アレルギー性鼻炎発症に関与する 細胞内シグナルを標的とした治療戦略の開発

水口 博之

要約：アレルギー疾患感受性遺伝子の発現レベルは症状の重篤性と相関するため、遺伝子発現の抑制は有効な治療法となりうる。我々は、ヒスタミン H_1 受容体 ($H1R$) 遺伝子が花粉症の疾患感受性遺伝子であることを証明し、その遺伝子発現がプロテインキナーゼ $C\delta$ ($PKC\delta$) シグナルを介することを明らかにした。また、和漢薬苦参由来 $H1R$ 遺伝子発現抑制化合物 (−) マーキアインの分子薬理学的研究から、花粉症に対する新規創薬ターゲットとしてヒートショックプロテイン 90 ($Hsp90$) を同定した。 $Hsp90$ 阻害薬は鼻過敏症モデルラットにおいて鼻粘膜 $H1R$ 遺伝子発現亢進を抑制し症状を改善した。抗ヒスタミン薬は $PKC\delta$ シグナルを抑制し症状を改善するが、抗ヒスタミン薬により $H1R$ 遺伝子発現がコントロールレベルにまで減少しても症状は完全には改善せず、花粉症の症状発現に $PKC\delta$ シグナルに加えて第2の細胞内シグナルの関与が考えられた。スプラタストは抗ヒスタミン薬と同様症状改善効果を示すが $PKC\delta$ シグナルを抑制せず、その症状改善効果は第2の細胞内シグナルの抑制によると考えられた。スプラタストと抗ヒスタミン薬エピナスチンの併用投与により、それぞれの薬物単独投与に比べ顕著な症状改善効果が認められた。スプラタストは鼻粘膜 $IL-9$ 遺伝子発現を強く抑制したが、エピナスチンは $IL-9$ 遺伝子発現を抑制せず、スプラタストが第2の細胞内シグナルを介した $IL-9$ 遺伝子発現を抑制することが示唆された。スプラタストは $RBL-2H3$ 細胞において $NFAT$ シグナルを介した $IL-9$ 遺伝子発現亢進や、 $NFAT$ シグナルを介することが知られている $Jurkat$ 細胞における $IL-2$ 遺伝子発現亢進を抑制した。これらのことから、スプラタストが $NFAT$ シグナルを抑制することが明らかとなった。以上の結果から、 $PKC\delta$

シグナルと $NFAT$ シグナルは花粉症発症に関与する細胞内シグナルであり、両シグナルを抑制することにより顕著に症状を改善できることが明らかとなった。

1. はじめに

花粉症は、現在、国民の30%が罹患する国民病であり、その有病率は過去10年間増加の一途を辿っている。現在の花粉症の治療薬は主として、抗ヒスタミン薬、ロイコトリエン受容体遮断薬を用いた対症療法であり、これらは、受容体遮断がその作用機序である。しかし、これらの効果は部分的であり、我々が行った鼻過敏症モデルラットを用いた研究でも、抗ヒスタミン薬投与により花粉症症状はおよそ60%しか改善されなかった(1)。近年、ステロイド点鼻薬による治療も盛んに行われているが、その作用機序や長期投与における副作用に対して不明な点が多い。また、スギ花粉を用いた舌下療法は医師のモニタリングが必須であり、有効な効果が得られるまで数年間治療を続けなければならない患者への負担が大きい。以上のことから、花粉症の高度の症状改善を達成するため、既存の治療薬と異なる薬理機構を持つ治療薬の開発が望まれている。

我々は、花粉症が遺伝子の異常発現を伴う多因子疾患であると捉え、遺伝子発現レベルが症状の重篤性に大きく関わる疾患感受性遺伝子に着目し、その遺伝子発現亢進に寄与する細胞内シグナル分子を治療ターゲットとし、天然物由来シグナル抑制化合物により花粉症において異常に亢進した遺伝子発現を抑制し正常レベルに戻すことで花粉症症状の改善を試みている(図1)。

キーワード：疾患感受性遺伝子, $PKC\delta$ シグナル, $Hsp90$, $NFAT$ シグナル, 天然医薬
徳島大学大学院 医歯薬学研究部 分子情報薬理学分野 (〒770-8505 徳島県徳島市庄町 1-78-1)
E-mail: guchi003@tokushima-u.ac.jp 原稿受領日：2017年7月21日、依頼原稿

