

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 25 年 4 月 4 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790769

研究課題名（和文） アレルギー性炎症に及ぼす高血糖および RAGE の作用解析と治療
応用への試み

研究課題名（英文） Analysis of hyperglycemia- and RAGE-induced allergic inflammation

研究代表者

鈴川 真穂 (SUZUKAWA MAHO)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：20453699

研究成果の概要（和文）：

高血糖下で血中に増加する糖化タンパクである AGE は、ヒト好塩基球のアポトーシスを誘導し、炎症性サイトカイン分泌を亢進した。ヒト好塩基球上には AGE のレセプターである RAGE の発現を認めた。RAGE のリガンドである S100/A12 の投与により、マウスの気道炎症が誘導された。アレルギーモデルマウスにおいて、S100/A12 の投与により気管支肺胞洗浄液中の炎症性サイトカインの上昇を認めた。

研究成果の概要（英文）：

Advanced glycation end products (AGEs) are substances produced in high-glucose disease conditions and induce apoptosis and inflammatory cytokine secretion from human basophils. Human basophils express receptor for AGEs (RAGE). S100/A12 is another ligand for RAGE. S100/A12 induces airway inflammation in mice as well as upregulates inflammatory cytokine levels in bronchoalveolar lavage fluid in allergic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：アレルギー、生活習慣病、糖尿病、気管支喘息、RAGE

1. 研究開始当初の背景

全世界において気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎などのアレルギー性疾患は増加の一途にあり、その病態解明と治療法の確立は患者のQOLを改善するためにも重要な課題である。気管支喘息の治療薬として吸入ステロイド薬が普及するに伴い、本邦における喘息死は確実に減少してきているが、気管支喘息患者の一部には、吸入ステロイドではコントロールが得られない難治性喘息が存在する。一方、先進国では食生活の変化がもたらしたメタボリック症候群、糖尿病を含めた生活習慣病に起因する二次性疾患の罹患や死亡の増加が問題となっている。呼吸器疾患において、肥満は呼吸機能を低下させる大きな要因であると同時に、気管支喘息のリスクファクターおよび増悪因子である

(Saint-Pierre P et al. *Allergy* 61;79, 2006)。逆に、難治性喘息患者はステロイド薬の全身投与が必要な場合が多く、二次的に糖尿病や高脂血症、高血圧症などを発症し、それら二次性疾患の治療が必要となることや、それらのために喘息治療薬を思うように使えなくなることなど、患者のQOLを低下させる場合も多く存在する。

近年、免疫担当細胞と生活習慣病が密接に関与していることが明らかにされてきている (Nishimura S et al. *Nat Med*. 15;914, 2009)。例えば、高血糖の条件下において、生体内では血中のタンパクや脂質が酵素反応を経ずに糖化され、血中にAGE (advanced glycation end products)が増加し、AGEはレセプターであるRAGE (receptor for advanced glycation end products)に直接作用することにより、糖尿病の様々な合併症や、種々の炎症惹起・増悪に関与していることが明らかにされて

いる (Maillard-Lefebvre et al. *Rheumatology*. 48;1190, 2009)。In vitro および in vivo の研究において、AGEはRAGEと結合することにより炎症細胞を活性化させること (Ichikawa K et al. *Atherosclerosis*. 136;281, 1998) (Schmidt M et al. *J Clin Invest*. 91;2155, 1993) (Basta G et al. *Circulation*. 105;816, 2002)、AGEの投与により、炎症反応が亢進すること等が報告されており、AGEは全身性の炎症を増悪させる方向に働くことが主に糖尿病の研究で明らかにされている。一方、RAGEはimmunoglobulin superfamilyに属する細胞表面のレセプターであり、ほとんどの組織に発現を認めるが、特に肺組織および皮膚組織において恒常的に強く発現していることが報告されている (Bierhaus et al. *J Mol Med*. 83; 876, 2005)。RAGEは多数のリガンドを持つレセプターであるが、現在までにRAGEの刺激により、全身性の炎症が強力に惹起されること (Hofmann M et al. *Cell*. 97;889, 1999) (Chavakis T et al. *J Exp Med*. 198;1507, 2003)が報告されており、RAGEの作用を中和する目的で、可溶性RAGEであるEsRAGEを投与することにより、in vivoにおける炎症反応が抑えられることが示されていることから (Chen Y et al. *J Immunol*. 173;1399, 2004)、RAGEの炎症に及ぼす強い作用が推察される。また最近ではRAGEのリガンドの一つであるS100/A12が気管支喘息患者の肺組織および喀痰中に多く発現していること、S100/A12がマスト細胞の脱顆粒を引き起こすことが示され (Yang Z et al. *J Allergy Clin Immunol*. 119; 106, 2007)、RAGEが気管支喘息を始めとしたアレルギー性疾患にも何らかの重要な作用を有すこと

が推察される。しかしながら、現在までにアレルギー性炎症と高血糖、メタボリックシンドロームの関連性に関して詳細に検討した研究はほとんど存在しない。

2. 研究の目的

本研究は難治性喘息の病態解明のために、アレルギー性炎症と高血糖、メタボリックシンドロームの関連性を解明することを主目的とする。

3. 研究の方法

(1) アレルギー性炎症細胞機能の解析

ヒト末梢血から、好塩基球を比重遠心法およびMACSを用いて分離精製し、AGE-RAGE系およびS100タンパク-RAGE系によるアレルギー性炎症細胞の機能解析を行う。好塩基球のRAGE発現を、Real-time PCR、フローサイトメトリー、免疫染色を用いて mRNA およびタンパクレベルで解析する。その後、AGEなどが好塩基球の生存およびアポトーシス、サイトカイン産生、脱顆粒などの機能に及ぼす影響をフローサイトメトリー、LUMINEX、ヒスタミン遊離試験などを用いて解析する。

(2) マウスモデルによる検討

in vivo モデルを用いて、生体内でのAGE-RAGE系およびS100/A12-RAGE系による気道炎症への影響を解析する。

OVA 感作チャレンジによるアレルギーモデルマウスおよびコントロールマウスから得られた肺組織を用い、免疫染色、PCR、フローサイトメトリーを用いて RAGE の局在を解析する。

また、アレルギーモデルマウスにAGE-BSA(糖化タンパク)およびS100/A12を投与することによる気道炎症増悪の有無を検討する。病態の変化を見るために気道過敏性を測定する。気管支肺胞洗浄液中の細胞分画を調べることで、炎症の責任細胞を同定する。気管支肺胞洗浄液中サイトカインを測定し、

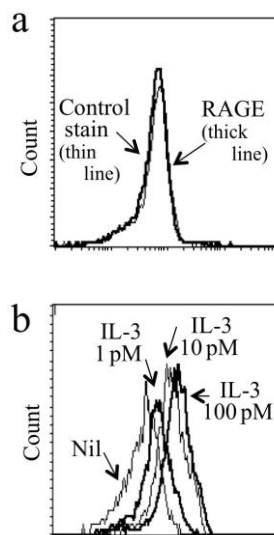
炎症の責任因子を同定する。

(3) 肺の構造細胞の解析

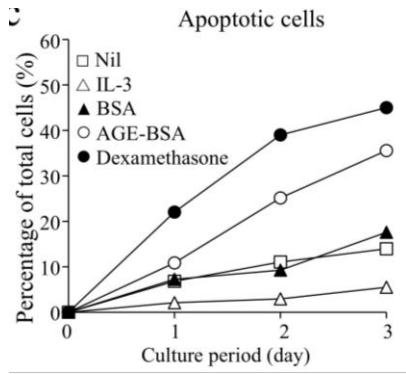
培養ヒト気道上皮細胞 BEAS-2B 用い、Real-time PCR、flow cytometry、免疫染色を用いて RAGE の発現を解析し、AGE などが細胞の生存およびアポトーシス、遊走、接着分子発現、サイトカイン産生に与える影響を前述の手法を用いて解析する。

