

アレルギー性気道炎症におけるAT II 1a受容体の機能解析

荒川 礼佳, 内田 宜伯, 高橋 佑美, 山本 佳和, 武田 真美, 渡部香奈子,
菅谷 健, 奥山 香織, 大和田恵子*, 高柳 元明, 大野 勲

The role of angiotensin II type 1a receptor in allergen-induced airway inflammation.

Reika ARAKAWA, Yoshinori UTIDA, Yumi TAKAHASHI, Yoshikazu YAMAMOTO, Mami TAKEDA
Kanao WATANABE, Takeshi SUGAYA, Kaori OKUYAMA, Keiko OHWADA*

Motoaki TAKAYANAGI and Isao OHNO

(Received November 22, 2004)

Chronic airway inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR) are fundamental features leading to airway narrowing in bronchial asthma. Airway inflammation in asthmatics is characterized with the accumulation and activation of inflammatory cells such as eosinophils and mast cells, which is orchestrated by a network of Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-5, released mainly from CD4⁺ T lymphocytes. The peptide hormone angiotensin II (AT II) plays an important role in the regulation of arterial blood pressure. Plasma levels of renin and AT II were reported to be elevated during acute exacerbation of asthma, and studies using type 1 AT II receptor (AT1) antagonist (ARB) suggested the involvement of the receptor in the pathogenesis of asthma. However, the pathogenic roles of AT II and AT1 in asthmatic airway inflammation remains elusive. Therefore, we investigated the effect of AT1a gene deletion (AT1aKO) on allergen-induced airway inflammation using a murine model of allergic asthma. In sensitized wild type mice (WT), the numbers of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were increased with a peak on 5 days after antigen challenge. In AT1aKO mice, in contrast, those were increased with two peaks on 3 and 7 days, which were significantly higher than in WT. The contents of IL-4 and IL-5 in BALF of AT1aKO mice 1 day after the challenge were significantly higher than those of WT mice. These data suggest that AT1a play a pivotal role in allergic airway inflammation via, at least in part, the downregulation of Th2 cytokine expression.

Key words — bronchial asthma, airway inflammation, angiotensin II, AT II 1a receptor

喘息の病態に関する現在の考え方は、特徴的な気道壁の慢性炎症過程が原因となって気流制限、気道過敏性の亢進が起こり、その結果様々な刺激に反応して気道の狭窄が起こってくると理解されている。喘息における気道炎症の病態発症は、気道粘膜及び気道内腔への好酸球、肥満細胞、マクロファージ及びTリンパ球など炎症細胞の集積による¹⁻³⁾。Tリンパ球からは、IgE

産生、好酸球や肥満細胞の分化増殖に関与しているIL-4, IL-5, IL-9, IL-13及びIL-16などのTh2サイトカインが発現する¹⁾。肥満細胞や好酸球は、ヒスタミン、好酸球顆粒タンパク、ロイコトリエン (LT)、血小板活性化因子 (PAF) など様々な化学伝達物質を遊離し、これらが平滑筋収縮、気道分泌亢進、粘膜浮腫、気道過敏性亢進を引き起こす³⁻⁵⁾。炎症部位へのこれらの

炎症細胞の動員は、喘息患者のアレルギー性炎症の持続、悪化に関与していると考えられる。血管内皮細胞や気道上皮細胞を介する炎症細胞の浸潤における分子機構において、接着分子やTNFやIL-4などのサイトカイン、ケモカイン、LT、PAFの関与がin vivoやin vitroの実験系で示唆されている⁶⁻⁸⁾。

アンジオテンシンⅡ(ATⅡ)はアンジオテンシン変換酵素(ACE)やキマーゼによって、アンジオテンシンⅠから生成され、血管緊張の調節及びNaや水の恒常性維持に重要な役割を果たす強力な血管作働性ホルモンである⁹⁾。ATⅡ受容体には主要な2つのファミリー、1型ATⅡ受容体(AT1)、2型ATⅡ受容体(AT2)があり、ATⅡの主な作用はAT1を介すると考えられている⁸⁾。ヒト肺組織では線維芽細胞、血管平滑筋細胞、monocyte/macrophage、上皮細胞にAT1が発現することが証明されている¹⁰⁾。一方、げっ歯類においては、AT1にはAT1a、AT1bの2つのサブタイプが存在し、AT1bは肺組織においてその発現が確認されていないが、AT1aは肝臓、心臓などの器官や肺組織、ラット胎児の肺の線維芽細胞に存在することが確認されている¹¹⁾。急性発作時の喘息患者では、血漿中のレニンやATⅡの上昇などレニン-アンジオテンシン系の賦活化が見られる¹²⁾。また、モルモットにおいてAT1が気道過敏性や好酸球浸潤に関与するとの報告がある¹³⁾。その一方で、ATⅡが気道過敏性や好酸球浸潤に影響しないことを示唆する報告もある^{14,15)}。ATⅡとAT1の炎症反応における役割に関しては、ATⅡはAT1を介し、リンパ球増殖、樹状細胞分化、サイトカイン/ケモカイン、接着分子、TGF β 1の発現を促進する¹⁶⁻¹⁸⁾。ラットにおいてATⅡ投与によりTh2サイトカイン産生が減少する¹⁹⁾一方、high ATⅡ ApoE^{-/-}マウスではTh1サイトカイン産生が亢進し²⁰⁾、また慢性心不全患者においてACE阻害薬の投与によりサイトカイン産生がTh2へ偏移する。このように、ATⅡ/AT1はTh1/Th2バランスに対して相反する作用が報告されている²¹⁾。