Title: Development of therapeutic strategy target for intracellular signaling molecules responsible for the pathogenesis of allergic diseases Author: Hiroyuki Mizuguchi

図1 研究のストラテジー

花粉症では遺伝子発現レベルが症状の重篤性と相関する疾患感受性遺伝子の遺伝子発現が異常に亢進していると考えられる (A)。天然医薬により疾患感受性遺伝子発現シグナルを抑制し、遺伝子発現レベルを是正することで症状の改善を試みる (B)。

2. 疾患感受性遺伝子としてのヒスタミン H_1 受容体 (H1R) 遺伝子

ヒスタミンは即時型アレルギー反応における主要ケミカルメディエーターであり、その作用は主としてGタンパク質共役型受容体 (GPCR) であるH1Rを介して起こる。一般に、GPCRはアゴニストの反復投与によりダウンレギュレーションを受けるが、これは、細胞内に必要以上の過剰なシグナルを入れないという合目的な防御機構である。これに対して、我々は、H1Rがヒスタミン刺激によりアップレギュレーションを受け、プロテインキナーゼC δ (PKC δ) シグナルを介してH1R遺伝子の発現が亢進することを見出した(2)。このヒスタミンによるH1R遺伝子アップレギュレーションは、アレルギー反応において発作誘発により放出されたヒスタミンが標的細胞においてH1R発現量を増加させ自身のヒスタミンに対する感受性を高め、より重度な症状を引き起こすというアレルギー増悪化の機構であると考えられた(3)。また、H1Rを介するシグナルの強さはH1R発現レベルに依存する(4)こと、アレルギー患者では、H1R遺伝子発現が亢進している(5)ことから、H1Rはシグナル伝達の律速分子でありH1R遺伝子の発現レベルがアレルギー症状の重篤性に大きく関わると考えられ、H1R遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子であることが強く示唆された。そこで、我々は、鼻過敏症アレルギーモデルラットに初期療法を模して抗ヒスタミン薬を長期投与し、アレルギー症状とH1R遺伝子発現への影響を検討した。その結果、抗ヒスタミン薬の長期投与により症状が改善し、H1R遺伝子発現量も有意に減少することが明らかとなった(1)。さらに、スギ花粉症患者

に初期療法を行い鼻炎症状と鼻粘膜H1R遺伝子発現レベルとの関連について検討し、鼻炎症状とH1R遺伝子発現レベルが正に相関すること、初期療法群では鼻炎症状もH1R遺伝子発現量も有意に減少していることが明らかとなった(図2A)(6)。さらに、このことは、花粉暴露室を利用した研究によっても証明され(図2B)(7)、H1R遺伝子が花粉症の疾患感受性遺伝子であることが明らかとなった。我々は、天然医薬にH1R遺伝子発現抑制成分を見出し、緑茶葉、和漢薬苦参及び、桑葉に含まれるH1R遺伝子発現化合物としてエピガロカテキンガレート、ケルセチン及び(-)マーキアインを同定した(8-10)。これらの化合物は鼻過敏症モデルラットにおいて鼻炎症状を改善し、鼻粘膜H1R遺伝子発現亢進も抑制していた。以上のことから、H1R遺伝子発現シグナルの抑制が花粉症治療戦略として有効であることが明らかとなった。

3. H1R 遺伝子発現シグナル分子ヒートショックタンパク質 90 (Hsp90) の発見

(-)マーキアインのH1R遺伝子発現抑制の分子機構を明らかにするため、(-)マーキアインの結合タンパク質の同定を試みた。(-)マーキアインはPKC δ の活性化に必須であるTyr³¹¹のリン酸化を抑制するがPKC δ のキナーゼ活性は阻害しないことから、PKC δ 以外に標的タンパク質が存在することが示唆された。一般に、トリプトファン残基を含むタンパク質において基質や阻害薬などの結合によるコンフォメーション変化に伴い内在性トリプトファン残基の蛍光が変化することが知られている(11)。そこで、これを利用し、(-)マーキアイン結合タンパク質の同定を試みた。HeLa細胞抽出液をイオン交換クロマトグラフィーに

