

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10775

研究課題名(和文) アレルギー性鼻炎の根治を指向したSIRT1活性化剤の基礎的研究

研究課題名(英文) basic research of SIRT1 activator for curative treatment of allergic rhinitis

研究代表者

中丸 裕爾 (Nakamaru, Yuji)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20344509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー性鼻炎患者におけるTSLP産生にヒストン脱アセチル化酵素がどのように働くか検討するため、ヒト気道上皮細胞株(Beas-2B細胞)を使用した。細胞がコンフルエントになったところで、ヒストン脱アセチル化酵素の抑制剤を添加した。薬剤投与30分後に細胞を刺激するため、ODN2006を最終濃度1 μ Mで添加した。24時間後に細胞を回収しRNAを抽出した。real time PCR法にてTSLPメッセンジャーRNAの産生量の変化を調べた。以上の実験の結果、ヒストン脱アセチル化酵素抑制剤の濃度依存性にTSLPの産生が増加した。またヒストンアセチル化酵素促進剤の濃度依存性にTSLPの産生が亢進した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate histone deacetylase for production of TSLP in patients with allergic rhinitis we used Beas-2B cells. After those cells were confluent, the inhibitor of histone deacetylase was added. Thirty minutes after the inhibitor was added, we stimulated the cells with ODN2006. Twenty four hours later, those cells were collected and the amount of TSLP mRNA was evaluated. We found that the inhibitor of histone deacetylase increased the amount of TSLP with dose-dependent manner. On the other hand, the activator of histone deacetylase decreased the amount of TSLP with dose-dependent manner.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：アレルギー学 ヒストンアセチル化酵素 アレルギー性鼻炎

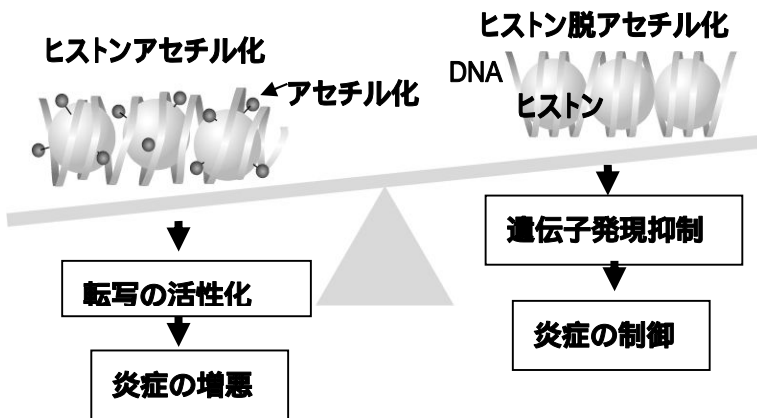
1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎は増加傾向にあり、現在日本国民 30%以上が罹患する国民病となっている。しかし治療は抗原回避や対症療法のみで、根治を期待できる方法は未だ開発されていない。

近年感染を契機に気道上皮細胞から放出された TSLP が樹状細胞などから Th2 サイトカインの産生を誘導することで、アレルギー性疾患の発症に関与することが明らかになってきた。

アレルギー性鼻炎においても TSLP の遺伝子多型がアレルギー性鼻炎の発症に関連することが示され (Nilsson D et. al. Allergy. 2014) 疾患の発症また病態の維持に関与すると考えられる。しかし TSLP 自体の発現調節機序は明らかになっていない。

近年、DNA と結合しているヒストン蛋白がアセチル化やメチル化などの修飾を受けクロマチンが構造変化する (クロマチンリモデリング) ことで DNA からの転写が調節されていることが判明してきた。



この遺伝子制御機構は発生、細胞分化や癌を含む様々な疾患の発症に関与していると推測されている。

今回の研究ではヒストン脱アセチル化作用を持つ SIRT (sirtuin) 1 という蛋白に注目し、鼻腔上皮細胞の TSLP 産生における役割を検討する。SIRT1 は、カロリー制限による寿命の延長に必須の蛋白である。カロリー制限では単に寿命が延長するのみでなく、神経変性疾患や自己免疫疾患などの炎症性疾患が抑制されることが知られており、本蛋白の活性化により多くの疾患が治療あるいは予防できる可能性がある。一方、SIRT1 はポリフェノールの一成分 (レスベラトロール) により活性化されることが判明しており、本薬剤の使用で TSLP の産生が抑制できればアレルギー性鼻炎が治療あるいは予防できる可能性があると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

申請者は、以前 SIRT1 とアレルギー疾患に係る炎症性サイトカインである MMP-9 の関連を検討した。ヒト単球細胞株に SIRT1 の抑制剤を投与すると、抑制剤の濃度依存的に PMA で誘導された MMP-9 の発現が増強された。この発現増強は mRNA のみならず蛋白のレベルでも確認できた。以上の結果より、SIRT1 は MMP-9 遺伝子発現調節に重要な役割を果たすことが示唆された。(Nakamaru Y et.al. 2009 Vol.23(9):2810-9.)