4. 研究成果

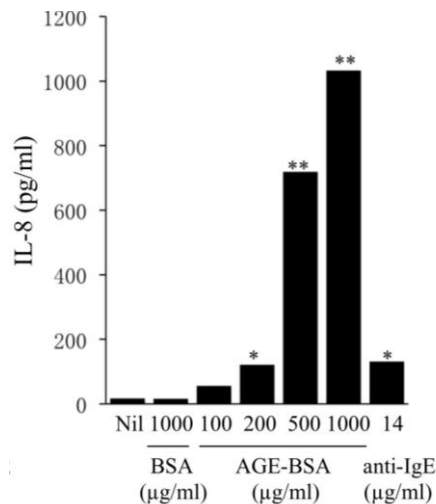
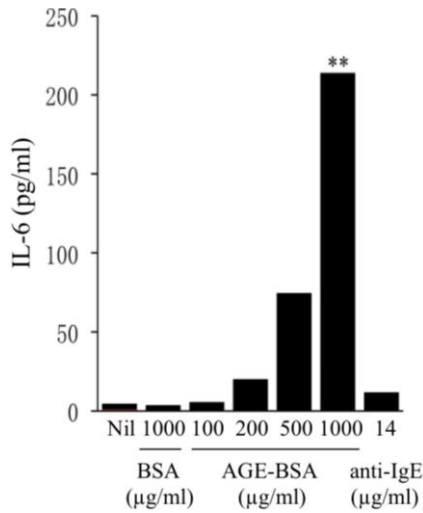
前述の背景から、RAGE が多種のリガンドにより多様な生体内反応を引き起こすことで、アレルギー性炎症を増悪させる方向に作用することを仮定し、最初にアレルギー性炎症細胞の一つである好塩基球をヒト末梢血から分離精製し、RAGE の発現を解析した。結果、ヒト好塩基球細胞表面にほとんど認めなかった RAGE の発現が IL-3 刺激により増強することを確認した (下図)。IL-3 は好塩基球を活性化する主要なサイトカインであることから、RAGE とアレルギー性炎症の関わりを示唆する所見であると考えられた。



ヒト好塩基球を AGE-BSA で刺激すると、好塩基球の活性化マーカー CD11b の発現、脱顆粒、および IL-4、IL-13 産生は変化しなかったが、好塩基球のアポトーシスが誘導された (下図)。

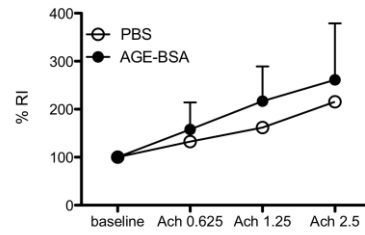


また、AGE-BSA の刺激により、ヒト好塩基球からの IL-6 および IL-8 の産生が増強された (下図)。このことから、AGE-RAGE の刺激により、好塩基球が活性化されることが示唆された。

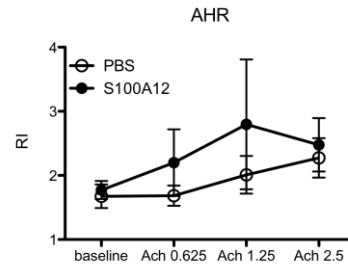


次に、AGE-BSA を A/J マウスに静脈内投与し、気道炎症を解析した。気道過敏性を測定したところ、コントロール群に比較して僅か

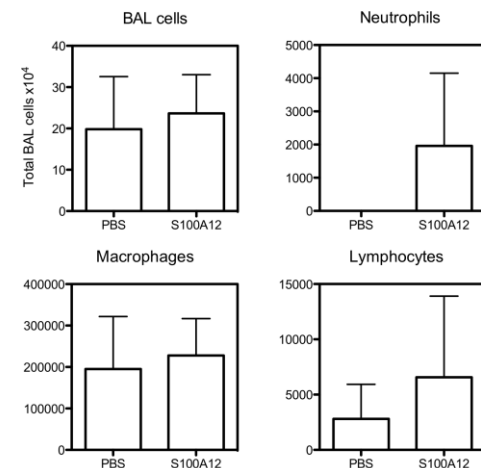
ではあるものの気道過敏性が亢進する傾向を見出した (下図)。



また、S100/A12 を静脈内投与し、気道過敏性を解析したところ、コントロール群に比較して気道過敏性が亢進する傾向を見出した (下図)。

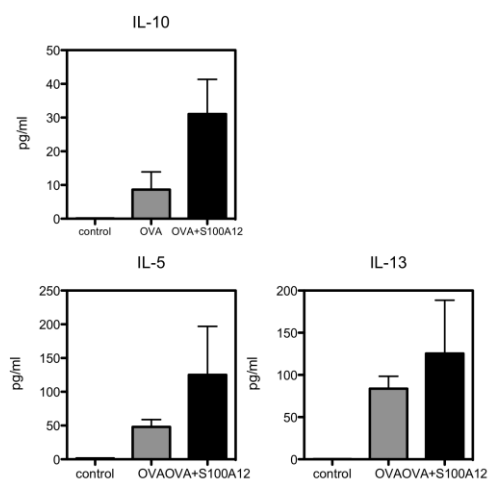


同じマウスから得られた気管支肺胞洗浄液中の細胞を解析すると、好中球、リンパ球が増加している傾向が見られ (下図)、S100/A12-RAGE の刺激により炎症が増強している可能性が示唆された。