図2 ヒスタミンH₁受容体(H1R)遺伝子は花粉症の疾患感受性遺伝子である

(A) 花粉症患者における抗ヒスタミン薬の初期療法の鼻炎症状およびH1R遺伝子発現への影響：H1R遺伝子発現レベルと鼻炎症状は正に相関した。抗ヒスタミン薬の初期療法(■)により初期療法を行わない群(○)に比較して鼻炎症状が改善しH1R遺伝子発現レベルも減少した(文献6より改変)。(B) 花粉暴露実験：(a) 抗ヒスタミン薬無処置群では花粉暴露によりH1R遺伝子発現が亢進した。抗ヒスタミン薬処置群では、花粉暴露前にすでにH1R遺伝子発現が減少していたが花粉暴露後も遺伝子発現は減少したままであった。(b) 抗ヒスタミン薬処置群(■)では、花粉暴露後も症状はほとんど現れなかった。データは平均±S.D. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. 抗ヒスタミン薬未処置+花粉暴露前, ## $P < 0.01$ vs. 抗ヒスタミン薬処置+花粉暴露前 ($n = 14$) (文献7より改変)。

図3 (-)マーキアイン結合タンパク質の同定

(A) 蛍光クエンチング実験：Hsp90の内在性トリプトファンに由来する蛍光は(-)マーキアインのHsp90への結合に伴い減少した。(B) ゲルダナマイシン競合試験：(-)マーキアインはゲルダナマイシンのHsp90への結合に競合した。(C) ATPase活性への影響：(-)マーキアインはHsp90のATPase活性を阻害しなかった。17-AAG：17-(allylamino)geldanamycinゲルダナマイシン誘導体、Hsp90阻害薬。(文献12より改変)

より分画後、それぞれの画分において(-)マーキアインの存在下・非存在下における蛍光を測定しその変化量の最も大きい画分についてタンパク質をSDS-PAGEにて分離し、画分に含まれるタンパク質をMS解析により同定した。その結果、候補タンパク質としてHsp90が見出された。リコンビナントHsp90の蛍光は(-)マーキアイン結合により減少した(図3A)。

Hsp90はそのクライアントタンパク質との結合にATPを必要とし、Hsp90阻害薬ゲルダナマイシンはHsp90のATP結合部位に結合することでHsp90の活性を阻害する。(-)マーキアインは蛍光ラベルしたゲルダナマイシンの結合を弱いながらも阻害したが、Hsp90のATPase活性は阻害しなかった(図3B, C)。このことから、(-)マーキアインはゲルダナマイシン

とは異なる様式で Hsp90 に結合することが明らかとなった。

以上の結果は Hsp90 が花粉症の新規創薬ターゲットとなる可能性を示唆するが、これまでに花粉症と Hsp90 との関係についての報告はなかった。そこで、Hsp90 阻害薬の H1R 遺伝子発現抑制及び症状改善効果について検討した(12)。その結果、Hsp90 阻害薬は、HeLa 細胞において、PMA 刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進を抑制することが明らかとなった(図 4A)。また、その分子機構として、PKC δ は Hsp90 のクライアントタンパク質であり、刺激のない時には Hsp90 と結合して存在しているが、(-)マーキアインはこの PKC δ と Hsp90 の結合を阻害することが明らかとなった(図 4B)。さらに、鼻過敏症モデルラットにおいて、Hsp90 阻害薬セラストロールは、鼻粘膜 H1R 遺伝子発現亢進を抑制するとともに鼻炎症状を改善した(図 4C)。以上の結果から、Hsp90 阻害薬が新規花粉症治療薬として有効であることが明らかとなった。

Hsp90 は、細胞周期・細胞分裂・細胞生存シグナル等に関わるさまざまな生理機能分子をクライアントタンパク質として結合し細胞内分子ネットワークの“ハブ”として機能するため、Hsp90 阻害薬は細胞内シグ

