

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591553

研究課題名(和文) 気道のTh2環境決定におけるTSLP等の活性物質とアラキドン酸代謝物との相互作用

研究課題名(英文) Interaction of arachidonic acid metabolites and bioactive substances in formation of Th2 environment

研究代表者

浜崎 雄平(hamasaki, yuhei)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10172967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内外の活性物質が気道上皮に及ぼす影響を与えているかを検討した。気道上皮はTRPA1とTRPV1を恒常的に発現しており、この発現はウイルス感染モデルであるpoly ICの刺激により増強する。TRPA1のagonist; allyl-isothiocyanateはpoly ICの前処置によって炎症性サイトカインIL-6の産生を増強する。ケラチノサイトはIL-33を産生してアレルギー性炎症を惹起することが示されているが、TNFαとINFγはケラチノサイト産生IL-33を増強する。感作によるアレルギー性皮膚炎を起こしたマウスに抗IL-33抗体を皮下注射するとほぼ完全に抑制する。

研究成果の概要(英文)：We investigated an interaction between various bioactive substances and human bronchial and skin epithelial cells. We found that (1) human bronchial epithelial cells constantly express TRPA1 and TRPV1 which are enhanced by poly IC stimulation, and (2) allyl-isothiocyanate, an agonist of TRPA1, stimulates production of IL-6 through pre-treatment of cells with poly IC. We also found that (3) the production of IL-33 is enhanced by TNFα and INFγ in keratinocytes, human skin epithelial cells, and (4) anti-IL-33 antibody completely inhibits allergen induced-dermatitis in mice. These results indicate that TRPA1 is associated with airway inflammation induced by viral upper respiratory infection. Keratinocyte produced-IL-33 plays an important role in allergic inflammation in human skin diseases and IL-33 probably an important target for treatment and management of allergic diseases.

研究分野：小児科学

キーワード：Th2 arachidonic acid IL-33 TRPA1

1. 研究開始当初の背景

小児に多いアレルギー疾患にはアトピー性皮膚炎、食物アレルギー、アレルギー性鼻炎、気管支喘息がある。そのうち、気管支喘息罹患率はこの30年間で倍増した。特に乳幼児喘息(喘鳴)が増加し、臨床上的大きな問題になっている。乳幼児喘息増加の機序は明確ではないが、気道感染を含めた環境要因の変化により、乳幼児の免疫環境がTh2優位状態にシフトしていることが重要な要因として指摘されている(Strachan Br Med J 299:1259,1989)。ところで、乳幼児期のTh1/Th2環境を決定する因子として気道上皮の役割が注目されている。気道上皮はサイトカイン、ケモカイン、アラキドン酸代謝物等に対する種々の受容体を発現し、これらの活性物質からのシグナルを通して、RANTES・Eotaxin・IL-8等のケモカイン、PGE₂・15HETEなどのアラキドン酸代謝物、IL-1・IL-11・G-CSFなどのサイトカインを産生する。また、ICAM-1等の接着因子、Toll like receptor(TLR-2, 3, 8, 9など)を発現し、ウイルス等の病原体に反応してインターフェロンを産生し感染防御に働くと共に自然免疫担当細胞としても作用している(Holgate ST, Trends in Immunol 28:248,2007)。また、気道上皮はThymic stromal lymphopoietin(TSLP)を産生するが、TSLPはdendritic cellのOX40L発現を誘導し、Th0のTh2への分化を誘導して局所のTh2環境を作り出すことが報告されている。我々は気道ウイルス感染時にケモカインであるRANTES・Eotaxin3・IL-8の気道上皮での産生がIL-4優位のTh2環境で亢進することを見だし、ウイルス感染による喘息発作の誘発がケモカインによる炎症細胞の浸潤による可能性を報告した(Tsuiji K, Eur Respir J 26:795,2005)。また、この反応がシステインロイコトリエン(cysLTs)により増幅されることも見だし、アラキドン酸代謝物による制御機構が存在することを示した。このように気道局所の免疫環境をTh2へのシフトを促す機能細胞としての気道上皮役割を検討することは乳幼児のアレルギー疾患、とくに気管支喘息の発症の機序と増加の原因を検討するうえで重要である。

2. 研究の目的

気道上皮に作用する脂肪酸代謝物を含む種々の内因性・外因性活性物質と気道上皮の交互反応を検討することにより気道の局所環境がTh2環境にシフトする機序を解明する。それによって、小児アレルギー疾患の発症の機構を明らかにし治療や予防に役立てることができる。

3. 研究の方法

(1)気道上皮における温度感受性受容体の発現と気道炎症における役割
細胞培養: ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B

(LHC-9 medium)と正常ヒト気道上皮細胞 NHBEは37℃、5% CO₂存在下で培養した。
mRNA抽出および定量的PCR法: 6well plateに細胞を播き、培養液中にpolyIC, AITC (TRPA1 agonist)等を添加後、決められた時間培養し、ISOGENを用いてRNAを抽出後cDNAを作成し Taqman real-time quantitative PCRにて測定した。
ELISA法による蛋白量測定: 上記6well plateで培養した細胞の上清を取り出し市販のassay-kitを用いて測定した。

(2)上皮細胞におけるIL-33の誘導の機序

細胞培養: ヒトケラチノサイト(KERTr細胞)は37℃、5% CO₂存在下で6well plateで培養した。
Western-blotting: 一次抗体として市販の抗IL-33を用い、二次抗体は(HRP)-conjugatedウサギ抗ヒツジIgG抗体を用い、通常の方法で行った。
皮膚炎マウスの作成: マウスは5% 4-ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one (oxa)で感作し(day0)、実験条件に合わせてday 5,7,9,11,13にチャレンジした。抗IL-33抗体は耳介の皮下に注射で投与した(day9)。
耳介の組織学的検討: 耳介の厚さを測定した後、組織を固定し免疫染色を行い解析した。

4. 研究成果

(1)気道上皮における温度感受性受容体の発現と気道炎症における役割

TRP温度感受性受容体は気道の知覚神経終末に発現していることが知られており、空気中の化学物質によって受容体が活性化されて咳嗽や分泌物の増加などが引き起こされる。しかし、気道上皮細胞にTRP温度感受性受容体が発現しているか否かは不明であった。今回その発現の有無を検討したところ、気道上皮細胞はTRPA1およびTRPV1のmRNAを恒常的に発現していることが判明した。さらに、TRPA1 mRNAの発現は気道ウイルス感染のモデルであるpolyICで刺激をすると増強された。その他種々の刺激物質(IL-4, IL-13, IL-6, IL-17, INF γ , TNF α , IL-33)を検討したが、同様の作用を示す物質は見つからず、特異的な反応であることが示された。

また、気道上皮はIL-6を産生するが、TRPA1のagonistであるallyl-isothiocyanate; AITC(わさびの成分)で刺激すると産生がわずかに増加する。polyICで24時間前処理した後AITCでさらに刺激するとIL-6の産生は有意に増加することが判明した。Poly ICが気道上皮のTRPA1発現を増強したことがその機序と考えられる。喘息の発症はウイルス感染と密接に関連していることが多くの研究で明らかになってきている。感染後にTRPA1の発現が上昇しIL-6の産生が増加することによって気道炎症・気道過敏性が獲得される機序の存在が推定された。

(2)上皮細胞における IL-33 の誘導の機序：IL-33 は種々の炎症性刺激により上皮細胞や内皮細胞より産生され、免疫系細胞に作用してアレルギー性炎症を引き起こす重要なサイトカインとして注目されている。今回、気道と同じ上皮系細胞であるヒト培養ケラチノサイトを用いて IL-33 産生の調節機構を検討した。TNF α INFr は IL-33 の産生を mRNA および蛋白のレベルで有意に増加させた。IL-33 の誘導の機序を介してアレルギー性の炎症をきたす機構が存在することが判明した。

次に耳介に炎症を生じさせたマウスを用いて、抗 IL-33 抗体を投与することにより炎症が抑制されるか否かを検討した。抗 IL-33 抗体は耳介の腫脹を抑制するのみならず、好酸球の浸潤を明らかに抑制した。このことは好酸球性の炎症に IL-33 が関与していることを間接的に示しており、IL-33 の制御がアレルギー性炎症の治療に効果を示す可能性があることを示したものである。

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 4 件)

- 浜崎雄平, 山本修一, 在津正文: 小児喘息の長期管理におけるロイコトリエン受容体拮抗薬(LTRA)の役割. 日本小児アレルギー学会誌 26(1):85-90; 2012 査読あり
- Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Sugioka T, Hamasaki Y. Blockade of interleukin-33 attenuates allergic contact dermatitis in model mice: possible mechanism via eosinophil infiltration. J Clin Exp Dermatol Res 2013 4, 3 査読あり
- Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Suyama Y, Sugioka T, Hamasaki Y. Interleukin 33 is induced by tumor necrosis factor α and interferon γ in keratinocytes and contributes to allergic contact dermatitis. J Invest Allergol Clin Immunol. 2013 23(6), 428-434. 査読あり
- Taniguchi K, Arima K, Masuoka M, Ohta S, Shiraishi H, Ohtsuka K, Suzuki S, Inamitsu M, Yamamoto K, Simmons O, Toda S, Conway SJ, Hamasaki Y, Izuhara K. Periostin controls keratinocytes proliferation and differentiation by interacting with the paracrine IL-1 α /IL-6 loop. J Invest Dermatol

In Press. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

- 浜崎雄平, 吉原重美, 勝沼俊雄: ニューロペプチド研究会 呼吸機能の発達と障害因子: 喘息 COPD を含む呼吸器疾患発症への関与 (イブニングシンポジウム). 第 49 回日本小児アレルギー学会 大阪 2012.9.15-16 日本小児アレルギー学会雑誌 26: 486, 2012
- Kazuto Taniguchi, Kazuhiko Arima, Miho Masuoka, Hiroshi Shiraishi, Kanako Ohtsuka, Shoichi Suzuki, Takashi Sugioka, Yuhei Hamasaki, Kenji Izuhara: The IL-1 alpha/periostin/IL-6 axis contributes to the keratinocyte proliferation and differentiation in atopic dermatitis. 29th Symposium of Collegium Internationale Allergologicum. Korea 2012.10.14-19.
- Hamasaki Y, Yamamoto S, Kobayashi I, Tsuji K, Ohtaguro I, Ichimaru T, Muro E, Miyazaki M, Nishi N, Taniguchi K, Inada Y, Hitomi E, Zaito M, Matsuo M: The roles of airway epithelium in virus induced wheezing and asthma exacerbation. Symposium on drug discovery and development Lexington Ky, 2013.9.19
- 浜崎雄平, 人見会美子, 山本修一: 気道におけるニューロペプチド研究の課題と展望 ニューロペプチド研究会 2013.10.19-20 横浜
- 浜崎雄平: 呼吸器疾患とケミカルメディエーター - 気道上皮の役割を中心に - 日本小児呼吸器学会 2013.11.22-23 佐賀市
- 浜崎雄平, 人見会美子, 山本修一: 気道におけるニューロペプチド研究の課題と展望 ニューロペプチド研究会 2013.10.19-20 横浜
- 浜崎雄平: 呼吸器疾患とケミカルメディエーター - 気道上皮の役割を中心に - 日本小児呼吸器学会 2013.11.22-23 佐賀市
- 谷口一登, 山本修一, 須山ゆかり, 稲田由紀子, 人見会美子, 杉岡隆, 浜崎雄平: インターロイキン 33 のアレルギー皮膚炎への関与. 第 67 回佐賀小児科地方会・第 190 回日本小児科学会長崎地方会合同地方会 2013. 7.21 佐賀

- Taniguchi K, Yamamoto S, Hitomi E, Inada Y, Suyama Y, Sugioka T, Hamasaki Y: Interleukin-33 is induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in keratinocytes, and contributes to allergic contact dermatitis. 第50回日本小児アレルギー学会 (English session) 2013.10.19 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜崎雄平 (HAMASAKI, Yuhei)
佐賀大学・医学部・客員研究員
研究者番号：10172967