

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591171

研究課題名（和文） TLR4 シグナルを介した気管支喘息抑制における分子機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanisms in asthma prevention by the TLR4 signal

研究代表者

太田 昭一郎 (SHOICHIRO OHTA)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20346886

研究成果の概要：われわれは、自然免疫を刺激する LPS の受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) に対する刺激型抗体(UT12)を樹立した。本研究では、UT12 を気管支喘息モデルマウスに投与すると気道炎症が抑制されるという知見が得られたことより、TLR4 シグナルの喘息抑制効果の機構を解析した。

本研究の過程においては、UT12 投与喘息モデルマウスの肺組織や脾細胞では、IL-4, IL-13, IL-17A, IFN- γ の mRNA 発現が抑制されており、また、IgG1 および IgE へのクラススイッチが抑制されていることが見出された。すなわち、UT12 が Th バランスを Th1 もしくは Th17 に傾けて Th2 への分化を抑制しているというよりは、UT12 によりナイーブ T 細胞の応答全般が抑制されていることが推定された。

次に、樹状細胞のオバルブミン取り込みを観察したところ、UT12 で前処理をしたマウスでは、樹状細胞による OVA の取り込みが抑制されることが判明した。また、UT12 の作用は、制御性 T 細胞の誘導や、CD4 陽性 T 細胞のアナジーによるものではないことを明らかにした。

これは TLR4 刺激が樹状細胞の抗原取り込みを抑制することで気管支喘息の発症を抑制していることを示した初めての研究であり、気管支喘息の予防的治療につながる可能性がある。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
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：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 自然免疫 TLR4 抗体 気管支喘息

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は最近増加傾向にあるが、その理由の一つとして、衛生環境の改善による感染症罹患リスクの低下により、幼少期の免疫系への刺激が不十分なため、通常無害な抗原に対して異常な免疫応答をしてしまう、という衛生仮説がある。この仮説を支持する研究として、喘息抗原に感作される際、微生物由来物質を投与すると発症を抑制できること

が報告されている。したがって、病原体の最初の認識とそのシグナル伝達を司る自然免疫が喘息の発症に重要な役割を担っていることが予想され、自然免疫と気管支喘息との関連が注目されている。しかし、なぜ気管支喘息が自然免疫刺激により抑制されるのか、そこにどのようなシグナル経路やサイトカインが関与しているのか、詳細は未だ明らかでない。

われわれは、グラム陰性細菌の細胞壁成分 lipopolysaccharide (LPS) の受容体であり、自然免疫の最前線を担う分子である Toll-like receptor 4 (TLR4) に対するマウスモノクローナル抗体(UT12)を樹立した(Ohta S. et al., Clin. Vaccine Immunol. 13: 1131-1136, 2006)。UT12 はマウス TLR4 に特異的に結合し、LPS 様の刺激を誘導することができる刺激型抗 TLR4 抗体である。われわれは、UT12 を気管支喘息モデルマウスに投与することにより、その発症が抑制できるかどうかを観察してきた。その結果、UT12 が LPS よりも効果的に気管支喘息の発症を抑制することを見出した。

前述のマウスの肺組織において、種々のサイトカインの発現レベルを比較したところ、UT12 投与群の気管支喘息マウスでは、非投与群またはコントロール抗体投与群と比べて、IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインや、IL-6 や IL-17A といった、Th17 に関連するサイトカインの発現レベルが有意に減少しているのが認められた。このとき Th1 サイトカインである IFN- γ の発現は上昇していなかった。すなわち、UT12 は Th バランスを Th1 もしくは Th17 に傾けて Th2 への分化を抑制しているというよりは、UT12 によりナイーブ T 細胞の応答全般が抑制されていることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、TLR4 の刺激が気管支喘息発症を抑制する機構を解析することを目的とし、以下の項目を明らかにしていくこととした。