ナルの異常亢進により引き起こされる多くの疾患に対して有効であると考えられるが、一方、多くのシグナルを一度に抑制するためその副作用も大きい。そこで、クライアントタンパク質選択性を有する Hsp90 阻害薬が開発できれば異常亢進している細胞内シグナルを選択的に抑制でき副作用も少ないことが期待される。しかし、Hsp90 のクライアントタンパク質認識機構については結合するタンパク質が多岐にわたることもあり不明な点が多い。我々の研究データは(-)マーキアインと既知 Hsp90 阻害薬では Hsp90 に対する結合様式に違いがあることを示しており、その違いを詳細に解析することは Hsp90 の疾患選択的創薬ドメインを明らかにし細胞内シグナル選択的な Hsp90 阻害薬の開発につながると考えられた。

4. 第 2 の花粉症症状発現シグナルの発見

鼻過敏症モデルラットを用いた研究から、PKC δ シグナル抑制薬である抗ヒスタミン薬の長期投与により、鼻粘膜 H1R 遺伝子発現はコントロールレベルにまで減少するが症状は完全には改善されなかった(1)。このことから、PKC δ シグナル以外の花粉症症状発現シグナルの存在が想定された。スプラタストは Th2 サ

図 4 Hsp90 阻害薬は H1R 遺伝子発現シグナルを抑制する

(A) HeLa 細胞における Hsp90 阻害薬の PMA 刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進に対する影響：Hsp90 阻害薬は HeLa 細胞における PMA 刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進を抑制した。データは平均±S.E.M. ** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs. PMA ($n=3$)。 (B) 共免疫沈降実験：PKC δ と Hsp90 は刺激のない状態では複合体を形成していたが、(-)マーキアイン処置により複合体は解離した。 (C) 鼻過敏症モデルラットにおける Hsp90 阻害薬の症状改善効果：Hsp90 阻害薬セラストロールはモデルラットにおいて症状を改善し、鼻粘膜 H1R 遺伝子発現も抑制した。データは平均±S.E.M. ** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs. TDI ($n=4$)。(文献 12 より改変)

イトカイン阻害薬として知られている抗アレルギー薬である。スプラタストは鼻過敏症モデルラットにおいて抗ヒスタミン薬と同様に症状改善効果を示す。しかし、スプラタストはHeLa細胞においてPMA刺激に伴い亢進するPKC δ シグナルを介したH1R遺伝子発現を抑制せず(13)、スプラタストの症状改善効果は第二の花粉尘症状発現シグナルの抑制によると考えられた。そこで、スプラタストの症状改善効果の分子機構を明らかにし、症状発現に関与する第2の細胞内シグナルの同定を試みた。抗ヒスタミン薬とスプラタストをモデルラットに併用投与したところ、それぞれの薬物の単独投与に比べ顕著な症状改善効果が認められた(図5A)(14)。スプラタストはラット鼻粘膜のIL-4遺伝子及びIL-5遺伝子の発現を抑制したが、それに加えてIL-9遺伝子発現を強く抑制することが明らかとなった(図5B)。一方、抗ヒスタミン薬はIL-9遺伝子発現を抑制しなかった。このことは、IL-9遺伝子発現シグナルが第2の花粉尘症状発現シグナルであることを強く示唆した。IL-9は主としてTh9細胞や肥満細胞などから産生されるサイトカインである。また、IL-9はILC(自然リンパ球)細胞やTh17細胞、Treg細胞からも産生される(15)。Th9細胞はIL-4/TGF- β またはTGF- β 刺激によりナイーブT細胞またはTh2細胞から分化する(16,17)。IL-9遺伝子発現亢進に寄与する生理活性物質についてはまだ明らかでないが、Th9細胞においてCGRP(calcitonin gene-related peptide)がPKA/NFATc2経路を介してIL-9を産生することが報告されており(18)、鼻過敏症モデルラットにおいてCGRPの産生が亢進していることから(19)、CGRPがIL-9の発現亢進に関与する可能性が考えられる。

5. NFATシグナルは第2の花粉尘症状発現シグナルである

我々は、RBL-2H3細胞においてPMA刺激に伴いIL-9遺伝子発現が亢進することを見出した(14)。このIL-9遺伝子発現亢進はカルシニューリン阻害薬のサイクロスポリンAやINCA-6により抑制されることからNFATシグナルを介することが明らかとなった(図6A)。スプラタスト及びその代謝物であるM-1はこのIL-9遺伝子発現亢進を抑制した(図6B)。また、スプラタスト及びM-1はJurkat細胞におけるPMA/イオノマイシン刺激に伴うNFATシグナルを介したIL-2遺伝子発現亢進も抑制した(図7)。さらに、IL-2遺伝子のNFAT結合領域を用いてスプラタストのNFAT転写活性に対する影響を検討した結果、M-1はNFATの転写活性を抑制した(データ省略)。以上の結果からNFATシグナルが第2の花粉尘症状発現シグナルであり、スプラタストはNFATシグナルを介したIL-9遺伝子発現を抑制することで鼻過敏症モデルラットにおける症状改善効果を示すものと考えられた。

