

平成 21 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790687

研究課題名（和文） ダイオキシンのアレルギー疾患発症への影響

研究課題名（英文） The effect of dioxin on the pathogenesis of allergic diseases

研究代表者 金地 佐千子 (KANAJI SACHIKO)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50363429

研究成果の概要：

ダイオキシン汚染は生体に対して及ぼす影響の中で、アレルギー疾患の増悪へ関与する可能性も指摘されているが、未だ解明が進んでいない。我々はアレルギー疾患の発症に重要な役割を果たすサイトカインがリンパ球や皮膚、気道の細胞においてダイオキシン受容体およびその代謝酵素の発現を促すことを明らかにした。またダイオキシン暴露がアレルギー疾患の病態形成に及ぼす影響を調べるため、アレルギー疾患の病態形成に関わるサイトカインシグナルとダイオキシン代謝経路との相互作用を解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	4,500,000	3,650,000

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

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：アレルギー疾患、ダイオキシン、サイトカインシグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) ダイオキシン汚染は生体に対して皮膚毒性、発癌、生殖機能異常、免疫機能低下などの影響をもたらす。

(2) ダイオキシンの免疫系への影響の一つとしてアレルギー疾患の増悪へ関与する可能性も指摘されているが、よく分かっていない。

(3) 我々は **IL-4** の新規の生物活性の検索を行うため、マイクロアレイを用いて **B** 細胞

における **IL-4** 誘導遺伝子の検索を行った。その結果得られた誘導遺伝子の中に、ダイオキシン受容体(**AhR**)が含まれていた。

(4) **IL-4/IL-13** といったサイトカイン刺激によってヒトやマウスの **B** リンパ球におけるダイオキシン受容体発現が誘導されるばかりでなく、活性化されることが分かった。

2. 研究の目的

(1) **IL-4/IL-13** による **AhR** 発現誘導機序

の解明。

(2) **IL-4/IL-13** による **AhR** 活性化機序の解明。

(3) **B** 細胞以外の生体細胞における **IL-4/IL-13** による **AhR** 誘導及び活性化の検討

(4) **AhR** 標的遺伝子の検索

3. 研究の方法

(1) ヒト **B** 細胞株を用いてルシフェラーゼによるレポーターアッセイにより **AhR** 遺伝子のプロモーター解析を行う。

(2) **AhR** は通常シャペロンと結合して細胞質に存在している。**IL-4** により誘導された **AhR** がダイオキシン非存在下で活性化するのは **IL-4** が直接、あるいは何らかの分子を介して **AhR** と相互作用し、構造変化をもたらすものと考えられる。本研究では **IL-4** 刺激 **B** 細胞を **AhR** 抗体で免疫沈降することにより、**AhR** と相互作用するタンパク質分子の検索を行う。

(3) 気道上皮細胞や皮膚角化細胞など **B** 細胞以外のヒトプライマリー細胞を用いて **IL-4/IL-13** による **AhR** 誘導を検討する。また **CYP1A1** 等薬物代謝酵素の誘導を指標にこういった細胞で **IL-4/IL-13** による **AhR** 活性化および **TCDD** との共刺激による相乗効果の有無を検討する。

4. 研究成果

(1) **IL-4** による **AhR** の発現誘導機序の解析を行うため、ヒト **AhR** 遺伝子の転写開始点より 3kb 上流の配列をプロモーター挿入部位に組み込んだレポータープラスミドを作製した。このプラスミドを HEK293T 細胞に一過性発現させ、恒常的な転写活性を確認した。また **IL-4** 刺激に反応する転写因子結合部位の同定を行うべく、様々な長さのプロモーター配列を有するコンストラクトを計 5 種類作製し、種々の細胞株に遺伝子導入して検討した。

(2) 気管支喘息やアトピー性皮膚炎といったアレルギー疾患において重要な役割を果たす一方、生体内でダイオキシンに曝露される細胞でもある皮膚角化細胞、気道上皮細胞などを用いて **IL-4/IL-13** 刺激による **AhR** 発現誘導の有無を解析した。その結果ヒト初代培養角化細胞、HaCaT 細胞においてわずかに **IL-4/IL-13** による **AhR** 発現誘導が見られた。またヒト気道上皮系細胞株である BEAS-2B では **AhR** 及びその下流の薬物代謝酵素の一つである **CYP1B1** の発現誘導が認められた。これらのサイトカイン刺激による **AhR** 発現誘導はリンパ球特異的なものではなく、アレルギー疾患発症に関わる種々の細胞でも共通のクロストーク機構が存在することが示唆された。

(3) **IL-4** 刺激後の **B** 細胞や皮膚角化細胞に

おける薬物代謝活性の測定を行った。**TCDD** 刺激後の HepG2 細胞と比較すると薬物代謝活性の亢進は見られなかった。さらに細胞分画を行い、精製ミクロソームを用いた検討を行ったが、**B** 細胞における薬物代謝活性は検出されなかった。**B** 細胞に発現した **AhR** は転写因子として他の遺伝子発現誘導に寄与しているものと考えられた。

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 12 件)

- ① Kanaji S, Kanaji T, Honda M, et al. Identification of four novel mutations in *F5* associated with congenital factor V deficiency. *Int J Hematol*. 2009; 89(1): 71-75. 査読有
- ② Sonoda E, Aoki S, Uchihashi K, Soejima H, Kanaji S, Izuhara K, Satoh S, Fujitani N, Sugihara H, Toda S. A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cell-like cells. *Endocrinology*. 2008; 149(10): 4794-98. 査読有
- ③ Izuhara K, Kanaji S, Arima K, Ohta S, Shiraishi H. Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites. *Med Chem*. 2008 ;4(4):322-27. 査読有
- ④ 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*. 2008 ;65(16):2541-53. 査読有
- ⑤ Honjo E, Shoyama Y, Tamada T, Shigematsu H, Hatanaka T, Kanaji S, Arima K, Ito Y, Izuhara K, Kuroki R. Expression of the extracellular region of the human

- interleukin-4 receptor alpha chain and interleukin-13 receptor alpha chain by a silkworm-baculovirus system. *Protein Expr Purif.* 2008; 60(1): 25-30. 査読有
- ⑥ Kanaji S, Kanaji T, Migita M, Kunishima S, Kunicki TJ, Okamura T, Izuhara K. Characterization of a patient with atypical amegakaryocytic thrombocytopenia. *Eur J Haematol.* 2008; 80: 361-64. 査読有
- ⑦ Nakao I, Kanaji S, Ohta S, Matsushita H, Arima K, Yuyama N, Yamaya M, Nakayama K, Kubo H, Watanabe M, Sagara H, Sugiyama K, Tanaka H, Toda S, Hayashi H, Nakajima A, Inoue M, Suzuki K, Okinami S, Nagai H, Hasegawa M, Fukuda T, Green ED, Izuhara K. Identification of pendrin as a common mediator for mucus production in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol.* 2008; 180: 6262-69. 査読有
- ⑧ Kanaji S, Tanaka Y, Sakata Y, Takeshita K, Arima K, Ohta S, Hansell EJ, Caffrey C, Mottram JC, Lowther J, Donnelly S, Stack C, Kadowaki T, Yamamoto K, McKerrow JH, Dalton JP, Coombs GH, Izuhara K. Squamous cell carcinoma antigen 1 is an inhibitor of parasite-derived cysteine proteases. *FEBS Lett.* 2007; 581: 4260-64. 査読有
- ⑨ Izuhara K, Arima K, Kanaji S, Kanaji T, Ohta S. IL-13 and its signal pathway: promising targets in the development of a therapeutic agent for bronchial asthma. *Current Signal Transduction Therapy* 2007 VOL. 2, 31. 査読有
- ⑩ Cheli Y, Kanaji S, Jacquelin B, Chang M, Nugent DJ, Kunicki TJ. Transcriptional and epigenetic regulation of the integrin collagen receptor locus ITGA1-PELO-ITGA2. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1769: 546-58. 査読有
- ⑪ Izuhara K, Kanaji S, Ohta S, Arima K. Clarification of the pathogenesis and development of clinical examination for allergic diseases、臨床病理、55 (4) 369-74, 2007, 査読有
- ⑫ 出原賢治、有馬和彦、金地佐千子、太田昭一郎、アトピー性皮膚炎患者におけるIL-4、IL-13 シグナルの遺伝子変異、炎症と免疫、15(4), 487-492, 2007, 査読有
- [学会発表] (計 12 件)
- ① ▪ Kenji Izuhara, Sachiko Kanaji, Isao Nakao I, Kazuhiko Arima, Aya Nakajima, Hidetomo Matsushita, Shoichiro Ohta, Hiroyuki Tanaka, 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. 2008 年 5 月 4 日、キュラソー島(NETH)
- ② ▪ 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、2007 年 11 月 23 日、大阪
- ③ ▪ 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、第 54 回日本臨床検査医学会学術集会 (シンポジウム)、2007 年 11 月 23 日、大阪
- ④ ▪ 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、永井博弼、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帯Pendrinの役割、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
- ⑤ ▪ 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、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」、2007 年 11 月 4 日、福岡
- ⑥ ▪ 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、永井博弼、福田健、出原賢治、Pendrinは気管支喘息における粘液産生に關与する、第37回日本

免疫学会総会・学術集会、2007年1月20日、東京

- ⑦ ▪ 金地泰典、金地佐千子、右田昌宏、国島伸治、出原賢治、岡村孝、無巨核球性血小板減少症患者におけるc-mplとGPVIの発現相関、第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会（合同総会）、2007年10月11日、横浜
- ⑧ ▪ 出原賢治、金地佐千子、有馬和彦、太田昭一郎、サイトカイン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、第28回日本炎症・再生医学会、2007年8月7日、東京
- ⑨ ▪ 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、第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20日、東京
- ⑩ ▪ 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、第57回日本アレルギー学会秋季学術大会（シンポジウム）2007年11月3日、東京
- ⑪ ▪ 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、第57回日本アレルギー学会秋季学術大会（ミニシンポジウム）、2007年11月2日、横浜
- ⑫ ▪ Kenji Izuhara, Sachiko Kanaji, Isao Nakao, Kazuhiko Arima, Aya Nakajima, Hidetomo, Matsushita, Shoichiro Ohta, Noriko Yuyama, Mutsuo Yayama, Katsutoshi Nakayama, Hiroshi Kubo, Hiroyuki Tanaka, Hiroich Nagai, Makoto Inoue, and Mamoru Hasegawa, Involvement of pendrin, an anion transporter in mucus hyperproduction of bronchial asthma, 13th International Congress of Mucosal Immunology 2007年7月9-12日、東京

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金地 佐千子 (KANAJI SACHIKO)

佐賀大学・医学部 ・助教

研究者番号：50363429

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

研究者番号：