

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 5月21日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790935

研究課題名（和文）新規サイトカイン TSLP の細胞内情報伝達機構理解に基づくアレルギー治療戦略

研究課題名（英文）Exploration of signal transduction mechanism of TSLP aiming at developing a novel therapy for allergic disorders

研究代表者

有馬 和彦（ARIMA, KAZUHIKO）

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：60336112

研究成果の概要（和文）：アレルギー性炎症発症に重要な役割を果たすサイトカイン TSLP の詳細な細胞内シグナル伝達を解析した。TSLP はヒト樹状細胞を活性化させ、Th2 免疫応答を誘導するが、そのシグナル伝達経路の活性化は Th1 免疫応答を誘導する刺激により選択的な抑制を受けた。またヒト TSLP の樹状細胞内シグナル伝達経路活性化を模倣する細胞株を樹立することに成功したので今後 TSLP 受容体と会合する分子の同定など生化学的解析が容易になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is a cytokine that plays an important role in the development of allergic inflammation. It was shown to activate human dendritic cells to promote Th2-type immune response. We examined the detailed signal transduction mechanism of TSLP. The multiple signal pathways activated by TSLP were selectively down-regulated by the Th1-inducing agents such as TLR ligands. Furthermore, we successfully established a cell line that demonstrates activation of the similar signal pathways by TSLP to those in dendritic cells. This cell line will be of great help in analyzing biochemical properties of the TSLP signal transduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー学，サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞が損傷に応じて産生するサイトカイン TSLP は、免疫系への抗原提示を担う樹状細胞(DC)に作用することで宿主の免疫応答をアレルギー性炎症へ向かせている。近年、ヒトアレルギー患者の病変組織における高発現、TSLP 受容体ノックアウトマウスに

おけるアレルギー症状の軽減・消失、さらには大規模ゲノムワイド相関解析において TSLP 遺伝子座に存在する一塩基多型がアレルギー発症と強く相関すること、などの事実より TSLP はアレルギー発症においてきわめて重要な役割を果たしていると考えられるようになってきていた。

2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえ、TSLPの細胞内シグナル伝達機構を明らかにすることで現行のステロイド剤による非特異的免疫反応抑制とは異なる特異的な抗アレルギー戦略を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

DCにおけるTSLPシグナル伝達経路の意義を明らかにするために各種微生物成分刺激やシグナル経路特異的阻害剤処理を行いTSLPのシグナル活性化をウエスタンブロットにより解析した。さらにDCに対するTSLPの作用を模した細胞系を確立するために各種細胞株にTSLP受容体分子をレトロウイルスを用いて強制発現させ、TSLP刺激後のシグナル伝達分子の活性化状態を評価した。

4. 研究成果

DCに作用してTh2免疫応答を誘導するTSLPの作用が、Th1免疫応答を誘導するとされる微生物関連パターン分子の作用によって減弱されることは以前から報告されていた。そこで、この分子機序を解明するために、研究代表者が近年明らかにしたTSLPのDC内でのシグナル伝達経路の活性化パターンが、Th1応答を誘導する二本鎖RNAウイルス感染を模倣したpoly(I:C)刺激によってどのように変化するかを調べた。その結果、poly(I:C)刺激はSTAT5の発現量を増加させ、TSLPによるSTAT5の活性化を増強させたが、DC特異的TSLPシグナルであるSTAT1, STAT6, AKT, ERKの活性化は顕著に抑制されることが分かった(図1に模式図を示す)。この結果はTh1誘導シグナル存在下でTh2誘導シグナルとしてのTSLPの作用が減弱する現象を説明し得る初めての実験的データである。

さらに、TSLPのTh2誘導作用がいかなる細胞内シグナルによって発揮されているのかを調べるために、各種シグナル伝達経路特異的阻害剤を用いて検討した。その結果、MEK阻害剤U0126で処理したDCはTh1応答を誘導するDCと似た表現型を示した。このことから、TSLPにより活性化されるシグナル伝達経路のうち、MEK-ERK経路はTh1応答を抑制する作用を担っていることが示唆された。すなわち、Th1-Th2免疫応答が相互に排他的に生じるような分子機構がDCレベルで働いていることが予想された。

次いでPoly(I:C)刺激によりDC内でどのような変化が生じたためにTSLPシグナルの変化が引き起こされたのかを調べたいと考えた。しかしながら、ヒトにおいてTSLPが

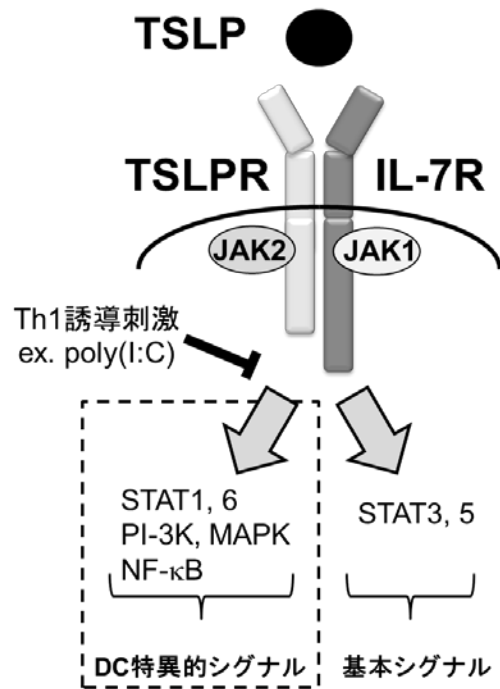


図1. TSLP受容体の構成と樹状細胞におけるシグナル伝達

TSLP受容体鎖はTSLPR鎖とIL-7R鎖のヘテロ二量体である。TSLPが受容体に結合すると、樹状細胞では図に示すような多彩なシグナル経路が活性化される。このうちSTAT3, 5以外の活性化はpoly(I:C)刺激により劇的に抑制されることが明らかとなった。

作用できる細胞は骨髄系DCやランゲルハンス細胞といった常時単離困難な細胞であり、これらの細胞におけるTSLPシグナル伝達機構を解析するのは容易ではなかった。この点を克服するために様々な細胞株にTSLP受容体を発現させてTSLPに反応する細胞株の樹立を試みた。テストしたほとんどの細胞ではTSLP受容体発現によりTSLP依存的STAT5活性化は認められたが、TSLPがヒトDCに対して示すような広範囲なSTAT1, STAT6, AKT, ERK等の活性化は誘導されなかった。一種のみTSLP刺激によりこのような広範囲なシグナル活性化を示すTSLP受容体強制発現細胞株を樹立することができた(図2)。今後、この細胞株は従来数が少なく実験機会が制限されていたヒトTSLP反応細胞としてTSLPシグナルの分子機構を明らかにするための生化学的研究材料として期待される。

本研究課題ではいまだ十分に解明されていないTSLPの細胞内シグナル伝達経路を詳細に解析することによりTSLPを阻害することによるアレルギー治療戦略に対し理論的基盤を与えることを目標としてきた。二年間の研究期間を終えたが、この間アレルギー疾患の病態におけるTSLPの果たす役割はますます

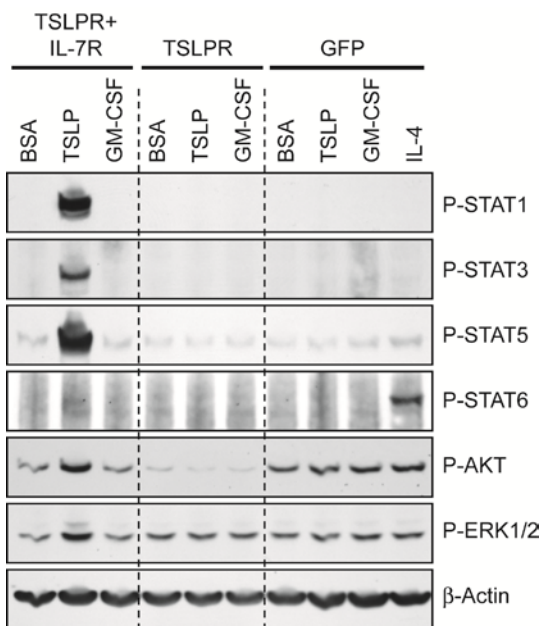


図2. 樹状細胞特異的 TSLP シグナルの再構成

TSLP 受容体トランスフェクタント (TSLPR+IL-7R)を無刺激(BSA), TSLP, GM-CSF, IL-4 の各種サイトカインで刺激した際のシグナル分子の活性化を特異的リン酸化抗体により検出した。

ます重要であることが認識されてきたものの、ヒト TSLP の反応細胞が希少なために TSLP 受容体下流のシグナル伝達経路に関する解析は世界的に見てもほとんど進展していないのが現状である。DC に働いて Th2 応答を誘導する TSLP シグナルが Th1 誘導シグナルによって顕著に抑制されることは、微生物の probiotic な作用が抗原提示細胞レベルで排他的な作用を示し、潜在的にアレルギー性炎症(=Th2 免疫応答)を抑制することを意味する。今回樹立された TSLP に反応する細胞株はこの分野の研究進展にとって重要な役割を果たすことが期待される。

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 11 件)

1. Ito T, Liu Y-J, Arima K. Cellular and molecular mechanisms of TSLP function in human allergic disorders -- TSLP programs the "Th2 code" in dendritic cells --. *Allergol Int* **61**: 35-43, 2012.
2. Arima K, Liu Y-J. Thymic stromal lymphopoietin programs the "allergy code" in dendritic cells. *Inflamm Regen* **32**: 23-31, 2012.

3. Uchida M, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Taniguchi K, Suzuki S, Okamoto M, Ahlfeld SK, Ohshima K, Kato S, Toda S, Sagara H, Aizawa H, Hoshino T, Conway SJ, Hayashi S, Izuhara K. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Jan 12 [Epub ahead of print].

4. Ontsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H, Serada S, Ohta S, Tanemura A, Yang L, Fujimoto M, Arima K, Suzuki S, Murota H, Toda S, Kudo A, Conway SJ, Narisawa Y, Katayama I, Izuhara K, Naka T. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp Dermatol*. **21**: 331-336, 2012.

5. 有馬和彦. 樹状細胞の機能的可塑性. 臨床免疫・アレルギー科. **57**: 227-233, 2012.

6. 出原賢治, 有馬和彦, 鈴木章一, 白石裕士, 太田昭一郎. ペリオスチンによる気管支喘息の病態形成機序. 臨床免疫・アレルギー科. **57**: 104-110, 2012.

7. 出原賢治, 有馬和彦, 鈴木章一, 白石裕士, 太田昭一郎. 気管支喘息におけるサイトカイン研究の最近の話題. 呼吸と循環. **60**: 179-187, 2012.

8. 出原賢治, 太田昭一郎, 白石裕士, 有馬和彦, 鈴木章一. 間質性肺炎の血清マーカーとしてのペリオスチン. 検査と技術. **40**: 157-160, 2012.

9. 有馬和彦. アレルギー発症における thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の作用. 生化学. **83**: 1109-1113, 2011.

10. Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, Arima K, Wang YH, Voo KS, Cao W, Liu YJ: Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of forkhead box P3⁺ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol*. **184**: 2999-3007, 2010.

11. 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.* **22**: 739-747, 2010.

〔学会発表〕(計5件)

1. Taniguchi K, Arima K, Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Ontsuka K, Suzuki S, Conway SJ, Izuhara K. ペリオスチンはインターロイキン6産生を介して表皮角化細胞の増殖・分化に関与する. 第40回日本免疫学会学術集会. 2011. 11.27. 幕張市, 千葉県.

2. 有馬和彦, 出原賢治. 細胞外マトリックスを介したアトピー性皮膚炎の病態形成(シンポジウム). 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2011.11.11. 東京都.

3. Arima K, Watanabe N, Hanabuchi S, Chang M, Sun S-C, Liu Y-J. Distinct signal codes generate dendritic cell functional plasticity. 14th International Congress of Immunology, 2011.8.24. 神戸市, 兵庫県

4. Ohta S, Shibata R, Nakao Y, Azuma Y, Taniguchi K, Arima K, Suzuki S, Shiraishi H, Iwasaka T, Izuhara K. 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. 2011.5.17. ベルリン, ドイツ.

5. 有馬和彦. TSLPとアレルギー(シンポジウム). 第31回日本炎症・再生医学会, 2010.8.6. 東京都.

〔図書〕(計3件)

1. Arima K, Liu Y-J. Thymic stromal lymphopoietin. In: *Inflammation and Allergy Drug Design*. Wiley-Blackwell, London, pp. 205-214, 2011.

2. 出原賢治, 有馬和彦, 鈴木章一, 白石裕士, 太田昭一郎. IL-4. In: *疾患モデルの作製と利用-免疫疾患*. 株式会社エル・アイ・シー. 東京. pp. 231-239, 2011.

3. 出原賢治, 有馬和彦, 鈴木章一, 白石裕士, 太田昭一郎. IL-13. In: *疾患モデルの作製と利用-免疫疾患*. 株式会社エル・アイ・シー. 東京. pp. 276-283, 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況(計3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: 出原賢治, 有馬和彦, 鈴木章一, 白石裕士, 太田昭一郎

権利者: 国立大学法人佐賀大学

種類: 特願

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

権利者: 国立大学法人佐賀大学

種類: 特願

番号: 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, 星野友昭, 東義則, 小野純也

権利者: 国立大学法人佐賀大学

種類: 特願

番号: 2011-194323

出願年月日: 2011. 9. 6.

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔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

有馬 和彦 (ARIMA, KAZUHIKO)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号: 60336112

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし