

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591283

研究課題名（和文）TLR4 シグナルを利用した気管支喘息発症の予防的治療戦略の構築

研究課題名（英文）Prophylactic therapy of bronchial asthma utilizing TLR4 signaling.

研究代表者

太田 昭一郎（OHTA SHOICHIRO）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20346886

研究成果の概要（和文）：われわれは、オвалブミン感作マウスモデルにおいて、TLR4 刺激によって気道過敏性が抑えられる機構を解明した。TLR4 刺激は LPS トレランスを誘導することにより、樹状細胞の抗原提示関連分子発現を抑制する。その結果、CD4+ T 細胞の抗原感作が抑制され、気道炎症が抑制されることにより、気道過敏性の上昇が抑えられる。

研究成果の概要（英文）：We elucidated a mechanism that the agonistic stimulation of TLR4 suppresses airway hyperreactivity in ovalbumin-sensitized mice. Expression of antigen presentation-associated molecules on dendritic cells is attenuated by LPS tolerance induced by agonistic stimulation of TLR4. Therefore, sensitization of CD4+ T cells is inhibited, leading to the suppression of airway inflammation and thereby airway hyperreactivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 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：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー学

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息罹患率は年々増加しているが、現在のところ、気管支喘息の発症を予防する治療は行われていない。増加の理由として衛生環境の改善によって微生物への曝露および感染症への罹患機会が減少したことに伴い、本来無害な抗原に対して過剰な免疫応答が起こってしまう、という衛生仮説が有力視されている。しかし、衛生仮説は分子免疫学的にはほとんど証明されていない。

われわれは、グラム陰性細菌の細胞壁成分 lipopolysaccharide (LPS) の受容体である

Toll-like receptor 4 (TLR4) に対する刺激型マウスモノクローナル抗体 (UT12) を樹立し (Clin Vaccine Immunol 13:1131-36, 2006)、UT12 を抗原に感作される前の気管支喘息モ

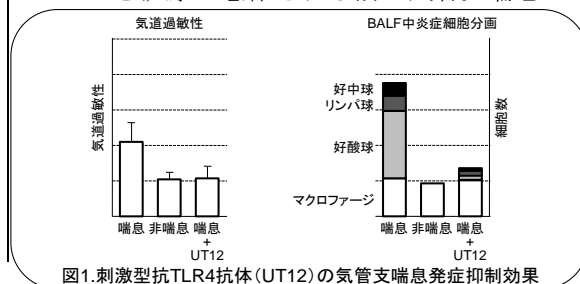


図1. 刺激型抗TLR4抗体(UT12)の気管支喘息発症抑制効果

デルマウスに投与することにより、気管支喘息発症をほぼ完全に抑制できるというデータを得た(図1)。言い換えると、UT12の投与により気管支喘息の予防的治療が可能であることを示した。

2. 研究の目的

本課題は、刺激型抗 TLR4 抗体を用いて、気管支喘息の予防的治療の基礎的研究を行うことを目的とし、下記の項目を実行していくこととした。

- (1) UT12による気管支喘息抑制効果の免疫学的機序の解明
- (2) UT12の乳児期投与による気管支喘息発症抑制系の解析
- (3) 刺激型抗ヒト TLR4 モノクローナル抗体の作製とその効果の解析

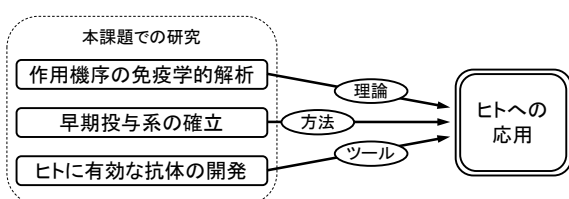


図2. 本研究の位置付け

3. 研究の方法

- (1) 気管支喘息発症抑制効果は、UT12がアレルゲンへの感作の過程を阻害することで発揮される。その際の UT12 の標的細胞の一つは樹状細胞である(未発表データ)ことを明らかにしているため、UT12 の樹状細胞へ与える影響を解析する。
- (2) 実際のヒト気管支喘息患者では、アレルゲンへの感作は生直後から持続的に起こり得るので、生後早期からの予防的治療が重要である。新生児期から乳児期のマウスに UT12 を投与し、それらが成体となった後でも気管支喘息の発症を抑制できるかどうか検討する。
- (3) UT12 はマウス TLR4 に対する抗体であり、ヒト TLR4 を刺激することはできない。刺激型抗ヒト TLR4 抗体を作製し、ヒト細胞を用いてその作用を解析することにより、ヒトへの応用を可能にする。

