

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591284

研究課題名（和文） イオンチャンネルを介した気管支喘息発症機序の解明と創薬の開発

研究課題名（英文） The pathogenesis of bronchial asthma via an anion channel, pendrin

研究代表者

鈴木 章一 (SUZUKI SHOICHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：40253695

研究成果の概要（和文）：気管支喘息の病態形成においてIL-13により誘導される陰イオンチャンネル「ペンドリン」が重要であることが示唆されていた。本研究においてペンドリンが喘息の病態形成に関与していることを明らかにすると共にペンドリンにより気道管腔に輸送されたチオシアネートイオンがヘムペルオキシダーゼの酵素反応によりヒポチオシアン酸へと変換され、これが気道上皮細胞に作用し、NF- κ B や ERK を活性化することで炎症反応が増幅し喘息の病態が増悪するという喘息病態形成機序の新たな仮説を提示することが出来た。

研究成果の概要（英文）：It is suggested that Pendrin, which is an anion channel induced by IL-13, is important for the pathogenesis of bronchial asthma. In this study, we confirmed the involvement of Pendrin in the pathogenesis of bronchial asthma, and present a novel hypothesis that a thiocyanate ion transported by Pendrin to the airway surface is converted to a hypothiocyanous acid by heme-peroxidase enzymes, and then this acid affects airway epithelial cells and amplifies allergic airway inflammation through the activation of NF- κ B and ERK.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：気管支喘息、イオンチャンネル、ヒポチオシアン酸、ペルオキシダーゼ、ペンドリン

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息などアレルギー疾患の発症機序にTh2型サイトカインが重要であるが、これらの中でも特にインターロイキン13(IL-13)が中心的な役割を果たしていることが、モデルマウスを用いた研究により示されていた

(Science, 282, 2261, 1998)。IL-13の標的胞として、気道上皮細胞が着目されていたものの、国内外を問わず、この細胞においてIL-13がどのようなエフェクター分子を誘導してアレルギー疾患の病態が形成されるのかという詳細な分子機序についてはほとんど明らかにされ

ていなかった。この点を明らかにするために、報告者らはマイクロアレイ法を用いた網羅的解析を行い、気道上皮細胞においてIL-13により誘導される遺伝子のひとつとしてイオンチャンネルであるペンドリンを見いだした。さらにこの分子の解析を進め、喘息患者の肺組織や喘息モデルマウスの肺組織において、気道上皮細胞の管腔側にペンドリンが強く発現されていること、気道上皮細胞株にペンドリンを強制発現させると主要なムチンタンパク質であるMUC5AC遺伝子の発現が増加すること、マウス個体の気道上皮細胞にセンダイウイルスを用いてペンドリン遺伝子を強制発現させるとムチンの産生が増加することを見だし、ペンドリンが気管支喘息の病態形成に関与している可能性を見いだした (J Immunol, 280, 6262, 2008)。しかしながらペンドリンを介した病態形成の詳細なメカニズムは全く不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は気管支喘息の発症機序における気道上皮細胞の役割に着目し、気道上皮細胞が発現する陰イオンチャンネル「ペンドリン」を介した気管支喘息の病態形成の分子機序を解明して、ペンドリンを標的とした新規の創薬開発に役立てることを目的とする。具体的にはペンドリン欠損マウスに喘息を誘導して野生型マウスの喘息の病態と比較し、喘息病態形成におけるペンドリンの重要性を明らかにすること、さらに、ペンドリンにより気道管腔側へ輸送されるチオシアネートイオン及び、このイオンからヘムペルオキシダーゼの酵素反応により生成するヒポチオシアン酸が喘息モデルマウスの病態や気道上皮細胞に与える影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウスおよびペンドリン欠損マウスに卵白アルブミン(OVA)をアジュバント(水酸化アルミニウム)と共に腹腔内に投与して感作させた後、OVAで暴露した(感作後22, 26, 30日後にOVAを吸入させた)。最終暴露から24時間後にメサコリンで刺激し全身型フレチスモグラフを用いて気道過敏性の程度を解析した。また最終暴露から48時間後に気管支肺胞洗浄を行い、洗浄液中の炎症細胞の種類と数を調べ、同時に肺組織を摘出し、PAS染色やヘマトキシリン/エオジン染色により組織像を観察した。また喘息病態形成におけるチオシアネートイオンおよびヒポチオシアン酸の関与を明らかにするために、上記に示したOVA誘導喘息マウスを作製

する際にチオシアネートイオンあるいはヘムペルオキシダーゼの阻害剤であるメチマゾールを飲水させて同様の解析を行った。In vitroで気道上皮細胞に対するヒポチオシアン酸の作用を明らかにするためにラクトペルオキシダーゼを用いてヒポチオシアン酸を調製し、ヒト気道上皮細胞株の培養液に添加して刺激した後、生存率やRT-PCRによる各種炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルの解析やEMSAによるNF- κ Bの活性化の解析を行った。

4. 研究成果

上記3に示した方法で解析することにより以下に示す成果が得られた。

(1) ペンドリンを欠損したOVA誘導喘息マウスの気道過敏性は野生型マウスのそれと同等レベルであったが、好酸球や好中球の肺組織への細胞浸潤が著しく低下しておりペンドリンが喘息病態形成に関与していることを確認した。(2) チオシアネートイオンを飲水に加えて喘息を誘導させると、飲水させてない喘息マウスよりも気道過敏性が亢進し、炎症細胞浸潤も増加することが明らかになった。この結果からペンドリンにより気道管腔側に輸送されるチオシアネートイオンは喘息の病態を増悪させる因子であることが強く示唆された。(3) 気道管腔のチオシアネートイオンは気道管腔に分泌されたラクトペルオキシダーゼや好中球や好酸球から放出されたミエロペルオキシダーゼ(MPO)や好酸球ペルオキシダーゼ(EPO)といったヘムペルオキシダーゼの酵素反応によりヒポチオシアン酸へと変換されることが知られているので、ヘムペルオキシダーゼの阻害剤であるメチマゾールを飲水させてヒポチオシアン酸が産生されないような状況下で喘息を誘導させると、気道過敏性亢進、炎症細胞浸潤、杯細胞過形成といった喘息の病態が著しく抑制されることを見いだした。この結果よりペンドリンにより輸送されたチオシアネートイオンがヘムペルオキシダーゼの働きによりヒポチオシアン酸へと変換された後、この酸の作用により喘息の病態が増悪する可能性が考えられた。(4) ヒポチオシアン酸が喘息の病態を増悪させる可能性をin vitroでも示すために、ヒト気道上皮細胞株であるH292細胞をヒポチオシアン酸で刺激し培養したところ、喘息の病態形成に深く関与しているERKやNF- κ Bの活性化が生じることを観察した。(5) NF- κ Bの活性化に伴いIL-8, IL-1 β , IL-6といった炎症性サイトカインのみならず喘息の病態形成に深く関与していることが示されているGM-CSF、フラクタルカインやTSLPといったサイトカイン遺伝子の発現がヒポチオシアン酸により誘導されることを明らかにした。このよう

に in vivo で得られた結果を支持する結果を in vitro でも得ることができた。(6) ヒポチオシアン酸により活性化される NF- κ B の構成因子を調べたところ、p52、p65、c-Rel 及び Rel-B は検出されず、p50 のみ検出され、ヒポチオシアン酸により活性化される NF- κ B は p50 のホモダイマーから構成されていることがわかった。p50 は転写活性化ドメインを保有していないので、ヒポチオシアン酸は転写活性化ドメインを有する他の因子をも同時に活性化しこれが p50 と複合体を形成して炎症性サイトカインの遺伝子が誘導されると考えられた。(7) また H292 細胞をヒポチオシアン酸処理し、細胞内レドックスの状態を調べたところ、還元型グルタチオンの量が顕著に減少し、酸化型グルタチオンの量が増加していたので、ヒポチオシアン酸によるレドックス変化が NF- κ B の活性化に関わると考えられた。しかし過酸化水素により H292 細胞の細胞内レドックスをヒポチオシアン酸刺激時と同様な状態へ変化させても NF- κ B は活性化されなかったので、ヒポチオシアン酸は単に細胞内レドックスを変化させるだけではなく、この酸に特有の作用機構が存在し、これにより NF- κ B が活性化される可能性が考えられた。

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 13 件)

- ① Charity Nofziger, Silvia Dossena, Shoichi Suzuki, Kenji Izuhara, and Markus Paulmichl, Pendrin function in airway epithelia, *Cell. Physiol. Biochem*, 査読有り, Vol 28, No. 3, 2011, pp571-578
- ② Hidetomo Matsushita, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraishi, Shoichi Suzuki, Kazuhiko Arima, Shuji Toda, Hiroyuki Tanaka, Hiroichi Nagai, Masao Kimoto, Akira Inokuchi, and Kenji Izuhara, Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells, *Int Immunol*, 査読有り, Vol 22, No. 9, 2010, pp739-747
- ③ 出原賢治, 白石裕士, 鈴木章一, 太田昭一郎, 炎症メディエーター主なサイトカイン インターロイキン 13, *日本臨床*, 査読無し, Vol 68, 2010, pp141-144
- ④ 出原賢治, 太田昭一郎, 白石裕士, 鈴木章一, アレルギー疾患の生化学的検

査方法、臨床と研究、査読無し、Vol 87, 2010, pp221-225

- ⑤ Takachika Ito, Shoichi Suzuki, Sachiko Kanaji, Hiroshi Shiraishi, Shoichiro Ohta, Kazuhiko Arima, Go Tanaka, Taro Tamada, Eijiro Honjo, K Christopher Garcia, Ryota Kuroki, and Kenji Izuhara, Distinct structural requirements for interleukin-4 (IL-4) and IL-13 binding to the shared IL-13 receptor facilitate cellular tuning of cytokine responsiveness. *J Biol Chem*, 査読有り, Vol 284, No. 36, 2009, pp24289-24296,
- ⑥ K Izuhara, S Ohta, H Shiraishi, S Suzuki, K Taniguchi, S Toda, T Tanabe, M Yasuo, K Kubo, T Hoshino, and H Aizawa, The mechanism of mucus production in bronchial asthma. *Curr. Med. Chem.* 査読有り, Vol 16, No. 22, 2009, pp2867-2875
- ⑦ 出原賢治, 白石裕士, 鈴木章一, 太田昭一郎 IL-4/IL-13 で誘導されるアレルギー性炎症、*実験医学増刊号*、査読無し、Vol 27, 2009, pp3297-3302

[学会発表] (計 8 件)

- ① Shoichiro Ohta, Rumiko Shibata, Yoshifumi Nakao, Yoshinori Azuma, Kazuto Taniguchi, Kazuhiko Arima, Shoichi Suzuki, Hiroshi Shiraishi, Tsuyoshi Iwasaka, and Kenji Izuhara Development of combined measurement of squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 as a potential companion diagnostic for anti-IL-4/IL-13 therapies in allergic diseases. *21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Berlin, Germany, 5/15-19/2011)*
- ② 出原賢治、マイクロアレイによる IL-13 誘導遺伝子とその機能解析、第 60 回日本アレルギー学会秋季学術学会、2010 11 25、東京
- ③ 鈴木章一、伊藤栄近、白石裕士、太田昭一郎、有馬和彦、出原賢治 Distinct structural requirements for IL-4 and IL-13 binding to the shared IL-13 receptor facilitate cellular tuning of cytokine responsiveness. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 12 4、大阪
- ④ 谷口一登、鈴木章一、濱崎雄平、出原賢治、気管支喘息における陰イオンチャンネルの役割、第 46 回日本小児アレルギー学会、2009 12 5、福岡

〔図書〕(計1件)

- ① Kenji Izuhara, Shoichiro Ohta, Hiroshi Shiraishi, and Shoichi Suzuki Interleukin 4, interleukin 13, and interleukin 9. Inflammation and Allergy Drug Design 175-185 Blackwell Publishing, Chichester, UK (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：気管支喘息の予防又は治療薬及びそのスクリーニング方法

発明者：出原賢治、太田昭一郎、白石裕士、有馬和彦、鈴木章一

権利者：佐賀大学

種類：特願

番号：2012-011838

出願年月日：平成24年1月24日

国内外の別：国内

○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

<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/medbiochem/publications.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 章一 (SUZUKI SHOICHI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：40253695

(2) 研究分担者

出原 賢治 (IZUHARA KENJI)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：00270463

(3) 連携研究者

なし