気管支喘息の病態発症におけるATⅡ、特にAT1を介した役割は依然不明である。そこで今

回我々はAT1a遺伝子欠損によるアレルギー性気道炎症の変化を検討した。

実験材料と方法

1. 抗原感作および抗原吸入

実験は、Kumagai²²⁾らの報告に従って行った。動物は6~8週齢のAT1a欠損マウス(AT1aKO)(田辺製薬より供与)及び野生型のC57BL/6J系雄性マウス(WT)(日本SLC,東京,日本)を使用した。マウスは実験に使用するまで明暗サイクル12時間(明期9:00~21:00,暗期21:00~9:00)、室温22 \pm 2 $^{\circ}$ Cの一定環境下で1週間以上飼育した。なお、動物には滅菌済みのマウス用固形飼料及び滅菌済みの水道水を自由に摂取させた。実験は東北薬科大学動物実験指針に従って行った。抗原として、卵白アルブミン(OVA)を用い、OVA/Alum(OVA16mg/mL(SIGMA, St. Louis, MO, USA) in Saline/Al(OH)₃(和光純薬(株),大阪,日本)8mg/mL in Saline)500 μ Lを腹腔内投与にて感作した。投与は5日間隔で2回行った。

2回目のOVA/Alum投与から12日後、プラスチックチャンバーにマウスを入れ、OVA(5mg/mL in Saline)あるいは対照としてSalineのエアロゾルを1時間、4時間間隔で2回吸入させた。エアロゾルはベネットネブライザー(Sunrise Medical HHG Inc.,Somerset,PA,USA)を用い5L/minで流入させた。

2. 検体採取

吸入前及び吸入後1, 3, 5, 7, 14日目に検体を採取した。Diethyl ether(和光純薬(株),大阪,日本)麻酔下で、脱血後マウスの胸部を開き、気管にカニューレを挿入、固定後気管及び肺を摘出した。カニューレよりPBS(phosphate-buffered saline:NaCl137mM,KCl2.7mM,Na₂HPO₄·12H₂O 8.1mM,KH₂PO₄1.47mM,pH7.4)(和光純薬(株))0.25mLを注入し2回洗浄した。回収した気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavagefluid(BALF))を200x g 4 $^{\circ}$ Cで3分間遠心後、上清は量を測定し、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)によるサイトカイン測定まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

Table 1. Primer sequences and the predict size of the PCR product

Mouse Gene		Sequence [5'-3']	PCR products (bp)
IL-5	Sense	5'-GCACAGTGGTGAAAGAGACC-3'	284
	Antisense	5'-TAATCCAGGAAGCTGCCTCGT-3'	
IFN- γ	Sense	5'-AGTGGCATAGATGTGGAAGAAA-3'	274
	Antisense	5'-GACCTCAAACCTTGGCAATACTC-3'	
GAPDH*	Sense	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'	249
	Antisense	5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3'	

*GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

上清回収後の細胞残渣は、1% Fetal bovine serum (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, USA) 含有 PBS 0.1 mL に再浮遊し、0.02 mL を 0.1% Trypan blue (PBS 含有) (和光純薬(株)) 0.02 mL に加え、ヘモサイトメーターを用いて総白血球数を算定した。残りの 0.08 mL は、300 rpm で 2 分間サイトスピン (Shandon, Runcorn, UK.) にかけて、乾燥後 Diff-Quick 染色液 (D-Q 染色液) (国際試薬, 神戸, 日本) で染色し、細胞分画を算定した (倍率 1000 で総細胞数 200 個以上観察)。

摘出した右肺は、液体窒素で凍結後 -80 °C で保存し、RNA の抽出に用いた。

3. サイトカインの測定

BALF 中の IL-4, IL-5 および IFN- γ 量は、それぞれの ELISA kit (AN'ALYZA) (TECHNE Corporation, Minneapolis, MN, USA) を用いて、付属プロトコールに従い測定した。なお、それぞれの測定範囲は IL-4; 7.8 ~ 500 pg/mL, IL-5; 15.6 ~ 1000 pg/mL, IFN- γ ; 9.4 ~ 600 pg/mL である。