4. 研究成果

(1) 刺激型抗 TLR4 抗体(UT12)を投与し TLR4 刺激を受けたマウスをオバルブミンで感作した後、脾臓細胞を単離して *in vitro* でオバルブミン刺激したところ、UT12 投与群では、Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 の産生が抑制されていた。また、IL-17A 産生も抑制されており、IFN- γ の産生上昇も認められなかった。

同マウスより脾臓 CD4+ T 細胞を単離し、無刺激の骨髄由来樹状細胞と混合してオバルブミン刺激をした場合も、UT12 投与群で

は、同様の全般的なサイトカイン産生の抑制が認められた。

一方、UT12 非投与のマウスから単離した脾臓 CD4+ T 細胞と UT12 を投与したマウスから単離した脾臓樹状細胞を混合してオバルブミン刺激をすると、サイトカイン産生の抑制が認められた。

同マウスから単離した脾臓樹状細胞では、UT12 投与群で、抗原提示関連分子である MHC class II, CD86, CD40 の発現が抑制されていた。

UT12 を投与したマウスは LPS トレランス状態になっており、トレランスの程度は UT12 による気道過敏性抑制の程度と関連していた。

以上より、UT12 は LPS トレランスを誘導することにより、樹状細胞の抗原提示関連分子発現を抑制し、その結果、CD4+ T 細胞の抗原感作が抑制され、気道過敏性の上昇が抑えられると考えられた。これは、TLR4 刺激が気管支喘息を抑制する機構として LPS トレランスが関与していることを新規に解明したものであり、気管支喘息の予防治療戦略において非常に重要な知見を加えるものである。(Matsushita et al. *Int Immunol.* 22:739-747, 2010)

(2) UT12の乳児期投与による気管支喘息発症抑制系の解析

本研究期間内には解析を行わなかった。

(3) ヒト TLR4 分子を発現する安定発現細胞株を作製し、TLR4 ノックアウトマウスに免疫して、細胞に刺激を入れる抗体をスクリーニングしたところ、複数のモノクローナル抗体が得られた。今年度、これらのモノクローナル抗体による刺激が TLR4 を介しているかどうか確認したが、TLR4 を認識しているものはまだ得られていない。

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 14 件)

(1) Shoichiro Ohta, Rumiko Shibata, Yoshifumi Nakao, Yoshinori Azuma, Kazuto Taniguchi, Kazuhiko Arima, Shoichi Suzuki, Hiroshi Shiraishi, Tsuyoshi Iwasaka and Kenji Izuhara The usefulness of combined measurements of squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in diagnosing atopic dermatitis. *Ann Clin Biochem* 49: 277-284 (2012)

(2) Kanako Ontsuka, Yorihisa Kotobuki, Hiroshi Shiraishi, Satoshi Serada, Shoichiro Ohta, Atsushi Tanemura, Lingli Yang, Minoru Fujimoto, Kazuhiko Arima, Shoichi Suzuki, Hiroyuki Murota, Shuji Toda, Akira Kudo, Simon J. Conway, Yutaka Narisawa, Ichiro Katayama, Kenji Izuhara, and Tetsuji Naka Periostin, a

matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* **21**: 331-336 (2012)

(3) Masaki Okamoto, Tomoaki Hoshino, Yasuhiko Kitasato, Yuki Sakazaki, Tomotaka Kawayama, Kiminori Fujimoto, Koichi Ohshima, Hiroshi Shiraishi, Masaru Uchida, Junya Ono, Shoichiro Ohta, Seiya Kato, Kenji Izuhara, and Hisamichi Aizawa Periostin, a matrix protein, is a novel biomarker for idiopathic interstitial pneumonias. *Eur Respir J* **37**: 1119-1127 (2011)

(4) Kiminori Fujimoto, Takumi Kawaguchi, Osamu Nakashima, Junya Ono, Shoichiro Ohta, Atsushi Kawaguchi, Tatsuyuki Tonan, Koichi Ohshima, Hirohisa Yano, Naofumi Hayabuchi, Kenji Izuhara, and Michio Sata Periostin, a matrix protein, has potential as a novel serodiagnostic marker for cholangiocarcinoma. (5) *Oncol Rep* **25**: 1211-1216 (2011)

Shigeo Yoshida, Keijiro Ishikawa, Ryo Asato, Mitsuru Arima, Yukio Sassa, Ayako Yoshida, Hiroshi Yoshikawa, Keisuke Narukawa, Satoshi Obika, Junya Ono, Shoichiro Ohta, Kenji Izuhara, Toshihiro Kono, and Tatsuro Ishibashi Increased Expression of Periostin in Vitreous and Fibrovascular Membranes Obtained from Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 5670-5678 (2011)

(6) Hidenori Sumiyoshi, Akio Mantani, Satoshi Nishiyama, Soh Fujiwaki, Shoichiro Ohta, Yoshikazu Masuda, Youhei Tomita, Naofumi Tarumoto, and Shigeto Yamawaki Yokukansan Treatment in Chronic Renal Failure Patients with Dementia Receiving Hemodialysis: An Open Label Study. *Am J Geriatr Psych* **19**: 906-907 (2011)

(7) Hidetomo Matsushita, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraishi, Shoichi Suzuki, Kazuhiko Arima, Shuji Toda, Hiroyuki Tanaka, Hiroichi Nagai, Masao Kimoto, Akira Inokuchi, and Kenji Izuhara Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells. *Int Immunol* **22**: 739-747 (2010)

(8) Sachiko Kanaji, Taisuke Kanaji, Miho Honda, Sachie Nakazato, Kazuo Wakayama, Yoshitomi Tabata, Shoichiro Shibata, Hisashi Gondo, Ikuko Nakamura, Koichi Node, Masanori Miura, Masaharu Miyahara, Takashi Okamura, Fumio Nagumo, Shoichiro Ohta, and Kenji Izuhara Identification of four novel mutations in *F5* associated with congenital factor V deficiency. *Int J Hematol* **89**: 71-75 (2009)

(9) Takachika Ito, Shoichi Suzuki, Sachiko Kanaji, Hiroshi Shiraishi, Shoichiro Ohta, Kazuhiko Arima, Go Tanaka, Taro Tamada, Eijiro

Honjo, K. Christopher Garcia, Ryota Kuroki, and Kenji Izuhara Distinct structural requirements for IL-4 and IL-13 binding to the shared IL-13 receptor facilitate cellular tuning of cytokine responsiveness. *J Biol Chem* **284**: 4289-4296 (2009)

(10) Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraishi, Shoichi Suzuki, Kazuto Taniguchi, Shuji Toda, Tsuyoshi Tanabe, Yasuo M, Kubo K, Tomoaki Hoshino, and Hisamichi Aizawa The mechanism of mucus production in bronchial asthma. *Curr Med Chem* **16**: 2867-2875 (2009)

[学会発表] (計 36 件)

(1) Shoichiro Ohta, Rumiko Shibata, Yoshifumi Nakao, Yoshinori Azuma, Kazuto Taniguchi, Kazuhiko Arima, Shoichi Suzuki, Hiroshi Shiraishi, Tsuyoshi Iwasaka, and Kenji Izuhara Development of combined measurement of squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 as a potential companion diagnostic for anti-IL-4/IL-13 therapies in allergic diseases. *21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Berlin, Germany, 5/15-19/2011)*

(2) Makoto Hayashi, Akio Mantani, Hidenori Sumiyoshi, Satoshi Nishiyama, Soh Fujiwaki, Shoichiro Ohta, Yoshikazu Masuda, Youhei Tomita, Naofumi Tarumoto, and Shigeto Yamawaki Yokukansan treatment of chronic renal failure patients receiving hemodialysis, with behavioral and psychological symptoms of dementia: An open-label study. *11th Annual Meeting of the International College of Geriatric Psychoneuropharmacology (Irvine, CA, 11/2-5/2011)*

(3) Takumi Kawaguchi, Kiminori Fujimoto, Osamu Nakashima, Shoichi Suzuki, Hiroshi Shiraishi, Shoichiro Ohta, Atsushi Kawaguchi, Tatsuyuki Tonan, Koichi Ohshima, Hirohisa Yano, Naofumi Hayabuchi, Kenji Izuhara, Michio Sata Periostin, a matrix protein, is a novel serodiagnostic marker for cholangiocarcinoma. *The 61st annual meeting of the American association for the study of Liver diseases (San Francisco, CA, 10/29-11/2/2010)*

(4) Tomoaki Hoshino, Masaki Okamoto, Kitasato Y, Shoichiro Ohta, Masaru Uchida, Kato S, Kawayama T, Kenji Izuhara, Hiromichi Aizawa Enhanced expression of periostin in lungs and sera of idiopathic pulmonary fibrosis. *T2010 American Thoracic Society International Conference (New Orleans, LA, 5/14-19/2010)*

(5) Kenji Izuhara, Miho Masuoka, Hiroshi Shiraishi, Shoichiro Ohta, Shoichi Suzuki Periostin, an extracellular matrix protein, acts as a master switch for the onset of inflammation in

atopic dermatitis. *28th Symposium of the collegium Internationale Allergologicum (Ischia, Italy, 4/25-30/2010)*

(6) Miho Masuoka, Hiroshi Shiraiishi, Shoichiro Ohta, Shoichi Suzuki, Hajime Sutoh, Naoki Inagaki, Masutaka Furue, Kenji Izuhara Periostin, an extracellular matrix protein, is a critical mediator for amplification and chronicity inflammation in atopic dermatitis. *14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan, 8/22-27/2010)*

(7) Yoshinori Nagai, Shoichiro Ohta, Masahi Ikutani, Ai kariyone, Kensuke Miyake, Kiyoshi Takatsu The RP105/MD-1 complex is required for TLR4/MD-2-dependent plasma cell differentiation and robust IgM production in marginal zone B cells. *14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan, 8/22-27/2010)*

(8) Hidetomo Matsushita, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraiishi, and Kenji Izuhara Inhibitory effects of TLR4 signals on allergic airway inflammation. *Allergy and Asthma, Fibrosis, Keystone Symposia (Keystone, CO, 1/22/2009)*

(9) Masaru Uchida, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraiishi, Koichi Ohshima, Masaki Okamoto, Tomoaki Hoshino, Hisamichi Aizawa, Simon J. Conway, and Kenji Izuhara Periostin plays an important role in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Allergy and Asthma, Fibrosis, Keystone Symposia (Keystone, CO, 1/23/2009)*

(10) Tomoaki Hoshino, Masaki Okamoto, Yasuhiko Kitasato, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraiishi, Masaru Uchida, Seiya Kato, Koichi Ohshima, Kenji Izuhara, and Hisamichi Aizawa Enhanced expression of periostin in lungs and sera of idiopathic pulmonary fibrosis. *14th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Seoul, Korea, 11/14/2009)*

(11) Yoshinori Nagai, Shoichiro Ohta, Kensuke Miyake, Kiyoshi Takatsu TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 differentially regulate LPS responsiveness in B cells. *The 96th Annual Meeting of The American Association of Immunologists (Seattle, WA 5/8/2009)*

(12) Yoshinori Nagai, Shoichiro Ohta, Kensuke Miyake, Kiyoshi Takatsu TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 differentially regulate LPS responsiveness in B cells. *The 9th World Congress on Inflammation (Tokyo, Japan, 7/6-10/2009)*

[図書] (計 6 件)

(1) Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraiishi, and Shoichi Suzuki Interleukin 4, interleukin 13, and interleukin 9. *Inflammation and Allergy Drug Design 175-185 Blackwell*

Publishing, Chichester, UK (2011)

(2) Kenji Izuhara, Sachiko Kanaji, Isao Nakao, Kazuhiko Arima, Aya Nakajima, Shoichiro Ohta, Hiroyuki Tanaka, and Hiroichi Nagai Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Environmental and Genetic Factors in Allergy and Clinical Immunology 159-162 Pacini Editore S.p.A., Pisa, Italy (2010)*

[産業財産権]

○出願状況 (計 9 件)

(1) 名称: 気管支喘息の予防又は治療薬及びそのスクリーニング方法

発明者: 太田昭一郎、出原賢治、有馬和彦、鈴木章一、白石裕士

権利者: 佐賀大学

種類: 特許権

番号: 特願 2012-011838

出願年月日: 2012/1/24

国内外の別: 国内

(2) 名称: 慢性副鼻腔炎の検出方法

発明者: 太田昭一郎、出原賢治、有馬和彦、鈴木章一、白石裕士、太田伸男、石田晃弘、鈴木祐輔

権利者: 佐賀大学、山形大学

種類: 特許権

番号: 特願 2011-238913

出願年月日: 2011/10/31

国内外の別: 国内

(3) 名称: ペリオスチンの特定領域に結合する抗体、並びにこの抗体を用いるペリオスチンの測定方法、測定試薬及び計画性の改善方法

発明者: 太田昭一郎、出原賢治、有馬和彦、鈴木章一、白石裕士、星野友昭、東義則、小野純也

権利者: 佐賀大学、久留米大学、株式会社シノテスト

種類: 特許権

番号: 特願 2011-194323

出願年月日: 2011/9/6

国内外の別: 国内

(4) 名称: 胆管細胞癌の検出方法および予防・治療剤のスクリーニング方法

発明者: 出原賢治、太田昭一郎、白石裕士、鈴木章一、佐田通夫、藤本公則、中島収、川口巧

権利者: 佐賀大学、久留米大学

種類: 特許権

番号: PCT/JP2010/071616

出願年月日: 2010/12/2

国内外の別: 国外

(5) 名称: ペリオスチン測定の正確性の改善方法

発明者: 出原賢治、太田昭一郎、有馬和彦、

白石裕士、鈴木章一、佐田通夫、相澤久道、藤本公則、川口巧、星野友昭、岡元昌樹、東義則、小野純也
権利者：佐賀大学、久留米大学、株式会社シノテスト

種類：特許権

番号：特願 2010-200564

出願年月日：2010/9/8

国内外の別：国内

(6) 名称：増殖糖尿病網膜症の検出方法および予防・治療剤のスクリーニング方法

発明者：出原賢治、太田昭一郎、有馬和彦、白石裕士、鈴木章一、佐田通夫、相澤久道、藤本公則、川口巧、星野友昭、岡元昌樹、東義則、小野純也

権利者：佐賀大学、久留米大学、九州大学、株式会社シノテスト

種類：特許権

番号：特願 2010-093240

出願年月日：2010/4/14

国内外の別：国内

(7) 名称：胆管細胞癌の検出方法および予防・治療剤のスクリーニング方法

発明者：出原賢治、太田昭一郎、白石裕士、鈴木章一、佐田通夫、藤本公則、中島収、川口巧

権利者：佐賀大学、久留米大学

種類：特許権

番号：特願 2009-274873

出願年月日：2009/12/2

国内外の別：国内

(8) 名称：アトピー性皮膚炎の検出方法及び予防・治療薬のスクリーニング方法

発明者：出原賢治、太田昭一郎、白石裕士、増岡美穂

権利者：佐賀大学

種類：特許権

番号：特願 2009-174692

出願年月日：2009/7/27

国内外の別：国内

(9) 名称：特発性間質性肺炎の検出方法

発明者：出原賢治、太田昭一郎、白石裕士、相澤久道、星野友昭、岡元昌樹

権利者：佐賀大学、久留米大学

種類：特許権

番号：PCT/JP2009/060567

出願年月日：2009/6/3

国内外の別：国外

○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

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

太田 昭一郎 (OHTA SHOICHIRO)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20346886

(2)研究分担者

出原 賢治 (IZUHARA KENJI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00270463

鈴木 章一 (SUZUKI SHOICHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：40253695

白石 裕士 (SHIRAISHI HIROSHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：80452837

(3)連携研究者

なし