

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 4月 6日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659025

研究課題名（和文） アレルギー反応増悪化に関わる新規化学物質受容機構の解明

研究課題名（英文） Novel recognition mechanisms to chemical compounds which enhance allergic responses

研究代表者

平澤 典保 (HIRASAWA NORIYASU)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80181155

研究成果の概要（和文）：

代表者は m-キシレンをマウス皮膚に塗布した場合に 皮膚上皮組織での thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の産生が強く誘導されることを見だし、その化学物質受容機序について解析した。まず、m-キシレンの受容蛋白を m-キシレン-アフィニティービーズにより分画し、同定した。そのうちの 1 つについて、Western blot 法でリガンドへの特異的結合を確認した。また TSLP の恒常的に産生する上皮細胞株において、TSLP の産生には ERK が大きく関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We found that xylene induces a allergy-inducing cytokine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) production. In this study, we prepared xylene-bound affinity gels and identified a candidate which selectively binds to xylene. In addition, in an epithelial cell line, we found that ERK plays an important role in induction of TSLP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	0	2,100,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	210,000	3,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境衛生学

キーワード：TSLP、キシレン、ケラチノサイト、化学物質認識蛋白質、アレルギー

1. 研究開始当初の背景

近年、アレルギー性疾患を有する患者数の増加が社会的問題となっている。私たちは環境中の化学物質がアレルギー反応誘発、増悪化に寄与しているのではないかと考えた。化学物質が最初に反応する上皮細胞であるが、近年、上皮細胞が産生する thymic stromal lymphopoietin (TSLP) がアレルギー反応の誘発を引き起こすためのマスター

スイッチであることが示唆されてきた。そこで、私たちは住環境中に存在する種々化合物およびその誘導体をマウス耳介に塗布するモデルを作製し、化学物質の TSLP 産生誘導作用を解析した。その結果、m-キシレンならびに 1,2,4-トリメチルキシレンに強い TSLP 産生誘導作用があること、また塩化ピクリル誘発接触皮膚炎モデルにおいて、m-キシレンを塗布すると、Th1/Th2 免疫バランスが Th2

優位へと変化し、アレルギー炎症の増悪化がみられることを明らかにした。さらにこのアレルギー性炎症増悪化作用は TSLP 受容体ノックアウトマウスにおいて減弱することから、TSLP 産生を介するものであることが示唆された。

さらに、キシレン類似化合物の TSLP 誘導活性を比較したところ、TSLP 誘導活性は、m-キシレンが最も強く、o-キシレンが最も弱く、メチル基の位置により活性が大きく異なることから、メチル基の位置を認識する機構すなわち受容体・認識蛋白質が存在することが考えられた。しかし、m-キシレンがどのような機序により認識され、TSLP の産生を誘導するかについては明らかではない。少なくとも、化学物質の受容体の一つであるアリル hidrocarbon 受容体刺激化学物質では TSLP の産生は亢進しないことを確認しており、新規の受容機構があると推察された。

2. 研究の目的

本研究は、m-キシレンを選択的に認識、受容する蛋白質を同定し、さらに化学物質による TSLP 産生機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) アフィニティーゲルの調製

ECH Sepharose 4B に 3,5-ジメチルアニリン、3,4-ジメチルアニリン、2,5-ジメチルアニリンおよびアニリンを常法によりカップリングさせた (図 1)。

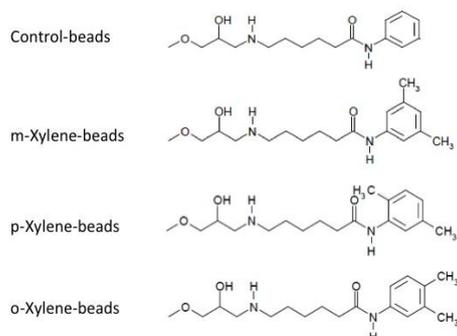


図 1 アフィニティーゲルのリガンド

2) 結合蛋白質の分画と質量分析装置による同定

マウス皮膚組織のホモジネート中の蛋白質から上記アフィニティービーズを用いて結合蛋白質を分画した。これを 2 次元電気泳動により分画し、m-キシレン-アフィニティービーズに多く結合する蛋白スポットを切り出し、常法により質量分析装置で蛋白を同定した。

3) Western blot

m-キシレン結合ビーズおよびベンゼン結

合ビーズに結合した蛋白質を特異抗体を用いて Western blot した。

4) レポーター遺伝子アッセイ

ヒト TSLP プロモーター領域 (-4.3kbp) を含むレポーター遺伝子は理化学研究所 玉利博士より譲与された。常法により dual reporter gene assay を行った。

5) MAP キナーゼ阻害薬の効果

TSLP を恒常的に産生する細胞に各種阻害薬を添加し、24 時間培養後、培養上清中の TSLP を ELISA により測定した。

4. 研究成果

1) m-キシレン結合蛋白質の分画と同定

m-キシレン-アフィニティー、2 次元電気泳動法により分画したところ、図 2 に示すように、m-キシレンに選択的に結合する十数個のスポットが認められた (図 2)。

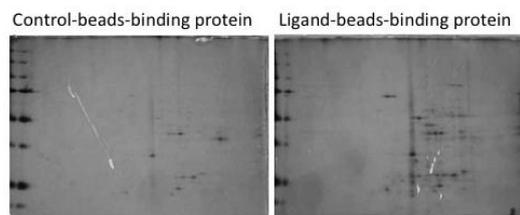


図 2 結合蛋白質の 2 次元電気泳動

これらのスポットを切り出し、トリプシン処理後、LC-MS により蛋白質を同定した。

3) Western blot による確認

これらの蛋白分子の中には、アトピー性皮膚炎患者において発現が低下していることが報告されている蛋白質があった。アトピー性皮膚炎患者の皮膚組織では TSLP の産生も亢進していることが知られている。そこでこの蛋白質に注目し、Western blot 法によりそのリガンドへの結合を確認した。その結果、TSLP 産生誘導活性の強さは m-キシレン > p-キシレン > o-キシレンの順であったが、本蛋白質の結合量も同様であった (図 3)。

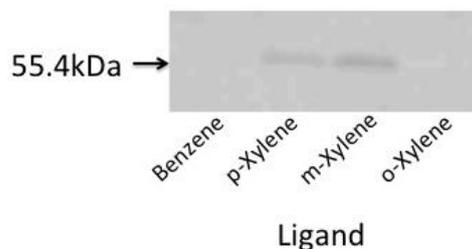


図 3 候補蛋白質の構造選択的結合
TSLP 産生誘導の強さと結合量は相関した。

現在、この蛋白質の酵素活性を m-キシレンが抑制するかどうか解析中である。

4) TSLP レポーター遺伝子アッセイ

筆者らは TSLP を恒常的に高濃度に産生する細胞を見いだした。TSLP の産生亢進に関わるシグナル経路を明らかにするために、本細胞と TSLP を恒常的には産生しないマウス上皮細胞株 PAM212 細胞において TSLP プロモーター領域を含むレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果、用いたプロモーター領域 (-4.3 kbp) では両細胞に差がみられなかった。この結果は、用いたプロモーター領域外に TSLP の恒常的産生に寄与する領域があることを示唆している。現在、TSLP 産生増大に必要な部位の特定を試みている。

5) MAP キナーゼ阻害薬の効果

本細胞は、リン酸化蛋白アレイ法により ERK, p38 MAP キナーゼ (p38 MAPK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化が亢進していることが明らかになった。そこで TSLP の産生における各種 MAP キナーゼの関与を検討した。その結果、ERK の活性化を抑制する U0126 は強く TSLP の産生を抑制したが、p38 MAPK や JNK の阻害薬は抑制しなかった (図 4)。

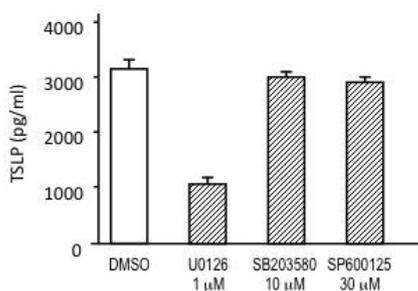


図 4 MAP キナーゼ阻害薬の効果

以上の結果から、アトピー性皮膚炎の原因と考えられる蛋白質が、m-キシレンと結合することが示唆された。m-キシレンが本蛋白質の活性を抑制しているかどうか現在検討中である。また、TSLP 産生のシグナル分子として、ERK が寄与していることも明らかになった。

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 21 件)

1. Hetero-oligomerization between adenosine A1 and thromboxane A2 receptors affects cellular signal transduction on stimulation with high

and low concentrations of agonists for both receptors. Mizuno, N., Suzuki, T., Hirasawa, N., Nakahata, N. *Eur. J. Pharmacol.* 677: 5-14 (2012) (査読あり)

DOI:10.1016/j.ejphar.2011.12.006

2. Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice. Satou, N., Ishihara, K., Hiratsuka, M., Tanaka, H., Endo, Y., Saito, S., Iwatate, Y., Leonard, W.J., Hirasawa, N. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 157: 194-201 (2011) (査読あり)

DOI:10.1159/000327545

3. Enhancement of nickel elution by lipopolysaccharide-induced inflammation. Tanaka, R., Goi, Y., Ishihara, K., Ueda, K., Narushima, T., Ohtsu, H., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. *J. Derm. Sci.* 62: 50-57 (2011) (査読あり)

DOI:10.1016/j.jdermsci.2010.12.006

4. Assessment of the release of nickel from biomaterials in vivo and in vitro: enhancement by lipopolysaccharide. Tanaka, R., Goi, Y., Ishihara, K., Ueda, K., Narushima, T., Ohtsu, H., Ohuchi, K., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. *Inflam. Regene.* 31: 302-306 (2011) (査読あり)

<http://www.jsir.gr.jp/journal/>

5. Induction of thymic stromal lymphopoietin by chemical compounds in vivo and exacerbation of allergy. Sato, N., Ishihara, K., Hiratsuka, M., Hirasawa, N. *Inflam. Regene.* 31: 184-188 (2011) (査読あり)

<http://www.jsir.gr.jp/journal/>

6. Suppression of intracellular calcium levels and inhibition of degranulation in RBL-2H3 mast cells by the sesquiterpene lactone parthenolide. Hong, J., Aoyama, S., Hirasawa, N., Zee, O., Ishihara, K., Hashida, C., Kimura, M., Seyama, T., Ohuchi, K. *Planta Medica* 77: 252-256 (2011) (査

- 読あり)
DOI:10.1055/s-0030-1250221
7. Novel Single Nucleotide Polymorphism of the CYP2A13 gene in Japanese individuals. Tamaki, Y., Honda, M., Muroi, Y., Arai, T., Sugimura, H., Matsubara, Y., Kanno, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metabolism & Pharmacokinetics* 26: 544-547 (2011) (査読あり)
DOI:10.2133/dmpk.DMPK-11-SC-033
 8. Association between Cancer Risk and Drug Metabolizing Enzyme Gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) Polymorphisms in Japanese Cases of Lung Cancer. Tamaki, Y., Arai, T., Sugimura, H., Sasaki, T., Honda, M., Muroi, Y., Matsubara, Y., Kanno, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metabolism & Pharmacokinetics* 26: 516-522 (2011) (査読あり)
DOI:10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-046
 9. Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of anti-malarial artemether. Honda, M., Muroi, Y., Tamaki, Y., Saigusa, D., Suzuki, N., Tomioka, Y., Matsubara, Y., Oda, A., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metab. Dispos.* 39: 1860-1865 (2011) (査読あり)
DOI:10.1124/dmd.111.040352
 10. 平澤典保 ステロイドの作用機序と耐性化メカニズム アレルギーの臨床 (The Allergy in Practice) 31: 1137-1141 (2011) (査読なし)
 11. 平澤典保 キシレン、トリメチルベンゼンによる表皮からのTSLP産生誘導 臨床と免疫・アレルギー科 56: 478-484 (2011) (査読なし)
 12. 平澤典保, Hong JangJa, 木邑道夫, 大内和雄 抗炎症薬 JOHNS 27: 1782-1786 (2011) (査読なし)
 13. 平澤典保, 奥直人 薬学新時代の大学院教育 薬学雑誌 131: 931 (2011) (査読なし)
DOI:10.1248/yakushi.131.931
 14. 富岡佳久, 平澤典保, 永沼章 6年制の大学院教育: 東北大学の場合 薬学雑誌 131: 932-938 (2011) (査読なし)
DOI:10.1248/yakushi.131.933
 15. 平澤典保, Hong JangJa, 木邑道夫, 大内和雄 TSLP 炎症と免疫 19: 437-440 (2011) (査読なし)
 16. 平澤典保 ステロイド薬の基礎 アレルギー 60:193-198 (2011) (査読なし)
<http://jja.jsaweb.jp/2011/060020193e.html>
 17. Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations. Ishihara, K., Okuyama, S., Kumano, S., Iida, K., Hamana, H., Murakoshi, M., Kobayashi, T., Usami, S., Ikeda, K., Haga, Y., Tsumoto, K., Nakamura, H., Hirasawa, N., Wada, H. *Hearing Research* 270: 110-118 (2010) (査読あり)
DOI:10.1016/j.heares.2010.08.015
 18. Kinetic of 6-thioxanthine metabolism by allelic variants of xanthine oxidase. Kudo, M., Sasaki, T., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25: 361-366 (2010) (査読あり)
DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RG-029
 19. Functional characterization of genetic polymorphisms identified in the promoter region of the xanthine oxidase gene. Kudo, M., Sasaki, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25: 599-604 (2010) (査読あり)
DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-10-NT-054
 20. Functional characterization of 26 CYP2B6 allelic variants (CYP2B6.2-CYP2B6.28, except CYP2B6.22). Watanabe, T., Sakuyama, K., Sasaki, T., Ishii, Y., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M. *Pharmacogenet. Genom.* 20: 459-462 (2010) (査読あり)

DOI:10.1097/FPC.0b013e32833bba0e

21. Involvement of prostaglandins and histamine in Nickel wire-induced acute inflammation in mice. Hirasawa, N., Goi Y., Tanaka, R., Ishihara, K., Ohtsu, H., Ohuchi, K. *J. Biomedical Materials Research Part 93A*: 1306-1311 (2010) (査読あり)
DOI: 10.1002/jbm.a.32628

[学会発表] (計 19 件)

1. 山下紗緒里、佐藤望未、平澤典保 中鎖脂肪酸によるTSLP産生誘導とアレルギー増悪化作用の解析 日本薬学会第132年会(2012年3月28-30日、札幌)
2. 高野貴幸、青島祐佑、田中里奈、浅川三喜、上田恭介、大津浩、成島尚之、平澤典保 マウスにおける金属からのニッケルイオン溶出過程とその制御機構の解析 日本薬学会第132年会(2012年3月28-30日、札幌)
3. 佐藤大樹、平澤典保 前脂肪細胞におけるHDAC阻害薬によるIL-6産生増加とその機序の検討 日本薬学会第132年会(2012年3月28-30日、札幌)
4. 平澤典保 特別講演「化学物質によるTSLP産生とアレルギー増悪化」平成23年度日本薬学会東北支部講演会第33回東北薬学セミナー (2011年12月3日 仙台)
5. 平塚真弘、本田雅志、三枝大輔、鈴木直人、富岡佳久、平澤典保 抗マalaria薬アーテメター代謝におけるCYP2B6遺伝子多型バリエーションの機能解析 第32回日本臨床薬理学会年会 (2011年12月1-3日、浜松)
6. Masahiro Hiratsuka, Yuka Muroi, Kanako Sakuyama, Yui Niinuma, Takahiro Saito, Masamitsu Takahashi and Noriyasu Hirasawa Oxidative metabolism of n-desmethyltamoxifen to endoxifen by Cyp2D6 allelic variants 日本薬物動態学会第26回年会 (2011年11月16-18日、広島)
7. 瀬川良佑、平澤典保 空気嚢型炎症モデルにおけるTSLP産生制御機構の解析 第50回記念日本薬学会東北支部大会 (2011年10月30日、仙台)
8. 佐藤大樹、平澤典保 前脂肪細胞株OP9におけるTLR4刺激によるIL-6産生：HDAC阻害薬の効果 第50回記念日本薬学会東北支部大会 (2011年10月30日、仙台)
9. 平澤典保 金属アレルギーの新たなアプローチ 第15回日本ヒスタミン学会シンポジウム「炎症・アレルギーを巡る最近のトピックス」(2011年10月21-22日 盛岡)
10. 平塚真弘、田巻佑一朗、新井富生、梶村春彦、平澤典保 肺がん発症リスクと薬物代謝酵素遺伝子多型との関連 第21回日本医療薬学会年会 (2011年10月1, 2日、神戸)
11. 大澤雄亮、平澤典保 マウスアトピー性皮膚炎モデルにおけるヒスタミンH1およびH4受容体拮抗薬の併用による治療効果 第15回日本ヒスタミン学会 (2011年10月21, 22日、盛岡)
12. 高橋亜希、平塚真弘、本田雅志、田巻佑一朗、室井祐佳、新沼優衣、眞野成康、平澤典保 東北大学病院における腎機能低下患者の割合と腎排泄型薬剤の使用状況調査 第5回日本腎と薬剤研究会学術大会 (2011年9月17, 18日、北九州)
13. Hirasawa, N. An exacerbated allergic dermatitis model in mice and participation of histamine. *2010 International Symposium on New Drug Development (Cheondju, Korea, Nov. 17, 2010)*
14. 平澤典保 マスト細胞とTSLP シンポジウム「秋の夜長とマストセル」第14

回日本ヒスタミン学会 (2010年10月
24-25日、川崎)

15. 田巻佑一郎、新井富生、相村春彦、佐々木崇光、平澤典保、平塚真弘 薬物代謝酵素遺伝子多型と肺がんリスクとの関連 第49回日本薬学会東北支部大会 (2010年10月24日、郡山)
16. 青島有佑、上田恭介、大津浩、成島尚之、小笠原康悦、平澤典保 金属系材料のマウス皮下における腐食挙動 日本金属学会 第147回大会 (2010年秋期) (2010年9月25~27日、札幌)
17. 平澤典保 ステロイド薬の基礎 シンポジウム「アレルギー疾患の薬物治療に役立つ基礎薬理学」 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会 (2010年5月9-10日、京都)
18. 平澤典保 増悪化アレルギー性皮膚炎症におけるヒスタミンの役割 シンポジウム「アレルギー疾患におけるヒスタミン研究の新展開」 第130年会日本薬学会 (2010年3月28-30日、岡山)
19. 田中里奈、五井嘉明、石原研治、上田恭介、成島尚之、大津浩、大内和雄、平澤典保 生体内における金属からのニッケル溶出の簡易測定法の確立と溶出機序の解析 日本薬学会第129年会 (京都、2009年3月26-28日)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: TSLP を恒常的に高発現する細胞、および前記細胞を利用した TSLP 調節剤のスクリーニング方法
発明者: 平澤典保、秀道広
権利者: 東北大学
種類: 出願 (PCT)
番号: PCT/JP2011/33329
出願年月日: H23年6月13日

国内外の別: 国外

○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.pharm.tohoku.ac.jp/-seikatsu/mysitel/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平澤 典保 (HIRASAWA NORIYASU)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 80181155

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: