

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591188

研究課題名（和文） アレルギー疾患の病態形成に関与する新規エフェクター分子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of novel effectors correlated with allergic diseases

研究代表者

出原 賢治（IZUHARA KENJI）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00270463

研究成果の概要（和文）：

気管支喘息の発症において Th2 サイトカインの一つである IL-13 の重要性が知られている。本研究において、Toll-like 4 受容体を介した刺激が IL-13 産生を抑制すること、IL-13 と受容体とのアミノ酸レベルでの結合様式、IL-13 が陰イオンチャネルである pendrin を介して炎症を誘導していることを明らかにした。これにより、IL-13 による気管支喘息の発症機序をより明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

It is known that IL-13, one of Th2-type cytokines, is important for the pathogenesis of bronchial asthma. In this study, we found the signals via Toll-like 4 receptor inhibit IL-13 production, how IL-13 interacts with its receptor, and IL-13 evokes allergic inflammation via pendrin, an anion transporter. We could show the detailed mechanism of how IL-13 causes bronchial asthma by these results.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー・ぜんそく、遺伝子、蛋白質、免疫学

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性炎症においては Th2 型免疫反応が主体となっており、Th2 型サイトカインの中でも IL-13 が中心的な役割を果たしていることが知られている。このため、現在、IL-13 を標的とした気管支喘息治療薬の開発も進められている。しかしながら、現時点でもアレルギー性炎症における IL-13 の役割に

関して不明な点がいくつか存在する。その中に以下のような事項があげられる。(1) 近年、気管支喘息を含めたアレルギー疾患が先進諸国を中心に増加しており、その増加の原因として、衛生状態の改善によるものとする「衛生仮説」が提唱されている。しかし、その免疫学的説明はなされていなかった。(2) Th2 サイトカインである IL-13 と IL-4 は共通

のレセプターを持ち、同じ細胞内情報を伝達するにもかかわらず、生体内において両者は異なる生物作用を発揮し、気管支喘息などのアレルギー疾患の発症機序において IL-4 と比較して IL-13 が中心的な役割を果たしていることが以前より知られているが、それを説明する分子機序はなかった。(3) IL-13 が気管支喘息の発症機序において重要であることが知られているが、どの細胞に作用してどのような分子を介して気管支喘息の病態形成を起こすのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究においては、1. で示した疑問について以下のような解析を行うことを目指した。(1) アレルギー増加につながる具体的な環境要因の一つとして細菌成分であるリポポリサッカライドがあげられており、その暴露によりアレルギー性炎症が抑制されることが、疫学的な見地よりこの仮説は支持されている。このため、リポポリサッカライドが IL-13 産生などの Th2 型免疫反応を抑制するか、あるいはその機序について喘息モデルマウスを用いて明らかにすることを目指した。(2) IL-13 と IL-4 の共通のレセプター構成成分である IL-13 受容体 α 1 鎖に対する IL-13、あるいは IL-4 との相互作用に相違点があるにかを生化学的手法と構造生物学的手法を組み合わせることを目指した。(3) 以前マイクロアレイ法を用いて網羅的に同定した気管支上皮細胞における IL-13 誘導遺伝子の一つであるイオンチャネルである pendrin に着目して、この分子が気管支喘息の発症機序に関与しているかについて解析を進めた。

3. 研究の方法

本研究においては、2. で示した目的について以下のような方法で解析を行った。(1) リポポリサッカライドがアレルギー性炎症を抑制する免疫学的機序を明らかにするために、リポポリサッカライドの受容体である Toll-like 4 (TLR4) 受容体に対する刺激型抗体を作製し、卵白アルブミンの感作・暴露による喘息モデルマウスにおける影響について解析を行った。(2) 構造上 IL-13 受容体 α 1 鎖と相互作用していると考えられる IL-13、あるいは IL-4 上のアミノ酸に変異を導入して、そのアミノ酸が IL-13 受容体 α 1 鎖との相互作用に貢献しているかについて

検討を行った。(3) 気管支喘息あるいは COPD のモデルマウスの肺組織、あるいは喘息患者の肺組織において pendrin の発現を解析するとともに、気道上皮細胞やマウス肺組織に pendrin を強制発現させた影響について解析を行った。

4. 研究成果

本研究においては、3. で示した方法により以下のような成果を得ることができた。(1) アレルゲン感作前に TLR4 に対する刺激型抗体を投与したところ、アレルゲン感作が抑制され、その結果、アレルゲン吸入によって引き起こされる気道過敏性の亢進、好酸球を中心とした炎症細胞の浸潤といった喘息様の病態発症が抑制された。その免疫学的機序を解析した結果、リポポリサッカライドが樹状細胞を刺激してエンドトキシン寛容を生じ、共刺激分子の発現を抑制していた。そのため、樹状細胞によるアレルゲン特異的 T 細胞の活性化が抑制されていることが明らかになった。これらの結果は、現在のアレルギー疾患増加の原因を免疫学的に説明する根拠になると考えられた。さらに、TLR4 刺激によるアレルギー炎症の抑制がアレルギー疾患に対する治療・予防に適用できる可能性が存在すると考えられた。(2) IL-13 受容体 α 1 鎖の 76、77、78 番目のリジン、リジン、イソロイシンの3つのアミノ酸が IL-13 とは結合するが、IL-4 とは結合しない能力を持っていることを確定した。これにより明らかとなった IL-13R α 1 の性質により、なぜ IL-13 と IL-4 が同じ濃度であっても IL-13 の方が強いシグナルを伝達し、気管支喘息などのアレルギー疾患において IL-13 が IL-4 に比べて中心的な役割を果たしているかについての分子的機序が説明できるようになった。この成果は、アレルギー分野における IL-13 と IL-4 に関しての大きな疑問に答えるばかりではなく、アレルギー疾患に対する治療薬の開発の基盤にもつながると期待される。(3) ①初代培養気道上皮細胞を air-interface 法にて IL-13 存在下で培養すると粘液産生細胞に分化し、その分化した細胞においてマイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子解析を行った結果、誘導遺伝子の中に pendrin 遺伝子が含まれていた。②気管支喘息あるいは COPD のモデルマウスの肺組織、あるいは喘息患者の肺組織において pendrin

の発現が増強していた。③気道上皮細胞株に pendrin を強制発現すると、粘液産生が亢進した。④マウス肺組織にウイルスベクターを用いて pendrin を強制発現させると、好中球浸潤とともに、粘液産生が亢進した。以上の結果は、pendrin が気管支喘息、COPD に共通した粘液産生における重要なメディエーターであることを明らかにした。

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20件)

- ① Fujimoto K, Kawaguchi T, Nakashima O, Ono J, Ohta S, Kawaguchi A, Tonan T, Ohshima K, Yano H, Hayabuchi N, Izuhara K, Sata M, Periostin, a matrix protein, has potential as a novel serodiagnostic marker for cholangiocarcinoma, *Oncol Rep*, 査読有, Vol. 25, No.5, 2011, pp1211-1216
- ② Matsushita H, Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S, Arima K, Toda S, Tanaka H, Nagai H, Kimoto M, Inokuchi A, Izuhara K, Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells, *Int Immunol*, 査読有, Vol. 22, No.9, 2010, pp739-747
- ③ Suzuki K, Inokuchi A, Miyazaki J, Kuratomi Y, Izuhara K, Relationship between squamous cell carcinoma antigen and the clinical severity of allergic rhinitis caused by *Dermatophagoidea farinae* and japanese cedar pollen, *Ann Oto Rhinol Laryn*, 査読有, Vol. 119, No.1, 2010, pp22-26
- ④ 出原賢治, IL-4 と IL-13 のレセプターとの結合様式、臨床免疫・アレルギー科、査読有、Vol. 54、2010、pp613-618
- ⑤ 出原 賢治、アレルギー疾患の生化学的検査方法、臨床と研究、査読有、Vol. 87、2010、pp221-225
- ⑥ Izuhara K, Ohta S, Shiraishi H, Suzuki S, Taniguchi K, Toda S, Tanabe T, Yasuo M, Kubo K, Hoshino T, Aizawa H, The mechanism of mucus production in bronchial asthma, *Curr Med Chem*, 査読有, Vol. 16, No.22, 2009, pp2867-2875
- ⑦ Ito T, Suzuki S, Kanaji S, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Tanaka G, Tamada T, Honjo E, Garcia KC, Kuroki R, Izuhara K, Distinct structural requirements for interleukin-4 (IL-4) and IL-13 binding to the shared IL-13 receptor facilitate cellular tuning of cytokine responsiveness, *J Biol Chem*, 査読有, Vol. 284, No. 36, 2009, pp24289-24296
- ⑧ Kanaji S, Kanaji T, Honda M, Nakazato S, Wakayama K, Tabata Y, Shibata S, Gondo H, Nakamura I, Node K, Miura M, Miyahara M, Okumura T, Nagumo F, Ohta S, Izuhara K, Identification of four novel mutations in *F5* associated with congenital factor V deficiency, *Int J Haematol*, 査読有, Vol. 89, 2009, pp71-75
- ⑨ 出原賢治、IL-4/IL-13 で誘導されるアレルギー性炎症、実験医学、査読有、Vol. 27、2009、pp3297-3302
- ⑩ 出原賢治、アレルギー疾患発症機序における環境要因の役割、臨床環境医学、査読有、Vol. 18、2009、pp67-74
- ⑪ Izuhara K, Ohta S, Kanaji S, Shiraishi H, Arima K, Recent progress in understanding the diversity of the human ov-serpin/clade B serpin family, *Cell Mol Life Sci*, 査読有, Vol. 65, 2008, pp2541-2553
- ⑫ Izuhara K, Kanaji S, Arima K, Ohta S, Shiraishi H, Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites, *Med Chem*, 査読有, Vol. 4, 2008, pp322-327
- ⑬ Nakao I, Kanaji S, Ohta S, Matsushita H, Arima K, Yuyama N, Yamaya M, Nakayama K, Kubo H, Watanabe M, Sagara H, Sugiyama K, Tanaka H, Toda S, Hayashi H, Inoue H, Hoshino T, Shiraki A, Inoue M, Suzuki K, Aizawa H, Okinami S, Nagai H, Hasegawa M, Fukuda T, Green ED, Izuhara K, Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *J Immunol*, 査読有, Vol. 180, No.9, 2008, pp6262-6269
- ⑭ Honjo E, Shoyama Y, Tamada T, Shigematsu H, Hatanaka T, Kanaji S, Arima K, Ito Y, Izuhara K, Kuroki R, Expression of the extracellular region of the human interleukin-4 receptor α chain and interleukin-13 receptor $\alpha 1$ chain by a silkworm-baculovirus system, *Protein Expr Purif*, 査読有, Vol. 60, 2008, pp25-30
- ⑮ Kanaji S, Kanaji T, Migita M, Kunishima S, Okamura T, TJ Kunicki, Izuhara K, Characterization of a patient with atypical amegakaryocytic