4. mRNA 発現の解析

RNA は凍結保存した右肺をグラインダー (KINEMATICA, Inc, Cincinnati, OH, USA) にて粉碎し、Total RNA 抽出キット (RNeasy Mini, QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA) を用いて付属プロトコールに従って抽出した。cDNA の合成は抽出した RNA 2 μ g より、Ready-To-Go-You-PrimeFirst-

Table 2. Table 2: Conditions for PCR amplification

Mouse Gene			Cycle
IL-5	First step	94 °C, 1min	47
	Denaturation	94 °C, 15sec	
	Annealing	58 °C, 20sec	
	Extension	72 °C, 30sec	
	Final step	72 °C, 6min	
IFN- γ	First step	95 °C, 4min	35
	Denaturation	95 °C, 1min	
	Annealing	57 °C, 2min	
	Extension	72 °C, 1min	
	Final step	72 °C, 6min	
GADPH	First step	95 °C, 1min	32
	Denaturation	94 °C, 1min	
	Annealing	67 °C, 1min	
	Extension	72 °C, 1min	
	Final step	72 °C, 7min	

strand Beads (Amersham Biosciences) を用いて、最終用量を 30 μ L として付属プロトコールに従って行った。

合成した cDNA 溶液 1 μ L を分取し、Ready-To-Go-PCR Beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用い、各サイトカイン特異的プライマー (Table 1) を添加し、Gene Amp PCR system 2400 (PERKIN ELMER, Norwalk, CT, USA) にて増幅させた (Table 2)。PCR 産物 10 μ L

に, 0.5%Bromo Phenol Blue μ Lおよび臭化エチル0.005mgを添加し, 1.5%アガロースゲルにて50V,1時間電気泳動を行った. 泳動後, アガロースゲルをUV transilluminator (UVP,INC, Upland,CA,USA)で照射下, ポラロイドカメラ(フナコシ,東京,日本)で写真撮影を行った.

5. 統計処理

データはmean \pm SDで表した. 時間経過のデータは対応なしの二元配置分散分析 (Two-factor analysis of variance) におけるBonferroniの多重比較検定で解析した. 総細胞数, 細胞分画, ELIZA, PCRの結果は対応なしのMann-WhitneyのU検定により解析した. なお, $P<0.05$ を有意差有りとした.

実験結果

1. OVA吸入後のBALF中炎症細胞の経時変化

OVA吸入後のBALF中炎症細胞数の経時変化は, WTでは5日目をピークとして総細胞と好酸球の有意な増加が見られた (Fig 1-A). 一方, AT1aKOでは3日目と7日目をピークとした二相性の総細胞と好酸球の有意な増加が見られた (Fig1-B). WTおよびAT1aKOとも生理食塩水吸入では炎症細胞の有意な増加は見られなかった.

OVA吸入後のBALF中炎症細胞をWTとAT1aKOの間で比較したところ, AT1aKOでは総細胞と好酸球が1日目, 3日目, 7日目, 14日目において, マクロファージが3日目と14日目

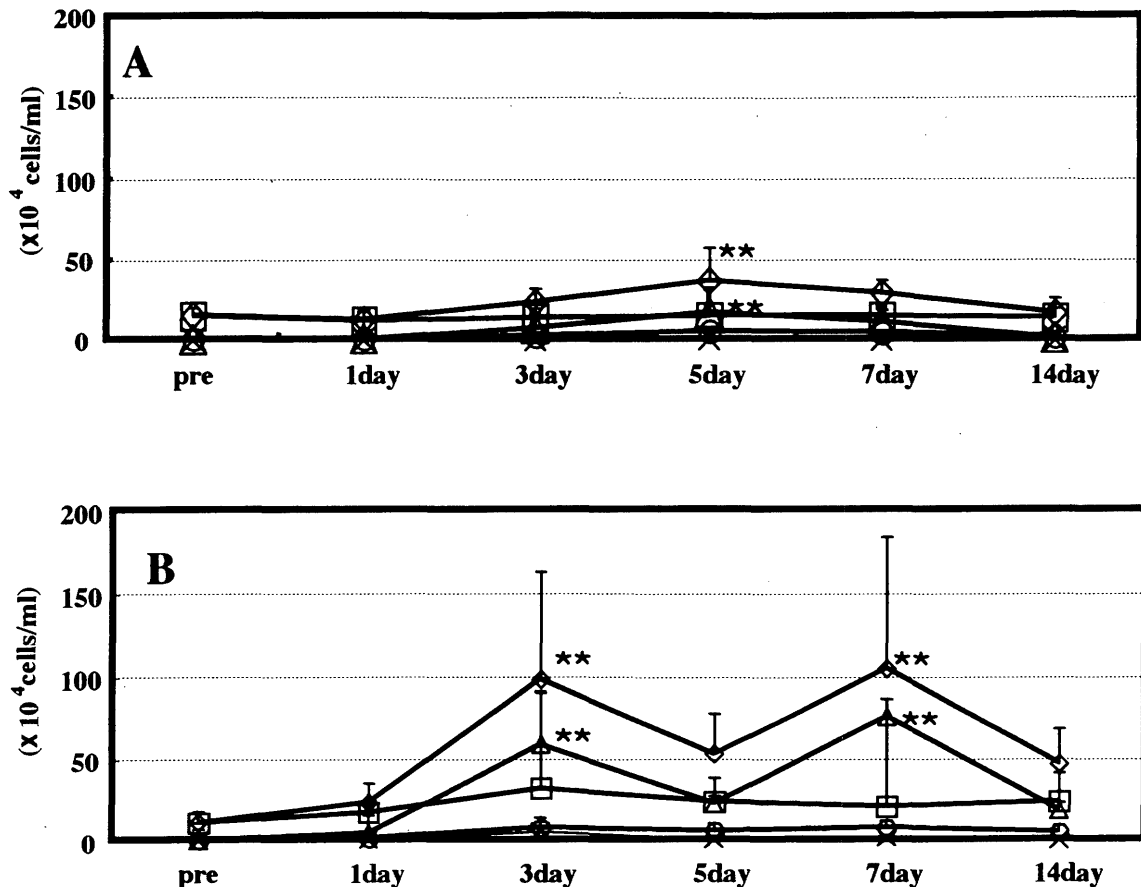


Fig. 1. Time course of cell numbers in BALF from WT and AT1aKO mice after OVA inhalation. In BALF from sensitized WT (A) and AT1aKO (B) mice challenged with OVA, the numbers of total cells (◇), macrophages (□), eosinophils (△), neutrophils (×) and lymphocytes (○) were counted. Data are expressed as mean \pm S.D. (n=3-12) ** $P<0.01$ compared with pre.

で、リンパ球が3日目でWTに比べ有意な増加を示した。しかし、5日目においては総細胞数と全ての細胞分画でWTとAT1aKOとの間に有意な差は見られなかった (Fig2)。

2. OVA吸入後のBALF中IL-4およびIL-5

気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のサイトカイン量を検討したところ、OVA吸入後1日目において、AT1aKOではWTと比較してIL-4およびIL-5量が有意に増加していた (Fig 3)。一方、IFN- γ 量はWTおよびAT1aKOにおいてすべての検体で測定限界未満であった。

3. Th1およびTh2サイトカインmRNA発現解析

肺組織におけるTh1およびTh2サイトカインmRNA発現を検討した。AT1aKOおよびWTマウスいずれにおいても、Th1サイトカインであるIFN- γ のmRNAは抗原吸入前から認められたが、抗原吸入によってもその発現の程度に明ら

かな変化は見られなかった。一方、Th2サイトカインであるIL-5のmRNAは、抗原吸入前では、AT1aKOおよびWTマウスいずれにおいても発現は認められなかった。しかしながら抗原吸入1日後においては、AT1aKOマウスにのみIL-5 mRNAの発現が認められた。(Fig4)

考 察

今回の実験で我々は、AT1a欠損マウス(AT1aKO)において、抗原吸入後のアレルギー性気道炎症が野生型マウス(WT)に比べ二相性に悪化することを発見した。すなわち、WTでは5日目をピークとした総炎症細胞と好酸球の有意な増加が見られたが、一方AT1aKOでは3日目と7日目にWTより有意な総炎症細胞と好酸球の増加が見られた。AT1aKOでは早期の気道炎症に先行して、1日目にBALF中のIL-4及びIL-5の増加が見られた。しかし、二相目である7日

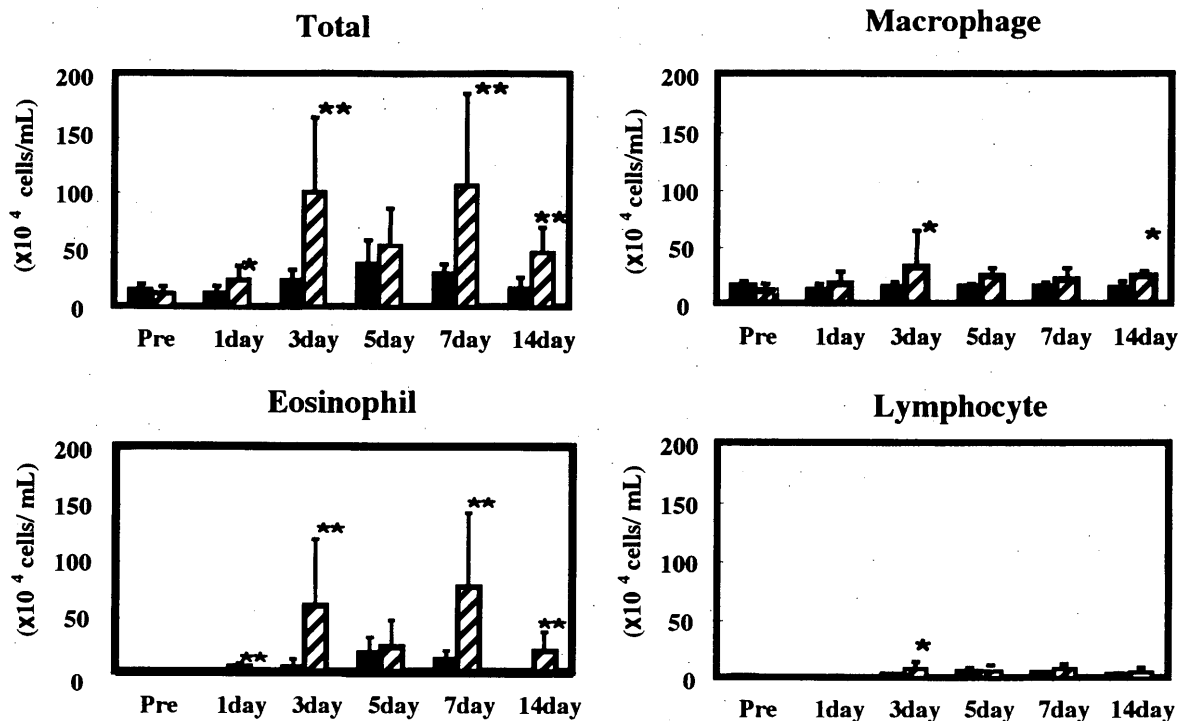


Fig. 2. Comparison of cell numbers in BALF between WT and AT1aKO mice after OVA inhalation.

The numbers of total cells, macrophages, eosinophils and lymphocytes in BALF from sensitized WT (■) and AT1aKO (▨) mice challenged with OVA were counted. Data are expressed as mean \pm S.D. (n=3-12). **P<0.01 and *P<0.05 compared with WT.

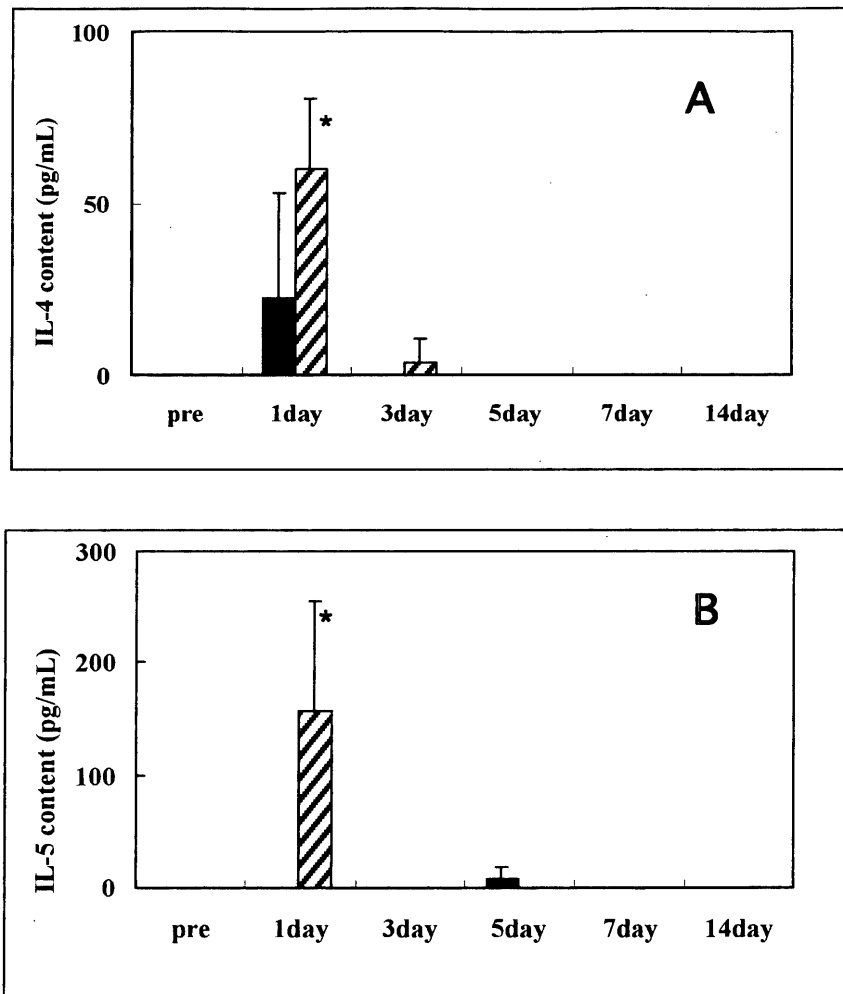


Fig. 3. Comparison of IL-4 and IL-5 contents in BALF between WT and AT1aKO mice after OVA inhalation.

IL-4 (A) and IL-5 (B) contents in BALF from WT (■) and AT1aKO (▨) expressed as mean \pm S.D. (n=3-12). **P<0.05 compared with WT.

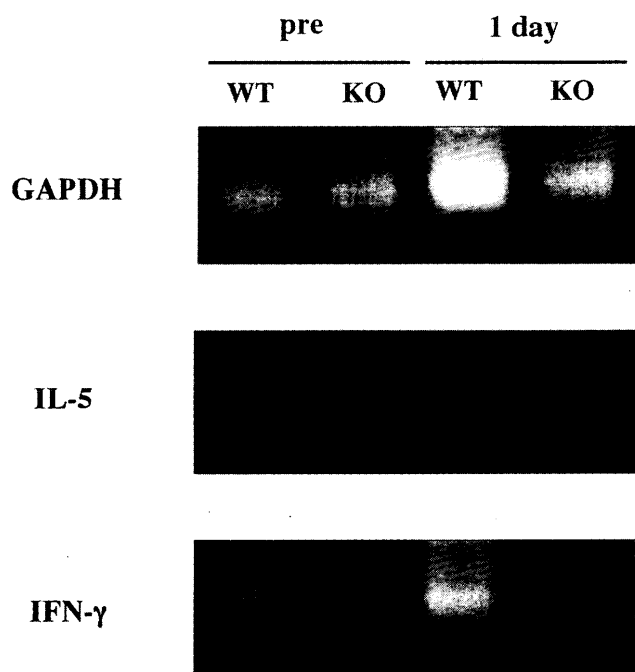


Fig. 4. RT-PCR analysis of IL-5 and IFN- γ transcripts in lung tissues from WT and AT1aKO mice.

Sensitized-WT and AT1aKO mice were inhaled with (1 day) or without OVA (pre). 1 day after the inhalation, RNA was extracted from lung tissues and analyzed for gene expression of GAPDH, IL-5 and IFN- γ by RT-PCR as described in materials and methods.

目においては気道炎症の悪化は見られたもののBALF中のサイトカイン(IL-4, IL-5)の増加は確認されなかった。モルモット喘息モデルではAT1受容体阻害薬(ARB)の投与により好酸球浸潤が抑制されたという報告がある¹³⁾。これはAT1a欠損により好酸球浸潤が増加したという我々の結果と相反するものであるが、この理由の1つとして、AT1の阻害期間が考えられる。モルモットモデルではARBの投与は抗原曝露前3日間(2回/日)で、AT1阻害期間が短期的であるのに対し¹³⁾、AT1aKOでは恒常的にAT1が阻害されていることから炎症発現に関与するサイトカインやケモカイン、接着分子などの発現が異なる可能性が考えられる。また、モルモットとマウスという種差による炎症反応の差異があるかもしれない。

気道炎症の病態発症には、気道への好酸球やリンパ球、肥満細胞の集積、活性化が重要である。血管内の好酸球・リンパ球は、その細胞表面にあるlymphocyte function-associated lymphocytes(LFA)-1²³⁾、very late activation antigen(VLA)-4²⁴⁾がcounter ligandである血管内皮細胞表面のintercellular adhesion molecule(ICAM)-1、vascular cell adhesion molecule(VCAM-1)とそれぞれ結合することにより血管壁に接着し、ケモカイン(eotaxin, regulated on activation normal T expressed and presumably secreted(RANTES)²⁵⁻²⁷⁾、MCP-1など)により血管外に遊走した後、さらにICAM-1/LFA-1²³⁾により気道上皮に接着し、気道腔へと移動する。この一連の集積や活性化の過程を制御するものとして、TNF, IL-1, Th2サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-13)の発現が、喘息気道で確認されている。IL-4はin vitroにおいてナイーブCD4⁺T細胞(Th0)からTh2細胞への分化誘導、B細胞からのIgE産生、血管内皮でのVCAM-1特異的発現、ケモカイン発現などに関与する²⁸⁾。またin vivoにおいてもIgE産生、気道内好酸球増加、気道過敏性発症に重要なサイトカインであることが報告されている^{29,30)}。一方IL-5は好酸球の分化・増殖や活性化に必須のサイトカインであり³¹⁾、好酸球性炎症の発現において重要な役割

を有することが知られている。従って我々のAT1aKOで見られた早期の気道炎症悪化の要因として、IL-4, IL-5の発現増強が考えられる。IL-4, IL-5の発現細胞としてリンパ球の他に肥満細胞、好酸球があるが、今回の実験では同定していない。またAT1aKOによるIL-4, IL-5の発現亢進メカニズムの詳細は不明である。ヒト単球においてAT IIはAT受容体(AT1, AT2)を介し、転写因子であるnuclear transcription factor- κ B(NF- κ B)を活性化することが報告されている。さらにNF- κ BはTh1(IFN- γ など)発現に必要とされており、NF- κ Bの抑制によりTh1反応(IFN- γ 産生や抗原特異的IgG産生)が減少することが報告されている³²⁾。また、AT II還流ラットにおいてもTh1サイトカイン(IFN- γ)を増加し、Th2サイトカイン(IL-4)を減少させること¹⁹⁾、high AT II ApoE^{-/-}マウス由来脾臓細胞においてnormal AT II ApoE^{+/+}マウスと比べIFN- γ の分泌量が増加していたこと²⁰⁾、ACE-inhibitorによりTh1優位のバランスが抑制されたことが報告されている²¹⁾。これらの結果からAT II/AT1aはNF- κ Bの活性化を介してTh1/Th2バランスをTh1へ偏移させることに関与しているかもしれない。またNF- κ Bが直接IL-4の誘導に拮抗することも報告されている³³⁾。従って今回のAT1aKOにおけるIL-4, IL-5の発現メカニズムの1つとしてAT1a欠損によるTh1/Th2バランスのTh2への偏移が考えられる。

気道炎症悪化のメカニズムとして抑制性サイトカインであるtransforming growth factor- β 1(TGF- β 1)の発現が低下している可能性も考えられる。TGF- β 1は、T細胞の機能抑制を介して抗炎症性に作用することからアレルギー性炎症の終焉に関与することが示唆されている⁴⁷⁾。喘息気道では、好酸球や線維芽細胞、好中球、肺胞マクロファージなどに過剰発現が報告されている³⁴⁻⁴⁰⁾。特に好酸球が主たるTGF- β 産生細胞の1つであることが示唆されている^{35,38)}。ヒト気道平滑筋においてAT IIは転写因子(egr-1, c-fos, c-jun)を急速に発現し、それに伴いTGF- β 1の発現を誘導する⁴¹⁾。プレオマイシン誘発性肺線維症モデルラットのBALF中におい

て増加したTGF- β 1がARBの投与により有意に減少を示した⁴²⁾との報告がある。従ってAT1a欠損によるAT II作用の消失により炎症抑制性のTGF- β 1発現が低下し、それに伴い炎症が悪化した可能性が考えられる。

AT1の欠損により血漿AT II濃度が亢進し、AT2へ結合すること⁴³⁾、またAT IIの代謝産物(AT III, AT IV)が他の受容体(AT4)に結合することも考えられる。さらにこれらの結合は炎症性タンパク質の発現を誘導することが報告されている^{44,45)}。従って今回見られた気道炎症の悪化、特にAT II代謝産物による二相目の炎症悪化、の要因としてAT2およびAT4の関与も考慮されるべきであろう。

臨床においてARBが気道収縮や血管性浮腫を誘発することや¹⁵⁾、また中等度の安定した喘息患者においてもARBが効果を示さないこと⁴⁶⁾が報告されている。これらの報告や今回の我々の結果より、現在高血圧治療薬として用いられているARBの喘息合併高血圧患者への投与の際に喘息に対する影響、特に気道炎症の増悪に注意が必要であることが示唆される。今回AT1aKOで得られた喘息気道炎症悪化のメカニズムを解析することは臨床的に重要であると考えられる。

参 考 文 献

- NHLBI/WHO workshop report. Global Strategy for Asthma Management and prevention. 02-3659 (2002).
- Vignola A.M., Chanez P., Campbell A.M., Souques F., Lebel B., Enander I., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **157**, 403-409 (1998).
- Bousquet J., Chanez P., Lacoste J.Y., Barneon G., Ghavanian N., Enander I., *N. Engl. J. Med.*, **323**, 1033-1039 (1990).
- Kay A.B., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **87**, 893-910 (1991).
- Busse W.W., Chalhoun W.F., Sedgwick J.D., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **147**, S20-S24 (1993).
- Catherine H.S., Lee T.H., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **148**, S75-S78 (1993).
- Teran L.M., Davies D.E., *Clin. Exp. Allergy*, **26**, 1005-1019 (1996).
- Resnik M.B., Wellar P.F., *Am. J. Cell Mol. Biol.*, **8**, 349-355 (1993).
- Johnson A.R., Ashton J., Schulz W.W., Erdos E.G., *Am. Rev. Respir. Dis.*, **132**, 564-568 (1985).
- Gillian R.B., Isabel S., Graeme B., Helmy M.S.M.G., *Histochem. Cell. Biol.*, **115**, 117-124 (2001).
- Jean M.G., Sadoutounissa S., Mathilde S., Pierre C., *Hypertension* **24**, 531-537 (1994).
- Millar E.A., Angus R.M., Hulks G., Thomson N.C., *Thorax*, **49**, 492-495 (1994).
- Myou S., Fujimura M., Watanabe K., Hirose T., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **162**, 45-49 (2000).
- Gabriel L.R., Claire J.D., Francois A.-G., Daniel J.D., *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**, 402-410 (1999).
- Kanazawa H., Hirata K., Yoshikawa j., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **159**, 165-168 (1999).
- Sergio A.M., Marta R.O., Jesus E., *Hypertension*, **38**, 635-638 (2001).
- Mckay S., Saxena P.R. Sharma H.S., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **18**, 823-833 (1998).
- Jolanta K.-R., Henryk S., Jan K. Marek P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **198**, 1034-1039 (1994).
- Jing S., Nangaku M., Miyata T., Kurokawa K., Fujita T., *Hypertension*, **42**, 31-38 (2003).
- Lucia M., Michel A.D., Martine K., Giulio G., Daniel H., *Hypertension*, **44**, 277-282 (2004).
- Julia R.G., Gregg F., Otoniel M.-M., Donna L.V., *Neuroimmunol.*, **11**, 173-180 (2004).
- Kumagai K., Ohno I., Okuda S., Shirato K., *J. Immunol.*, **162**, 4212-4219 (1999).
- Jahnz-Rozyk K., Chcialowski A., Pirozynska E., Rogalewska A., *Pol. Merkuriusz. Lek.*, **9**, 649-652 (2000).
- Dorbina A., Menegazzi R., Carlos T.M., Nardon E., Cramer R., Zacchi T., Harlan J.M., Patricia P., *J. Clin. Invest.*, **88**, 20-26 (1991).

- 25) Heath H., Qin S., Rao P., Wu L., Larosa G., Kassam N., Ponath P.D., Mackay C.R., *J. Clin. Invest.*, **99**,178-184 (1997).
- 26) Panina-Bordignon P., Papi A., Mariani M., Di L.P., Casoni G., Bellettato C., Buonsanti C., Miotto D., Mapp C., Villa A., Arrigoni G., Fabbri L.M., Sinigaglia F., *J. Clin. Invest.*, **107**, 1357-1364 (2001).
- 27) Grob M., Schmid-Grendelmerier P., Joller-Jemelka H.I., Ludwig E., Dubs R.W., Grob P.J., Wuthrich B., Bisset L.R., *Allergy*, **58**, 239-245 (2003).
- 28) Brown M.A., Hural J., *Crit. Rev. Immunol.*, **17**, 1-32 (1997).
- 29) Tanaka H., Kawada N., Yamada T., Kawada K., Nagai H., *Allergol. Int.*, **49**, 253-261 (2000).
- 30) Nagai H., Maeda Y., Tanaka H., *Clin. Exp. Allergy*, **27**, 218-224 (1997).
- 31) Greenfeder S., Umland S.P., Cuss F.M., Chapman R.W., Egan R.W., *Respir. Med.*, **2**, 71-79 (2001).
- 32) Mark A. A., Ana L. M., Daphne B. M., Patricia W. F., Joyce E. J., James R. S., Mark R. B., *J. Immunol.*, **163**, 5116-5124 (1999).
- 33) Asta V., Sabine L. G., Briggt S., Djillali S., *J. Immunol.*, **172**, 688-698 (2004).
- 34) Magnan A., Retornaz F., Tsiopoulos A., *Clin. Exp. Allergy*, **27**, 389-395 (1997).
- 35) Ohno I., Nitta Y., Yamauchi K., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **15**, 404-409 (1996).
- 36) Vignola A.M., Chanez P., Chiappara G., *Clin. Exp. Immunol.*, **106**, 114-119 (1996).
- 37) Vignola A.M., Chanez P., Chiappara G., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **156**, 591-599 (1997).
- 38) Minshall E.M., Leung D.Y., Martin R.J., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **17**, 326-333 (1997).
- 39) Redington A.E., Madden J., Frew A.J., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **156**, 642-647 (1997).
- 40) Chu H.W., Trudeau J.B., Balzar S., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **106**, 1115-1123 (2000).
- 41) Sue M., Johan C. de J., Pramod R. S., *Am. j. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **18**, 823-833 (1998).
- 42) Otsuka M., Takahashi H., Shiratori M., Chiba H., Abe S., *Thorax. Jan.*, **59**(1), 31-38 (2004).
- 43) Esteban V., Lorenzo O., Ruperez M., Suzuki Y., Mezzano S., Blanco J., Kretzler M., Sugaya T., Egido J., Ruiz-Ortega M., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, 1514-1529 (2004).
- 44) Esteban V., Rupere M., Sanchez-Lopez E., Rodinguez-Vita J., Lopez A., Lorenzo O., Egido J., Ruiz-Ortega M., *Circulation*, **108**, 305, (2003).
- 45) Lorenzo O., Ruiz-Ortega M., Suzuki Y., Ruperez M., Esteban V., Sugaya T., Egido J., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 1162-1171, (2002).
- 46) Dicpinigaitis P.V., J. B. Dobkin., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **60**, 41-46 (1981)
- 47) Ohno I., *Zensoku*, **17**(3), 60-64 (2004).