(1) 喘息マウスの UT12 刺激による Th バランスの変化

予備実験により、UT12 刺激が Th17 を抑制していることが示唆される。本研究では喘息モデルマウスの Th1/Th2/Th17 バランスが UT12 刺激によってどのように変化しているかを詳細に検討する。

(2) UT12 が作用する標的細胞の同定

UT12 が作用して喘息抑制の機能を発揮する細胞を同定する。

(3) UT12 刺激が抗原提示と T 細胞応答に与える影響

Th17 が抑制されているという予備実験の結果から、UT12 投与が抗原提示細胞に何らかの影響を及ぼして、それを介して T 細胞の分化を制御していることが推測される。UT12 刺激した抗原提示細胞を T 細胞と作用させ、T 細胞応答の変化を検討する。

3. 研究の方法

(1) 喘息モデルマウスにおける UT12 刺激の Th バランスの変化の検討

野生型マウスをオバルブミン(OVA)と alum で感作した後、OVA を吸入させ、喘息モデルマウスを作製する。脾細胞から T 細胞を単離して、Th1 サイトカイン (IL-12, IFN- γ など)、Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13 など)、Th17 サイトカイン (IL-17A, IL17F, IL-6 など) を染色し、Th1/Th2/Th17 細胞の割合を測定する。このマウスに UT12 を投与した場合、Th1/Th2/Th17 細胞の割合がどのように変化するか観察する。

(2) UT12 の標的細胞の同定

UT12 が作用する標的細胞の一つは、抗原提示細胞であると予想しているため、樹上細胞やマクロファージなどに UT12 が作用したときの抗原提示細胞の活性化状態 (副刺激分子の発現)、抗原提示能、遊走能などを解析する。

(3) UT12 刺激が抗原提示と T 細胞応答に及ぼす影響の in vitro での観察

マウス生体への UT12 投与で観察された Th バランスの変化が、in vitro で再現できるか検討する。In vitro の実験系を確立することで、UT12 刺激・非刺激の細胞を組み合わせることが容易になり、UT12 の作用を細胞ごとに切り分けて観察することができる。

具体的には OVA と alum で感作した野生型マウスに UT12 を投与した後、脾細胞 (抗原提示細胞と T 細胞が混在) を取り出し、in vitro で OVA を加えて、各種サイトカインの産生レベルを RT-PCR や ELISA にて測定し、UT12 非投与の場合と比較する。

また、OVA 感作野生型マウスに UT12 を投与した後、セルソーティングにて脾細胞または樹状細胞を単離する。次に UT12 非投与の OVA 感作マウスの T 細胞を単離して、前記細胞と混合し OVA 刺激の後、サイトカイン産生および T 細胞の増殖を観察する。

4. 研究成果

UT12 を投与した気管支喘息モデルマウスの肺組織においては、IL-4, IL-13 のみならず、IL-17A の発現も抑制されていた上、IFN- γ の発現も増強されていないことを確認した。また、OVA 感作後のマウスより脾細胞を取り出して、in vitro で OVA 存在下に培養すると、UT12 投与群で IL-4, IL-13, IL-17A, IFN- γ の mRNA 発現が抑制されており、また、IgG1 および IgE へのクラススイッチが抑制されていることを見出した。これらのことより、UT12 が Th バランスを Th1 もしくは Th17 に傾けて Th2 への分化を抑制しているというよりは、UT12 によりナイーブ T 細胞の応答全般が抑制され、Th 分化が阻害されていることという仮説が裏付けられた。

次に蛍光標識 OVA と alum の混合物をマウスの腹腔内に投与して、脾臓の樹状細胞のオвалブミン取り込みを観察したところ、UT12 で前処理をしたマウスでは、樹状細胞による OVA の取り込みが抑制されることを明らかにした。また、UT12 による抗原感作抑制は、制御性 T 細胞の誘導や、CD4 陽性 T 細胞のアナジーによるものではないことを明らかにした。

これは TLR4 刺激が樹状細胞の抗原取り込みを抑制することで気管支喘息の発症を抑制していることを示した初めての研究であり、気管支喘息の予防的治療につながる可能性がある。

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 31 件) (全て査読あり)

1. Lu M, Varley AW, Ohta S, Hardwick J, Munford RS. Host inactivation of bacterial lipopolysaccharide prevents prolonged microbial tolerance following Gram-negative bacterial infection. *Cell Host Microbe* 82:293-302 (2008)
2. Nakao I, Ohta S, Izuhara K (他 24 名、3 番目) Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol* 180:6262-69 (2008)
3. Izuhara K, Ohta S, Kanaji S, Shiraishi H, Arima K Recent progress in understanding the diversity of the human ov-serpin/clade B serpin family. *Cell Mol Life Sci* 65:2541-53 (2008)
4. Kanaji S, Izuhara K. (他 5 名、最終) Characterization of a patient with atypical amegakaryocytic thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 80:361-64 (2008)
5. Oku E, Izuhara K. (他 13 名、14 番目) Periostin and bone marrow fibrosis. *Int J Hematol* 88:57-63 (2008)
6. Izuhara K, Kanaji S, Arima K, Ohta S, Shiraishi H Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites. *Med Chem* 4:322-27 (2008)
7. Honjo E, Izuhara K. (他 8 名、9 番目) Expression of the extracellular region of the human interleukin-4 receptor α chain and interleukin-13 receptor $\alpha 1$ chain by a silkworm-baculovirus system. *Protein Expr Purif* 60:25-30 (2008)
8. Kanaji S, Ohta S, Izuhara K (他 12 名、6 番目) Squamous cell carcinoma antigen 1 is an inhibitor of parasite-derived cysteine proteases. *FEBS Lett* 581:4260-64 (2007)
9. Izuhara K, Ohta S (他 3 名、最終) IL-13 and its signal pathway: promising targets in the development of a therapeutic agent for

bronchial asthma. *Curr Signal Transd Ther* 2:31-40 (2007)

10. Hayashi N, Izuhara K (他 4 名、3 番目) T helper 1 cells stimulated with ovalbumin and IL-18 induce airway hyperresponsiveness and lung fibrosis by IFN- γ and IL-13 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14765-770 (2007).
11. Yoshida Y, Izuhara K (他 5 名、5 番目) Analysis of internal motions of interleukin-13 variant associated with severe bronchial asthma using ^{15}N NMR relaxation measurements. *Biochem Biophys Res Commun* 358:292-97 (2007)
12. Ohkuri T, Izuhara K (他 4 名、4 番目) Expression of human IL-13 receptor $\alpha 2$ extracellular domain in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 56:48-53 (2007)
13. Andrews AL, Izuhara K (他 5 名、4 番目) Effect of IL-13 receptor $\alpha 2$ levels on the biological activity of IL-13 variant R110Q. *J Allergy Clin Immunol* 120:91-97 (2007)

[学会発表] (計 29 件)

1. Masaru Uchida, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraishi, Koichi Ohshima, Masaki Okamoto, Tomoaki Hoshino, Hisamichi Aizawa, Simon J. Conway, and Kenji Izuhara Periostin plays an important role in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Allergy and Asthma, Fibrosis, Keystone Symposia (Keystone, Colorado, 1/23/2009) Keystone Symposia, Allergy and Asthma, Fibrosis, 2009 Abstract Book 154 (2009)
2. Hidetomo Matsushita, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraishi, and Kenji Izuhara Inhibitory effects of TLR4 signals on allergic airway inflammation. Allergy and Asthma, Fibrosis, Keystone Symposia (Keystone, Colorado, 1/22/2009) Keystone Symposia, Allergy and Asthma, Fibrosis, 2009 Abstract Book 75 (2009)
3. Miho Masuoka, Hiroshi Shiraishi, Shoichiro Ohta, Hajime Sutoh, Naoki Inagaki, Masutaka Furue, and Kenji Izuhara アトピー性皮膚炎の病態形成における細胞外マトリックスタンパク質ペリオスチンの関与 / Involvement of an extracellular matrix protein, periostin, in the pathogenesis of atopic dermatitis. 第 38 回日本免疫学会総会学術総会 (12/1/2008) *Proceeding of the Japanese Society for Immunology* 38: 48 (2008)
4. Yoshinori Nagai, Masashi Ikutani, Ai Kariyone, Shoichiro Ohta, Kensuke Miyake, Kiyoshi Takatsu TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 differentially regulate LPS responsiveness in B cells. 第 38 回日本免疫学会総会学術総会 (12/1/2008) *Proceeding of the Japanese Society for Immunology* 38: 147 (2008)

5. 出原賢治、太田昭一郎、白石裕士 オーダーメイド医療を目指したアレルギー疾患における病因診断システムの確立 (シンポジウム) 第55回日本臨床検査医学会学術集会 (11/28/2008) 臨床病理 56 (補冊) : 78 (2008)
6. 出原賢治、太田昭一郎、白石裕士 アレルギー疾患におけるオーダーメイド医療 (シンポジウム) 第55回日本臨床検査医学会学術集会 (11/28/2008) 臨床病理 56 (補冊) : 84 (2008)
7. 太田昭一郎、岡元昌樹、内田賢、星野友昭、白石裕士、大島孝一、相澤久道、出原賢治 特発性間質性肺炎における細胞外マトリクス分子 periostin 発現解析の意義 第55回日本臨床検査医学会学術集会 (11/28/2008) 臨床病理 56 (補冊) : 151 (2008)
8. 出原賢治、太田昭一郎、白石裕士、松下英友 アレルギー疾患免疫機序からみた一次予防のターゲットの可能性 (シンポジウム) 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 (11/28/2008) アレルギー 57(9, 10):1274 (2008)
9. 出原賢治、白石裕士、太田昭一郎、増岡美穂、内田賢 アレルギー疾患における新規の線維化機序とその重要性 (シンポジウム) 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 (11/28/2008) アレルギー 57(9, 10):1287 (2008)
10. Kenji Izuhara, Sachiko Kanaji, Isao Nakao I, Kazuhiko Arima, Aya Nakajima, Hidetomo Matsushita, Shoichiro Ohta, Hiroyuki Tanaka, and Hiroichi Nagai Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. 27th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (Workshop)(Curacao, Netherland, 5/4/2008)
11. 金地佐千子、本田美穂、若山一夫、田端介富、中里幸恵、金地泰典、中村郁子、野出孝一、岡村孝、太田昭一郎、南雲文夫、出原賢治 先天性第V因子 (FV) 欠乏症4例の遺伝子解析 第54回日本臨床検査医学会学術集会 (11/24/2007) 臨床病理 55 (補冊) : 241 (2007)
12. 出原賢治、太田昭一郎、金地佐千子、白石裕士 オーダーメイド医療を目指したアレルギー疾患診断の確立 (シンポジウム) 第54回日本臨床検査医学会学術集会 (11/23/2007) 臨床病理 55 (補冊) : 75 (2007)
13. 中尾功、金地佐千子、太田昭一郎、松下英友、有馬和彦、中山勝敏、相良博典、田中宏幸、鈴木幸一、長井博式、福田健、出原賢治 Pendrin は気管支喘息における粘液産生に関与する / Identification fo pendrin as a mediator for mucus hypersecretion in bronchial asthma. 第37回日本免疫学会総会学術総会 (11/20/2007) Proceeding of the Japanese Society for Immunology 37: 102 (2007)
14. 松下英友、太田昭一郎、金地佐千子、木本雅夫、出原賢治 抗マウス TLR4 刺激抗体によるアレルギー性気道炎症の抑制 / Suppression of allergic airway inflammation by an agonistic anti-mouse TLR4 antibody. 第37回日本免疫学会総会学術総会 (11/20/2007) Proceeding of the Japanese Society for Immunology 37: 105 (2007)
15. 松下英友、太田昭一郎、金地佐千子、木本雅夫、出原賢治 細菌感染症罹患の減少に伴うアレルギー疾患増加における免疫学的機序の解析 / Immunological mechanism underlying the increase in prevalence of allergic diseases accompanied with the decrease of the morbidity of bacterial infection. 第10回日本補完代替医療学会学術集会「東西医療の知恵の融合」(11/4/2007) プログラム・抄録集 61 (2007)
16. 出原賢治、金地佐千子、太田昭一郎、白石裕士、有馬和彦 IL-13 を基盤としたアレルギー疾患の病態形成機序と治療戦略 (シンポジウム) 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 (11/1/2007) アレルギー 56(8,9): 966 (2007)
17. 太田昭一郎、松下英友、金地佐千子、木本雅夫、出原賢治 TLR4 シグナル活性化によるアレルギー性気道炎症の抑制機序 (シンポジウム) 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 (11/1/2007) アレルギー 56(8,9): 1059 (2007)
18. 金地佐千子、中尾功、太田昭一郎、松下英友、有馬和彦、湯山則子、中山勝敏、相良博典、田中宏幸、長井博式、福田健、出原賢治 気管支喘息の病態形成における陰イオン輸送体 Pendrin の役割 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 (11/1/2007) アレルギー 56(8,9): 1079 (2007)
19. Kenji Izuhara, Sachiko Kanaji, Isao Nakao, Kazuhiko Arima, Aya Nakajima, Hidetomo Matsushita, Shoichiro Ohta, Noriko Yuyama, Mutsuo Yayama, Katsutoshi Nakayama, Hiroshi Kubo, Hiroyuki Tanaka, Hiroichi Nagai, Makoto Inoue, and Mamoru Hasegawa Involvement of pendrin, an anion transporter, in mucus hyperproduction of bronchial asthma. 13th International Congress of Mucosal Immunology (Tokyo, Japan, 7/12/2007) Abstract 258 (2007)

[図書] (計2件)

1. Kenji Izuhara, Go Takayama, Kazuhiko Arima,

Taisuke Kanaji, Sachiko Kanaji, Shoichiro Ohta, Hiroyuki Tanaka, and Hiroichi Nagai Involvement of periostin in subepithelial fibrosis of bronchial asthma downstream of IL-4 and IL-13 signals. *Cellular and Molecular Targets in Allergy and Clinical Immunology* 315-317 Hogrefe and Huber publishers, Cambridge, Massachusetts (2008)

2. Kenji Izuhara, Sachiko Kanaji, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraishi, Kazuhiko Arima, Noriko Yuyama Gene expression patterns in asthma. *Microarrays in Inflammation* 107-114 Birkhäuser, Basel, Switzerland (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1.

産業財産権の名称

特発性間質性肺炎の検出方法

発明者

出原賢治、太田昭一郎 他

権利者

同上

産業財産権の種類、番号

2008-147822

出願年月日

2008 年 6 月 5 日

国内・外国の別

国内

2.

産業財産権の名称

アトピー性皮膚炎の治療薬

発明者

出原賢治、太田昭一郎 他

権利者

同上

産業財産権の種類、番号

2008-241295

出願年月日

2008 年 9 月 19 日

国内・外国の別

国内

3.

産業財産権の名称

特発性間質性肺炎の治療薬のスクリーニング方法

発明者

出原賢治、太田昭一郎 他

権利者

同上

産業財産権の種類、番号

2008-324484

出願年月日

2008 年 12 月 19 日
国内・外国の別
国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 昭一郎

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：20346886

(2) 研究分担者

出原 賢治

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00270463

金地 佐千子

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50363429

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

松下 英友

佐賀大学・医学部・大学院生