- thrombocytopenia, Eur J Haematol, 査読有, Vol. 80, 2008, pp361-364
- ⑩ Oku E, Kanaji T, Tanaka Y, Ohshima K, Seki R, Morishige S, Imamura R, Ohtsubo K, Hashiguchi M, Osaki K, Yakushiji K, Yoshimoto K, Ogata H, Hamada H, Izuhara K, Sata M, Okumura T, Periostin and bone marrow fibrosis, Int J Hematol, 査読有, Vol. 88, 2008, pp57-63
- ⑪ Sonoda E, Aoki S, Uchihashi K, Soejima H, Kanaji S, Izuhara K, Satoh S, Fujitani N, Sugihara H, Toda S, A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells, Endocrinology, 査読有, Vol. 149, No.10, 2008, 4794-4798
- ⑫ 出原賢治, IL-13 を基盤としたアレルギー疾患の病態形成機序と治療戦略. 喘息と遺伝学、査読有、Vol. 10、2008、pp58-66
- ⑬ 出原賢治、遺伝子検査の現状と展望、Medical Technology、査読有、Vol. 36、2008、pp409-411
- ⑭ 出原賢治、喘息患者における遺伝子多型、呼吸、査読有、Vol. 27、2008、pp1044-1048
- [学会発表] (計18件)
- ① Kawaguchi T, Periostin, a matrix protein, is a novel serodiagnostic marker for cholangiocarcinoma, The 61th annual meeting of the American association for the study of Liver diseases, The Liver Meeting, 2010 10 29-11 2, Boston(USA)
- ② Masuoka M, Periostin, an extracellular matrix protein, is a critical mediator for amplification and chronicity of inflammation in atopic dermatitis, 14th International congress of Immunology, 2010 8 23, 神戸 (日本)
- ③ Izuhara K, Periostin, an extracellular matrix protein, acts as a master switch for the onset of inflammation in atopic dermatitis, Symposium of the collegium Internationalale Allergologicum, 2010 4 28, Ischia(Italy)
- ④ 出原賢治、マイクロアレイによる IL-13 誘導遺伝子とその機能解析、第 60 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2010 11 25、東京
- ⑤ Izuhara K, A new paradigm in the pathogenesis of atopic dermatitis, XXI World Allergy Congress 2009, 2009 12 8, Buenos Aires (Argentina)
- ⑥ Hoshino T, Enhanced expression of periostin in lungs and sera of idiopathic pulmonary fibrosis, 14th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 2009 11 14-18, Seoul (Korea)
- ⑦ Iwamoto R, Expression of periostin in small peripheral lung adenocarcinoma Correlation with high-resolution CT findings, pathologic findings, and likelihood of tumor recurrence, 13th world conference on lung cancer, 2009 7 31-8 4, San Francisco(USA)
- ⑧ Matsushita H, Inhibitory effects of TLR4 signals on allergic airway inflammation, Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology, 2009 1 22, Keystone (USA)
- ⑨ Uchida M, Periostin plays an important role in the pathogenesis of pulmonary fibrosis, Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology, 2009 1 23, Keystone (USA)
- ⑩ 出原賢治、サイトカインとアレルギー疾患、第 46 回日本小児アレルギー学会 2009 12 5、福岡
- ⑪ 出原賢治、アレルギー疾患の生化学的検査方法、第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2009 10 29、秋田
- ⑫ 出原賢治、オーダーメイド医療を目指したアレルギー疾患における病因診断システムの確立、第 56 回日本臨床検査医学会学術集会、2009 8 28、札幌
- ⑬ 出原賢治、アレルギー疾患の発症機序における環境要因の役割、第 18 回日本臨床環境医学会学術集会、2009 7 3、岡山
- ⑭ Izuhara K, Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease, 27th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, 2008 5 4, Curacao(オランダ領アンティル(NETH))
- ⑮ 出原賢治、アレルギー疾患における新規の線維化機序とその重要性、第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008 11 28、東京
- ⑯ 出原賢治、オーダーメイド医療を目指したアレルギー疾患における病因診断システムの確立、第 55 回日本臨床検査医学会学術集会、2008 11 28、名古屋
- ⑰ 出原賢治、アレルギー疾患におけるオーダーメイド医療、第 55 回日本臨床検査医学会学術集会、2008 11 28、名古屋
- ⑱ 出原賢治、アレルギー疾患免疫機序から

みた一次予防のターゲットの可能性、第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、2008 11 27、東京

〔図書〕(計4件)

- ① 出原賢治, 他、ライフサイエンス出版、第30回六甲カンファレンス 2010年における気管支喘息のすべて、2011、194 (167-173)
- ② Izuhara K, 他、Pacini editore medicina. Environmental and Genetic factors in allergy and clinical immunology, 2010、301 (159-162)
- ③ 出原賢治, 他、日本臨牀社、関節リウマチ(第2版)-寛解を目指す治療の新時代-、2010、664 (141-144)
- ④ Izuhara K, 他、Birkauser, Microarrays in inflammation, 2008、232 (107-114)

〔産業財産権〕

○出願状況(計8件)

- ① 名称: ペリオスチン測定 of 正確性の改善方法
発明者: 出原賢治他
権利者: 国立大学法人佐賀大学他
種類: 特許
番号: 特願 2010-200564
出願年月日: 22年9月8日
国内外の別: 国内
- ② 名称: 増殖糖尿病網膜症の検出方法及び予防・治療剤のスクリーニング方法
発明者: 出原賢治他
権利者: 国立大学法人佐賀大学他
種類: 特許
番号: 特願 2010-093240
出願年月日: 22年4月14日
国内外の別: 国内
- ③ 名称: SCCA2 濃度測定によるアレルギー疾患の検査方法
発明者: 出原賢治他
権利者: 株式会社シノテスト
種類: 特許
番号: 特願 2009-298690
出願年月日: 21年12月7日
国内外の別: 国内
- ④ 名称: アレルギー疾患の検査方法
発明者: 出原賢治他
権利者: 株式会社シノテスト
種類: 特許
番号: 特願 2009-298689
出願年月日: 21年12月7日
国内外の別: 国内
- ⑤ 名称: 胆管細胞癌の検出方法及び予防・治療剤のスクリーニング方法
発明者: 出原賢治他
権利者: 国立大学法人佐賀大学他
種類: 特許

番号: 特願 2009-274873

出願年月日: 21年12月2日

国内外の別: 国内

- ⑥ 名称: アトピー性皮膚炎の検出方法及び予防・治療剤のスクリーニング方法
発明者: 出原賢治
権利者: 佐賀大学
種類: 特許
番号: 特願 2009-174692
出願年月日: 21年7月27日
国内外の別: 国内
- ⑦ 名称: 特発性間質性肺炎の治療薬のスクリーニング方法
発明者: 出原賢治
権利者: 佐賀大学
種類: 特許
番号: 特願 2008-324484
出願年月日: 20年12月19日
国内外の別: 国内
- ⑧ 名称: 特発性間質性肺炎の検出方法
発明者: 出原賢治
権利者: 佐賀大学
種類: 特許
番号: 特願 2008-147822
出願年月日: 20年6月5日
国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: 循環器病マーカーとしてのインターロイキン13
発明者: 出原賢治他
権利者: 佐賀大学他
種類: 特許
番号: 4465469
取得年月日: 22年3月5日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/medbiochem/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出原 賢治 (IZUHARA KENJI)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号: 00270463

(2) 研究分担者

太田 昭一郎 (OHTA SHOICHIRO)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号: 20346886
金地 佐千子 (KANAJI SACHIKO)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号: 50363429
白石 裕士 (SHIRAISHI HIROSHI)
佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80452837
有馬 和彦 (ARIMA KAZUHIKO)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号：60336112
鈴木 章一 (SUZUKI SHOICHI)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：40253695

(3) 連携研究者
()

研究者番号：