

平成 29 年度 博士論文

レチノイン酸による TSLP 産生誘導とその応用

東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野

B4YD1024 畑山 昂大

指導教員 平澤 典保

略語一覽

atRA	all-trans retinoic acid
CRABP-2	Cellular retinoic acid binding protein 2
CYP26A1	Cytochrome P450 26A1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HA	Hemagglutinin
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IL-1 β	Interleukin 1 β
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphate-buffered saline
PBT	1 % Tween 20-PBS
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RAR	Retinoic acid receptor
RXR	Retinoid X receptor
Th	Helper T
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
TSLPR-KO	TSLP receptor knock out

目次

1. 序論	4
2. 実験材料	10
2-1 実験動物	10
2-2 試薬	10
2-3 Primer	13
2-4 試薬の調製	14
3. 実験方法	21
3-1 マウス耳介への薬物投与	21
3-2 マウスへの抗原感作実験	23
3-3 統計処理	26
4. 実験結果	27
4-1 atRA による TSLP 発現の誘導	27
4-2 atRA のアジュバント効果	38
4-3 atRA のアジュバント効果の特性	42
5. 考察	47
謝辞	54
引用文献	55

1. 序論

過去、感染症は人類にとって最大の死の要因であり、現在でも感染症は人類の死因の上位に位置する (1)。たとえば、20 世紀における天然痘の流行は、3 億人から 5 億人の死をもたらしたとされ、過去 1000 年間に世界人口の 1 割程度を死亡させたと思われている (2)。加えて、中世ヨーロッパにおけるペストの流行は当時の人口の 4 分の 1 から 3 分の 1 程度を死亡させたとされている (3)。また、近代になって発生したスペイン風邪の流行は、当時の世界人口の約半数に感染し、数千万人の死者を出したとされている (4)。このように、感染症の流行は、医学的・健康上の不利益のみならず、大きな社会的悪影響を及ぼしてきた。近代になり、抗生物質や抗ウイルス薬の開発が進み、先進国においてはこれらの感染症によって命を落とす危険は大きく減少した。しかし、発展途上国においては今もなお、感染による下痢性疾患や下気道感染による死者が、死因の大多数を占めているのが現状である (5)。また先進国においても、新興・再興感染症などの脅威は存続している。近年では、重症急性呼吸器症候群 (SARS)、新型インフルエンザの発生、結核の再流行などが報道されている。これらの感染症を予防する有効な手段の一つに、ワクチンがある。しかしワクチンは十分量の供給が困難な場合があること (6, 7)、ワクチンに残存する感染性や、その起炎性などによる様々な副作用が医学的問題となるほか (8, 9)、特に日本においては副作用による訴訟が相次ぎ、製薬企業が研究開発に消極的になるなどの、社会的制約を受ける場合が多くある。これらの理由より、安全かつ有効な新たなワクチンを開発するための方策を示すことが求められている。

従来のワクチンにおいては、弱毒化あるいは不活化した病原体そのものが使用されている。最初期のワクチンとされる牛痘の接種はもとより、カルメット・ゲラン桿菌の生菌より調製される BCG、麻疹・風疹などの、現在使用されている各種ワクチンも、病原体の全成分を含む製剤として生産され、広く利用されている。これらのワクチンの成

分は、機能的に大きく二つに分けることができる。一つは抗原性を示すタンパク質であり、これに対する免疫記憶が形成され、当該病原体による感染に対して免疫が獲得される。もう一つは、免疫反応を増強する病原体成分である。Lipopolysaccharide、ウイルス DNA などの病原体構成成分は免疫反応を増強する。たとえばインフルエンザワクチンに含まれるウイルス RNA は toll-like receptor 7 の活性化を介して、内因性の免疫増強剤（アジュバント）として機能することが報告されている (10)。このように、各種免疫増強成分は自然免疫系を活性化して、感染防御に重要な抗原に対する免疫の獲得を促す。しかし、これらのワクチンはその感染性や、接種部位への炎症・発赤・疼痛などの副作用をしばしば引き起こす。また、インフルエンザワクチンのように発育鶏卵を使用して抗原となる病原体を精製する場合、迅速に、十分量を供給できないことが問題となる。

この問題を解決するため、近年研究・開発が進みつつあるのが、純粋なリコンビナント抗原のみを用いた成分ワクチンである。これらは感染防御に重要な抗原のみを使用したワクチンで、自然免疫系を活性化する余分な病原体成分を含まないため、これまで問題となっていた感染性・起炎性などの副作用が大きく軽減されている (11)。また、培養細胞などを用いて抗原を生産・精製するため、インフルエンザのパンデミック時などに、必要な抗原を迅速に精製し、ワクチンを生産することができる。たとえば、リコンビナントインフルエンザヘマグルチニンを主な成分としたワクチンである Flublock[®] は、米国で実際に使用されている成分ワクチンの一種である (12)。その一方で、一般にこのような成分ワクチンは抗体産生誘導能が弱く、十分な免疫を獲得するためにはアジュバントの添加を必要とする (13)。現在、アジュバントとしては、抗原を吸着して局所にとどめ、また各種サイトカインの発現を高めて免疫反応を増強する、アルミニウムゲルが広く用いられている。また、インフルエンザなどの一部のワクチンでは、アルミニウムゲルと toll-like receptor 4 作動薬を組み合わせアジュバントとしているものもある

(14, 15)。しかし、これらのアジュバントもまた、病原体成分と同様に、非選択的な炎症性サイトカインの誘導・自然免疫系の活性化などを引き起こすため (16-18)、従来のワクチンと同様の問題が生じうる。これらの問題より、より有効かつ安全なワクチンを開発するため、新たなアジュバントを開発する必要があると考えられる。

近年、新たなアジュバントとしての利用が試みられているものに、免疫系を制御するタンパク質である、サイトカインがある。たとえば、腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリーのサイトカインである、TNF- α , a proliferation-inducing ligand (APRIL), TNF-like protein 1A (TL1A) は、抗原とともにマウスに経鼻投与した際に、抗原に対する抗体産生量を高めることが報告されており、この反応が脾臓からの IL-4 などの Th2 サイトカインの発現上昇を介している可能性が示唆されている (19)。また、1型インターフェロン (IFN) である IFN- α/β は、マウスへのトリ γ グロブリンの感作において、同様に抗体産生を高めることが報告されており、この反応に IFN- α/β による樹状細胞の活性化が関与している可能性が示唆されている (20)。さらに、免疫制御サイトカインである thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は、マウスにおいて、HIV 抗原に対する血清中 IgG や粘膜中 IgA 発現を増強する効果があることが明らかになっている (21)。このように、複数のサイトカインで、アジュバント効果が認められることが示されている。

TSLP は interleukin-7 (IL-7) 様サイトカインの一種で、当初胸腺で産生される B 細胞の増殖・活性化を促す因子として見出された (22)。この TSLP は、その後の研究により、主に皮膚・気道・腸管などの上皮細胞より、化学物質・物理的刺激・サイトカインなどの各種刺激によって産生されること、樹状細胞の活性化を介して Th2 型免疫反応を誘導する因子であることが示された。TSLP 受容体 (TSLPR) は IL-7 受容体 α 鎖と複合体をなしており (23, 24)、下流の Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) の活性化を介してシグナルを伝える。TSLP シグナルにより活性化した樹状細胞は、OX40 ligand (25) や CD80/CD86 (26) などの、T 細胞の活性化や抗原提示に重要

な分子を発現し、リンパ節へ遊走する。その後、樹状細胞は OX40 ligand/OX40 相互作用を介して naïve CD4 陽性 T 細胞を刺激し、ケモカイン受容体 CXCR5 発現上昇による B 細胞濾胞への遊走・胚中心形成、プロテインキナーゼ B 活性化による生存促進、c-jun n-terminal kinase (JNK), activator protein 1 (AP-1) の活性化などを起こし、T 細胞の Th2 分化、IL-4 などの Th2 サイトカイン発現、抗体産生などの反応を誘導する (27-29)。この他、TSLP は好塩基球を刺激し、major histocompatibility complex (MHC) II 分子の発現誘導を介して、好塩基球に抗原提示細胞としての働きを発現させる可能性が示唆されている (30)。このように、TSLP は抗原提示細胞の抗原提示および、それに続く T 細胞の分化・活性化に重要な因子であることが知られている。

本研究においては、サイトカインを新たなアジュバントとして実用化するにあたり、この TSLP に注目した。その理由は、TSLP のアジュバントとしての使用が炎症反応を起こさず (21)、また皮膚への様々な低分子化合物の塗布によって発現誘導されることが知られているからである。炎症性サイトカインである TNF- α や IFN- α/β をアジュバントとして使用する場合、投与局所で炎症を起こすことが懸念される。加えて、TSLP タンパク自身をワクチンのアジュバントとして利用する場合、タンパク質であるがゆえに、保存・調製において温度・湿度など厳しい取り扱い条件を要求される可能性がある。また、大量生産が困難で、コスト的にも効果となることが予想される。そこで本研究では、TSLP 発現を誘導する低分子化合物で、TSLP タンパク質を代替することに着目した。当研究室では、これまでの研究により、12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), *m*-xylene, nonanoic acid などの低分子化合物に、マウス皮膚において TSLP 発現を誘導する作用があることが明らかになっている (31-33)。また、他の研究者らの報告により、ビタミン D アナログである MC903 や、ビタミン A の活性代謝物である all-trans retinoic acid (atRA) を連続投与することで、マウス皮膚において TSLP 発現が誘導されることが示されている (34, 35)。

このように、様々な低分子化合物による TSLP の発現誘導が報告されているが、本研究ではこの中でも、atRA に着目した。その理由は、TPA や nonanoic acid には皮膚に対する明らかな起炎性があり (31, 33)、*m*-xylene や MC903 も外用剤としての使用実績がない一方で、atRA をはじめとする各種レチノイドは、外用剤としての長期の使用実績があるからである。通常、レチノイド外用剤は尋常性痤瘡や角化疾患などの各種皮膚疾患に使用され、表皮基底層の増殖亢進・角質減少などの生理作用を示す。副作用として、長期の投与において紅斑・掻痒感・皮膚の乾燥などの副作用が見られる (36-39)。しかし、安全性に対する長期の使用実績があることより、他の低分子化合物より安全な TSLP 誘導剤として使用できることが見込まれた。

atRA をはじめとするレチノイドは、多くの場合、retinoic acid receptor (RAR) に結合してその効果を発揮する (40)。RAR には RAR α , RAR β , RAR γ の、大きく 3 つに分けられるサブタイプが存在し、いずれも retinoid X receptor (RXR) とのヘテロダイマーとなり、転写因子として機能する。これらの転写因子は DNA 上の retinoic acid response element (RARE) に結合する。この RARE はいくつかの種類があり、ヒト・マウスともに TSLP 遺伝子の promoter 上に、direct repeat (DR) 1, 2 と呼ばれるいくつかの RARE があることが示されている (34)。Ganti らの報告によれば、通常 RAR γ -RXR 複合体は DNA 上で TSLP promoter を不活性状態にしているが、atRA 刺激下で共刺激因子と結合し、TSLP promoter を活性化するとされている (41)。このように、atRA の TSLP 発現誘導における分子機構についても、様々な報告がなされている。

これまで述べたとおり、atRA にはマウス皮膚において TSLP 発現を誘導する作用があり (34, 35)、TSLP には抗体産生を増強する作用があることが報告されている (21)。そこで本研究では、有効かつ安全な新たなワクチンアジュバントを開発する一環として、atRA が TSLP 産生を介してアジュバント効果を示すかを検討した。そして、「TSLP 発現を誘導する低分子化合物の経皮アジュバントとしての利用」という、新たなワクチン

開発の戦略を構築することを目的とした。

2. 実験材料

2-1. 実験動物

ICR 雄性マウス	日本エスエルシー株式会社
BALB/c 雌性マウス	日本エスエルシー株式会社
C57BL/6 雄性・雌性マウス	日本エスエルシー株式会社
TSLPR-KO マウス (C57BL/6 back ground)	

Dr. Warren J. Leonard (米国 NIH) より供与

動物実験のプロトコルは東北大学環境安全委員会動物実験専門委員会において了承され (2017 薬動-003、2016 薬動-014-1)、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づき行った。

2-2. 試薬

Acetic acid	和光純薬工業株式会社
Acetone	和光純薬工業株式会社
Albumin, from bovine serum (BSA)	SIGMA-ALDRICH
Albumin, from chicken egg white (OVA)	SIGMA-ALDRICH
Alexa Fluor [®] 488	Thermo Fisher
AlK(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O	和光純薬工業株式会社
all-trans retinoic acid (atRA)	SIGMA-ALDRICH
Al(OH) ₃	和光純薬工業株式会社

2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris)	和光純薬工業株式会社
Anti-Ovalbumin IgG1 (mouse) ELISA standard	Cayman
anti-TSLP rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology
BMS189961	Axon Medchem
BMS195614	Tocris
BMS753	SIGMA-ALDRICH
Can Get Signal [®] Immunostain	TOYOBO
chloroform	和光純薬工業株式会社
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	同人化学研究所
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	SIGMA-ALDRICH
ELISA POD 基質 TMB キット	ナカライテスク
Eosin Y	MERCK Japan Inc.
Ethylendiamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid, disodiumsalt, dihydrate (EDTA · 2Na · 2H ₂ O)	同人化学研究所
Ethanol	和光純薬工業株式会社
Goat-anti-mouse IgE	Southern Biotech
Hematoxylin	MERCK Japan Inc.
H ₃ PO ₄	和光純薬工業株式会社
Isoflurane	和光純薬工業株式会社
KCl	和光純薬工業株式会社
KH ₂ PO ₄	和光純薬工業株式会社
MM11253	Tocris
Mouse IL-1β/IL-1F2 ELISA kit	R&D Systems
Mouse IgG HRP Linked Whole Ab	SIGMA-ALDRICH

Mouse TNF α ELISA Ready-Set-Go!	eBioscience
Mouse TSLP ELISA kit	R&D Systems
NaCl	和光純薬工業株式会社
Na ₂ CO ₃	和光純薬工業株式会社
NaHCO ₃	和光純薬工業株式会社
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	和光純薬工業株式会社
O.T.C. compound	サクラファインテック
Ovalbumin, Biotin labeled	Nanocs
Paraformaldehyde	和光純薬工業株式会社
Phosphoric acid (H ₃ PO ₄)	和光純薬工業株式会社
Polyoxyethylene (20) sorbiton monooleate	和光純薬工業株式会社
PrimeScript [®] RT Master Mix (Perfect Real Time)	タカラバイオ株式会社
2-propanol	和光純薬工業株式会社
Protease Inhibitor Cocktail for General Use	ナカライテスク
Recombinant influenza hemagglutinin (HA)	
A/California/7/2009 (H1N1)	
B/Brisbane/60/2008	株式会社 UNIGEN より提供
RNA iso plus	タカラバイオ株式会社
Sodium iodide	和光純薬工業株式会社
SYBR [®] Premix Ex Taq [™] II (Tli RNaseH Plus)	タカラバイオ株式会社
<i>m</i> -Xylene	和光純薬工業株式会社
大塚生食注	大塚製薬株式会社

2-3. Primers

- mGAPDH

Forward: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

Reverse: 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

- mTSLP

Forward: 5'-AGCTTGTCCCTGAAAATCGAG-3'

Reverse: 5'-AGGTTTGATTCAGGCAGATGTT-3'

- mTNF- α

Forward: 5'-CCTCCCTCTCATCAGTTCTA-3'

Reverse: 5'-ACTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'

- mIL-1 β

Forward: 5'-GAAGAAGAGCCCATCCTCTG-3'

Reverse: 5'-TCATCTCGGAGCCTGTAGTG-3'

- mCYP26A1

Forward: 5'-AGAGCAAGGGCTTACTTTGC-3'

Reverse: 5'-CCTGGAACCGGAGGATTCAA-3'

- mCRABP-2

Forward: 5'-ACCTCCACCACTGTGCGAAC-3'

Reverse: 5'-CGGAAGTCGTCTCAGGCAGT-3'

以上、株式会社 FASMAC

2-4. 試薬の調製

・ 10 × Phosphate-buffered saline (PBS)

NaCl	40 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	14.5 g
KCl	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MilliQ 水	500 mL

調製後、オートクレーブ滅菌（121 °C、15 分間）を行った。適宜、MilliQ 水で 10 倍に希釈して 1 × PBS とし、再度同様にオートクレーブ滅菌を行った。

・ 40 mM atRA acetone 溶液

atRA	100 mg
Acetone	8.35 mL

これを原液とし、用時 acetone で希釈して各種濃度として使用した。

・ 5 mM BMS195614

BMS195614	10 mg
Acetone	4.4 mL

・ 5 mM BMS189961

BMS189961	10 mg
Acetone	5 mL

• 5 mM BMS753

BMS753	5 mg
Acetone	2.8 mL

• 5 mM MM11253

MM11253	10 mg
Acetone	4.4 mL

• 4 % パラホルムアルデヒド

パラホルムアルデヒド	2 g
PBS	10 mL

以上を分注して凍結保存し、用時融解し、PBS で 5 倍希釈して用いた

• Hematoxylin staining solution

Ethanol	5 mL
Hematoxylin	1 g
AlK (SO ₄) ₂ · 12H ₂ O	25 g
Sodium iodide	0.2 g
Glycerin	100 mL

• Eosin concentrate solution

Eosin Y	5 g
Acetic acid	1 mL
IEW	100 mL

• Eosin staining solution

Eosin concentrate solution	100 mL
80 % Ethanol	300 mL

• 5 % BSA-PBS

BSA	5.0 g
PBS	100 mL

• PBT

PBS	50 mL
Tween 20	0.5 mL

• DEPC 水

DEPC	1 mL
MilliQ 水	1 L

よく混合し、室温に一晩おいた後 121 °C で 40 分間オートクレーブ処理を行った。

• 75% Ethanol

Ethanol	30 mL
DEPC 水	10 mL

・逆転写反応溶液 (1 サンプル当たり)

PrimeScript [®] RT Master Mix (Perfect Real Time)	2 μ L
MilliQ 水	3 μ L
希釈済み抽出 RNA 溶液	5 μ L

必要に応じて適宜スケールアップした。

・ Quantitative real-time PCR 反応溶液 (1 サンプル当たり)

SYBR [®] Premix Ex Taq [™] II (Tli RNaseH Plus)	5 μ L
Forward primer	0.05 μ L
Reverse primer	0.05 μ L
MilliQ 水	3.9 μ L
逆転写済み cDNA 溶液	1 μ L

なお、primer は以下の TE buffer で溶解し、100 μ M としたものをを用いた。

・ 1 M Tris

Tris	6.06 g
IEW	50 mL

5 M HCl で pH 8.0 とした。

・ 0.5 M EDTA

EDTA \cdot 2Na \cdot 2H ₂ O	9.31 g
IEW	50 mL

5 M NaOH で pH 8.0 とした。

• 10 × TE buffer

1 M Tris	10 mL
0.5 M EDTA	2 mL
IEW	88 mL

121 °C 15 分間のオートクレーブ処理後、用時、IEW で 10 倍希釈して用いた。

• 逆転写反応溶液 (1 サンプル当たり)

PrimeScript [®] RT Master Mix (Perfect Real Time)	2 μL
MilliQ 水	3 μL
希釈済み抽出 RNA 溶液	5 μL

必要に応じて適宜スケールアップまたは逆転写後に MilliQ 水で希釈した。

• Quantitative real-time PCR 反応溶液 (1 サンプル当たり)

SYBR [®] Premix Ex Taq [™] II (Tli RNaseH Plus)	10 μL
Forward primer	0.05 μL
Reverse primer	0.05 μL
MilliQ 水	7.9 μL
逆転写済み cDNA 溶液	2 μL

• 組織ホモジナイズ用 buffer

適宜必要量の PBS に対し、1/200 量の Protease Inhibitor Cocktail for General Use を加えたものを用いた。

• 1 % BSA-PBS

BSA	5.0 g
PBS	500 mL

• 25 × PBS

NaCl	100 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	36.25 g
KCl	2.5 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
MilliQ 水	500 mL

• 25 × wash buffer

Polyoxiethylene (20) sorbiton monooleate	6.25 mL
25 × PBS	500 mL

用時、IEW で 25 倍に希釈して使用した。

• 1 M H₃PO₄

H ₃ PO ₄
MilliQ 水

• OVA 溶液

OVA	20 mg
大塚生食注	1 mL

上記溶液を適宜、大塚生食注で 1 または 3 μg/50 μL となるよう希釈して使用した。

HA 溶液 (A/California/7/2009 (H1N1))

A/California/7/2009 (H1N1) (536.5 µg/mL)	100 µL
--	--------

大塚生食注	1690 µL
-------	---------

HA 溶液 (B/Brisbane/60/2008)

B/Brisbane/60/2008 (760.8 µg/mL)	100 µL
----------------------------------	--------

大塚生食注	2440 µL
-------	---------

なお、HA 抗原原液は、-80 °C に保存していたものを 30 °C の水浴で融解し、on ice にて希釈した。

3. 実験方法

3-1. マウス耳介への薬物投与

3-1-1. マウス処置

マウスを isoflurane 麻酔下、各種薬物を記載の用量 (acetone 20 μ L に溶解) で耳介皮膚に塗布した。記載の時間の経過後、マウスを頸椎脱臼にて致死させ、耳介組織を回収した。ELISA 用のサンプルに関しては、重量も測定した。また、必要に応じて、投与および致死させる直前に耳介組織の厚さを gauge (DIAL THICKNESS GAUGE G, PEACOCK) にて測定した。

3-1-2. ELISA 用サンプル処置

回収した耳介組織に、組織ホモジナイズ用 buffer 500 μ L/sample を加え、クラッシュ用ビーズ (直径 5 mm) を用いて、5000 rpm で 30 秒間ホモジナイズした。続いてこれらを 21600 g , 4 $^{\circ}C$ で 20 分間遠心分離した。その後、上清を回収し、ELISA 法による測定サンプルとした。

3-1-3. ELISA 法によるタンパク質の測定

ホモジネート上清中の TSLP, TNF- α , IL-1 β の測定は、各測定キットの取り扱い説明書に従って行った。TSLP の測定に際しては、発色基質として ELISA POD 基質 TMB キットを使用した。発色反応の停止液には、いずれの場合も 1M H_3PO_4 を用いた。なお、組織ホモジネート中のタンパク質濃度は、Satou の方法 (32) に従って計算した。

3-1-4. RNA 抽出

回収した耳介組織に、RNA iso plus 500 μ L/sample を加え、3-1-2 と同様に crash した。続いて chloroform 100 μ L/sample を加え、よく振り混ぜたのちに遠心分離 (21600 g , 4 $^{\circ}C$, 15 min) を行った。この上清を回収し、2-propanol 250 μ L/sample を加え、ボルテ

ックスして 10 分静置した。これを再度同様に遠心分離し、沈殿した RNA ペレットを 75 % ethanol 500 μ L/sample で 2 回洗浄した。洗浄後のペレットは乾燥させたのち、DEPC 水で 50 ng/ μ L となるように溶解した。

3-1-5. 逆転写反応

96 well PCR plate (WATSON) を用いて逆転写反応溶液を作製し、PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (タカラバイオ株式会社) を用いて、以下の条件で逆転写反応を行った。

37 °C	85 °C	4 °C
15 min	5 sec	∞

3-1-6. qRT-PCR

8 連 PCR チューブ (日本ジェネティクス) を用いて 2-4 の通り Quantitative real-time PCR 反応溶液を作製し、Thermal Cycle Dice[™] Real Time System (タカラバイオ株式会社) を用いて、以下の条件で PCR を行った。

Hold	2 Step PCR		Dissociation		
95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	60 °C	95 °C
30 sec	5 sec	60 sec	15 sec	30 sec	15 sec
40 cycles					

3-1-7. qRT-PCR の解析

各サンプルの threshold cycle (Ct) 値は 2nd derivative maximum 法により算出し、各遺伝子の発現量は各々のサンプルの GAPDH mRNA 発現量で補正し、コントロールの値を 1.0 として表記した。

3-1-8. 凍結切片の作成

回収した耳介組織を液体窒素で凍結した。これを O.T.C. compound 中へ投入し、液体窒素で compound を凍結させて包埋した。この凍結組織を、クリオスタットを用いて

10 μm の厚さに薄切し、APS コートのスライドガラス（松浪硝子工業）に張り付け、凍結切片とした。張り付けた切片は、4 % paraformaldehyde 溶液で 15 分間処理して固定した。

3-1-9. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

固定処理した試料を hematoxylin 染色液に 7 分間浸し、水道水で軽く水洗した後 IEW に 10 分間浸し、色出しを行った。次いで eosin 染色液に 2 分間浸し、水道水で軽く水洗した。そして 70 % ethanol (1 回)、100 % ethanol (2 回)、xylene (3 回) の順に浸し、脱水処理を行った。その後、カバーガラスを用いて封入処理を行った。皮膚組織は光学顕微鏡にて、倍率 200 倍で観察した。

3-1-10. 免疫染色

Paraformaldehyde 処置後の試料を、PBS で 3 回洗浄した。続いて、5 % BSA-PBS でスライドガラスを 1 時間処置し、blocking を行った。その後、can get signal で 1000 倍希釈した anti-TSLP rabbit polyclonal IgG でスライドガラスを処置し、4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。翌日、PBT で 3 回洗浄したのち、室温遮光条件下で、can get signal で 2000 倍希釈した Alexa Fluor[®] 488 で 1 時間処置した。さらに PBT で 3 回洗浄後、5 % BSA-PBS で 1000 倍希釈した DAPI 溶液で、遮光して室温で 15 分処置した。そしてカバーガラスで封入し、共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。

3-2. マウスへの抗原感作実験

3-2-1. マウスへの OVA 感作実験

まず第 0 日に、マウスを isoflurane 麻酔下、背部皮膚を剃毛した。そして剃毛部に acetone または記載用量の atRA (acetone 40 μL に溶解) を塗布し、24 時間放置した。続いて、第 1 日に、atRA を投与した部位と同じ部位に、記載量の OVA を 50 μL の大塚

生食注に溶解したものを皮内投与した。感作後は 7 日ごとのケージ交換を行った。第 21 日に、マウスを isoflurane 麻酔下、頸動脈を切断して血液を回収後、致死させた。回収した血液は 860 μ g, 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離し、上清を回収し、- 20 $^{\circ}$ C に保存した。

3-2-2. OVA-IgG の測定

まず、bicarbonate buffer (0.1 M Na_2CO_3 と 0.1 M NaHCO_3 を 3:7 で混合) で 10 mg/mL OVA 液を 1000 倍希釈し、96 well plate の各 well へ 100 μ L ずつ加え、室温で一晩インキュベートした。翌日、wash buffer で 3 回洗浄し、1 % BSA-PBS を各 well に 300 μ L 加え、室温で 1 時間インキュベートして blocking を行った。Blocking 後、wash buffer で 3 回洗浄し、血清サンプルを 1 % BSA-PBS で適宜希釈して各 well に 100 μ L ずつ加え、室温で 2 時間インキュベートした。続いて wash buffer で 3 回洗浄後、1 % BSA-PBS で 6000 倍希釈した Mouse IgG HRP Linked Whole Ab を 100 μ L ずつ分注し、室温で 1 時間インキュベートした。さらに wash buffer で 3 回洗浄し、ELISA POD 基質 TMB 溶液を 100 μ L ずつ加えて遮光し、室温で 20 分間インキュベートした。最後に 1 M H_3PO_4 100 μ L ずつ加えて反応を止め、450 nm の吸光度を測定し、Anti-Ovalbumin IgG1 (mouse) ELISA Standard を用いて作成した検量線をもとに、各サンプルの OVA-IgG 濃度を計算した。

3-2-3. OVA-IgE の測定

まず、bicarbonate buffer (0.1 M Na_2CO_3 と 0.1 M NaHCO_3 を 2:3 で混合) で Goat-anti-Mouse IgE を 500 倍希釈し、96 well plate の各 well に 100 μ L ずつ加え、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。翌日、wash buffer で 4 回洗浄し、1 % BSA-PBS を各 well へ 100 μ L ずつ加え、室温で 1 時間インキュベートして blocking を行った。Blocking 後、wash buffer で 1 回洗浄し、血清サンプルを 1 % BSA-PBS で適宜希釈して各 well に 100 μ L 加え、室温で 2 時間インキュベートした。続いて wash buffer で 4 回洗浄後、1 %

BSA-PBS で 10000 倍希釈した ovalbumin, Biotin labeled を各 well へ 100 μ l ずつ加え、室温で 1 時間インキュベートした。さらに、wash buffer で 4 回洗浄したのち、avidin-HRP 液を各 well に 100 μ L ずつ加え、室温で 30 分間インキュベートした。そして、wash buffer で 4 回洗浄したのち、ELISA POD 基質 TMB 溶液を各 well へ 100 μ L ずつ加えて遮光し、室温で 20 分間インキュベートした。最後に 1 M H_3PO_4 100 μ l を各 well へ加えて反応を止め、450 nm の吸光度を測定し、Anti-Ovalbumin IgG1 (mouse) EIA Kit に含まれる Anti-Ovalbumin IgG1 (mouse) EIA standard を用いて作成した検量線をもとに、各サンプルの OVA-IgE 濃度を計算した。

3-2-4. マウスへのリコンビナント HA 感作実験

まず第 0 日に、マウスを isoflurane 麻酔下、背部皮膚を剃毛した。そして剃毛部に acetone (40 μ L) または記載用量の atRA (acetone 40 μ L に溶解) を塗布し、24 時間後に、atRA を投与した部位と同じ部位に、記載量の HA を 50 μ L の大塚生食注に溶解したものを皮内投与した。感作後は 7 日ごとのケージ交換を行った。また、第 20 日と 21 日に、それぞれ atRA の投与と HA の感作をそれぞれ再度行った。第 35 日に、マウスを isoflurane 麻酔下、頸動脈切断により血液を採取後、致死させた。採取した血液は 860 μ g, 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離し、上清を回収し、-20 $^{\circ}$ C に保存した。

3-2-5. 抗 HA 抗体価測定

赤血球凝集抑制 (HI) 法による抗 HA 抗体価の測定は、株式会社 UMN ファーマに依頼した。

3-3. 統計処理

各データは 平均値±標準誤差 で示した。ただし、抗 HA 抗体価は幾何平均値を示した。全数値に対して棄却検定を Thompson's F-test にて行い、有意差検定は Student's *t*-test または Student-Newman-Keuls test により行った。

4. 結果

4-1. atRA による TSLP 発現の誘導

4-1-4. TSLP 発現に対する atRA の作用

記載の用量の atRA を ICR 雄性マウスの耳介皮膚に塗布し、24 時間後の TSLP 発現を検討した。その結果、atRA は ICR マウス耳介組織中の TSLP mRNA およびタンパク質レベルをともに用量依存的に増加させた (Fig. 1)。

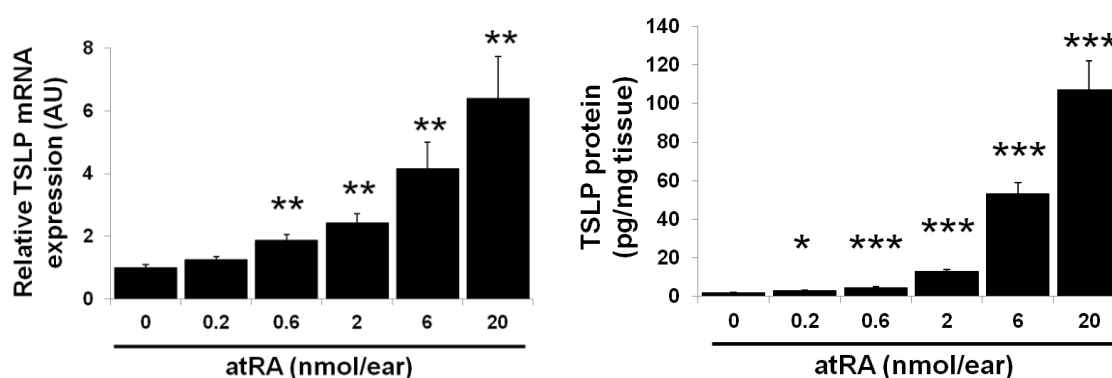


Figure 1. atRA induces TSLP expression in ears of mice.

Indicated amount of atRA was applied on the ear lobes of ICR male mice. Twenty-four hours later, the mice were sacrificed and their ears were collected. The mRNA and protein levels of TSLP in the ear homogenate were measured by qRT-PCR and ELISA respectively. Expression levels of mRNA were standardized against *Gapdh* mRNA expression in the same sample and the mean value of acetone-group at time 4 h was set at 1.0. Data are shown as mean \pm S.E.M. from 6-8 ear samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. atRA (-) group.

4-1-2. atRA の TSLP 発現誘導のマウス系統差

マウス耳介皮膚における atRA による TSLP 発現誘導が、ICR マウス以外の系統のマウスでも見られるかを検討した。ICR, BALB/c および C57BL/6 マウスの耳介皮膚に、2 nmol/ear の atRA を塗布し、24 時間後の TSLP タンパク質発現量を測定した。その結果、強さに差はあるものの、いずれの系統のマウスでも、atRA による TSLP 発現の誘導が認められることが示された。すなわち、atRA による TSLP 誘導の強さは、ICR マウスにおいて最も強く、C57BL/6 マウスにおいて最も弱かった (Fig. 2)。そこで、以下、特に記載しない場合は、最も TSLP 産生量が高かった ICR マウスを用いた。

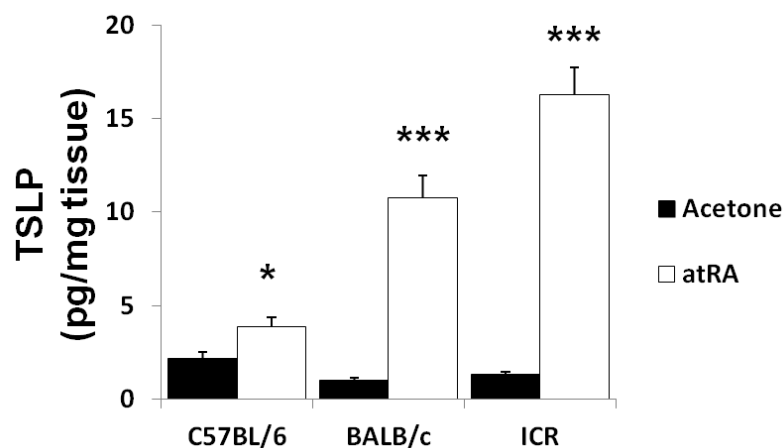


Figure 2. atRA induces TSLP expression in ICR, BALB/c, and C57BL6 mice.

Two nmol/ear of atRA was applied on the ear lobes of ICR, BALB/c, and C57BL/6 male mice. Twenty-four hours later, the mice were sacrificed and their ears were collected. The protein levels of TSLP in the ear homogenate were measured by ELISA. Data are shown as mean \pm S.E.M. from 6-8 ear samples. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. corresponding atRA (-) group.

4-1-3. atRA による TSLP 発現の経時変化

マウス耳介皮膚に atRA を塗布した場合の TSLP 発現誘導の経時変化を検討した。ICR 雄性マウスの耳介に 2 nmol/ear の atRA を塗布し、4, 8, 12, 24, および 48 時間後の耳介組織中の TSLP 発現を検討した。その結果、TSLP mRNA 発現は atRA 塗布後 12 時間、TSLP タンパク質発現は atRA 塗布後 24 時間をピークとして上昇することが明らかになった (Fig. 3)。

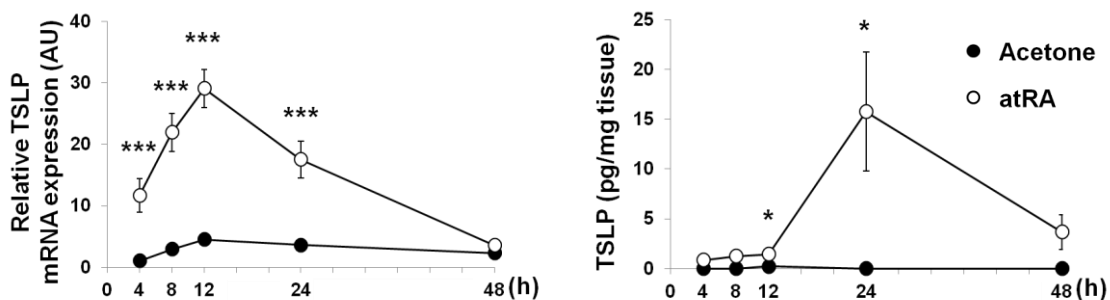


Figure 3. Timecourses of TSLP expression by atRA.

Two nmol/ear of atRA was applied on the ear lobes of ICR male mice. Four, 8, 12, 24, and 48 hours later, the mice were sacrificed and their ears were collected. The mRNA and protein levels of TSLP in the ear homogenate were measured by qRT-PCR and ELISA respectively. Expression levels of mRNA were standardized against *Gapdh* mRNA expression in the same sample and the mean value of acetone-group at time 4 h was set at 1.0. Data are shown as mean \pm S.E.M. from 4-8 ear samples. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. corresponding atRA (-) group.

4-1-4. atRA の炎症誘発作用の評価

マウス皮膚への atRA の塗布が、炎症反応を誘導するかを検討した。2 nmol/ear の atRA を ICR 雄性マウス耳介に塗布し、4, 8, 12, 24, および 48 時間後の耳介組織中の炎症性サイトカインの発現を解析した。その結果、代表的な炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β の mRNA、およびタンパク質は、いずれも atRA による有意な上昇を示さなかった (Fig. 4A)。また、皮膚の炎症所見の指標の一つとして、各時間における耳介組織の厚さを計測したところ、acetone および atRA 両群間での有意な差は認められなかった。加えて、atRA 投与後 24 時間時点での耳介組織切片を作製し、HE 染色像を観察したところ、atRA 塗布群においても明らかな細胞浸潤の増加、組織の肥厚などの炎症所見は認められなかった (Fig. 4B, C)。

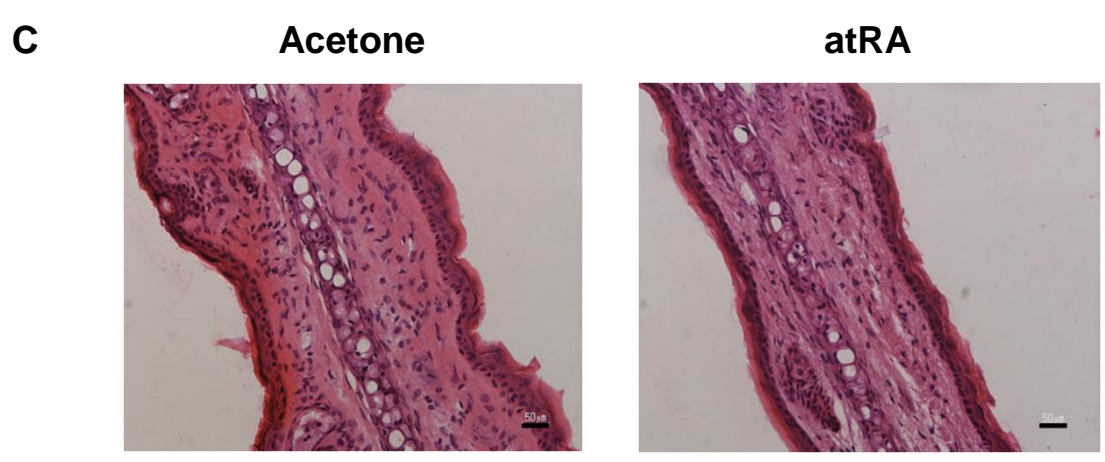
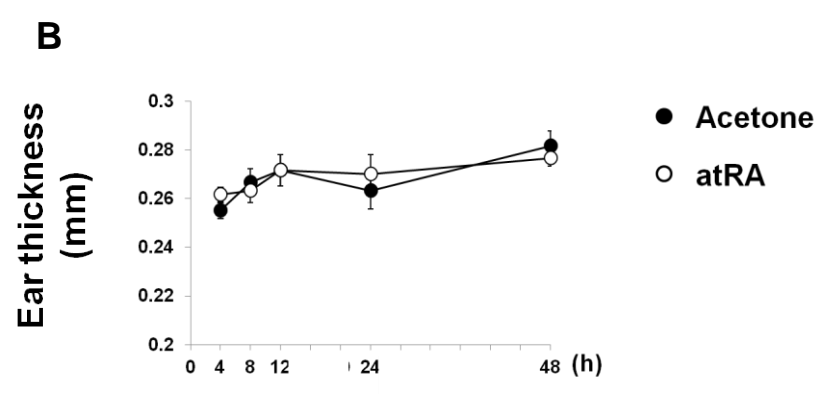
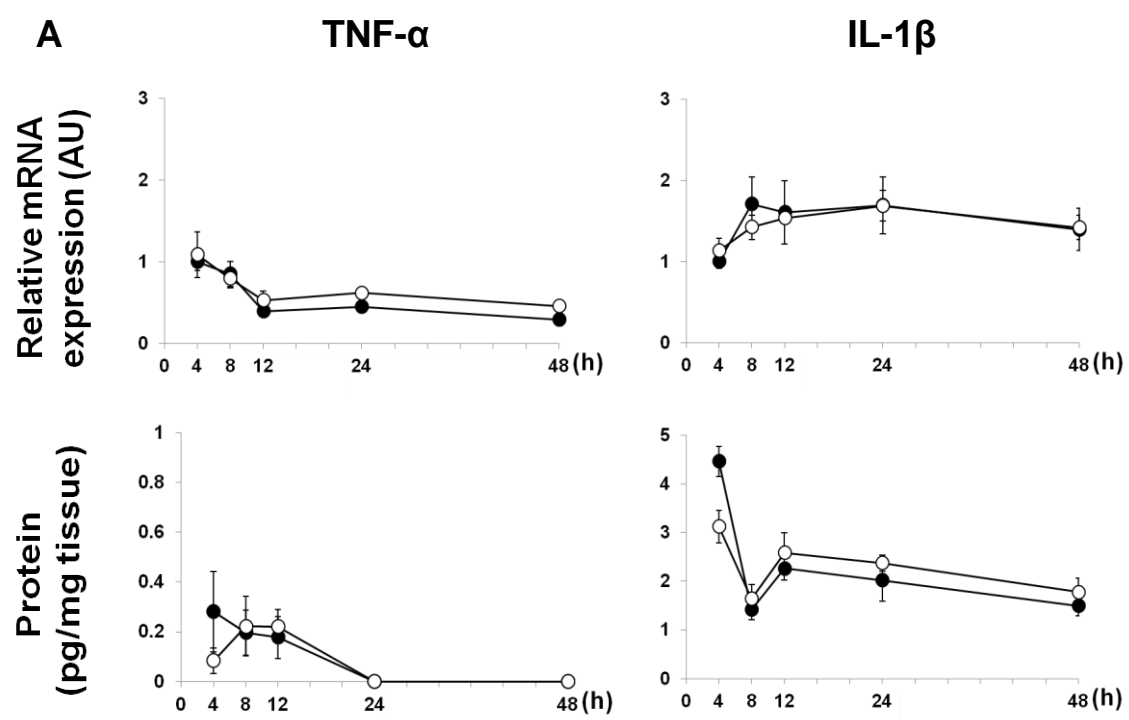


Figure 4. Topical atRA did not induce inflammation.

(A) Two nmol/ear of atRA was painted on ear lobes of ICR male mice. Mice were sacrificed 4, 8, 12, 24, and 48 h after painting, and their ears were excised and homogenized. The mRNA and protein levels of major inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) were measured using qRT-PCR and ELISA respectively. Expression levels of mRNA were standardized against *Gapdh* mRNA expression in the same sample and the mean value of acetone-group at time 4 h was set at 1.0. (B) Ear thickness was measured before and 4, 8, 12, 24, and 48 h after 2 nmol/ear of atRA application. (C) ICR male mice were treated with acetone or 2 nmol/ear atRA on their ear lobes. Twenty-four hours later, ears were collected, sectioned, and stained by H&E. Sections were observed at 200-fold magnification. The scale bars indicate 40- μ m portions. Data are shown as mean \pm SEM from 4-8 ear samples (A, B) and the pictures are representative pictures (C).

4-1-5. atRA により誘導された TSLP タンパク質の局在

マウス耳介に、2 nmol/ear の atRA を塗布し、その 24 時間後の TSLP の局在を、抗 TSLP 抗体を用いた免疫染色法により検討した。その結果、TSLP は主に表皮組織に局在していることが明らかになった (Fig. 5)。

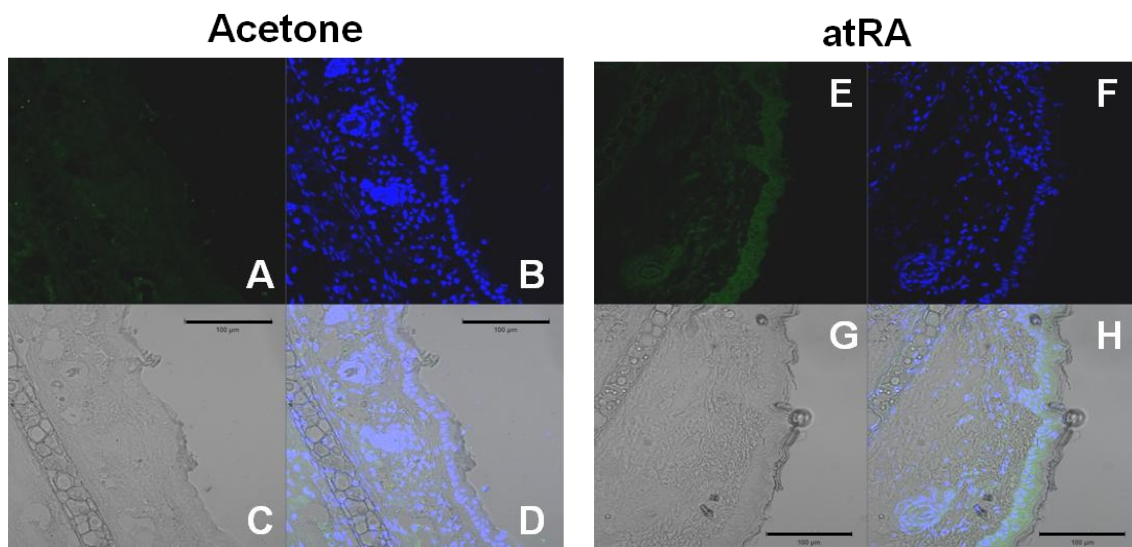


Figure 5. Localization of atRA-induced TSLP. ICR male mice were treated with acetone or 2 nmol/ear of atRA on their ear lobes. Twenty-four hours later, mice were sacrificed and ears were collected. The frozen sections of ears were prepared and TSLP was immunostained. Sections were observed at 200-fold magnification and scale bars indicate 100- μ m sections. (A and E) TSLP-immunostaining, (B and F) DAPI staining, (C and G) differential interference contrast image, (D and H) merge. The experiments were performed twice independently and representative pictures are shown. Brightness was increased by 10 % in all pictures.

4-1-6. atRA による TSLP 誘導に関与している受容体

atRA による TSLP 発現誘導における、RAR の各サブタイプの関与を、各受容体の antagonist を用いて検討した。なお、また、皮膚組織には RAR α および γ が発現し、RAR β はほとんど発現していないことが報告されているため (42)、RAR α および RAR γ の関与についてのみ検討した。

その結果、atRA による TSLP 発現誘導は、RAR α antagonist の BMS195614 (43) により有意に抑制された。一方で、RAR γ antagonist とされる MM11253 (44) は atRA による TSLP 発現誘導を、有意に増強した。また、MM11253 は単独でも TSLP 発現を誘導した (Fig. 6)。

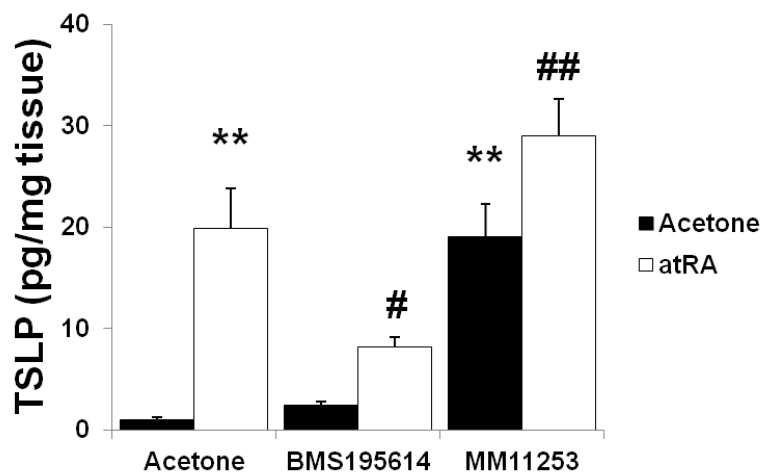


Figure 6. Effect of RAR α and γ antagonists on atRA-induced TSLP production.

Acetone solution (200 nmol/ear each) of BMS195614 (RAR α antagonist), and MM11253 (RAR γ antagonist) was administered in combination with acetone or 2 nmol/ear atRA on ear lobes of ICR male mice. Twenty-four hours after administration, mice were sacrificed and the ears were excised and homogenized. The TSLP protein levels were measured using ELISA. Data are shown as mean \pm SEM from 4-8 ear samples. ** $p < 0.01$ vs. control group, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. corresponding atRA (-) group.

4-1-7. TSLP 産生における RAR α と RAR γ の協働作用

RAR α agonist の BMS753 および RAR γ agonist の BMS189961 (43) を用いて、両受容体の TSLP 産生に対する作用を検討した。その結果、BMS189961 は単独で TSLP 発現を上昇させた。BMS753 は単独では TSLP 発現を有意に変化させなかったが、BMS189961 による TSLP 発現誘導を増強することが示された。BMS195614 は単独の場合も BMS189961 と併用した場合も、TSLP 産生に有意な変化を及ぼさなかった (Fig. 7)。

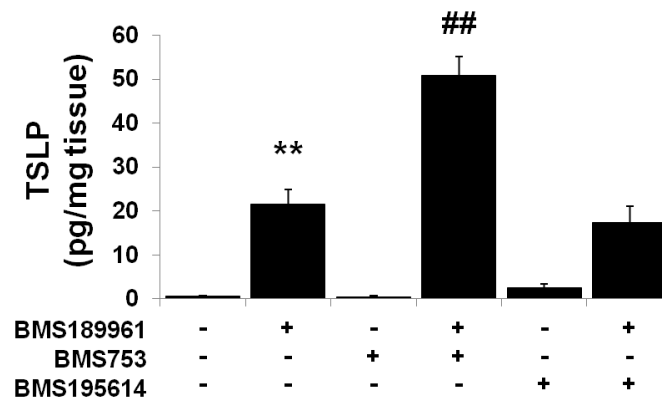


Figure 7. Effect of RAR α and γ on TSLP production.

Agonists and antagonists of RAR α and RAR γ , (100 nmol/ear each), were administered on ear lobes of ICR male mice in the described combination. Twenty-four hours after administration, mice were sacrificed and the ears were excised and homogenized. The TSLP protein levels were measured using ELISA. Measurements are shown as mean \pm SEM from 7-8 ear samples. ** $p < 0.01$ vs. control group and ## $p < 0.01$ vs. BMS189961 only group.

4-1-8. MM11253 の RAR γ agonist 活性

4-1-6 および 4-1-7 の結果より、RAR γ agonist の BMS189961 および antagonist とされる MM11253 とも、TSLP 発現を誘導することが示された。ここで、MM11253 が単純な RAR γ の antagonist ではなく、agonist 活性も持つ可能性が考えられたため、両試薬をマウス耳介皮膚に塗布したときの、TSLP 発現および RAR γ 活性のマーカ遺伝子である CYP26A1 および CRABP-2 (45) 発現を検討した。その結果、BMS189961, MM11253 とも TSLP タンパク質、CYP26A1 および CRABP-2 mRNA の発現を有意に上昇させ、かつその活性は前者の方が強かった。この結果より、MM11253 は純粋な RAR γ antagonist ではなく、少なくとも部分的な agonist 活性を持つことが示された (Fig. 8)。

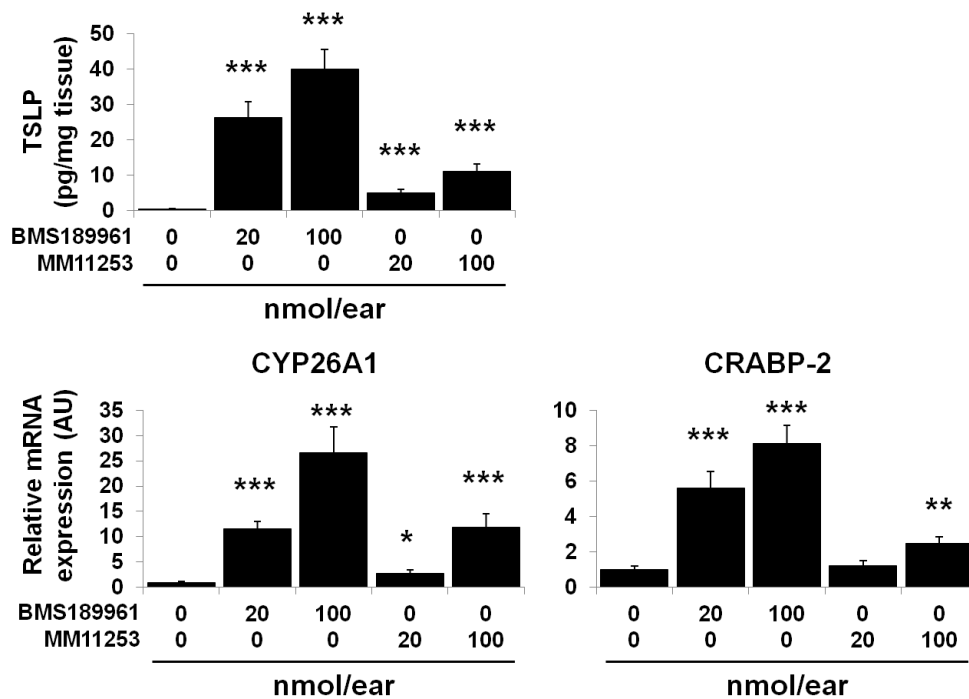


Figure 8. Agonistic activity of MM11253 on RAR γ

RAR γ agonist (BMS189961) and antagonist (MM11253) were administered on ear lobes of ICR male mice. Twenty-four hours after administration, mice were sacrificed and the ears were excised and homogenized. The TSLP protein levels were measured using ELISA. The mRNA levels of *Cyp26a1* and *Crabp-2* were measured using qRT-PCR. Their mRNA levels were then standardized against *Gapdh* mRNA expression in the same samples; the mean value of control group was set at 1.0. Measurements are shown as mean \pm SEM from 7-8 ear samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ vs. control group.

4-2. atRA のアジュバント効果

4-2-1. atRA の抗 OVA 抗体産生増強作用

atRA が TSLP 発現誘導を介して、安全なアジュバントとして機能する可能性が考えられた。そこで、atRA の皮膚への投与が、マウスへの OVA 感作実験において、抗 OVA 抗体の産生を増強するかを検討した。

まず、ICR 雄性マウスの背部皮膚に 4~40 nmol/site の atRA を塗布した。TSLP 発現がピークとなる 24 時間後、背部皮内に 1 または 3 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の OVA で感作し、21 日間飼育した。21 日後、マウスから血液を採取し、血清中の OVA 特異的 IgG (OVA-IgG) および OVA 特異的 IgE (OVA-IgE) 量を ELISA 法により測定した。その結果、マウスあたり 3 μg の OVA で感作した場合、12 nmol 以上の atRA を前処置することにより、OVA-IgG 産生が有意に上昇し、また、4 nmol の atRA でも増加する傾向が認められた (Fig. 9A)。この時、OVA-IgE 産生量も同時に測定したところ、atRA 4 nmol では有意な上昇は見られず、12 nmol 以上で有意な上昇または上昇傾向を示すことがわかった (Fig. 9B)。また、OVA の投与量がマウスあたり 1 μg の場合、やはり OVA-IgG 産生は atRA 4 nmol 以上で有意な上昇、または上昇傾向を示すことがわかった (Fig. 9C)。この時、OVA-IgE はいずれの群でも検出されなかった。

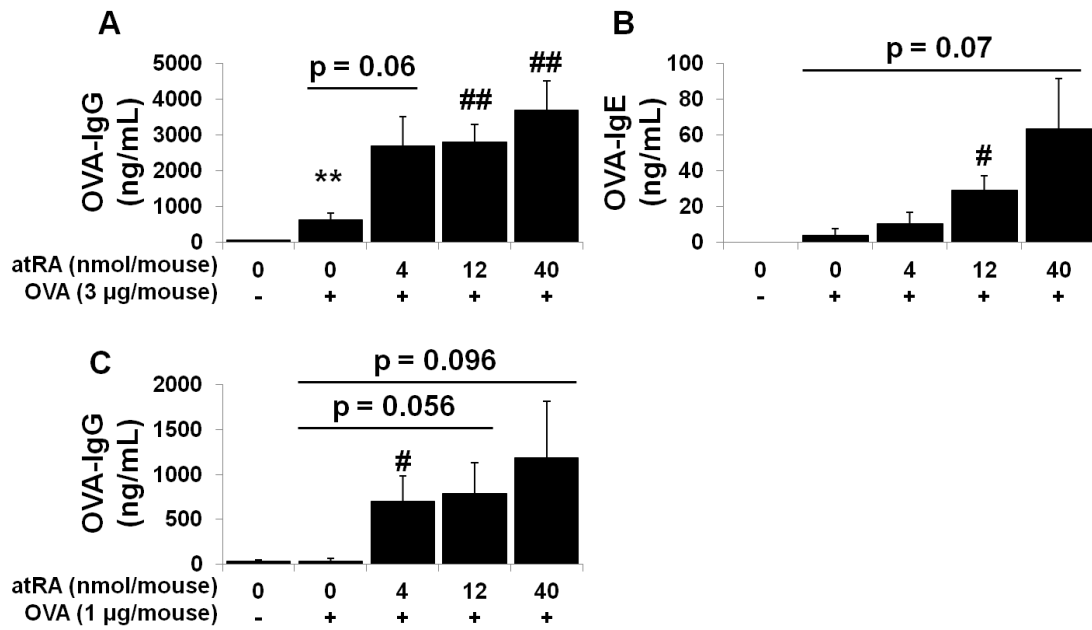


Figure 9. atRA enhances antibody production during OVA sensitization.

On day 0, ICR male mice were painted with the indicated dose of atRA on their dorsal skin. Twenty-four hours later, the mice were administered saline or 1 or 3 µg/mouse of OVA intradermally. On day 21, the mice were sacrificed and their blood was collected. Serum OVA-IgG and OVA-IgE levels were measured using ELISA. Measurements are shown as mean \pm SEM from 5-6 samples. ** $p < 0.01$ vs. control, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. OVA alone.

4-2-2. atRA の抗 hemagglutinin (HA) 抗体産生増強作用

atRA が HA 感作実験においても、OVA 感作実験と同様に抗原に対する抗体産生を増強するかを検討した。本実験では、HA 感作実験において一般的に使用されている BALB/c 雌性マウスを使用した (46, 47)。BALB/c 雌性マウスの背部皮膚に 40 nmol/mouse の atRA を塗布し、24 時間後に記載の用量の HA (A カリフォルニア株または B ブリスベン株) を皮下注射した。HA は抗原性が低いため、初めの感作から 20 日後と 21 日後に、再度 atRA の塗布と抗原感作をそれぞれ行った。初めの感作から 35 日後、マウスから血液を採取し、血清中の抗 HA 抗体価を HI 法により測定した。その結果、A カリフォルニア株を感作した場合、atRA 40 nmol/mouse を抗原感作の 24 時間前に投与することで、HA に対する抗体価は有意に上昇または上昇する傾向を示した。一方、B ブリスベン株の場合、絶対的な抗体価が A カリフォルニア株より低く、atRA 前処置による有意な変化は得られなかったが、全体的に atRA の前処置により抗体価が上昇する傾向が見られた (Fig. 10A)。続いて、A カリフォルニア株 HA を用い、抗原用量を 0.003 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{time}$ に固定し、抗体産生量に対する atRA の用量依存性を、同様の方法で検討した。その結果、atRA の用量に依存して、抗体価は有意に上昇または上昇する傾向を示した (Fig. 10B)。

通常、抗 HA 抗体価は 40 以上で十分な感染防御能を示し、抗体価が陽性に転換したと判定される (48, 49)。データは示していないが、上記の実験において、atRA を前処置することにより、抗体価の陽性転換率も向上することが確認された。

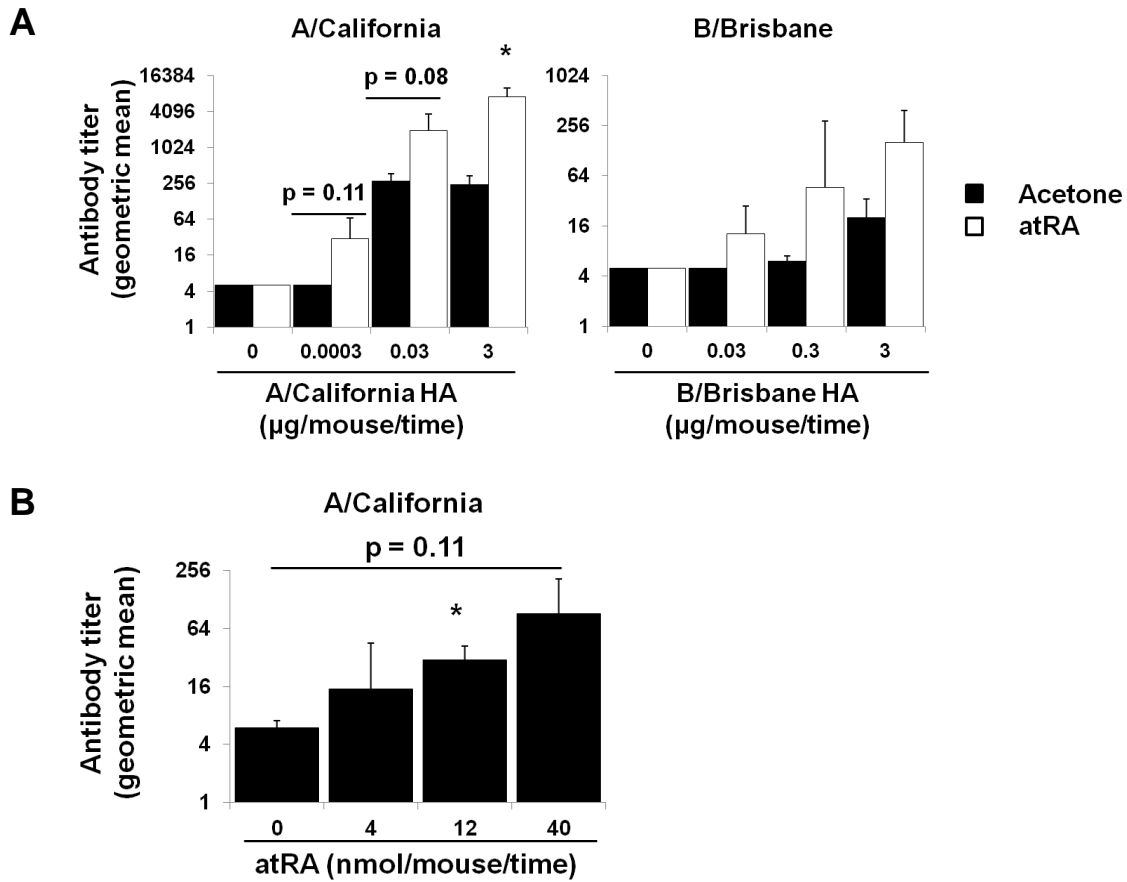


Figure 10. atRA enhances antibody production during HA sensitization

(A) On day 0, BALB/c female mice were administered 40 nmol/mouse of atRA on their dorsal skin. Twenty-four hours later, the described dose of recombinant HA (A/California/7/2009(H1N1) or B/Brisbane/60/2008) was administered subcutaneously at the same site. These treatments were repeated after 20 days. On day 42, mice were sacrificed and their blood was collected. (B) On day 0, BALB/c female mice were administered a described dose of atRA on their dorsal skin. Twenty-four hours after this, 0.003 µg/mouse recombinant HA (A/California/7/2009(H1N1)) was administered subcutaneously at the same site. These treatments were repeated after 20 days. On day 42, mice were sacrificed and their blood was collected. Serum HA-neutralizing antibody levels were measured by HI-test. Results are shown as the geometric mean \pm SEM from 5 samples. (A) * $p < 0.05$ vs. corresponding atRA (-). (B) * $p < 0.05$ vs. atRA (-).

4-3. atRA のアジュバント効果の特性

4-3-1. TSLPR-KO マウスにおける atRA による TSLP 産生誘導とアジュバント効果

TSLPR-KO マウスにおいて、atRA の TSLP 産生誘導作用とアジュバント効果がどのように変化するかを検討した。本実験では、TSLPR-KO マウスの系統に合わせて、C57BL/6 マウスを使用した。まず、耳介に 2 nmol/ear の atRA を塗布し、24 時間後の組織中 TSLP 産生量を検討したところ、wild type より弱いものの、TSLPR-KO マウスにおいても atRA による TSLP 発現誘導が認められた(Fig. 11A)。続いて、TSLPR-KO マウスにおける atRA のアジュバント効果を調べるため、4-2-1 と同様の実験を行った。その結果、野生型 C57BL/6 マウスでも atRA のアジュバント効果は ICR マウスと同様に見られたが、TSLPR-KO マウスにおいてはこのアジュバント効果はほぼ完全に消失した (Fig. 11B)。

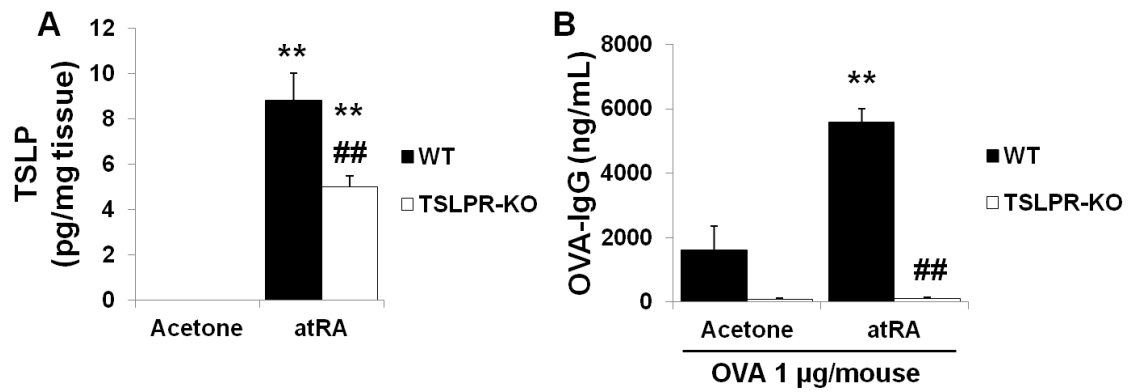


Figure 11. Adjuvant effect of atRA is canceled in TSLPR-KO mice.

(A) C57BL/6 wild type and TSLPR-KO mice were treated with acetone or 2 nmol/ear of atRA on their ears. Twenty-four hours later, their ears were collected and homogenized. The TSLP levels in the homogenate were determined by ELISA. (B) C57BL/6 wild type and TSLPR-KO mice were treated similarly as described in 4-2-1. Acetone or 4 nmol/mouse atRA plus 1 µg/mouse OVA was administered to all mice. Serum OVA-IgG levels were measured using ELISA. Measurements are shown as mean ± SEM from 5-6 samples. ** $p < 0.01$ vs. corresponding atRA (-), ## $p < 0.01$ vs. corresponding wild-type.

4-3-2. atRA のアジュバント効果は投与局所に限定している

atRA により皮膚において産生誘導された TSLP が、どの程度全身に拡散するかを検討した。ICR マウス耳介皮膚に記載の用量の atRA を塗布し、24 時間後の耳介組織中および血清中の TSLP 濃度を測定した。その結果、耳介皮膚への atRA の投与は、血清中 TSLP 濃度を有意に増加させるものの、その絶対的な濃度は耳介組織中と比べてはるかに低いことがわかった (Fig. 12A)。

続いて、経皮投与した atRA のアジュバント効果が、局所的なものなのか、全身性のものなのかを検討した。本実験では、acetone または atRA を背部皮膚あるいは左耳に塗布し、24 時間後に OVA を背部皮内に注射した。これまでの OVA 感作実験と同様に処置したのち、血清中の OVA 特異的 IgG 濃度を測定した。その結果、atRA と OVA の投与部位を同一にした群 (Same site) ではこれまで通り atRA のアジュバント効果が認められたが、投与部位が異なる群 (Separated site) では atRA のアジュバント効果は認められなかった (Fig. 12B)。

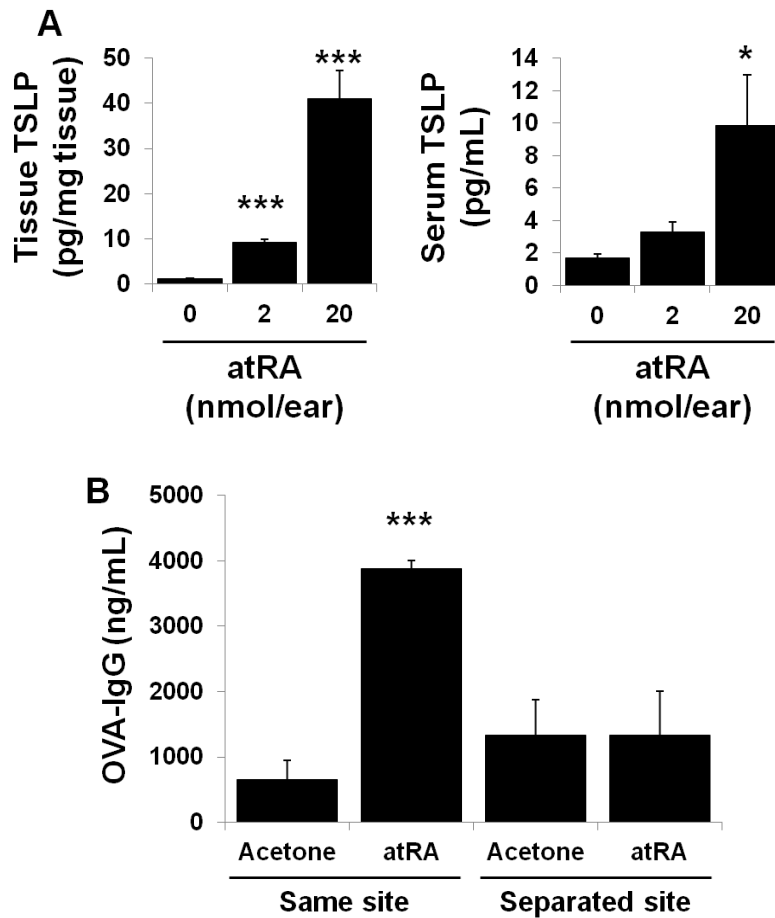


Figure 12. The adjuvant effect of atRA is limited in local site.

(A) ICR mice were treated with acetone or 2 nmol/ear of atRA on their ears. Twenty-four hours later, their ears were collected and homogenized. Their serum was also collected at this time. The TSLP levels in the homogenate and serum were determined by ELISA. (B) ICR mice were treated with acetone or 40 nmol/mouse of atRA on their dorsal skin (Same site group) or left ear (Separated site group). Twenty-four hours later, 3 μ g/mouse of OVA was injected intradermally on their dorsal skin. Twenty-one days later, the mice were sacrificed and the serum was collected. Serum OVA-IgG levels were measured by ELISA. Measurements are shown as mean \pm SEM from 4 samples. *** $p < 0.001$ vs. corresponding atRA (-).

4-3-3 *m*-Xylene のアジュバント作用についての検討

m-Xylene は atRA と同様に、マウス皮膚への塗布で塗布後 24 時間をピークとして TSLP 発現を誘導することが明らかになっている。そこで、他の TSLP 誘導剤が atRA と同様にアジュバント効果を示すかを検討する一環として、*m*-xylene がアジュバント効果を示すかについて検討した。Acetone 40 μ L に溶解した atRA 40 nmol または同容量の *m*-xylene をマウス背部皮膚に塗布し、これまでの OVA 感作実験と同様にマウスを処置したのち、血清を回収し、血清中の OVA-IgG 濃度を測定した。その結果、*m*-xylene にも atRA と同様に、OVA-IgG 発現を上昇させる効果が認められた。

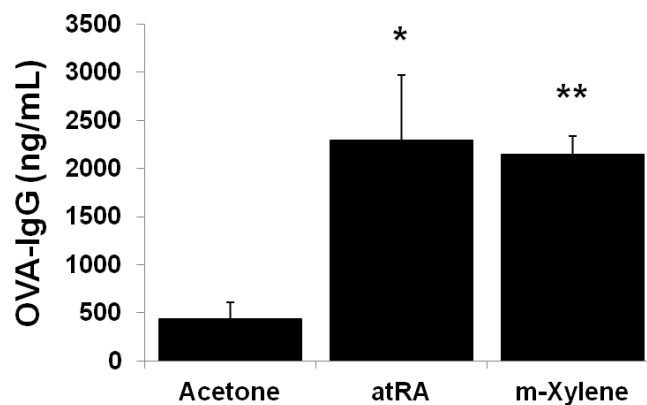


Figure 13. *m*-Xylene also works as an adjuvant.

ICR mice were treated with acetone, 40 nmol/mouse of atRA, or 40 μ L/mouse of *m*-xylene on their dorsal skin. Twenty-four hours later, 3 μ g/mouse of OVA was injected intradermally on their dorsal skin. Twenty-one days later, The mice were sacrificed and their serum was collected. Serum OVA-IgG levels were measured by ELISA. Measurements are shown as mean \pm SEM from 3-4 samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. acetone group.

5. 考察

新興・再興感染症による健康被害や、発展途上国における感染症に起因する死を防ぐため、新たなワクチン開発の戦略を確立することが求められてきた。本研究では、皮膚への atRA の塗布が、TSLP 産生を介して、同部位に投与された抗原に対する抗体産生を増強することが示された。このことは、atRA がワクチンアジュバントとして機能すること、さらには TSLP 発現を誘導する低分子化合物が効果的な化学アジュバントとして使用できる可能性を示すものである。

・ atRA と他の TSLP 誘導剤の比較

本研究では、atRA は皮膚に塗布することで、皮膚組織中で TSLP 発現を誘導した。これ以外にも、皮膚中 TSLP 発現は、様々な低分子化合物を皮膚に塗布することで誘導されることが報告されている (31-35)。TSLP は主に皮膚などの上皮細胞で産生・検出される (50)。この性質が、低分子化合物の塗布による局所的な TSLP 産生を誘導することを可能にしていると考えられる。本研究室ではこれまでに、TPA, *m*-xylene, nonanoic acid などに、皮膚における TSLP 発現誘導作用があることを示している (31-33)。しかし、TPA や nonanoic acid は、皮膚に対する明らかな起炎性があり (36, 38)、外用の TSLP 誘導薬としては不適切である。また、*m*-xylene は単回投与における起炎性はほとんどないものの、高濃度で使用しなければ効果が得られず (32)、外用で使用する際に、用量の調節が困難である可能性がある。本研究では、atRA はマウス皮膚において、用量依存的に TSLP 産生誘導作用を示した (fig. 1)。このことは、外用の TSLP 誘導剤として使用する際に、用量・TSLP 産生誘導量の調節が容易であることを示している。

・ atRA の外用における副作用についての考察

本研究では、atRA は外用剤として使用している。atRA をはじめとするレチノイドは外用剤としての長期の使用実績があり、単回で適切な用量を使用する限りは安全であると考えられる。しかし、他のグループらの先行研究において、レチノイドの連続投与が皮膚で TSLP 発現の上昇を起こすこと、また皮膚に紅斑などの炎症様の副作用を起こすことが報告されている (36-39)。さらに、表皮特異的 TSLP トランスジェニックマウスや、TSLP を過剰発現する表皮特異的 RXR 欠損マウスを用いた検討より、TSLP の皮膚における過剰な発現が、重篤な皮膚の炎症を起こす可能性が示唆されている (51, 52)。そこで本研究では、atRA が皮膚に対して、単回投与で起炎性を示すかを検討した。その結果、単回投与の atRA は TSLP 発現は有意に上昇させたものの、炎症性サイトカイン発現の上昇、皮膚の肥厚、細胞浸潤などの明らかな炎症所見は示さなかった (fig. 3, 4)。これらのことより、本研究で用いた用量の atRA を皮膚に単回投与する限りでは、炎症反応を起こさず、TSLP 発現を誘導できる可能性が示された。

atRA をはじめとするレチノイドは、生体内に普遍的に存在する物質である。しかしその過剰な摂取は、上で述べた皮膚炎様症状のみならず、頭痛、悪心嘔吐などの副作用のほか、妊婦においては胎児に催奇形性を示すことが知られている (53)。特に催奇形性はレチノイド製剤を使用する上で最も重大な副作用であり、内服・外用問わず多くのレチノイド製剤が妊婦への使用を禁忌とされている。通常妊婦に対する1日 5000 IU (約 5 μ mol) 以上のレチノイド内服は禁忌とされている (54)。また、尋常性痤瘡に対して使用される、合成レチノイド外用剤であるディフェリン[®]ゲルは、外用であっても妊婦に対する使用は禁忌である (55)。しかし、本研究で用いた atRA の用量は、5000 IU よりも少ない 4~40 nmol/site (約 4~40 IU/site) である。また、外用レチノイドの全身性の影響は内服よりもはるかに少ないこと (56)、臨床研究においても妊婦への外用レチノイドが奇形の発生率を有意に変化させなかったこと (57, 58) などが報告されている。こ

れらを考えると、本研究で使用した用量のように、適切な用量の atRA を決定して使用するならば、妊婦に対しても催奇形性等のリスクをもたらさずに使用できるものと考えられる。

・ atRA による TSLP 産生誘導機構

Mihály らの先行研究においては、RAR γ agonist がマウス皮膚において TSLP 発現を誘導し、RAR α agonist は誘導しないことが報告されている (35)。本研究においても、RAR α agonist および RAR γ agonist をそれぞれ単独で使用した場合、これと同様の結果が得られた。しかし、本研究では新たな知見として、atRA による TSLP 産生誘導が RAR α antagonist で抑制されること、RAR γ agonist による TSLP 発現誘導が RAR α agonist の共刺激により増強されることがわかった (fig. 6)。このことは、レチノイドによる TSLP 産生制御に、RAR γ のみでなく、RAR α も関与していることを示す結果であるとともに、RAR α と RAR γ が TSLP 産生において協働的に作用することを示す初めての知見である。通常、RAR α は全身の細胞に発現している一方で、RAR γ は表皮組織に発現しているとされる (42)。この共同作用が表皮細胞内で起きているものか、あるいは表皮と他の細胞の間で起こっているものかは不明である。Ganti らの報告によれば、マウスケラチノサイトにおいては RAR γ -RXR β 複合体が TSLP 遺伝子のプロモーターに結合しており、レチノイド刺激によって TSLP 遺伝子の転写を活性化することが示されている (41)。このことより、atRA はマウスの皮膚においても、表皮組織中の RAR γ 刺激を介して TSLP 産生を誘導しているものと推測される。マウス皮膚での RAR γ による TSLP 産生誘導に対する、RAR α の作用機構に関する仮説の一つとして、heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) の関与の可能性が挙げられる。HB-EGF は epidermal growth factor (EGF) ファミリーの一種で、RAR α への刺激により、表皮基底上層において産生され (59)、EGF 受容体を刺激することが報告

されている (60)。加えて、EGF 受容体への刺激は皮膚や気道の上皮細胞において、TSLP 発現を誘導することが示されている (61, 62)。この HB-EGF を介した反応機構が、RAR α による TSLP 産生増強効果に関与している可能性がある。しかし、この仮説だけでは RAR α 刺激単独で TSLP 産生が起こらないことは説明できないため、TSLP 産生に対する RAR α および RAR γ の作用機構について、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

・ atRA の抗体産生誘導効果

本研究では、atRA のアジュバント効果を検討するため、atRA をマウス皮膚に投与した 24 時間後に、同部位の皮内または皮下に抗原を投与した。これは、atRA による TSLP 発現が投与後 24 時間をピークとして上昇し (fig. 3)、またその TSLP が表皮組織にとどまっていると考えられたためである (fig. 5)。本研究では 4~40 nmol/mouse の atRA を使用し、TSLP 発現を誘導したが、fig. 9, 10 の結果より、この用量の atRA は抗原に対する抗体産生を増強するに十分な量の TSLP 発現を誘導したと考えられる。その一方で、Fig. 12B の結果より、atRA によるアジュバント効果は atRA と同部位に抗原を投与しなければ得られなかった。このことより、atRA の皮膚への投与は血清中の TSLP 濃度もわずかながら上昇させるものの (Fig. 12A)、アジュバント効果を示すために十分な量の TSLP 発現は、atRA を投与した局所でしか得られないものと推測される。また、TSLPR-KO マウスを用いた検討より、atRA のアジュバント作用は、TSLPR に大きく依存していることが示された。TSLPR-KO マウスにおいては、atRA を投与しない群においても、wild type マウスと比べて抗原特異的 IgG 産生量が著しく低かった (fig. 11)。TSLP は樹状細胞における CD80/CD86 分子などの、抗原提示に重要な補助刺激分子の発現を誘導する作用が報告されている (26)。TSLPR-KO マウスにおいては、この働きが失われて、抗原提示による T 細胞の活性化ができなかったことが、抗体産生量が

大きく低下した理由の一つであると考えられる。また、他の TSLP 誘導剤である *m*-xylene を atRA の代わりに用いた場合も、atRA と同様に抗原特異的 IgG 産生の増加が認められた (fig. 13)。この結果は、TSLP がアジュバント効果の発現に寄与していることを強く示唆するものである。同時に、皮膚に塗布することで TSLP 産生を誘導する低分子化合物は、一般的に経皮アジュバントとして利用できる可能性が示唆された。

・ atRA の使用による IgE 産生誘導とアレルギー反応のリスク

Th2 サイトカインの一種である TSLP は、抗原に対する IgE 抗体の産生を増強すること (63)、TSLP シグナルを遮断することで抗原特異的 IgE 発現が減少することが報告されている (64)。これらの知見より、TSLP のアジュバントとしての利用には、抗原特異的 IgE 産生の誘導による、アレルギー反応の誘発が予想され、懸念の一つとなる。しかし、Van Roey らの報告では、HIV タンパクを抗原として使用した場合は、アジュバントとして TSLP を使用しても抗原特異的 IgE の産生誘導は認められなかったと述べられている (21)。本実験においても、抗原特異的 IgE 産生が誘導されるよりも少ない atRA・抗原の用量で、抗原特異的 IgG の産生のみが誘導されることが認められている (fig. 9)。IgE 発現誘導を含む TSLP による Th2 反応の誘導は、TSLP により樹状細胞上の OX40 ligand の発現誘導を介した T 細胞の活性化によって起こる。一方で、TSLP を介したアジュバント作用の少なくとも一部は、樹状細胞上の CD80、CD86 などの、抗原提示における補助刺激分子の発現を誘導することによるものであると推測される。本実験においては、低用量の atRA で抗原特異的 IgG 発現のみが増加する傾向が見られ、より高用量の atRA では抗原特異的 IgE 発現も上昇する傾向が見られた (Fig. 9A, B)。このことより、樹状細胞に対して、低濃度の TSLP は CD80/86 発現のみを誘導して抗原特異的 IgG 産生のみを起こすが、より高濃度の TSLP は OX40L 発現も誘導して Th2 反応を誘導して抗原特異的 IgE 産生も増強する、という可能性が推測

される。TSLP 濃度による樹状細胞の反応の違いについては明らかではなく、さらなる検討が必要である。しかし、この仮説に従うとすると、atRA や抗原の用量を適切に設定することで、抗原特異的 IgE の産生誘導、およびそれによるアレルギー反応を起こさず、抗原特異的 IgG 産生のみを誘導することが可能であることを示している。

・ atRA を用いたワクチンの実用化に向けての展望と問題点

本研究においては、atRA を投与した 24 時間後に抗原を投与した。しかしこの方法では、被接種者を少なくとも 2 回処置する必要があり、ワクチンとして実用化する際に大きな負担になると考えられる。一方で、atRA と抗原を同時に投与する場合、atRA による TSLP 発現の有意な上昇には少なくとも 12 時間かかるため (fig. 3) atRA のアジュバント効果が得られなくなることが懸念される。この問題を解決する方策として、製剤学的アプローチによる抗原の局所への保持時間を向上し、atRA と抗原の同時投与を可能にすることがあげられる。たとえば Wilson らは、poly (dicarboxylatophenoxy)-phosphazene の使用により、その正電荷が負電荷を持つ抗原タンパク質を吸着し、抗原の局所への保持時間が延長することで、抗原特異的抗体の産生を増強することを示している (65)。また、もう一つの方策として、ハイドロゲルパッチ (66) との併用がある。ハイドロゲルパッチは皮膚に貼付する方式の非侵襲的なワクチン投与方法であり、パッチからの抗原の溶出速度を調節することで、atRA を塗布した直後にハイドロゲルパッチを貼付するという形で、atRA と抗原の同時投与を可能にすると期待できる。また、一般にハイドロゲルパッチは皮内投与と比べて大量の抗原が必要になるため、atRA との組み合わせは抗原使用量を減らすことにも寄与するかもしれない。これらの技術と組み合わせ、抗原の保持時間または溶出速度を制御することで、atRA と抗原の同時投与が可能になり、接種時の負担を減らすことができるものと期待される。

atRA をアジュバントとして利用することにはいくつかの利点がある。まず、低分子

化合物であるために、タンパク質と比べて取り扱いが容易であるということである。リコンビナント TSLP タンパク質自身をアジュバントとして使用する場合、温度・湿度・保存期間など、より厳重な条件で保存する必要がある。また、調製時にもこれらの条件を守る必要がある。さらに、不適切な条件で保存・調製された場合、タンパク質の変性を起こし、投与時に変性 TSLP が抗原性を示して、TSLP に対するアレルギーを起こす危険性も予想される。一方で、低分子化合物である atRA は一般的なタンパク質と比べると安定な化合物である。光による異性化、および酸素による酸化の可能性はあるが、褐色アンプルに遮光、密封して供給し、開封後すぐに使用することを徹底することで、タンパク質のような変質の危険性なしに、容易な取り扱いができることが期待される。もう一つの利点は、atRA は安価に、大量に、安定的に生産することが容易であるということである。純粋な低分子化合物である atRA は、ワクチン 1 回あたりの必要な抗原量を減らすことができる可能性があり、リコンビナント抗原と組み合わせることで、感染性・起炎性等の副作用も減らすことができるとともに、パンデミック時などに迅速にワクチンを生産・供給することに寄与すると考えられる。

本研究では、atRA がマウス皮膚において TSLP 発現を誘導し、アジュバントとして機能することを見出した。この結果は、「TSLP 発現を誘導する低分子化合物のアジュバントとしての利用」という形で一般化できる可能性があり、有効かつ安全な次世代のワクチンを開発するためのアジュバント開発戦略の一端を担うものと期待される。

謝辞

本研究を進めるに際し、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました、東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 平澤 典保 教授 に謹んで感謝の意を表します。

本研究に際し、終始多大なるご指導、ご助言を賜りました、東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 平塚 真弘 准教授、東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 守屋 考洋 准教授、東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 水野 夏実 助教授、ならびに東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 瀬川 良佑 助手 に謹んで感謝の意を表します。

本論文の執筆にあたり、本研究内容を深くご理解いただき、多くの有意義なご助言を賜りました、東北大学薬学研究科分子細胞生化学分野 青木 淳賢 教授 ならびに東北大学薬学研究科生命機能解析学分野 矢野 環 准教授 に謹んで感謝の意を表します。

最後に、本研究の遂行にあたり、多大なるご助言、ご協力をいただきました、東北大学薬学研究科生活習慣病治療薬学分野の皆様には感謝の意を表します。

引用文献

1. World Health Organization. **The World Health Report 2003.**
2. Thèves C, Biagini P, Crubézy E. 2014. **The rediscovery of smallpox.** *Clin. Microbiol. Infect.* 20:210-218.
3. Wheelis M. 2002. **Biological warfare at the 1346 siege of Caffa.** *Emerg. Infect. Dis.* 8:971-975.
4. Borza T. 2001. **Spanish flu in Norway 1918-19.** *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 121:3551-3554.
5. World Health Organization **The global burden of disease: 2004 update.**
6. Harris RC, Dodd PJ, White RG. 2016. **The potential impact of BCG vaccine supply shortages on global paediatric tuberculosis mortality.** *BMC Med.* 14:138
7. Parker LA, Rumunu J, Jamet C, Kenyi Y, Lino RL, Wamala JF, Mpairwe AM, Ciglenecki I, Luquero FJ, Azman AS, Cabrol JC. 2017. **Adapting to the global shortage of cholera vaccines: targeted single dose cholera vaccine in response to an outbreak in South Sudan.** *Lancet Infect. Dis.* 17:e123-127
8. 厚生労働省. 予防接種後副反応報告書平成 23 年度分
9. Moro PL, Museru OI, Niu M, Lewis P, Broder K. 2014. **Reports to the Vaccine Adverse Event Reporting System after hepatitis A and hepatitis AB vaccines in pregnant women.** *Am. J. Obstet. Gynecol.* 210:561.e1-6.
10. Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ. 2010. **Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes.** *Sci. Transl. Med.* 2: 25ra24.
11. 青枝 大貴、石井 健 2014. **次世代ワクチンの方向性.** *感染 炎症 免疫.* 44:194-207

12. Izikson R, Leffell DJ, Bock SA, Patriarca PA, Post P, Dunkle LM, Cox MM. 2015. **Randomized comparison of the safety of Flublok[®] versus licensed inactivated influenza vaccine in healthy, medically stable adults \geq 50 years of age.** *Vaccine* 33:6622-6628.
13. Treanor JJ, Wilkinson BE, Maseoud F, Hu-Primmer J, Battaglia R, O'Brien D, Wolff M, Rabinovich G, Blackwelder W, Katz JM. 2001. **Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans.** *Vaccine* 19: 1732-1737.
14. Kool M, Fierens K, Lambrecht BN. 2012. **Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant.** *J. Med. Microbiol.* 61: 927-934.
15. Verstraeten T, Descamps D, David MP, Zahaf T, Hardt K, Izurieta P, Dubin G, Breuer T. 2008, **Analysis of adverse events of potential autoimmune aetiology in a large integrated safety database of AS04 adjuvanted vaccines.** *Vaccine* 26: 6630-6638.
16. Yamanishi R, Yusa I, Bando N, Terao J. 2003. **Adjuvant activity of alum in inducing antigen specific IgE antibodies in BALB/c mice: a reevaluation.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 166-169.
17. Goto N, Kato H, Maeyama J, Shibano M, Saito T, Yamaguchi J, Yoshihara S. 1997. **Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties.** *Vaccine* 15: 1364-1371.
18. Li H, Nookala S, Re F. 2007. **Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release.** *J. Immunol.* 178: 5271-5276.
19. Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Mayumi T, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. 2009. **TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384: 296-300.

20. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. 2001. **Type I Interferons Potently Enhance Humoral Immunity and Can Promote Isotype Switching by Stimulating Dendritic Cells In Vivo.** *Immunity*, 14: 461-470.
21. Van Roey GA, Arias MA, Tregoning JS, Rowe G, Shattock RJ. 2012. **Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) acts as a potent mucosal adjuvant for HIV-1 gp140 vaccination in mice.** *Eur. J. Immunol.* 42: 353-363.
22. Ray RJ, Furlonger C, Williams DE, Paige CJ. 1996. **Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro.** *Eur. J. Immunol.* 26(1):10-16.
23. Park LS, Martin U, Garka K, Gliniak B, Di Santo JP, Muller W, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA, Farr AG, Ziegler SF, Morrissey PJ, Paxton R, Sims JE. 2000. **Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor.** *J. Exp. Med.* 192(5):659-670.
24. Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, Clifford T, Liu Mr, Travis M, Zurawski SM, Johnston J, Liu YJ, Spits H, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Bazan JF. 2001. **Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells.** *J. Immunol.* 167(1):336-343.
25. Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, Qin FX, Yao Z, Cao W, Liu YJ. 2005. **TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand.** *J. Exp. Med.* 202(9):1213-1223.
26. Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ. 2005. **A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model.** *J. Exp. Med.* 202(6):829-839.

27. Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, de Waal Malefyt R, Liu YJ. 2004. **Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion.** *Nat. Immunol.* 5(4):426-434.
28. 安部 良. 2005. T 細胞補助刺激による免疫応答制御. *Jpn. J. Clin. Immunol.* 28:21-32.
29. Croft M. 2003. **Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?** *Nat. Rev. Immunol.* 3:609-620.
30. Perrigoue JG, Saenz SA, Siracusa MC, Allenspach EJ, Taylor BC, Giacomini PR, Nair MG, Du Y, Zaph C, van Rooijen N, Comeau MR, Pearce EJ, Laufer TM, Artis D. 2009. **MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity.** *Nat. Immunol.* 10:697-705.
31. Hirasawa N, Ohsawa Y, Katoh G, Shibata K, Ishihara K, Seyama T, Tamura S, Hong J, Ohuchi K. 2009. **Modification of the picryl chloride-induced allergic dermatitis model in mouse ear lobes by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, and analysis of the role of histamine in the modified model.** *Int. Arch. Allergy Immunol.* 148: 279-288.
32. Satou N, Ishihara K, Hiratsuka M, Tanaka H, Endo Y, Saito S, Iwakura Y, Leonard WJ, Hirasawa N. 2012. **Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice.** *Int. Arch. Allergy Immunol.* 157: 194-201.
33. Yamashita S, Segawa R, Satou N, Hiratsuka M, Leonard WJ, Hirasawa N. 2013. **Induction of thymic stromal lymphopoietin production by nonanoic acid and exacerbation of allergic inflammation in mice.** *Allergol. Int.* 62: 463-471.
34. Li M, Hener P, Zhang Z, Kato S, Metzger D, Chambon P. 2006. **Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 11736-11741.

35. Mihály J, Gericke J, Lucas R, de Lera AR, Alvarez S, Töröcsik D, Rühl R. 2016. **TSLP expression in the skin is mediated via RAR γ -RXR pathways.** *Immunobiology* 221: 161-165.
36. Lee JE, Chang JY, Lee SE, Kim MY, Lee JS, Lee MG, Kim SC. 2010. **Epidermal Hyperplasia and Elevated HB-EGF are More Prominent in Retinoid Dermatitis Compared with Irritant Contact Dermatitis Induced by Benzalkonium Chloride.** *Ann. Dermatol.* 22:290-299.
37. Ipek Y, Hulya D, Melih A. 2012. **Disseminated exfoliative dermatitis associated with all-transretinoic Acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia.** *Case Rep. Med.* 2012:236174.
38. Fallon JC, Buckley A, Murphy GM. 2008. **Allergic contact dermatitis after isotretinoin treatment for acne.** *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 22:1377-1378.
39. Anderson A, Gebauer K. 2014. **Periorbital allergic contact dermatitis resulting from topical retinoic acid use.** *Australas. Dermatol.* 55:152-153.
40. Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N. 2007. **Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors.** *Cell* 129:723-733.
41. Ganti KP, Mukherji A, Surjit M, Li M, Chambon P. 2017. **Similarities and differences in the transcriptional control of expression of the mouse TSLP gene in skin epidermis and intestinal epithelium.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 114:E951-E960.
42. Michaille JJ, Kanzler B, Blanchet S, Garnier JM, Dhouailly D. 1995. **Characterization of cDNAs encoding two chick retinoic acid receptor alpha isoforms and distribution of retinoic acid receptor alpha, beta and gamma transcripts during chick skin development.** *Int. J. Dev. Biol.* 39: 587-596.

43. Géhin M, Vivat V, Wurtz JM, Losson R, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H. 1999. **Structural basis for engineering of retinoic acid receptor isotype-selective agonists and antagonists.** *Chem. Biol.* 6:519-529.
44. Le Q, Dawson MI, Soprano DR, Soprano KJ. 2000. **Modulation of retinoic acid receptor function alters the growth inhibitory response of oral SCC cells to retinoids.** *Oncogene* 19:1457-1465.
45. Gericke J, Ippensohn J, Mihály J, Alvarez S, Alvarez R, Töröcsik D, de Lera AR, Rühl R. 2013. **Regulation of Retinoid-Mediated Signaling Involved in Skin Homeostasis by RAR and RXR Agonists/Antagonists in Mouse Skin.** *PLOS One* 8: e62643.
46. Yang P, Xing L, Tang C, Jia W, Zhao Z, Liu K, Gao X, Wang X. 2010. **Response of BALB/c mice to a monovalent influenza A (H1N1) 2009 split vaccine.** *Cell Mol. Immunol.* 7:116-122.
47. Blanchfield K, Kamal RP, Tzeng WP, Music N, Wilson JR, Stevens J, Lipatov AS, Katz JM, York IA. 2014. **Recombinant influenza H7 hemagglutinins induce lower neutralizing antibody titers in mice than do seasonal hemagglutinins.** *Influenza Other Respir. Viruses.* 8:628-635.
48. Coudeville L, Bailleux F, Riche B, Megas F, Andre P, Ecochard R. 2010. **Relationship between haemagglutination-inhibiting antibody titres and clinical protection against influenza: development and application of a bayesian random-effects model.** *BMC Med. Res. Methodol.* 10:18.
49. Shoji Y, Prokhnevsky A, Leffet B, Vetter N, Tottey S, Satinover S, Musiychuk K, Shamloul M, Norikane J, Jones RM, Chichester JA, Green BJ, Streatfield SJ, Yusibov V. 2015. **Immunogenicity of H1N1 influenza virus-like particles produced in *Nicotiana benthamiana*.** *Hum. Vaccine Immunother.* 11:118-123.

50. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, Gilliet M, Ho S, Antonenko S, Lauerma A, Smith K, Gorman D, Zurawski S, Abrams J, Menon S, McClanahan T, de Waal-Malefyt Rd R, Bazan F, Kastelein RA, Liu YJ. 2002. **Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP.** *Nat. Immunol.* 3:672-680.
51. Li M, Messaddeq N, Teletin M, Pasquali JL, Metzger D, Chambon P. 2005. **Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102: 14795-14800.
52. Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, Comeau MR, Campbell DJ, Ziegler SF. 2005, **Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin.** *J. Exp. Med.* 202: 541-549.
53. Lammer EJ, Schunior A, Hayes AM, Holmes LB. 1988. **Isotretinoin dose and teratogenicity.** *Lancet.* 2:503-504.
54. 厚生労働省「第6次改定日本人の栄養所要量について」
55. マルホ株式会社. デイフェリン®ゲル 添付文書
56. Clewell HJ 3rd, Andersen ME, Wills RJ, Latriano L. 1977. **A physiologically based pharmacokinetic model for retinoic acid and its metabolites.** *J. Am. Acad. Dermatol.* 36:S77-85.
57. Kirsten D, Loureiro, Kelly K, Kao, Kenneth Lyons Jones, Sonia Alvarado, Carmen Chavez, Lyn Dick, Robert Felix, Diana Johnson, and Christina D. Chambers. 2005. **Minor Malformations Characteristic of the Retinoic Acid Embryopathy and Other Birth Outcomes in Children of Women Exposed to Topical Tretinoin During Early Pregnancy.** *Am. J. of Medical Genetics.* 136A:117-121

58. Panchaud A, Csajka C, Merlob P, Schaefer C, Berlin M, De Santis M, Vial T, Ieri A, Malm H, Eleftheriou G, Stahl B, Rouso P, Winterfeld U, Rothuizen LE, Buclin T. 2012. **Pregnancy outcome following exposure to topical retinoids: a multicenter prospective study.** *J. Clin. Pharmacol.* 52:1844-1851.
59. Xiao JH, Feng X, Di W, Peng ZH, Li LA, Chambon P, Voorhees JJ. 1999. **Identification of heparin-binding EGF-like growth factor as a target in intercellular regulation of epidermal basal cell growth by suprabasal retinoic acid receptors.** *The EMBO. J.* 18:1539-1548.
60. Kimura R, Iwamoto R, Mekada E. 2005. **Soluble Form of Heparin-binding EGF-like Growth Factor Contributes to Retinoic Acid-induced Epidermal Hyperplasia.** *Cell Struct. Funct.* 30:35-42.
61. Farley SM, Purdy DE, Ryabinina OP, Schneider P, Magun BE, Jordanov MS. 2008. **Fas Ligand-induced Proinflammatory Transcriptional Responses in Reconstructed Human Epidermis.** *J. Biol. Chem.* 283:919-928.
62. Heijink IH, Kies PM, Kauffman HF, Postma DS, van Oosterhout AJ, Vellenga E.. 2007. **Down-Regulation of E-Cadherin in Human Bronchial Epithelial Cells Leads to Epidermal Growth Factor Receptor-Dependent Th2 Cell-Promoting Activity.** *J. Immunol.* 178:7678-7685.
63. Poulsen LK, Hummelshoj L. 2007. **Triggers of IgE class switching and allergy development.** *Ann. Med.* 39: 440-456.
64. Zhang F, Huang G, Hu B, Song Y, Shi Y. 2011. **A soluble thymic stromal lymphopoietin (TSLP) antagonist, TSLPR-immunoglobulin, reduces the severity of allergic disease by regulating pulmonary dendritic cells.** *Clin. Exp. Immunol.* 164: 256-264.

65. Wilson HL, Kovacs-Nolan J, Latimer L, Buchanan R, Gomis S, Babiuk L, van Drunen Littel-van den Hurk S. 2010. **A novel triple adjuvant formulation promotes strong, Th1-biased immune responses and significant antigen retention at the site of injection.** *Vaccine* 28:8288-8299.
66. Ishii Y, Nakae T, Sakamoto F, Matsuo K, Matsuo K, Quan YS, Kamiyama F, Fujita T, Yamamoto A, Nakagawa S, Okada N. 2008. **A transcutaneous vaccination system using a hydrogel patch for viral and bacterial infection.** *J. Control Release* 131:113-120.