6. 2つの花粉尘症状発現シグナル抑制による花粉尘症状の改善効果

花粉尘症状発現主要細胞内シグナルとしてPKC δ シグナルとNFATシグナルが存在することが明らかとなった(図8)。また、抗ヒスタミン薬とスプラタストの併用実験から両シグナルを同時に抑制することで症状を顕著に改善できる可能性が示唆された。我々はこれまでに徳島県特産物の阿波晩茶やレンコン抽出物中にIL-9遺伝子発現抑制成分の存在を見出しその有効成分の同定に成功している。鼻過敏症モデルラットに

図5 鼻過敏症モデルラットにおけるスプラタストの症状改善効果

(A) スプラタストと抗ヒスタミン薬の併用効果：抗ヒスタミン薬とスプラタストをモデルラットに併用投与したところ、それぞれの薬物の単独投与に比べ顕著な症状改善効果が認められた。(B) スプラタストの鼻粘膜Th2サイトカイン遺伝子発現への影響：スプラタストはIL-9遺伝子発現を強く抑制した。一方、抗ヒスタミン薬はIL-9遺伝子発現を抑制しなかった。データは平均±S.E.M. ** P <0.01 vs. TDI, # P <0.05, ** P <0.01 vs. エピナスチン; \$ P <0.01 vs. スプラタスト (n =4)。(文献14より改変)

図6 RBL-2H3細胞におけるPMA刺激に伴うIL-9遺伝子発現亢進はNFATシグナルを介する

(A) IL-9遺伝子発現亢進に対するNFATシグナル阻害薬の影響：NFATシグナル阻害薬のサイクロスポリンA (CsA) および INCA-6はIL-9遺伝子発現亢進を抑制した。(B) IL-9遺伝子発現亢進に対するスプラタストおよびその代謝物M-1の影響：スプラタストおよびM-1はIL-9遺伝子発現亢進を抑制した。IO：イオノマイシン，INCA-6：(9,10-dihydro-9,10[1',2']-benzoanthracene-1,4-dione) カルシニューリン-NFAT相互作用阻害薬。データは平均±S.E.M. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. イオノマイシン ($n=3$)。 (文献14より改変)

図7 Jurkat細胞におけるPMA/イオノマイシン刺激に伴うNFATシグナルを介したIL-2遺伝子発現亢進に対するスプラタストの影響

IL-2遺伝子発現亢進に対するスプラタストおよびその代謝物M-1の影響：スプラタストおよびM-1はIL-2遺伝子発現亢進を抑制した。P/I：PMA+イオノマイシン。データは平均±S.E.M. ** $P<0.01$ vs. PMA+イオノマイシン ($n=3\sim4$)。 (文献14より改変)

において有効成分は抗ヒスタミン薬と併用投与することによりスプラタストの場合と同様に症状が顕著に改善されることが明らかとなった (図9)。以上のことから、PKC δ シグナルとNFATシグナルの同時抑制が症状の改善に有効であることを支持する。

7. 終わりに

これまでに我々が対象としたのはくしゃみや鼻水という花粉症の急性症状である。一方、鼻閉など花粉症の慢性症状は好酸球増多を原因とすることが知られている。我々は、花粉症患者において鼻粘膜IL-33遺伝

子発現レベルが血中好酸球数と相関することから、IL-33遺伝子が慢性症状の疾患感受性遺伝子である可能性を見出した。また、IL-33遺伝子発現シグナルにPKC δ 及びHsp90が関与することを明らかにしている。このことは、PKC δ /Hsp90シグナル抑制化合物が急性症状だけでなく慢性症状も改善できる可能性を示唆する。また、好酸球増多により引き起こされる喘息などの疾患に対してもPKC δ /Hsp90シグナル抑制は有効であると考えられる。現在、野ぶどうや小青竜湯にIL-33遺伝子発現抑制成分の存在を見出しており、これらの有効成分を単離し、IL-33遺伝子発現抑制によ

