった。また、気管支 xenograft に浸潤した T 細胞は CD4 陽性細胞優位であった。さらに喘息患者の PBMC を移植したマウスの

気管支 xenograft の CD3 陽性細胞に対する CD45RO、CD103 陽性細胞の比も上昇していた。Th2 タイプのサイトカインである IL-4 及び IL-5 mRNA は喘息患者の PBMC を移植したマウスから摘出された気管支 xenograft 組織で有意に発現が増加していた。一方、Th1 タイプのサイトカインである IL-2 及び IFN- $\gamma$  mRNA は有意差が認められなかった。以上のような所見から喘息患者の T 細胞、特に Th2 細胞はヒト気管支に浸潤しやすい性質を有することが示唆された。

## Summary

Bronchial asthma is considered as chronic inflammatory disorder of the airways in which many cells and cellular elements play a role. The airway inflammation may be associated with changes in airway hyperresponsiveness, airway limitation, and mucus secretion. We previously reported the expressions of adhesion molecules E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 in the human bronchial vasculature by allergen-induced mast cell activation. These findings suggested that allergic response induced by IgE and mast cells causes preparation for infiltration of lymphocytes, eosinophils, and neutrophils into the bronchial mucosa. In other organs, e.g., intestine, skin, and lymph nodes, tissue-specific adhesion molecules, chemokines, and their receptors that recruit T cells have already been discovered. Despite these discoveries, it is not well known how T cells recirculate into the bronchial mucosa in allergic diseases such as asthma. Since SCID mice are unable to reject xenogenic transplants, many xenotransplant models using various human tissues have been developed. Therefore, to examine the interaction between bronchi and T lymphocytes of asthma, it may be possible to use the human bronchial xenograft and PBMC xenograft in SCID mice. We transplanted human bronchi into the subcutaneum of SCID mice and intraperitoneally injected PBMCs that were obtained from patients with asthma, atopic dermatitis and rheumatoid arthritis, and normal subjects (asthmatic, dermatitis, rheumatic and normal huPBMC-SCID mice). There was no difference in the percentage of CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RO, CD103, and CLA positive cells in PBMCs between asthmatic patients and normal subjects, and CD3 positive cells in peripheral blood of asthmatic and normal huPBMC-SCID mice. The number

of CD3, CD4, CD8 positive cells in the xenografts of asthmatic huPBMC-SCID mice was higher than those of normal huPBMC-SCID mice, atopic dermatitis huPBMC-SCID mice and rheumatoid arthritis huPBMC-SCID mice. The CD4 positive cells preferentially infiltrated into the bronchial xenografts compared with the CD8 positive cells. The percentages of CD45RO or CD103 positive cells of CD3 positive cells in the bronchial xenografts of asthmatic huPBMC-SCID mice were higher than those of normal huPBMC-SCID mice, atopic dermatitis huPBMC-SCID mice and rheumatoid arthritis huPBMC-SCID mice. IL-4 mRNA and IL-5 mRNA were significantly higher in the xenografts of asthmatic huPBMC-SCID mice than that in the xenografts of normal huPBMC-SCID mice, but there were no significant differences in the expressions of IL-2 mRNA or IFN- $\gamma$  mRNA between the xenografts of asthmatic huPBMC-SCID mice and those of normal huPBMC-SCID mice. These findings suggest that T cells, especially Th2-type T cells, of asthmatics preferentially infiltrate into the human bronchi.

## 2. 発表論文リスト

### 関連文献

Tsumori, K., Kohrogi, H., Goto, E., Hirata, N., Hirosako, S., Fujii, K., Ando, M.,  
Kawano, O. and Mizuta, H.

T Cells of Atopic Asthmatics Preferentially Infiltrate Into Human Bronchial  
Xenografts in SCID Mice. *J. Immunol.* 170:5712-5718. 2003.

### 参考文献

Goto, E., Kohrogi, H., Hirata, N., Tsumori, K., Hirosako, S., Hamamoto, J.,  
Fujii, K., Kawano, O., and Ando, M.

Human Bronchial Intraepithelial T Lymphocytes as a Distinct T-Cell Subset:  
Their Long-Term Survival in SCID-Hu Chimeras. *Am. J. Respir. Cell Mol.*  
*Biol.* 22: 405-411. 2000.



### 3. 謝 辞

本研究を行うにあたり、全面的に御支援、御指導下さいました熊本大学大学院医学研究科内科学第一講座 佐々木裕教授に深く感謝致します。

さらに本研究に用いた組織を御提供頂いた熊本市民病院外科 馬場憲一郎先生、熊本中央病院呼吸器科 藤野昇先生、最勝寺哲志先生、熊本大学医学薬学研究部運動骨格病態学分野 水田博志助教授、熊本整形外科病院 東野通志先生に深く感謝致します。また、御指導頂きました熊本大学医学部附属病院呼吸器内科 興柁博次講師、並びに共同研究者と同講座の皆様に深く感謝致します。

#### 4. 略語一覧

CCR; CC chemokine receptor

CLA; cutaneous lymphocyte antigen

DAB; 3,3'-diaminobenzidine

DMSO; dimethylsulfoxide

FCS; fetal calf serum

H.E.; hematoxyline and eosin

HBSS; Hanks' Balanced Salt Solution

IL; interleukin

MAdCAM-1; mucosal addressin cell adhesion molecule-1

MDC; monocyte-derived chemokine

OVA; ovalubumin

PBMC; peripheral blood mononuclear cell

PBS; phosphate-buffered saline

PCR; reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SCID; severe combined immunodeficiency

TARC; thymus- and activation-regulated chemokine

TECK; thymus-expressed chemokine

## 5. 研究の背景と目的

### 5-(1) 気管支喘息とリンパ球

気管支喘息は肥満細胞、好酸球、好中球、マクロファージ、上皮細胞、リンパ球といった種々の細胞が関与した慢性の気道炎症性疾患である。これらの細胞の中で T 細胞は気道の炎症を制御することに重要な役割を果たしている。喘息の気道では、成人及び小児において T 細胞が有意に浸潤していること (Bentley, et al., 1992, Cokugras et al., 2001)、CD45、CD3、CD4、CD8 陽性細胞が多いこと (Azzawi, et al., 1990)、活性化した好酸球も増加していること、ステロイド耐性の喘息では末梢血のリンパ球が細胞の増殖の阻害や IL-2, IFN- $\gamma$  を産生する上でステロイドに対し耐性があるものの、Cyclosporin A に対しては感受性があること (Corrigan, et al., 1991) などが報告されている。T 細胞は感作や免疫反応において重要な役割を果たす。さらにこれらの細胞は IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF を産生しており、Th2 タイプの細胞を優位に活性化する (Robinson, et al., 1992)。そうした活性化された Th2 細胞は、抗原によって誘導された喘息において好酸球浸潤を伴った炎症を引き起こすことを示唆する (Bentley, et al., 1993)。非アトピー型喘息患者の気管支においても同様の病理学的な変化が観察される (Humbert, et al., 1999)。非アトピー型喘息患者の気道においても IL-4, IL-5, IL-13 のような Th2 タイプのサイトカインの発現がコントロールと比較して増加しており、また血清中の IgE 上昇や skin prick test 陽性反応を欠いているにもかかわらず、気管支粘膜では局所の IgE 産生が亢進していることも報告されている (Ying, et al., 2001)。最近では Th2 タイプの細胞が浸潤し、Th1 タイプの細胞の転写因子の T-bet の発現が低下していることも報告されている (Finotto, et al., 2002)。これらの所見は喘息の病態において Th2 タイプの細胞が重要な役割を果たしていることを示唆する。Th2 タイプのサイトカインは IgE 産生、肥満細胞や好塩基細胞の成熟や活性、好酸球浸潤、上皮の損傷などを通して喘息の病態に関与する (Kay, et al., 2001)。

## 5-(2) リンパ球と臓器特異性

炎症性疾患において、炎症細胞が組織に浸潤する過程については rolling, activation, firm adhesion, diapedesis を含む multistep paradigm によって説明され (Springer, et al., 1994)、複数の接着分子、ケモカイン、そのレセプターなどが関与している。我々は以前、抗原に誘導された肥満細胞の活性化によってヒト気管支血管内皮上の ICAM-1, VCAM-1, E-selectin といった接着分子が発現することを報告している。これらの所見は IgE によってアレルギー反応が誘導され、肥満細胞が気管支粘膜へのリンパ球、好酸球、好中球の浸潤の準備をすることを示唆する (Hirata, et al., 1999)。他の臓器においては、消化管、皮膚、リンパ節等にそれぞれ特異性を有する因子について報告されている (Jones, et al., 1994, Alon, et al., 1994, Campbell, et al., 1998)。具体的には、消化管では  $\alpha 4\beta 7$  が選択的に腸管の内皮細胞に発現する MAdCAM-1 に結合する gut-homing receptor と考えられており (Bargatze, et al., 1995)、TECK は小腸の T 細胞の活性と遊走の段階で CCR9 に結合すると報告されている (Kunkel, et al., 2000)。皮膚では CLA が皮膚の炎症組織に発現している E-selectin に結合する skin-homing receptor として知られており、皮膚の炎症部位では T 細胞は CLA や P-selectin を発現し、血管内皮は E-selectin や P-selectin を発現していることが報告されている (Campbell, et al., 2002)。さらに CCR4 と TARC が皮膚の T 細胞浸潤に重要な役割を果たすことも報告されている (Campbell, et al., 1999)。最近では気道や肺に浸潤する T 細胞は腸管や皮膚に浸潤する T 細胞と異なる性質を有するという報告が散見され、例えば肺の T 細胞は CLA- $\alpha 4\beta 7^{\text{low}}$  優位といった報告や (Picker et al., 1994)、CCR5 や CXCR3 を発現しているが CCR9 や CLA は発現していなかったという報告 (Campbell, et al., 2001) などが認められる。しかしながら、喘息のようなアレルギー疾患においてどのように T 細胞が再循環するかということについては未だ不明な点が多い。気道に浸潤する T 細胞の特定が可能であれば、それをブロックすることが喘息治療戦略の中心となりうる可能性がある。

### 5-(3) 動物モデル

気管支喘息のメカニズムについて検討する際、実際の喘息患者の気道を繰り返し採取することは困難である。そのために喘息の動物モデルとしてさまざまなモデルが作製されている。代表的なものはマウスに抗原（特に OVA）を感作、チャレンジしたモデルであるが、短期間に高濃度の抗原に曝露されることや、マウスの系統により反応が異なること（Gregory, et al., 2003）などからは、動物モデルで認められる現象をヒトの気道炎症反応に置き換えることには多くの問題点がある。そのため、喘息患者の気道でみられる炎症細胞の動きはヒトの気道で検証することが望ましいと考えられる。

### 5-(4) SCID マウスを用いた疾患モデル

Bosma らは、BALB/c マウスと C57BL/Ka マウスを交配した C.B.-17 系統の中に血清免疫グロブリンを検出できないマウスを発見した（Bosma, et al., 1983）。このマウスは機能的 T、B 細胞を欠失しており、SCID マウスと命名された。SCID マウスは異種間の移植細胞や組織を拒絶する能力が低いことから、種々の疾患モデルが作製されている。患者の末梢血を移植することで、マウスにヒト疾患類似の病変を再現することも可能となっており、グレープス病（Martin, et al., 1997）、慢性関節リウマチ（Kaul, et al., 1995）、全身性エリテマトーデス（Ashany, et al., 1992）などの自己免疫疾患のモデルが作製されている。さらに組織を移植して生着させたモデルも多数報告されており、Albelda らはヒト気管支を SCID マウスに移植した際の観察で、9 週間にわたり気管支上皮細胞、血管内皮細胞、肥満細胞等が生存することを報告した（Pilewski, et al., 1994）。我々も以前ヒト気管支組織を SCID マウスの皮下に移植し、5 ヶ月の長期に渡り移植組織が拒絶されることなく生着することを確認している（Goto, et al., 1999）。したがってヒト気管支を SCID マウスに移植したこのモデルは長期の培養が可能であり、気管支局所の炎症細胞の動態の解析などに有用であると考えられる。

## 5-(5) 本研究の目的

T細胞は気管支喘息の病態において重要な役割を果たしている。しかしながら、喘息患者において循環血液中の T 細胞が気道に浸潤するメカニズムについてはまだ解明されていない点も多い。そこで気管支喘息患者の T 細胞の特性を解析するため、ヒト気管支を移植した SCID マウスに喘息患者の PBMC 及びコントロールとしてアトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者、健常者の PBMC を移植し、ヒト気管支 xenograft に浸潤した T 細胞について検討した。

## 6. 実験方法

### 6-(1) ヒト気管支組織の採取及び処理

ヒト気管支組織は、肺癌のため肺切除術を行われた 19 名の患者の切除肺から採取された。患者は他の呼吸器疾患（喘息、肺気腫、感染症を含む）あるいはアレルギー疾患の合併なく、画像上肺癌以外の異常所見なく、呼吸機能（肺活量、努力肺活量、一秒量）は正常範囲であった。

組織は切除直後氷冷した Krebs-Henseleit 液（NaCl 118.3mM, KCl 4.7mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.0mM, glucose 11.1mM）に入れ、切除後 2 時間以内に肉眼的に正常な 3 次から 5 次の気管支を摘出した。摘出された組織は付着した肺組織をできるだけ取り除き、約 1cm 長の気管支リングを作成した。この処置は氷冷した Krebs-Henseleit 液中に 95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>の混合ガスを注入しつつ行った。

### 6-(2) ヒト PBMC 採取及び処理

ヒト PBMC は、19 名の喘息患者、9 名の健常者、6 名のアトピー性皮膚炎患者、5 名の慢性関節リウマチ患者から採取された。喘息患者は気道閉塞に伴う症状を保持していることと肺機能上β<sub>2</sub>刺激薬吸入前後で 200ml 以上または 12%を越える改善率を認めることで診断した。喘息患者全員がハウスダストまたはコナヒョウヒダニに対する IgE RAST クラス 2 以上のアトピー性気管支喘息患者で、1 名が無治療、残る 18 名が吸入ステロイドを使用しているが（BDP 200~800 μg）、末梢血を採取する前 2 ヶ月は喘息症状の増悪なく、ステロイドの内服あるいは点滴は行われていなかった。健常者は全員呼吸器疾患あるいはアレルギー疾患の既往なく、IgE RAST あるいは RAST が陰性であった。アトピー性皮膚炎患者は外用のステロイド剤あるいは内服の抗アレルギー剤を使用していたが、全身性のステロイド剤を使用している患者は除いた。慢性関節リウマチ患者はアメリカリウマチ学会提唱の 1987 年改訂慢性関節リウ

マチ分類基準にて 4 項目以上該当していることで診断し、ステロイドを除く抗炎症剤を使用していた。

末梢血は 50ml へパリン加採血を行い、Ficoll-Paque 液を用いて PBMC を遠心分離した。分離された PBMC は、RPMI1640+20%FCS+10%DMSO 中に  $5 \times 10^6$ /ml の濃度で、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

### 6-(3) SCID マウス

SCID マウス (Clea, Tokyo) は、雄の 5~10 週齢のマウスを使用した。全ての SCID マウスは 4 週齢の時点で血清中免疫グロブリンの存在を平板拡散法にて検定し、leak がないことを確認した後出荷されている。これらの SCID マウスは、熊本大学医学部動物資源開発研究センターにて、SPF 環境下でフィルタートップを使用し、滅菌水、滅菌飼料にて飼育された。

### 6-(4) 気管支移植

Day 0 に 5~10 週齢の SCID マウスをエーテル麻酔した後、腹壁に 1cm の小切開をつくり、皮下トンネルを作成した。その後ヒト気管支リングを挿入し閉創した。手術操作はクリーンベンチ内で滅菌器具を用いて行った。

### 6-(5) ヒト PBMC 移植

Day 7 に $-80^{\circ}\text{C}$ で保存していた PBMC を解凍し、HBSS 液で洗浄後、PBMC  $2 \times 10^7$  を RPMI1640+10%FCS 500  $\mu\text{l}$  に浮遊させ、ヒト気管支を移植した SCID マウスの腹腔内に移植した。

### 6-(6) 組織の回収

Day 21 にマウスを sacrifice し、ヒト気管支 xenograft とマウス末梢血を回収し



た。気管支 xenograft は $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、末梢血はヘパリン加採血の後、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  溶液で RBC 破碎し有核細胞を取り出した。

## 6-(7) Flowcytometry

移植前の喘息患者、健常者、アトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者の PBMC、及び sacrifice 時に回収したマウスの有核細胞の細胞表面マーカーの解析を行った。細胞は FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) で解析し、Cell Quest software (Becton Dickinson) を用いて細胞表面のマーカーの陽性率を算出した。用いた一次抗体は anti-CD3 (UCHT1, DAKO, Denmark)、anti-CD4 (MT310, DAKO)、anti-CD8 (DK25, DAKO)、anti-CD19 (HD37, DAKO)、anti-CD25 (ACT-1, DAKO)、anti-CD45RO (UCHL1, Pharmingen, San Diego)、anti-CD103 ( $\alpha\epsilon\beta 7$ ) (2G5, Immunotech, France)、anti-CLA (HECA-452, Pharmingen) であり、二次抗体は FITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (DAKO) を使用した。PBMC またはマウス有核細胞は 15 分 rabbit serum (DAKO) で blocking 後、一次抗体で 30 分 incubation し、PBS+1%FCS で洗浄後、二次抗体で 30 分 incubation 行い、PBS+5% paraformaldehyde で固定した。

## 6-(8) 免疫組織化学染色

凍結された気管支 xenograft は  $6\mu\text{m}$  の切片を作成し、以前の報告のように免疫組織染色を行った (Goto, et al., 1999)。一次抗体は 6-(7)に列記した抗体を 100 倍希釈で用いた。最初に  $\text{H}_2\text{O}_2$  にて内因性ペルオキシダーゼを除去後 PBS+10%FCS で blocking した後、一次抗体で 90 分 incubation し、PBS で洗浄後、二次抗体で 30 分 incubation を行った。ペルオキシダーゼの発色基質は 3,3-diaminobenzidine (DAB) (Dojin chemical, Kumamoto, Japan) を用いた。核染色は Mayers hematoxylin で行った。

## 6-(9) 組織の定量、評価法

プレパラートは VANOX AHBS3 microscope (OLYMPUS, Tokyo) にて鏡検した。CD3、CD4、CD8 陽性細胞数は各プレパラートの気管支リングの粘膜固有層内の陽性細胞数をカウントし、1mm<sup>2</sup>あたりの陽性細胞数で表現した。また、CD45RO、CD25、CD103 陽性細胞は、連続切片にて CD3 陽性細胞数に対する陽性細胞数の比率をカウントした。

## 6-(10) RT-PCR

移植前 PBMC 並びに移植前後気管支スライス は micro-fast track kit (Invitrogen) で mRNA を抽出し、RT-PCR を行った。使用した primer の配列はそれぞれ IL-2 は 5-caagaatcccaaactcaccagg-3、5-caatggttgctgtctcatcagc-3、IFN- $\gamma$  は 5-ctcttggtgctgttactgccag-3、5-tccttgatgggtctccacact-3、IL-4 は 5-cggacacaagtgcgatatcacc-3、5-ccaacgtactctggttggttcc-3、IL-5 は 5-cgaactctgctgatagccaatg-3、5-ccactcgggtgttcattacaccaag-3 は  $\beta$ -actin は 5-ccagccatgtacgttgct-3、5-cttctccagggaggagct-3 である。また、annealing 温度、サイクル数は、IL-2、IL-4、IL-5 で 60°C、35 サイクル、IFN- $\gamma$  で 50°C、35 サイクル、 $\beta$ -actin で 60°C、30 サイクルにて行った。PCR 産物は 1.5% agarose gel で電気泳動を行い、ethidium bromide で染色した。バンドを densitometry (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) で濃度を測定し、サイトカインの PCR 産物を  $\beta$ -actin の PCR 産物に対する比で表した。

## 6-(11) 統計学的解析

データは全て平均値±標準誤差として記載した。有意差検定は Man-Whitney U test で行った。

## 7. 実験結果

### 7-(1) 気管支喘息患者、健常者、アトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者の PBMC の表面抗原のプロフィール

flowcytometry による解析にて、PBMC の CD3、CD4、CD8、CD25、CD45RO、CD19、CD103、CLA においてそれぞれの疾患群における有意差はみられなかった (表1)。

### 7-(2) 気管支喘息患者、健常者の PBMC 及び移植前気管支のサイトカイン mRNA の発現

移植前気管支のサイトカイン mRNA は、いずれも検出されなかった。IL-2、IL-4、IL-5、IFN- $\gamma$  mRNA に関しては、喘息患者及び健常者において発現の有意差は認められなかった (図1)。

### 7-(3) PBMC を移植したマウス末梢血有核細胞中に占めるヒト CD3 陽性細胞の割合

喘息患者、アトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者、健常者の PBMC を移植したマウスを sacrifice した時点で回収した末梢血有核細胞におけるヒト CD3 陽性細胞の比率は  $5.14 \pm 1.87\%$ 、 $6.20 \pm 1.44\%$ 、 $6.84 \pm 1.33\%$ 、 $4.93 \pm 2.65\%$  で各群間の有意差はみられなかった。

### 7-(4) ヒト気管支 xenograft の生着

Day21 に回収されたヒト気管支 xenograft は、気道上皮細胞も保たれ、移植前の正常気管支とほぼ同様の外観を示した。図2は H.E.染色の結果である。気管支

xenograft の全例でマウスの CD18 陽性細胞が散在しており (図 3-A)、マウスの循環血流からの還流が生じていることが確認された。

#### 7-(5) マウス組織内のヒト CD3 陽性細胞

PBMC を移植されたマウスの肺や脾臓ではヒト CD3 陽性細胞が散在しており、腹腔内に移植したヒト T 細胞がマウスの循環血液内に入り、マウスの臓器にトラップされていることが確認された (図 3-B)。

#### 7-(6) ヒト気管支 xenograft の CD3、CD4、CD8 陽性細胞

喘息患者と健常者の PBMC を移植したマウスから回収した xenograft の免疫組織染色を図 4 に示す。喘息患者の PBMC を移植したマウスから回収された気管支 xenograft の粘膜固有層内の CD3、CD4、CD8 陽性細胞数は、アトピー性皮膚炎患者、リウマチ患者、健常者の PBMC を移植したマウスあるいは PBMC を移植しなかったマウスから回収された気管支 xenograft に比較して、有意に増加していた。しかしながら喘息患者以外の PBMC を移植したマウスの気管支 xenograft 群では有意差が認められなかった (図 5、6)。また気管支 xenograft の CD3 陽性細胞のうちいずれも CD4 陽性細胞が CD8 陽性細胞に比較して優位であった。

#### 7-(7) ヒト気管支 xenograft の CD45RO、CD25、CD103 陽性細胞

CD45RO 陽性細胞の CD3 陽性細胞に対する比は、喘息患者の PBMC を移植したマウスの気管支 xenograft で健常者の PBMC を移植したマウスの気管支 xenograft に比較して有意に増加していた。CD25 陽性細胞/CD3 陽性細胞の比は喘息患者の PBMC を移植したマウスの xenograft と PBMC を移植していないマウスの xenograft では有意差はみられたが ( $9.9 \pm 1.5$  vs.  $3.2 \pm 2.2$ ,  $p < 0.05$ )、喘息患者

群と健常者群の比較では有意差は認められなかった ( $9.9 \pm 1.5$  vs.  $9.0 \pm 2.0$ )。一方 CD103 陽性細胞/CD3 陽性細胞比は喘息患者の PBMC を移植したマウスの気管支 xenograft と健常者の PBMC を移植したマウスの xenograft で有意差が認められた (図7)。また、いずれの xenograft においても CD19、CLA の陽性細胞は認められなかった。さらに TARC、MDC の免疫染色では気道上皮に発現がわずかにみられたが、疾患群間の有意差は得られなかった。

#### 7-(8) 気管支 xenograft のサイトカイン mRNA の発現

気管支 xenograft のサイトカイン mRNA の発現を  $\beta$ -actin mRNA に対する比で検討すると、Th1 タイプサイトカインの IL-2、IFN- $\gamma$  は喘息患者の PBMC を移植したマウスの xenograft と健常者の PBMC を移植したマウスの xenograft で有意差がみられないが、Th2 タイプサイトカインの IL-4、IL-5 の mRNA の発現は、喘息患者の PBMC を移植したマウスの xenograft で有意に増加していた (図8)。

## 8. 考察

本研究で我々は、1) 気管支喘息患者由来の CD3、CD4、CD8、CD45RO、CD103 陽性細胞は、健常者、アトピー性皮膚炎患者、慢性関節リウマチ患者に比較して有意にヒト気管支 xenograft に浸潤する、2) 喘息患者の PBMC を移植したマウスから取り出されたヒト気管支 xenograft は IL-4 mRNA、IL-5 mRNA を有意に発現することを確認した。これらの結果より以下のことを考察した。

喘息患者の CD3、CD4、CD8 陽性細胞はアトピー性皮膚炎患者やリウマチ患者、健常者に比較して気管支 xenograft へ浸潤している細胞数が多かった。さらに CD4 陽性細胞は CD8 陽性細胞に比較して有意に多くの細胞が浸潤しており、CD4/8 比は末梢血中と比較しても有意に高かった (xenograft 内 CD4/8  $2.94 \pm 0.61$ 、末梢血 CD4/8  $1.37 \pm 0.24$ )。我々の以前の実験 (Goto, et al., 2000) において SCID マウスに移植したヒト気管支 xenograft の粘膜固有層内の CD3 陽性細胞は移植後 3~4 週程度で消失することが確認されており、そのことからこの実験で用いたモデルの気管支 xenograft 中のリンパ球は主としてマウスの循環血流内から移動した移植ヒト PBMC 由来と考えられる。

このモデルにおいては気管支と PBMC が別々の個体由来であり、allogenic な移植モデルとなる。従って T 細胞の浸潤が拒絶反応による可能性もあるが、移植前 PBMC の表面マーカーに差がないにもかかわらず、喘息患者と疾患コントロールとなるアトピー性皮膚炎患者やリウマチ患者と xenograft 上の CD3、CD4、CD8 陽性細胞数に有意差が認められたことや、喘息患者の PBMC 移植マウスの気管支 xenograft における IL-4 mRNA や IL-5 mRNA の発現が高値であったことから、T 細胞の浸潤は主に喘息によるものであることが示唆される。喘息患者の PBMC 移植マウス上の気管支 xenograft では CD3、CD4、CD8 陽性細胞が有意に浸潤している一方で、皮膚炎患者、リウマチ患者、健常者の PBMC を移植したマウス上の xenograft や PBMC を移植していないマウス上の xenograft に少数の CD3 陽性細

胞が観察されたことについては以下のような説明が考えられる。1) 元々移植気管支に存在したT細胞を観察している、2) allograft を認識したT細胞が浸潤した、3) 急性気管支炎のような以前の気道疾患によって気管支組織へ炎症細胞が浸潤したことなどが挙げられる。

喘息患者の PBMC を移植したマウスの気管支 xenograft の IL-4 mRNA と IL-5 mRNA の発現は健常者の PBMC 移植群に比較して高いが、移植前の PBMC の mRNA の発現は喘息患者と健常者で有意差はみられなかった。xenograft における IL-4 産生細胞は CD4 陽性細胞、好塩基球、肥満細胞の可能性が考えられる。健常者の PBMC を移植したマウスの気管支 xenograft では IL-4 mRNA は検出されなかった。そのため元々気管支組織に存在している肥満細胞が IL-4 の産生細胞である可能性は低い。喘息患者の気道に抗原チャレンジ後、好塩基球が IL-4 を産生するという報告はあるものの (Nouri-Aria, et al., 2001)、我々の実験において好塩基球の役割ははっきりしておらず、末梢血の T 細胞が気管支 xenograft に浸潤して IL-4 や IL-5 を産生したと考えられる。

循環血中から臓器へのリンパ球の homing はリンパ球と postcapillary venule の血管内皮間の連続した interaction によって制御される。臓器特異性は接着分子やケモカインレセプターなどによって特徴づけられるが、皮膚や消化管に比較すると、気道や肺に浸潤している T 細胞の接着分子やケモカインは未だ不明な点が多い。Panina-Bordignon らは喘息患者の気道に抗原チャレンジすると気管支の T 細胞が IL-4、CCR4、CCR8 を発現し、気管支の上皮が TARC、MDC を発現することを報告した (Panina-Bordignon, et al., 2001)。これらの所見は喘息患者の気道のアレルギー反応が上皮の MDC や TARC の産生を誘導し、そのようなケモカインが Th2 細胞を刺激し、アレルギー性炎症の場である気道に細胞を誘導することが示唆される。一方、本研究では気管支喘息患者の PBMC を移植したマウスから得られた気管支 xenograft において IL-4 mRNA や IL-5 mRNA が検出されたが、CCR4、CCR8、TARC、MDC については健常者の PBMC 移植群との有意差は認められなかった。その理由としては抗原によって気道を刺激していることが挙げられる。Panina-

Bordignon らの実験においては抗原刺激前の気道組織では IL-4、CCR4、CCR8 の発現が認められなかった。したがって CCR4 や CCR8 の発現は炎症部位の抗原刺激を必要とする可能性がある。さらに TARC や MDC は気道上皮のみならず、皮膚や (Vestergaard, et al., 2000)、鼻粘膜 (Terada et al., 2001) にも存在することが報告されている。本研究では、喘息患者の末梢血中の T 細胞、特に Th2 細胞は MDC や TARC といったケモカインやそのリガンドである CCR4 以外のメカニズムで炎症性刺激なしに血中から気管支組織に移行する可能性をもつことが示唆された。

さらに本研究では喘息患者の PBMC を移植したマウスの気管支 xenograft において CD103 ( $\alpha\beta 7$ ) 陽性細胞が気道に浸潤しやすいことが示された。 $\alpha\beta 7$  陽性細胞は上皮細胞に発現する E-cadherin という接着分子のリガンドであり (Cepek, et al., 1994)、末梢血 T 細胞の 5% 以下にしか発現していないにも関わらず、消化管の 95% 以上の上皮 T 細胞で発現する (Cerf-Bensussan, et al., 1987)。さらに鼻ポリープにも存在しており気道系の homing との関連についても考えられている (Sanchez-Segura, et al., 1998)。

喘息患者の気道炎症の治療をよりよく行うためには、気道に浸潤する T 細胞の制御を行う特異的な接着分子、ケモカイン、そのレセプター等について解明すべき問題が多く、今後更なる研究が必要である。



## 9. 結語

気管支喘息患者の末梢血の T 細胞は、ヒト気管支組織に浸潤しやすい性質を有していた。またそれらの T 細胞が浸潤している気管支組織では IL-4 mRNA、IL-5 mRNA といった Th2 タイプのサイトカインの mRNA の発現が増加していた。そうした現象は、何らかの原因で気道に移行しやすい臓器特異性を有する T 細胞が気管支喘息患者の末梢血中に存在する可能性を示唆する。気管支に移行する T 細胞の特性を解明し、その細胞を制御することにより、喘息の治療につながるものと予測される。

## 10. 図表及びその説明

表1 各患者群のPBMCの表面マーカー

Cell surface antigen	BA	AD	RA	Normal (%)
CD3	58.8 ± 2.3	62.0 ± 3.2	57.5 ± 1.3	62.8 ± 4.1
CD4	43.0 ± 2.3	40.0 ± 5.6	33.8 ± 2.2	41.2 ± 2.3
CD8	28.5 ± 2.3	25.0 ± 3.1	24.5 ± 3.2	31.7 ± 3.8
CD25	8.0 ± 1.4	11.7 ± 5.1	6.9 ± 2.1	8.4 ± 0.6
CD45RO	31.4 ± 4.5	31.3 ± 4.5	30.5 ± 4.3	34.3 ± 2.0
CD103	5.4 ± 1.9	4.2 ± 1.0	4.0 ± 0.6	4.3 ± 0.5
CLA	16.6 ± 3.5	21.0 ± 3.1	16.5 ± 3.9	11.2 ± 1.9
CD19	26.7 ± 5.2	23.5 ± 4.0	17.2 ± 1.6	15.0 ± 1.1

BA: bronchial asthmatic patients. AD: atopic dermatitis patients, RA: rheumatoid arthritis patients

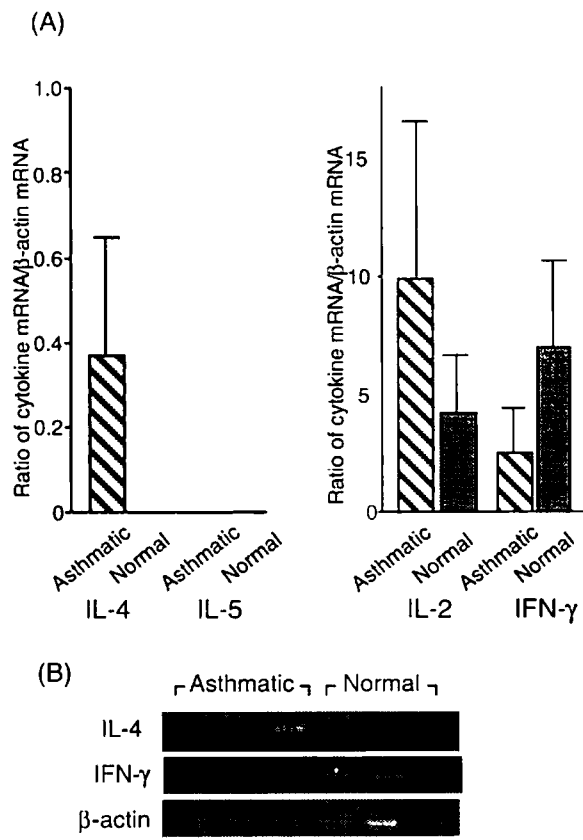


図1) 喘息患者と健常者の移植前のPBMCのmRNAの発現

喘息患者と健常者のPBMCのTh2、Th1タイプのサイトカインmRNAの発現は、有意差は認められなかった(A)。(B)はRT-PCRの代表を示す。症例数はそれぞれ5。

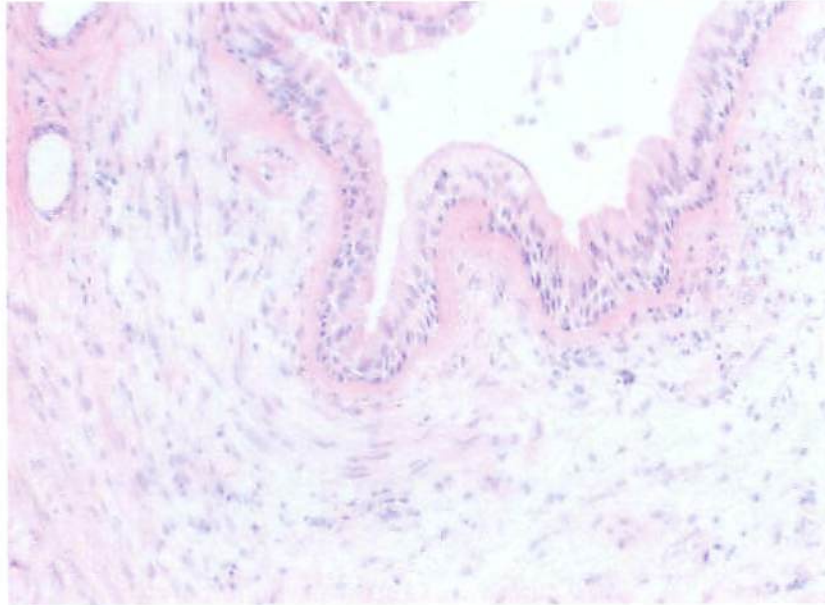


図 2) 移植後 21 日目のヒト気管支 xenograft

肉眼的に移植前気管支との差が認められず。H.E.染色標本。

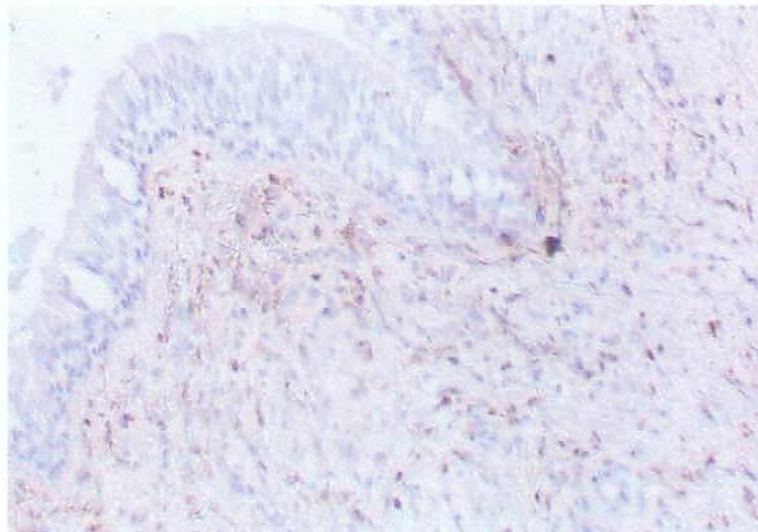


図 3-A) Day21 の気管支 xenograft のマウス CD18 陽性細胞の免疫組織染色

気管支 xenograft の全例でマウスの CD18 陽性細胞が散在しており、マウスの循環血流からの再還流が生じていることが示唆された。

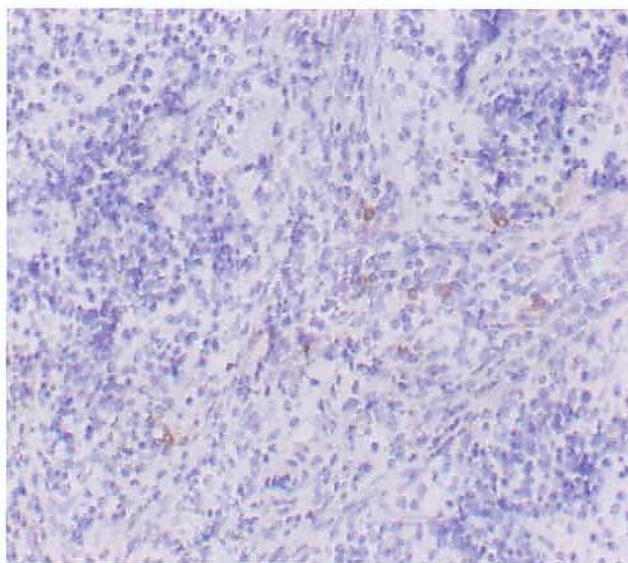


図 3-B) マウス脾臓のヒト CD3 陽性細胞の免疫組織染色

PBMC を移植されたマウスの脾臓ではヒト CD3 陽性細胞が散在しており、腹腔内に移植したヒト T 細胞がマウスの循環血流内に入り、マウスの臓器にトラップされていることが確認された。

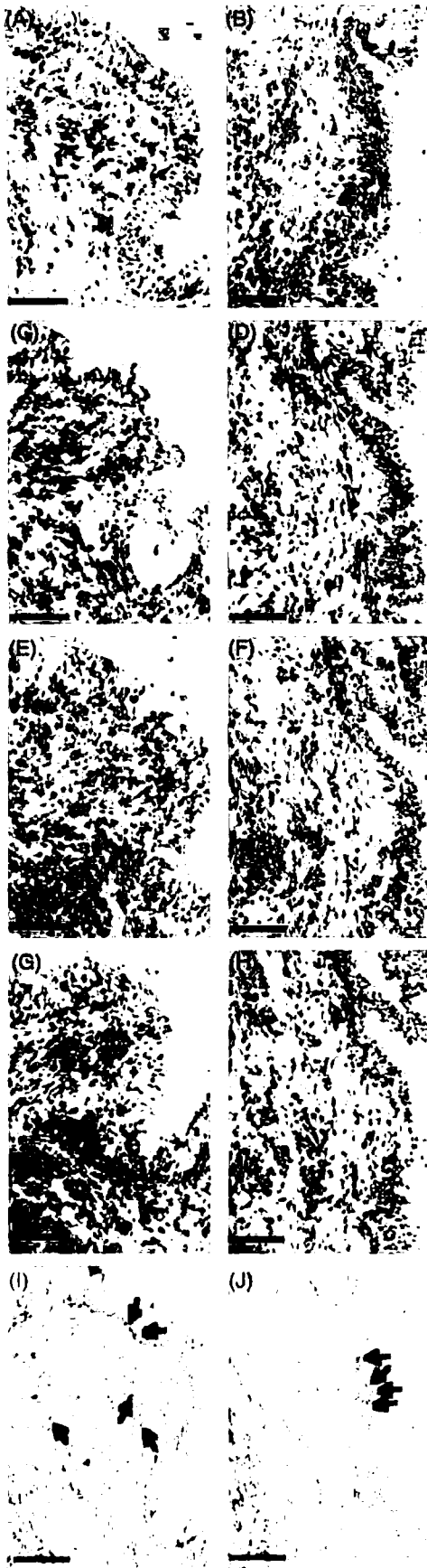


図4) hu-SCID マウスの気管支 xenograft の免疫染色

(A) (C) (E) (G) (I) は喘息患者の PBMC を移植したマウスから得られた気管支 xenograft。 (B) (D) (F) (H) (J) は健常者の PBMC を移植したマウスから得られた気管支 xenograft。さらに (A) (B) は CD3、(C) (D) は CD4、(E) (F) は CD8、(G) (H) は CD45RO、(I) (J) は CD103 陽性細胞の免疫組織染色。粘膜固有層内の T 細胞は喘息患者の PBMC を移植したマウスからの xenograft で有意に多い。Bar=100 $\mu$ m。矢印は CD103 陽性細胞。

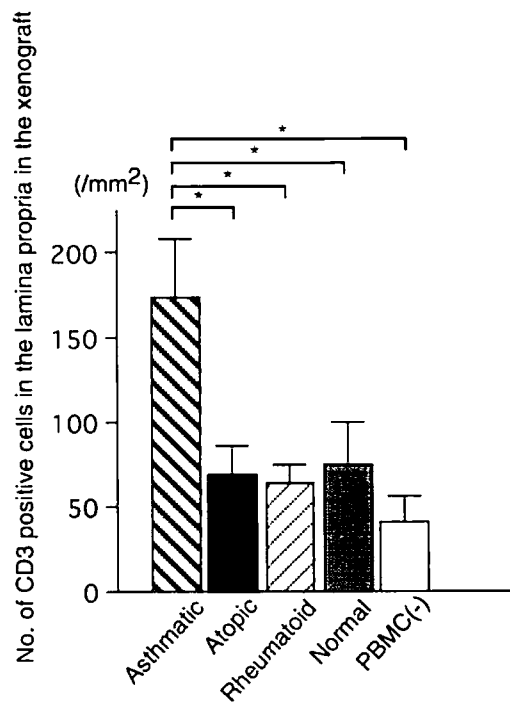
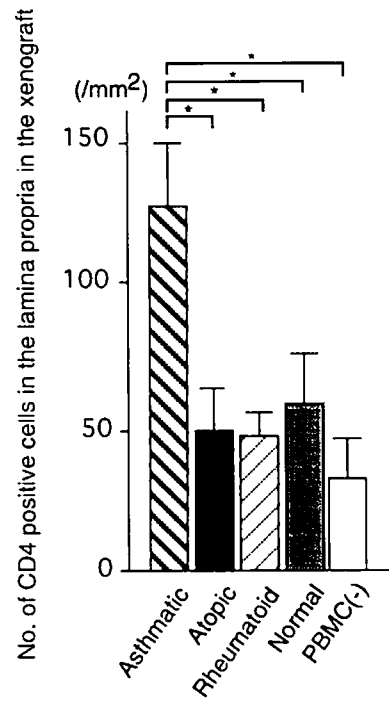


図5) hu-PBMC SCID マウスの気管支 xenograft の粘膜固有層内の  
CD3 陽性細胞

喘息患者の PBMC を移植したマウスから取り出した気管支 xenograft 内の CD3 陽性細胞は他の疾患患者の PBMC 移植群に比較して有意に増加している。それぞれの個体数は12、6、5、9、5である。\* $p < 0.05$ 。

(A)



(B)

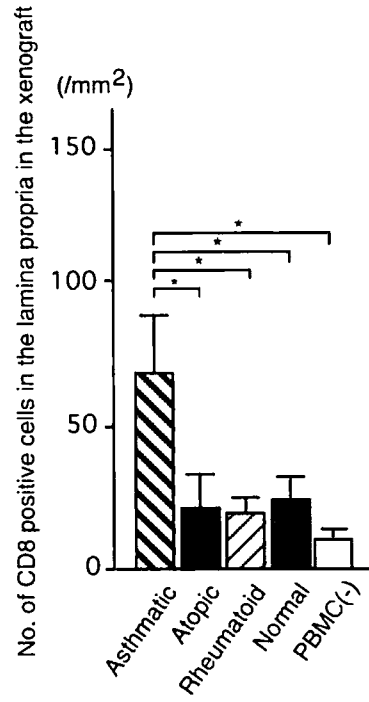


図 6) hu-PBMC SCID マウスの気管支 xenograft の粘膜固有層内の  
CD 4、CD8 陽性細胞

喘息患者のPBMCを移植したマウスから取り出した気管支 xenograft 内のCD4陽性細胞(A)、CD8陽性細胞(B)は他疾患患者のPBMC移植群に比較して有意に増加している。それぞれの個体数は12、6、5、9、5である。\* $p < 0.05$ 。



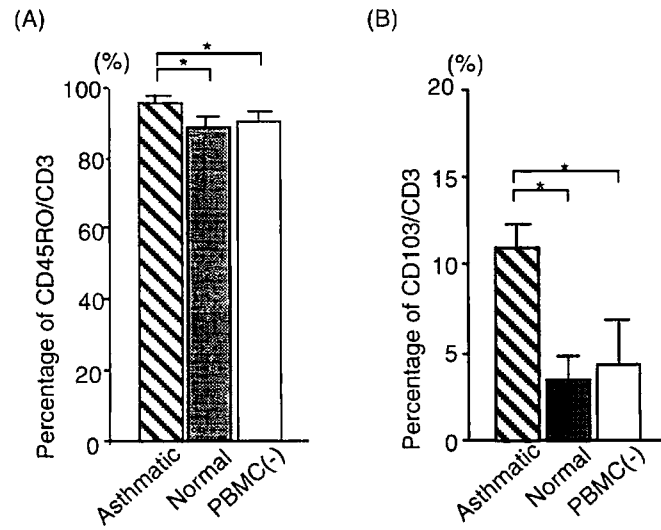


図7) 喘息患者と健常者のPBMCを移植したhu-SCIDマウスの気管支 xenograft の粘膜固有層内CD45RO陽性細胞及びCD103陽性細胞CD3陽性細胞に対するCD45RO陽性細胞比及びCD103陽性細胞比はいずれも喘息患者のPBMCを移植したマウスのxenograftにて有意に増加している。個体数はそれぞれ12、9、5である。\* $p < 0.05$ 。

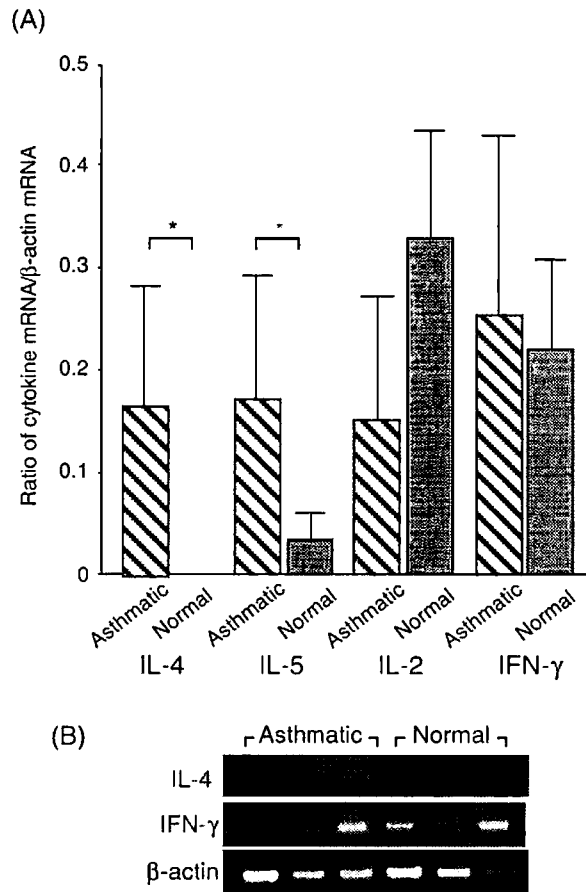


図8) 喘息患者と健常者の huPBMC-SCID マウスの気管支 xenograft の mRNA

IL-4 mRNA と IL-5 mRNA のそれぞれ $\beta$ -actin に対する比は喘息患者の PBMC 移植したマウスの xenograft で有意に高値であるが、Th1 タイプのサイトカインでは有意差は認められなかった (A)。RT-PCR の代表を (B) に示す。それぞれの個体数は5である。\* $p < 0.05$ 。

## 11. 参考文献

Alon R, Rossiter H, Wang X, Springer TA and Kupper TS. Distinct cell surface ligands mediate T lymphocyte attachment and rolling on P and E selectin under physiological flow. *J. Cell. Biol.* 127: 1485-1495. 1994.

Ashany D, Hines J, Gharavi A, Mouradian J and Elkon KB. Analysis of autoantibody production in SCID-systemic lupus erythematosus (SLE) chimeras. *Clin. Exp. Immunol.* 88: 84-90. 1992.

Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S and Kay AB. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 1407-1413. 1990

Bargatze RF, Jutila MA and Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 3: 99-108, 1995.

Bentley AM, Menz G, Storz C, Robinson DS, Bradley B, Jeffery PK, Durham SR and Kay AB. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146: 500-506, 1992.

Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB and Durham SR. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8: 35-42, 1993.

Bosma GC, Custer RP and Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-530, 1983.

Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA and Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279: 381-384, 1998.

Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P, Andrew DP, Warnke R, Ruffing N, Kassam N, Wu L and Butcher EC. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 400: 776–780, 1999.

Campbell JJ, Brightling CE, Symon FA, Qin S, Murphy KE, Hodge M, Andrew DP, Wu L, Butcher EC and Wardlaw AJ. Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. *J. Immunol.* 166: 2842–2848, 2001.

Campbell DJ and Butcher EC. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4 (+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 195: 135–141, 2002.

Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, Russell GJ, Morrow JS, Rimm DL and Brenner MB. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 372: 190–193, 1994.

Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Lisowska-Grospierre B, Guy-Grand D and Griscelli C. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 17: 1279–1285, 1987.

Cokugras H, Akcakaya N, Seckin, Camcioglu Y, Sarimurat N and Aksoy F. Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax* 56: 25–29, 2001.

Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ and Kay AB. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the T lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144: 1026–1032, 1991.

Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT and Glimcher LH. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295: 336–338, 2002.

Goto E, Kohrogi H, Hirata N, Tsumori K, Hirosako S, Hamamoto J, Fujii K, Kawano O and Ando M. Human bronchial intraepithelial T lymphocytes as a

distinct T-cell subset: their long-term survival in SCID-Hu chimeras. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22: 405-411, 2000.

Hirata N, Kohrogi H, Iwagoe H, Goto E, Hamamoto J, Fujii K, Yamaguchi T, Kawano O and Ando M. Allergen exposure induces the expression of endothelial adhesion molecules in passively sensitized human bronchus: time course and the role of cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18: 12-20, 1998.

Humbert M, Menz G, Ying S, Corrigan CJ, Robinson DS, Durham SR and Kay AB. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol. Today* 20: 528-533, 1999.

Jones DA, McIntire LV, Smith CW and Picker LJ. A two-step adhesion cascade for T cell/endothelial cell interactions under flow conditions. *J. Clin. Invest.* 94: 2443-2450., 1994.

Kaul R, Sharma A, Lisse JR and Christadoss P. Human recombinant IL-2 augments immunoglobulin and induces rheumatoid factor production by rheumatoid arthritis lymphocytes engrafted into severe combined immunodeficient mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 74: 271-282, 1995.

Kay AB. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344: 30-37, 2001.

Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Boisvert J, Roberts AI, Ebert EC, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Greenberg HB, Parker CM, Butcher EC, Andrew DP and Agace WW. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J. Exp. Med.* 192: 761-768, 2000.

Martin A, Matsuoka N, Zhang J, Zhou A, Nakashima M, Unger P, Schwartz AE, Friedman EW, Shultz LD and Davies TF. Preservation of functioning human thyroid "organoids" in the scid mouse. IV. In vivo selection of an intrathyroidal T cell receptor repertoire. *Endocrinology* 138: 4868-4875, 1997.

Nouri-Aria KT, Irani AM, Jacobson MR, O'Brien F, Varga EM, Till SJ, Durham

SR and Schwartz LB. Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: 205-211, 2001.

Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M, Di Lucia P, Casoni G, Bellettato C, Buonsanti C, Miotto D, Mapp C, Villa A, Arrigoni G, Fabbri LM and Sinigaglia F. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J. Clin. Invest.* 107: 1357-1364, 2001.

Picker LJ, Martin RJ, Trumble A, Newman LS, Collins PA, Bergstresser PR and Leung DY. Differential expression of lymphocyte homing receptors by human memory/effector T cells in pulmonary versus cutaneous immune effector sites. *Eur. J. Immunol.* 24: 1269-1277, 1994.

Pilewski JM, Panettieri RA, Jr., Kaiser LR and Albelda SM. Expression of endothelial cell adhesion molecules in human bronchial xenografts. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 795-801, 1994.

Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tscopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR and Kay AB. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* 326: 298-304, 1992.

Sanchez-Segura A, Brieva JA and Rodriguez C. T lymphocytes that infiltrate nasal polyps have a specialized phenotype and produce a mixed TH1/TH2 pattern of cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102: 953-960, 1998.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314, 1994.

Terada N, Nomura T, Kim WJ, Otsuka Y, Takahashi R, Kishi H, Yamashita T, Sugawara N, Fukuda S, Ikeda-Ito T and Konno A. Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines. *Clin. Exp. Allergy* 31: 1923-1931, 2001.

Vestergaard C, Bang K, Gesser B, Yoneyama H, Matsushima K and Larsen CG. A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *J. Invest. Dermatol.* 115: 640-646, 2000.

Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, Foster WM and Schwartz DA. Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. *Am. J. Physiol.* 285: L32-42, 2003.

Ying S, Humbert M, Meng Q, Pfister R, Menz G, Gould HJ, Kay AB and Durham SR. Local expression of epsilon germline gene transcripts and RNA for the epsilon heavy chain of IgE in the bronchial mucosa in atopic and nonatopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107: 686-692, 2001.