また、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) がラット肥満細胞株からの IL-4 産生に関するか検討を行った。HDAC の抑制剤にて前処置をした後、抗原刺激を行うと、IL-4 mRNA および IL-4 蛋白の産生が促進された。HDAC を抑制することで肥満細胞からの IL-4 産生が増加することが確認できた。(Nakamaru Y et.al. Otolaryngol Head Neck Surg 2015, Vol. 152(1): 48-52)

TSLP は主に上皮細胞に発現している。組織に感染が生じると上皮細胞より放出され上皮下の樹状細胞と結合することで、Th2 タイプのサイトカイン産生を誘導する。TSLP はアレルギー性鼻炎や喘息などアトピー性疾患の上皮に高発現しており、アトピー性疾患の発症また病態の維持に関与すると考えられる。しかし TSLP 産生自体の調節機構については明らかになっていない。

SIRT1 蛋白はカロリー制限による寿命延長に本蛋白が関連する機序解明が進んでいる。現在のところ SIRT1 は神経変性疾患や前立腺癌細胞において細胞周期を停止させアポトーシスを誘導することが示されている。しかし、SIRT1 とアレルギー性疾患との関連について検討した研究は現在のところ報告されていない。SIRT1 以外のヒストン脱アセチル化酵素に関しては、喘息患者の T 細胞からの IL-5 産生がヒストンアセチル化酵素活性により調節されていることが報告され、アレルギー性疾患とヒストンのアセチル化との密接な関連が疑われている。

アレルギー性疾患発症の引き金として注目されている TSLP の産生に、クロマチンの構造変化にて遺伝子の発現を抑制する SIRT1 蛋白が関与しているかを検討する。

TSLP はアレルギー疾患発症に関与するサイトカインと考えられ、予防、治療のターゲットとして注目されている。一方上述のように SIRT1 は炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制する蛋白である。SIRT1 蛋白をコントロールすることで TSLP 産生を抑制しアレルギー性疾患の予防と治療をめざす。

3. 研究の方法

(1) ヒト気道上皮細胞株 (Beas-2B 細胞) を

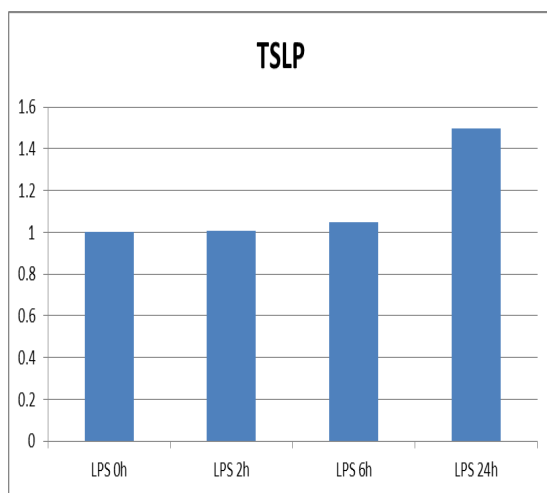
使用した。

(2) 細胞が confluent になったところで SIRT1 の抑制剤 (resveratrol)、促進剤 (spiltomysin) を添加する。またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である (Trichostatin A) も添加した。

(3) 薬剤投与 30 分後 LPS を添加し細胞を刺激する。

刺激後培養し、細胞を回収する。RNA を採取し、逆転写後 real time PCR にて TSLP mRNA 量を測定する。

(4) まず最初に細胞刺激の時間を決めるため、LPS の反応時間を 0、2、6、24 時間に設定し、TSLP の mRNA 量を測定した。



附図説明

LPS の反応時間は 24 時間が最も TSLP の mRNA 量が多かった。

このため反応時間は 24 時間とすることにした。

(5) 続いて LPS 濃度を決めるため、LPS の濃度を 0、0.1、1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に設定し、TSLP の mRNA 量を測定した。

LPS 濃度は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ がもっとも TSLP の反応が良好で、LPS 濃度は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とすることとした。

(6) 以上の結果より

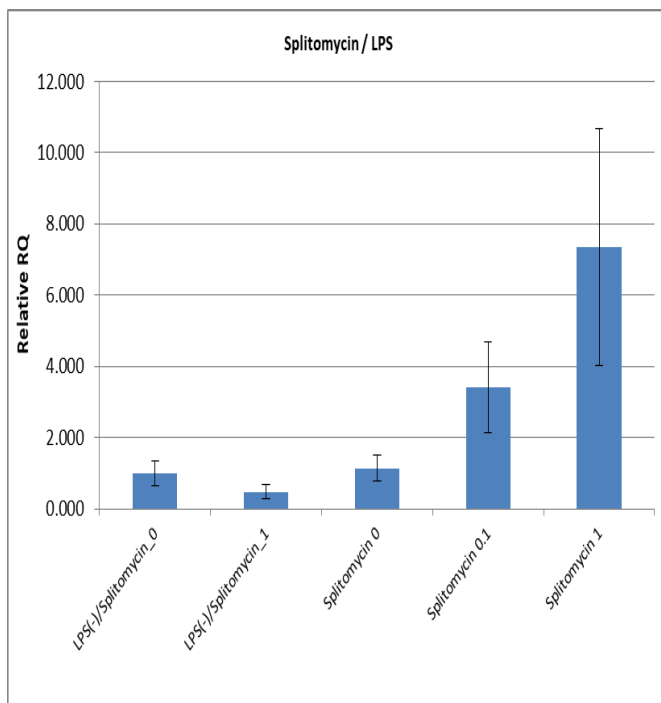
薬剤投与 30 分後 LPS を最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し細胞を刺激する。刺激後 24 時間培養し、細胞を回収する。RNA を採取し、逆転写後 real time PCR にて TSLP mRNA 量を測定することとした。

4. 研究成果

(1) まず最初に SIRT1 の促進剤である spiltomysin を濃度を変えて投与し、TSLP の mRNA 量を測定した。

Spiltomysin 0、0.1、1 μM に設定し実験をした上記の実験の結果、SIRT1 抑制剤

(spiltomysin) の濃度依存性に TSLP mRNA の産生が増加することが確認できた。



附図説明

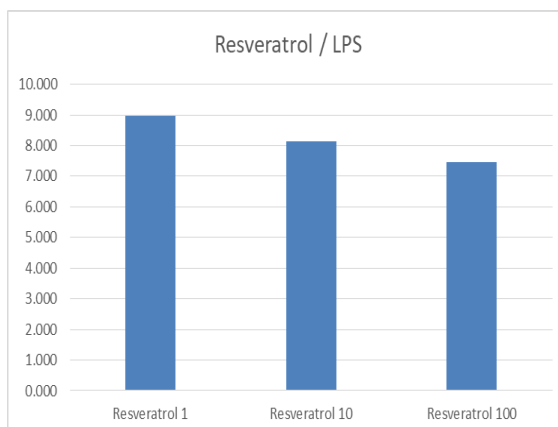
縦軸が TSLP の産生量 (mRNA 量)、横軸には各細胞に添加した薬剤を示す。

最初の 2 つの検体は LPS 非存在下の Spiltomysin 添加した場合の TSLP 反応をみた。こちらは反応なかった。

Spiltomysin 添加濃度 0 に比べ、0.1 μM では有意に TSLP の産生量が増加していた。また Spiltomysin 1 μM ではさらに TSLP mRNA 産生量の増加を認めた。

SIRT1 抑制剤の添加では、濃度依存的に、TSLP 産生量が増加が確認できた。

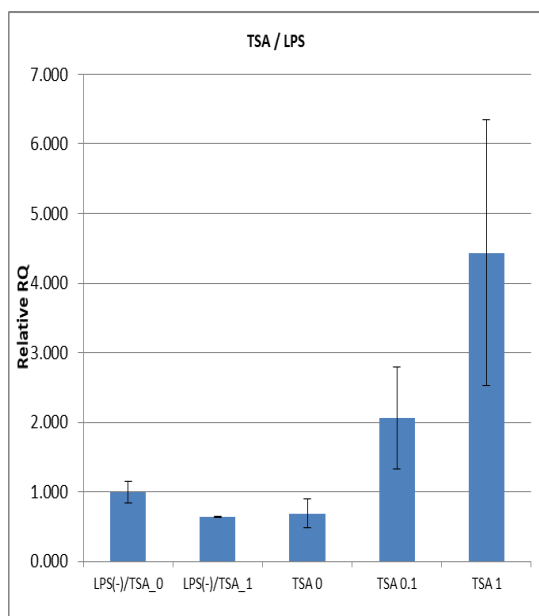
(2) つづいて SIRT1 の促進剤である Resveratrol を添加し TSLP の量を測定した。Resveratrol 1、10、100 μM の濃度にて添加した。



附図説明

縦軸が TSLP の産生量 (mRNA 量)、横軸には各細胞に添加した薬剤を示す。Resveratrol (SIRT1 促進剤) 1 μ M にくらべ 10 μ M では TSLP 産生量が減少していた。また Resveratrol 10 μ M に比べ 100 μ M ではさらに TSLP 産生量が減少した。Resveratrol の濃度依存的に、TSLP mRNA 産生量が減少した。

(3) さらにヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 抑制剤である、Trichostatin A の TSLP における役割を調べるため、Trichostatin A 濃度を 0、0.1、1 μ g/ml にして TSA mRNA 量を測定した。



附图説明

縦軸が TSLP の産生量 (mRNA 量)、横軸には各細胞に添加した薬剤を示す。

最初の 2 つの検体は LPS 非存在下の Trichostatin A 添加した場合の TSLP 反応をみた。こちらは反応なかった。

Trichostatin A 添加濃度 0 に比べ、0.1 μ M では有意に TSLP の産生量が増加していた。また Trichostatin A 1 μ M ではさらに TSLP mRNA 産生量の増加を認めた。

Trichostatin A の添加では、濃度依存的に、TSLP 産生量が増加が確認できた。

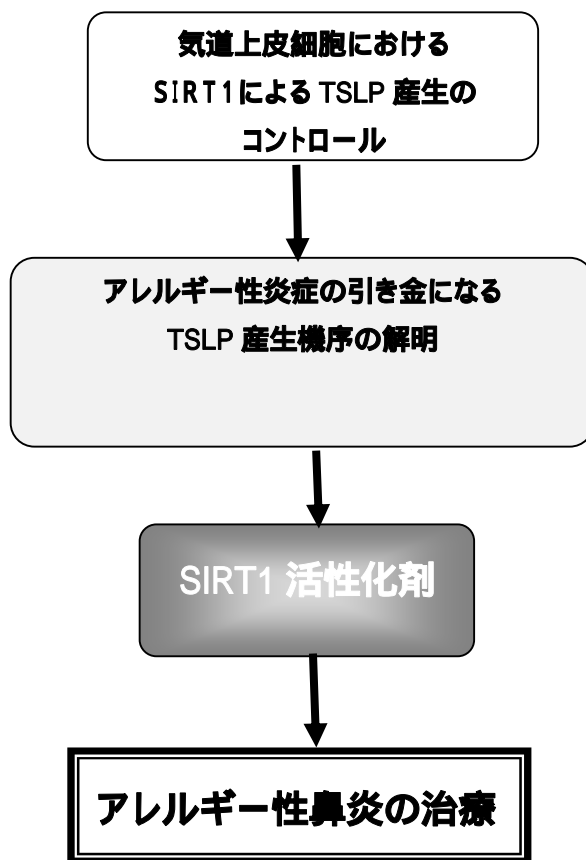
結果のまとめと考察

以上の結果より、気道上皮細胞においては、SIRT1 の促進剤により TSLP 発現が減少し、SIRT1 抑制剤により TSLP 発現が増加するという結果が得られた。さらにヒストン脱アセチル化酵素全体の抑制剤である、Trichostatin A 投与においても同様に、TSLP mRNA 発現を増加させるという結果が得られた。

これらの結果は、気道上皮における TSLP の産生にクロマチンリモデリングの一部の機構が関与することを示唆している。

アレルギー性気道炎症産生における SIRT1

を含むヒストン脱アセチル化酵素変化の全容を解明し、Resveratrol などのヒストン脱アセチル化を促進する薬剤が、アレルギー性炎症消炎に効果があるかどうかを確認していく必要がある。



5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Yuji Nakamaru, Dai Takagi, Satoshi Fukuda. Regulation of IL-4 Gene Expression by SIRT1 in Human Mast Cell. AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, ASTHMA & IMMUNOLOGY, 2016.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 中丸裕爾 (NAKAMARU, Yuji)
北海道大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：20344509

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4)研究協力者 なし
()