図8 花粉症症状発現に關する2つの細胞内シグナル

る好酸球性炎症の治療の有効性を明らかにしていきたいと考えている。さらに、PKC δ シグナルやNFATシグナル抑制化合物は、これらのシグナルが症状発現に關するアレルギー疾患以外の他の疾患の治療への応用も可能である。我々は、これまでに、PKC δ シグナルが膵ランゲルハンス島 α 細胞からのグルカゴン分泌に關与することを証明しており(20)、PKC δ シグナル抑制による糖尿病治療の有効性について証明したいと考えている。薬理学は単に薬物の作用機序を明らかにするだけでなく、得られた知見を元に病態に基づいた治療法及び治療薬の開発を行う薬物治療学でもある。疾患感受性遺伝子に着目しその遺伝子発現細胞内シグナルを標的とする我々の治療戦略は多くの疾患に対して有効であり、これらの疾患の予防や治療へ展開していきたいと考えている。

図9 鼻過敏症モデルラットにおける天然医薬由来 IL-9 遺伝子発現シグナル抑制化合物と抗ヒスタミン薬の併用効果
阿波晩茶 (a) およびレンコン (b) 由来 IL-9 遺伝子発現シグナル抑制化合物と抗ヒスタミン薬をモデルラットに併用投与したところ、それぞれの化合物単独投与に比べ顕著な症状改善効果が認められた。データは平均 $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ vs. TDI, # $P < 0.05$ vs. エピナスチン ($n = 4$)。

謝辞：本研究遂行に關し共同研究者の徳島大学大学院医歯薬学研究部耳鼻咽喉科学分野武田憲昭教授、北村嘉章講師、並びに分子情報薬理学教室の皆様のご協力に深謝いたします。本研究は文部科学省科学研究助成事業、並びに公益財団法人大阪難病研究財団の助成を受けて実施しました。最後になりましたが、第89回日本薬理学会年会シンポジウムにおいて発表の機会を与えていただきましたオーガナイザーの東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野谷内一彦教授、徳島大学医歯薬学研究部分子難病学分野福井裕行特任教授、および本稿を作成する機会を与えていただきました編集部の方々に心より感謝申し上げます。

著者の利益相反：水口博之（株式会社ニチレイバイオサイエンス，株式会社明治，株式会社 Nab）。

文 献

- 1) Mizuguchi H, et al. J Pharmacol Sci. 2009;108:480-486.
- 2) Das AK, et al. J Pharmacol Sci. 2007;103:374-382.
- 3) Mizuguchi H, et al. Yakugaku Zasshi. 2011;131:171-178.
- 4) Ohuchi Y, et al. Int J Mol Med. 1998;1:355-360.
- 5) Iriyoshi N, et al. Clin Exp Allergy. 1996;26:379-385.
- 6) Mizuguchi H, et al. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2010;32:745-748.
- 7) Kitamura Y, et al. J Pharmacol Sci. 2015;129:183-187.
- 8) Matsushita C, et al. J Trad Med. 2008;25:133-142.
- 9) Hattori M, et al. Int Immunopharmacol. 2013;15:232-239.
- 10) Mizuguchi H, et al. Pharmacol Res Perspect. 2015;3:e00166. doi: 10.1002/prp2.166.
- 11) Böhl M, et al. Anal Biochem. 2005;346:295-299.
- 12) Nariai Y, et al. J Biol Chem. 2015;290:27393-27402.
- 13) Shahriar M, et al. J Immunol. 2009;183:2133-2141.
- 14) Mizuguchi H, et al. J Pharmacol Sci. 2016;130:151-158.
- 15) Schmit E, et al. Trends Immunol. 2014;35:61-68.
- 16) Veldhoen M, et al. Nat Immunol. 2008;9:1341-1346.
- 17) Dardalhon V, et al. Nat Immunol. 2008;9:1347-1355.
- 18) Mikami N, et al. J Immunol. 2013;190:4046-4055.
- 19) Kaibi B, et al. Brain Res. 1992;576:287-296.
- 20) Yamamoto K, et al. J Med Invest. 2017;64:122-128.