

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19591950
 研究課題名(和文) ヒストン脱アセチル化酵素活性化剤を用いたアレルギー性鼻炎根治のための基礎的研究
 研究課題名(英文) Basic study for permanent cure of allergic rhinitis with use of the activator of a histone deacetylase
 研究代表者
 中丸 裕爾 (NAKAMARU YUJI)
 北海道大学・北海道大学病院・講師
 研究者番号：20344509

研究成果の概要：ラット肥満細胞 (RBL-2H3 細胞) を DNP 特異的 IgE と培養し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (Tricostatin A: TSA) を加え、NP-KLH (抗原) を反応させ培養後、細胞を回収した。RNA を採取し、逆転写後 real time PCR にて Th2 型サイトカイン (IL-4, IL-5) mRNA 量を測定した。結果であるが、TSA を添加した細胞では TSA の濃度依存性に IL-4, IL-5 ともに mRNA の産生量が増加した。また、抗原刺激後の培養上清中の蛋白を ELISA 法にて測定すると、TSA による肥満細胞からの IL-4 の産生亢進は蛋白レベルでも確認できた。以上より、ヒストン脱アセチル化酵素は Th2 型サイトカイン産生を抑制している可能性が示唆された。次に、ヒト肥満細胞株にて SIRT1 の肥満細胞の Th2 型サイトカイン産生に関する実験をした。TSA の代わりに SIRT1 の抑制剤である suramin を添加した。すると suramin の濃度依存性に IL-4 の産生増加が認められた。一方 SIRT1 の活性化剤である resveratorol を添加すると抗原刺激にて誘導された IL-4 の産生は抑制された。また SIRT1 の siRNA を肥満細胞に導入して遺伝子を knock down すると IL-4 の産生は増加した。以上のことから、SIRT1 は肥満細胞にたいして Th2 型サイトカイン産生を抑制する働きをしていると示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：アレルギー、鼻炎、ヒストン、アセチル化

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎は近年増加傾向にあり、現在日本国民 30%以上が罹患する国民病となっている。しかし治療は抗原回避や対症療法のみで、根治を期待できる方法は未だ開発されていない。

近年、DNA と結合しているヒストン蛋白がアセチル化やメチル化などの修飾をうけクロマチンが構造変化する（クロマチンリモデリング）ことで DNA からの転写が調節されていることが判明してきた。ある遺伝子のプロモーター領域のヒストンがアセチル化されていると、遺伝子が開いた状態になり、転写が容易になる。逆にヒストンが脱アセチル化されると、プロモーター領域が閉じた状態になり転写は抑制される。この遺伝子制御機構は発生、細胞分化や癌を含む様々な疾患の発症に関与していると推測されている。

一方、アレルギー性疾患においてもナイーブ T 細胞から Th2 型細胞への分化の本質がクロマチンリモデリングであることが示され、発症や炎症の維持に重要な役割を演じている可能性が高い。

2. 研究の目的

今回の研究ではヒストン脱アセチル化作用を持つ SIRT1 という蛋白に注目し、アレルギー性鼻炎発症における役割を検討する。SIRT (sirtuin) 1 は、カロリー制限による寿命の延長に必須の蛋白である。カロリー制限では単に寿命が延長するのみでなく、癌、神経変性疾患や自己免疫疾患などの慢性炎症性疾患が抑制されることが知られており、本蛋白の活性化により多くの疾患が治療あるいは予防できる可能性がある。一方、SIRT1 はポリフェノールの一成分（レスベラトロール）

により活性化されることが判明しており、本薬剤を使用することで慢性炎症疾患のひとつであるアレルギー性鼻炎が治療あるいは予防できる可能性があると考え、本研究の着想に至った。

3. 研究の方法

(1) ラット肥満細胞 (RBL-2H3 細胞) を DNP 特異的 IgE と培養。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA) を加える。

DNP-KLH (抗原) を反応させ培養後、細胞を回収。RNA を採取し、逆転写後 real time PCR にて Th2 型サイトカイン (IL-4, IL-5 etc) 量を測定。抗原反応させ培養後に培養上清を採取。ELISA 法にてサイトカインの蛋白量を測定する。

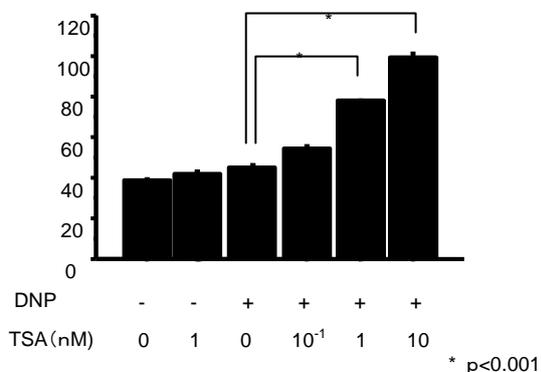
(2) ヒト肥満細胞 (HMC-1 細胞) を培養。SIRT1 阻害剤および SIRT1 の活性化剤を加える。

カルシウムイオノファと PMA を反応させ培養後、細胞を回収。RNA を採取し、逆転写後 real time PCR にて IL-4 量を測定。抗原反応させ培養後に培養上清を採取。ELISA 法にてサイトカインの蛋白量を測定する。

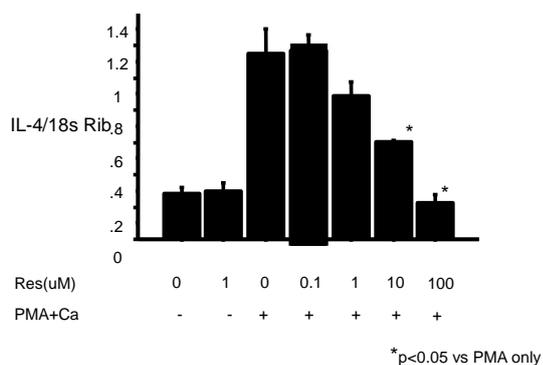
4. 研究成果

(1) TSA を添加した細胞では TSA の濃度依存性に IL-4, IL-5 とともに mRNA の産生量が増加した。また、抗原刺激後の培養上清中の蛋白を ELISA 法にて測定すると、TSA による肥満細胞からの IL-4 の産生亢進は蛋白レベルでも確認できた。

IL-4(pg/ml)



(2) ヒト肥満細胞株にて SIRT1 の肥満細胞の Th2 型サイトカイン産生に関する実験をした。SIRT1 の抑制剤である suramin を添加すると suramin の濃度依存性に IL-4 の産生増加が認められた。一方 SIRT1 の活性化剤である resveratorol を添加すると抗原刺激にて誘導された IL-4 の産生は抑制された。



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 3 件)

- ① 中丸裕爾、シラカバ花粉症、鼻アレルギーフロンティア、8、46-49、2008、査読無
- ② 中丸裕爾、アレルギー性鼻炎、アレルギーの臨床、28、349-354、2008、査読無
- ③ 中丸裕爾、アレルギー性鼻炎におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割、日本鼻科学会誌、46、32-34、2007、査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 中丸裕爾、SIRT1 による肥満細胞の IL-4 産生調節、第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2009 年 2 月 13 日、千葉市 (三井ガーデンホテル千葉)
- ② 中丸裕爾、肥満細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素による IL-4 産生調節、第 58 回日本アレルギー秋季学術大会、2008 年 11 月 27 日、東京都 (東京国際フォーラム)
- ③ Nakamaru Y、Oxidative stress upregulates Th2 cytokine gene expression in mast cells through reduction of histone deacetylase、International Conference of the American Thoracic Society、2008 年 5 月 19 日、トロント (トロントコンベンションセンター)
- ④ 中丸裕爾、ヒストン脱アセチル化酵素による肥満細胞における IL-4 産生調節、第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2007 年 11 月 2 日、横浜市 (パシフィコ横浜会議センター)
- ⑤ 中丸裕爾、肥満細胞におけるヒストン脱アセチル化酵素による IL-4 産生調節、第 46 回日本鼻科学会、2007 年 9 月 28 日、宇都宮市 (栃木県総合文化センター)
- ⑥ 中丸裕爾、酸化ストレスはヒストン脱アセチル化酵素の減少により肥満細胞における IL-4 産生を増加させる、第 108 回日

本耳鼻咽喉科学会総会、2007年5月17
日、金沢市（ホテル日航金沢）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中丸 裕爾 (NAKAMARU YUJI)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：20344509

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし