

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659474

研究課題名(和文) 血中好酸球増多に相関する IL-33 遺伝子発現亢進の天然物由来抑制薬の同定

研究課題名(英文) Natural medicine-derived suppressor of IL-33 gene expression correlated with eosinophilia

研究代表者

福井 裕行 (FUKUI, Hiroyuki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90112052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：好酸球増多を伴う花粉症患者において、鼻粘膜IL-33 mRNAレベルと血中好酸球レベルの相関性を見いだした。そして、IL-33遺伝子発現亢進が引き起こされる培養細胞として、Swiss 3T3細胞を見いだした。IL-33 mRNAレベル上昇は、PMA刺激により引き起こされ、PKC 特異的阻害薬 rottlerin、天然物由来PKC 抑制薬 maackiain、quercetin、及び、Hsp90抑制薬17-AAGにより抑制された。また、MEK阻害薬U0126はIL-33遺伝子発現を抑制したが、PARP-1阻害薬DPQは抑制しなかった。

研究成果の概要(英文)：We observed the close relationship between levels of IL-33 mRNA in nasal mucosa and blood eosinophil in pollinosis patients. We succeeded in finding Swiss3T3 cells in which IL-33 mRNA level was up-regulated by the stimulation of PMA. Then we observed that PMA-induced up-regulation of IL-33 mRNA was strongly suppressed by the extract of Kujin, an anti-allergic Kampo medicine. (-)-Maackiain, an inhibitor of PKC-delta from Kujin revealed to be a suppressor. Up-regulation of IL-33 mRNA was also suppressed by either rottlerin, a PKC-delta inhibitor, quercetin, another natural PKC-delta inhibitor or 17-AAG, a suppressor of heat shock protein-90. IL-33 mRNA up-regulation was suppressed by U0126, a MEK inhibitor, but not by DPQ, a PARP-1 inhibitor.

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：アレルギー性鼻炎 花粉症 好酸球 IL-33 プロテインキナーゼC

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の病理学は、ヒスタミンなどのアレルギーメディエーターによる細胞間シグナルの研究により進められて来た。そして、抗原・IgE 抗体複合体による高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) 刺激による肥満細胞からのメディエーター遊離機構、更には、免疫学の背景の研究が進められて来た。一方、我々は、ヒスタミンの標的分子であるヒスタミン H₁ 受容体の刺激による H₁ 受容体遺伝子発現亢進の発見を契機に、アレルギー疾患の症状に関与する感受性遺伝子の同定と遺伝子発現亢進を引き起こす細胞内シグナルの解明、及び、細胞内シグナルを作用点とする抗アレルギー天然物の有効成分の薬理機構の解明を行い、アレルギー疾患の新しい病理機構についての研究を行ってきた。その結果、ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子がくしゃみ・鼻汁症状の感受性遺伝子であること、及び、H₁ 受容体遺伝子発現亢進には、細胞内蛋白キナーゼ C-δ シグナルが有用な働きを担っていることを明らかにした。

2. 研究の目的

アレルギー疾患の慢性症状として、好酸球性炎症が重要であることが明らかにされつつある。しかし、血中好酸球増多を引き起こす病理機構は明らかでない。我々は、花粉症患者の血中好酸球レベルと鼻粘膜 IL-33 mRNA レベルの間に高い相関性があることを発見した。この結果は、好酸球増多量に関与する感受性遺伝子が、IL-33 遺伝子である可能性を示している。そこで、IL-33 遺伝子発現機構の解明を目的として、本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) Swiss3T3 細胞の培養

Swiss3T3 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) (Sigma, MO, USA) 及び抗生物質 (10,000 Unit/mL penicillin G sodium, 10 mg/mL streptomycin sulfate salt) を添加した DMEM (high glucose) 培地 (Gibco Island, NY, USA) を用い培養シャーレにまき、37 °C、5% CO₂ インキュベータにて静置培養した。約 90% confluent の状態に達した時、FBS 0.5% の培地と交換し (stravation) さらに 20 ~ 24 時間培養した。

(2) リアルタイム PCR による IL-33 mRNA 測定法

培養細胞を PBS(-) で洗浄後、0.7 mL/well の RNAiso plus (Takara) を加えかきとった。Chloroform を 210 µL 加え、浸透・静置後、15,000 rpm、15 分、4 °C の遠心を行い、RNA を含む水層を回収した。水層と同量の

isopropanol を加え、浸透・静置後、15,000 rpm、15 分、4 °C の遠心によりペレット状 RNA を得た。このペレットに 75% 凍結 ethanol (-20 °C) 0.5 mL 加え、15,000 rpm、15 分、4 °C の遠心により得られたペレットに DEPC 水を加え RNA solution を作成した。分光光度計 (Thermo: Nanodrop ND-1000) により各サンプルの total RNA 濃度と純度を測定した。PrimeScript® RT reagent kit (Takara) を用いてサーマルサイクラ (Biometra: T3000 thermocycler) で PrimeScript® RT reagent Kit を用いた逆転写反応プログラムにより逆転写反応を行った。

Swiss3T3 培養細胞の IL-33 mRNA は、IL-33 mRNA 用プローブ (Applied Biosystems: Mm00505403_m1)、及び、GAPDH mRNA 用プローブ (Applied Biosystems: TaqMan Rodent GAPDH control reagent) を用いて、real-time PCR により測定した。

(3) 統計処理

実験データは mean value ± S.E.M で示し One-way ANOVA 及び Dunnett's multiple comparison test を用いて統計処理を行った。

4. 研究成果

(1) IL-33 遺伝子発現亢進が誘導される細胞株の探索

IL-33 遺伝子発現抑制化合物の探索のためのアッセイ系を確立する必要がある。IL-33 遺伝子発現亢進が報告されている肥満細胞株 MHC-1 細胞、好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞、線維芽細胞株 Swiss3T3 細胞、及び、上皮細胞株 HeLa 細胞を用いて、IL-33 遺伝子発現亢進の有無を検討した。その結果、Swiss3T3 細胞のみにおいて ionomycin と PMA の共刺激により有意な IL-33 mRNA の上昇が認められた。

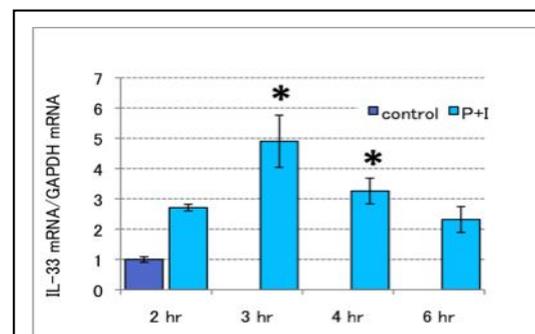


図 1. 100 nM PMA と 1 µM ionomycin (P+I, ■) で刺激した Swiss3T3 細胞における IL-33 mRNA レベル変化. * p < 0.01 vs. control

control () .

(2) Swiss3T3 細胞における IL-33 遺伝子発現亢進機構

PMA 単独刺激は、PMA+ionomycin 刺激と同等の IL-33 mRNA 上昇を引き起こした。PMA による IL-33 mRNA 上昇は、rottlerin (PKC δ/ϵ イソフォーム選択的阻害薬) により完全に抑制された。rottlerin による抑制の強さ (IC₅₀ = 3.22 μ M) から、IL-33 遺伝子発現亢進には、PKC δ の関与が示唆された。

(3) IL-33 遺伝子発現亢進に対する天然物由来 PKC δ 阻害薬、及び、ヒートショックタンパク 90 (Hsp90) 阻害薬の影響

我々は、PMA 刺激によるヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現亢進において、PKC δ が Hsp90 のクライアント蛋白であり、(-)maackiain や quercetin は PKC δ と Hsp90 との結合を阻害し、PKC δ の Golgi 体への移行、及び PKC δ の活性化を抑制することを明らかにした。そこで、PMA 刺激を行った Swiss3T3 細胞の IL-33 mRNA 上昇に対する quercetin、及び、(-)maackiain (天然物由来 PKC δ 阻害薬) の抑制活性を調べた。その結果、quercetin、及び、(±)maackiain は、IL-33 mRNA 上昇に対する濃度依存的抑制を示した (図 2)

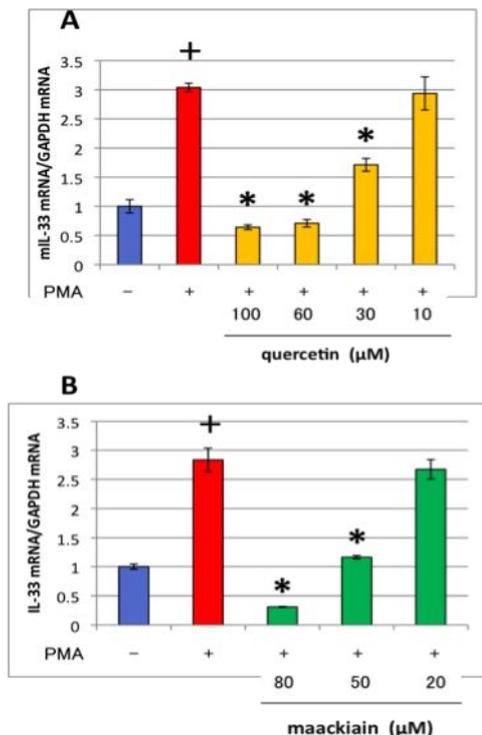


図 2 . 100 nM PMA で刺激した Swiss3Ts 細胞の IL-33 mRNA 上昇に対する quercetin

(A) 及び、(±)maackiain (B) の抑制作用 . +p<0.01 vs. control, * p<0.01 vs. PMA.

PKC δ と同様に、17-AAG(Hsp90 阻害薬、17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin) も、PMA 刺激を行った Swiss3T3 細胞の IL-33 mRNA 上昇に対する抑制作用を示し、Hsp90 の関与が示唆された (図 3)

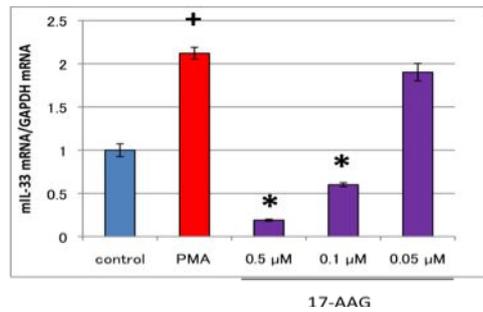


図 3 . 100 nM PMA で刺激した Swiss3Ts 細胞の IL-33 mRNA 上昇に対する AAG の抑制作用 . +p<0.01 vs. control, * p<0.01 vs. PMA.

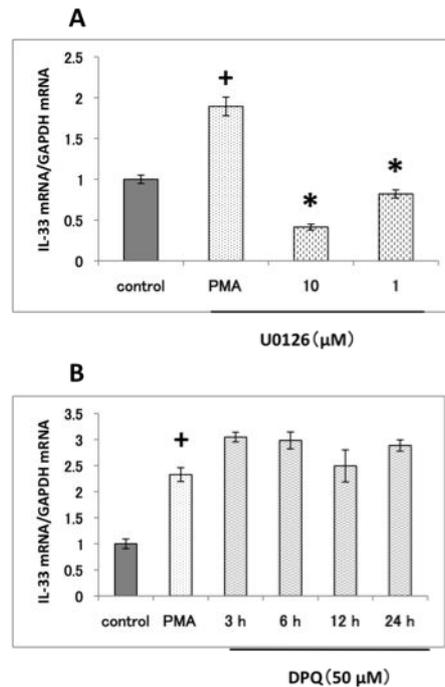


図 4 . 100 nM PMA で刺激した Swiss3Ts 細胞の IL-33 mRNA 上昇に対する U0126 (A) 及び、DPQ (B) の抑制作用 . +p<0.01 vs. control, * p<0.01 vs. PMA.

(4) IL-33 遺伝子発現亢進に關与する細胞内シグナル

我々は、以前、ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現亢進が、PKC δ から、ERK、PARP-1 に流れる細胞内シグナルにより引き起こされることを明らかにした。IL-33 遺伝子発現亢進において、ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現亢進と同様か否かを検討した。その結果、U0126 (MEK 阻害薬) は IL-33 遺伝子発現を抑制したが、DPQ (PARP-1 阻害薬) は抑制しなかった (図 4)。このことから、IL-33 遺伝子発現亢進は、ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現遺伝子発現亢進とは異なるシグナルであることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 福井裕行 細胞内シグナル分子を標的とするアレルギー疾患治療薬ターゲットの探索 (Searching a drug target for allergic diseases targeting intracellular signaling molecule). シンポジウム (JPS Symposia) 難治性疾患の病理機構解明と治療薬開発アプローチ最前線 (Investigation of pathological signaling and drug target discovery for incurable diseases at the front). 第 87 回日本薬理学会年会 東北大学百周年記念会館川内萩ホール、仙台国際センター (宮城県仙台市) 2014 年 3 月 19 日～21 日

2) 山本沙弥香、水口博之、松井恒樹、江洲貴子、北村嘉章、奈邊健、武田憲昭、福井裕行 Swiss 3T3 細胞におけるイオノマイシン刺激に伴うインターロイキン-33 遺伝子発現亢進の分子機構 (Molecular mechanism of PMA-induced up-regulation of interleukin-33 gene expression in Swiss 3T3 cells). 第 87 回日本薬理学会年会 (東北大学百周年記念会館川内萩ホール、仙台国際センター (宮城県仙台市) 2014 年 3 月 19 日～21 日

3) 福井裕行 ヒスタミン H₁ 受容体を標的としたアレルギー性鼻炎に対する新しい治療戦略. 教育研修会. 第 32 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 ホテルクレメント徳島 (徳島県徳島市) 2014 年 2 月 6 日～8 日

4) 山本沙弥香、水口博之、松井恒樹、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行 Swiss3T3 細胞における IL-33 遺伝子発現亢進機構. 第 17 回日本ヒスタミン学会 松江テルサ (島根県松江市)、2013 年 11 月 22 日～23 日

5) 福井裕行 炎症論におけるヒスタミンの位置づけと今後の展開. 第 17 回日本ヒスタミン学会 招待講演・理事長講演 松江テルサ (島根県松江市)、2013 年 11 月 22 日～23 日

6) 山本沙弥香、水口博之、松井恒樹、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行 Swiss3T3 細胞にお

ける IL-33 遺伝子発現亢進機構. 第 52 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 松山大学 (愛媛県松山市)、2013 年 10 月 26 日～27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔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

福井 裕行 (FUKUI, Hiroyuki)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：90112052

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

武田 憲昭 (TAKEDA, Noriaki)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：30206982

水口 博之 (MIZUGUCHI, Hiroyuki)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号：40247838

北村 嘉章 (KITAMURA, Yoshiaki)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師
研究者番号：60380028

藤井 達也 (FUJII, Tatsuya)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・特任助教
研究者番号：00724048