次に OVA 感作チャレンジによるアレルギーモデルマウスに S100/A12 を静脈内投与し、気道過敏性を解析したところ、コントロール

群に比較して気道過敏性はほとんど変化を認めず、気管支肺胞洗浄液中の細胞数もほとんど違いを認めなかった。しかしながら、LUMINEX を用いて気管支肺胞洗浄液中のサイトカインを測定したところ、IL-10、IL-5、IL-13 等の Th2 サイトカインが、コントロール群に比較して高値であった（下図）。このことから、S100/A12-RAGE の刺激により、アレルギー性炎症が増悪する可能性が示唆された。



一方、マウス肺組織の免疫染色、real-time PCR、フローサイトメトリーにより、マウス肺構造細胞に RAGE の発現を認め、免疫染色の結果から、気道上皮細胞に RAGE の局在を認めた。そこで、培養ヒト気道上皮細胞 BEAS-2B を用いた検討を行った。AGE-BSA 添加により BEAS-2B のアポトーシスが誘導された。

以上の結果から、AGE-RAGE の刺激を介して、ヒト好塩基球、気道上皮細胞はアポトーシスを起こすこと、また AGE-RAGE または S100/A12-RAGE の刺激を介して、in vivo において気道炎症が増悪することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

①Miller M, Tam A, Cho JY, Doherty T, Pham

A, Khorram N, Rosenthal P, Mueller J, Hoffman H, Suzukawa M, Niwa M, Broide D. ORMDL-3 is an allergen inducible lung epithelial ER protein regulating metalloproteases, chemokines, OAS, and ATF6. Proc Natl Acad Sci USA 109(41):16648-53, 2012. 査読有。

②Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwaru N, Ohno T, Ishii A, Korner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide D, Matsumoto K, Nakae S. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. J Immunol 189(7):3641-52, 2012. 査読有。

③Suzukawa M, Nagase H, Ogahara I, Han K, Tashimo H, Shibui A, Koketsu R, Nakae S, Yamaguchi M, Ohta K. Leptin enhances survival and induces migration, degranulation and cytokine synthesis of human basophils. J Immunol 186(9):5254-5260, 2011. 査読有。

④Han K*, Suzukawa M* (* equally first authors), Yamaguchi M, Sugimoto N, Nakase Y, Toda T, Nagase H, Ohta K. The *in vitro* effects of advanced glycation end products on basophil functions. Int Arch Allergy Immunol 155(suppl 1):64-70, 2011. 査読有。

⑤Toda T, Yamaguchi M, Nakase Y, Sugimoto N, Suzukawa M, Nagase H, Ohta K. A Case of Anaphylactic Reaction Following Matsutake Mushroom Ingestion: Demonstration of Histamine Release Reaction of Basophil. Allergol Int 59(4) 417-419, 2011.

⑥杉本 直也, 中瀬 裕子, 鈴川 真穂, 田下 浩之, 新井 秀宜, 長瀬 洋之, 加藤 愛香, 山口 正雄, 大田 健、好塩基球脱顆粒反応が陽性であった豆腐、および大豆を原因とするアナフィラキシーの2例、アレルギーの臨床、32巻7号 Page650-653, 2012, 査読有。

[学会発表] (計 16 件)

Maho Suzukawa, Masao Yamaguchi, Kaiyu Han, Takako Toda, Hiroyuki Nagase, Ken Ohta The role of advanced glycation endproducts (AGEs) on basophil functions American Academy of Allergy Asthma & Immunology 2011 Annual meeting, Washington DC, USA

[図書] (計 3 件)

①鈴川 真穂, 大田 健、レプチンと好塩基球機能、2012年、臨床免疫・アレルギー科58巻1号 Page99-104

②鈴川 真穂, 大田 健、咳喘息、2010年、成人病と生活習慣病40巻11号 Page1257-1260

③鈴川 真穂, 大田 健、IL-33による好塩基球と好酸球の活性化、2010年、臨床免疫・アレルギー科53巻1号 Page21-28

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴川 真穂 (SUZUKAWA MAHO)

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：20453699

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし