

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590417

研究課題名(和文)ヒスタミン産生因子とリウマチ関節炎との関連に関する研究

研究課題名(英文)Relationship between Histamine releasing Factor and rheumatoid arthritis

研究代表者

石川 章夫(Ishikawa, Akio)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：80468652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：リウマチ関節炎(RA)などのアレルギーの発症機構を解明するために、HRFに対する抗体を作成し、RAモデルマウスに投与後、発症を抑制した。HRFとRA及びアレルギーとの関連は未だ不明である。HRFとアレルギーとの関連を調べるために、RAマウスとアトピー性皮膚炎(AD)マウスの作成をした。RAやADマウスは炎症部にリンパ球やマクロファージ、マスト細胞の浸潤が見られた。これらの動物でのIgE、ヒスタミンの産生量は増加した。マウスでのHRFの発現を調べるため、HRF抗体の性質を解析した。これらの結果はアレルギー疾患でのIgE、ヒスタミンを介するHRFとの関連を調べる材料となり得る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We made an antibody against HRF to elucidate mechanism for allergic diseases such as a rheumatic arthritis (RA) and controlled the development after the injection of antibody to RA model mice. It is still unclear the correlation with between HRF and RA. To study the association between HRF and allergy, we tried to make RA mouse and atopic dermatitis (AD) mouse. In RA and AD model mice, cellular infiltrations were found as lymphocytes and macrophages and mast cells in the inflammatory region. In these animals IgE and histamine productions decreased. We analyzed the property of the HRF antibody to examine the expression of HRF with the model mice. These results showed the possibility that it could become the materials which examined the correlation between the allergic disease with HRF.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：HRF リウマチ関節炎 ヒスタミン

## 1. 研究開始当初の背景

近年 RA の病態形成に関する研究報告は数多くされているが発症原因や機構は未解明なままである。我々は RA が IL-1 などの炎症性サイトカインの発現亢進などの免疫異常 (Horai; J.Clinical.Inv) により発生することや、さらに血管内の細胞や因子が関節滑膜へ滲出し、腫れと痛みを引き起こすこと、更には破骨細胞と骨芽細胞とのバランスの異常による骨破壊を伴う疾患であることを報告した。骨破壊は RANKL(破骨細胞誘導因子)により破骨前駆細胞を破骨細胞へと分化させる。一方、INF- $\beta$ は破骨細胞の分化を抑制するが、この機構の異常が骨破壊を起こすと報告されている (Takayanagi; Nature)。この疾患の治療には抗 TNF $\alpha$ 抗体薬が使用されているが、完全な治療法には至っていない。我々は HRF に対する抗体を作成し、RA モデルマウスに投与したところ、関節炎の発症を抑制する結果を得た。この結果は RA の発症に HRF が関与すること、さらに、この分子を標的とした治療の可能性を示している。HRF は 1995 年に IgE 依存的に好塩基球からヒスタミンを産生することが報告され (MacDonald; Science)、炎症やアレルギーに関与する分子として知られるようになったが、詳細は不明のままである。この分子は TCTP(Translationally control Tumor Protein)とも呼ばれ、リンパ球の分化段階でのアポトーシスの阻害に関与する報告もある。この分子について我々は HRF がダイオキシンにより発現誘導され、子宮内膜症に発現が高いことを報告した (Oikawa; J. Pathol.)。しかし、RA における HRF の発現と疾患との関連についての報告は全くない。また、HRF に関する生物学的な機能やその機能に関わる分子についての研究報告も散見するのみで、未解決のままである。

## 2. 研究の目的

関節リウマチ(RA)は世界人口の 1%を占め、

未だ完全な治療法が確立されていない。

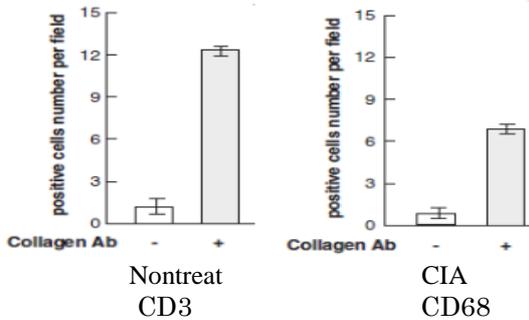
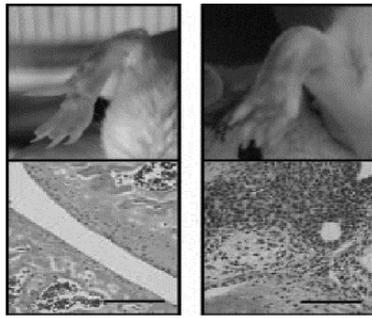
また、ヒスタミン産生因子である HRF (Histamine Releasing Factor)のアレルギー疾患との関係も未だ明らかではない。ところが、我々は HRF に対する抗体を作成し、RA モデルマウスに投与したところ、関節炎の発症を抑制する結果を世界で初めて得ることに成功した。この結果は HRF が新たに RA の発症に関与することや、この分子を標的とした治療の可能性を示している。このことから、本研究では HRF の RA やアレルギー疾患での発症の関与、診断マーカーとしての利用、治療法の可能性について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

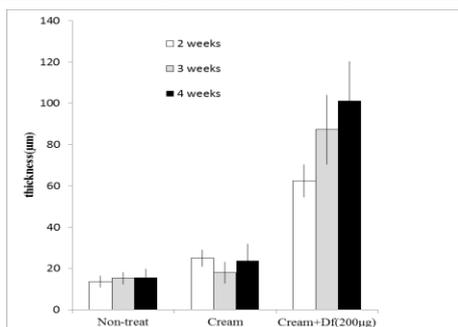
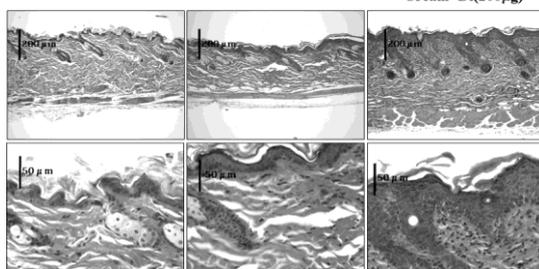
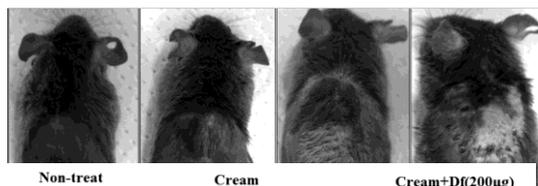
- (1) HRF とアレルギー疾患との関連を調べるために、RA 及びアレルギー病態 (皮膚炎)モデルマウスの作成を行った。これららのマウスの病態の解析を生化学的、病理組織学的手法を用いて行った。
- (2) 作成した抗 HRF 抗体に対する機能を解析するために、抗体の抗原との反応部位、抗体のアイソタイプの解析を行った。これらの抗体の使用法について検討を行った。

## 4. 研究成果

- (1) モデルマウスの作成  
アレルギーモデル動物を作成するために、Balb/c マウスに抗コラーゲンカクテル抗体(CIA)を投与し、2日後に LPS で刺激後に関節の腫脹を確認した。CIA で誘導した脚の関節を病理組織標本で確認した。

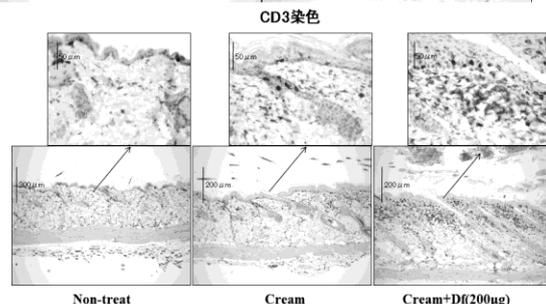
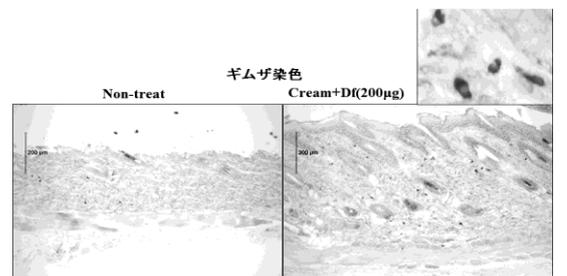


さらに、組織中の浸潤した細胞の解析を免疫染色法にて行った。コラーゲン抗体を投与した群ではT細胞抗原に陽性のものやマクロファージ抗原に陽性細胞が多く存在することを確認することが出来た。続いてアレルギーモデル動物としてアトピー性皮膚炎モデルの作成を試みた。NC/Nga マウスにダニ抗原 (Df) を軟膏と混ぜ、剃毛した背部に1週間2回、4週間塗布し、経過観察と、皮膚及び血液のサンプリングを行った。



間塗布し、経過観察と、皮膚及び血液のサンプリングを行った。

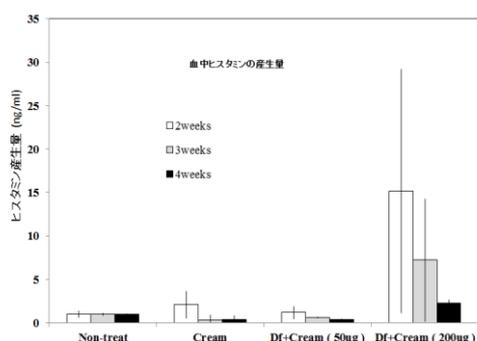
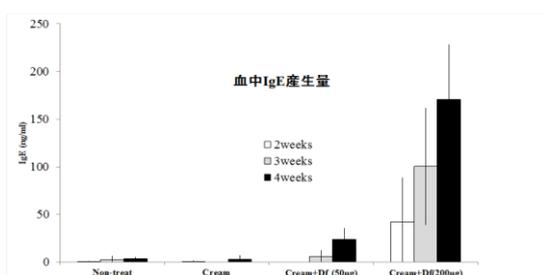
Df を軟膏に混ぜて塗布したマウスの背部は2週間あたりから湿疹が観察された。4週間目にマウスの皮膚を採取し、ホルマリン固定後、薄切 HE 染色を行って観察をすると、Df を処理した群では皮膚の肥厚が確認された。また、病理標本では DF を塗布した群では皮膚への細胞浸潤が多く観察された。浸潤細胞について組織学的な解析を行い、細胞の同定を行った。まず、ギムザ染色を行い組織浸潤細胞の核を観察すると、Df を塗布した群では浸潤した細胞の中に赤紫色に染色された細胞が確認され、他の実験群より染色された細胞数が多いことを確認した。さらに、浸潤細胞の分類を免疫組織学的手法により解析した。T細胞及びマクロファージ系細胞抗原で確認すると DF で処置した群では他の群と比較して DC3 陽性細胞と Iba1 陽性細胞が多いことから浸潤細胞はT細胞とマクロファージであることが判明した。



また、血清中の IgE 及び、ヒスタミン

の産生量を ELISA 法で測定し、炎症関連分子の発現を確認した。IgE の産生は Df 塗布した群で上昇し、経時的に産生が高くなった。一方、ヒスタミンの産生は Df の塗布群で産生が上昇したが、Df 処置後の初期に上昇が見られた。

これらのアレルギー疾患動物は炎症局所にリンパ球及び、単球、肥満細胞の存在を確認した。また、これらの動物での血液中には炎症メディエータの IgE やヒスタミンが上昇することも確認した。



(2) これらの因子の産生と HRF の関連を調べるために作成した HRF 特異的抗体の機能を調べ、抗体の抗原との反応部位、抗体のアイソタイプの解析を行った。

得られたモノクローナル抗体は 9 クローンで、そのうち 3 クローンを ELISA による抗原との反応性から選択した。さらに、抗体の抗原認識部位を決定するために抗原断片を作成して、それぞれの抗体クローンと抗原断片との反応を確認した。その結果、2つのクローンで抗原反応部位が一致した。また、残り 1つのクローンと他の 2つのクローンは抗体のアイソタイプが異なっていた。以上の結果から、これらの抗体を組み合わせることで、HRF の ELISA に応用出来る可

能性が高まり、モデル動物での HRF の発現を検出することが可能なことが予想される。

## 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 8 件)

- ① Wu W., Takanashi M., Borjigin N., Ohno S., Fujita K., Hoshino S., Osaka Y., Tsuchida A., Kuroda M. miRNA-18a modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3 during gastric adenocarcinogenesis. *British J. Cancer*, doi: 10.1038/bjc.2012.587 査読有 108(3), 2013, 653-661.
- ② Yamaguchi G, Takanashi M., Fujita K., Ohira T., Kuroda M., Ikeda N. Isolation of mRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.008 査読有 420(2), 2012, 411-416
- ③ Ohno S., Takanashi M., Sudo K., Ueda S., Ishida A., Matsuyama N., Fujita K., Mizitani T., Ohgi T., Ochiya T., et. al., Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol. Ther.*, doi: 10.1038/mt.2012.180 査読有 21(1) 2012 185-191
- ④ Borjigin N., Ohno S., Wu W., Tanaka M., Suzuki R., Fujita K., Takanashi M., Oikawa K., et. al., TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.063 査読有 427(2) 2012 355-360.
- ⑤ Oikawa K., Tanaka S., Itoh S., Takanashi M., Ozaki T., Muragaki Y., Kuroda M., A novel oncogenic pathway by TLS-CHOP involving repression of MDA-7/ IL-24 expression. *British J. Canc.* doi: 10.1038/bjc.2012.199 査読有 106(12) 2012 1976-1979
- ⑥ Xu M., Takanashi M., Oikawa K., Nishi H., Isaka K., Yoshimoto T., Ohyashiki J., Kuroda M., Identification of a novel role of Septin 10 in paclitaxel-resistance in cancers through a functional genomics screen. *Cancer Sci.*, doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02221.x 査読有 103(4) 2012 821-827
- ⑦ Tsuchida A., Ohno S., Wu W., Borjigin N., Fujita K., Aoki T., Ueda S., Takanashi M., Kuroda M. miR-92 is a key oncogenic

component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci.*, 査読有 102(12), 2011, 2264-2271

- ⑧ Suzuki R., Tanaka M., Takanashi M., Hussain A., Yuan B., Toyoda H., Kuroda M. Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. *Nutrition & metabolism*. doi:10.1186/1743-7075-8-14 査読有 8(14) 2011

[学会発表] (計 11 件)

- ① 高梨正勝 須藤カツ子 松永芳径 石川章夫 大木忠明 濱崎智洋 後藤浩 黒田雅彦 新規核酸を用いた血管新生網膜症に対する分子標的治療薬 第 102 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 6 日～8 日 札幌
- ② Ohno S, Takanashi M., Ohgi T, Mizutani T, Murakami T, Kuroda M., Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver anti-tumor microRNA to breast cancer cells. *Keystones Symposia Conference-Noncording RNAs in Development and cancer*. 2013 年 1 月 20 日～25 日 Vancouver, CANADA
- ③ Oikawa K Takanashi M Niwa M Sun Y Gui T Shimokado A Itoh S Ozaki T Kuroda M Muragaki Y Wapl regulates HP1 expression and levels of various histone H3 tail modification. 第 35 回 日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日～14 日 福岡
- ④ 高梨正勝 須藤カツ子 大野慎一郎 上田しのぶ 石川章夫 黒田雅彦 マウスに経口投与したエクソソームの生体内での安定性と分布 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日～21 日 札幌
- ⑤ 及川恒輔 高梨正勝 黒田雅彦 村垣泰光 粘膜型脂肪肉腫において TLS-CHOP は抗がん性サイトカイン MDA-7/IL-24 の発現を抑制する 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日～21 日 札幌
- ⑥ 高梨正勝 須藤カツ子 松永芳径 大木忠明 濱崎智洋 谷口維紹 臼井嘉彦 後藤浩 黒田雅彦 第 32 回日本眼薬理学会総会 滋賀 2012 年 9 月 15 日～16 日
- ⑦ 高梨正勝 須藤カツ子 松永芳径 石川章夫 大木忠明 濱崎智洋 後藤浩 黒田雅彦 新規核酸を用いた血管新生網膜症に対する分子標的治療法の開発 第 102 回 日本病理学会総会 2012 年 6 月 6 日～8 日 札幌
- ⑧ 那日蘇 大野慎一郎 田中正視 呉偉紅 田中理英子 藤田浩司 高梨正勝 黒田雅彦 TLS-CHOP 癌遺伝子が発現制御する miRNA の解析 第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 26 日～28 日 東京
- ⑨ 倉田厚 呉偉紅 山田正俊 那日蘇 藤田浩司 大野慎一郎 高梨正勝 黒田雅彦 胃低分化癌における in situ hybridization 法を用いた miR-92a およ

び miR-200c の発現低下の意義 第 101 回日本病理学会総会 2012 年 4 月 26 日～28 日 東京

- ⑩ 高梨正勝 須藤カツ子 大野慎一郎 上田しのぶ 石川章夫 黒田雅彦 CD63-GFP を発現したエクソソームのマウス生体内での安定性と分布について 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日～5 日名古屋
- ⑪ 高梨正勝 須藤カツ子 大野慎一郎 上田しのぶ 石川章夫 黒田雅彦 人工型 exosome の生体分布と安定性についての研究 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 28 日～30 日 横浜

[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

石川 章夫 (Ishikawa Akio)  
東京医科大学・医学部・助手  
研究者番号：80468652

### (2) 研究分担者

高梨 正勝 (TAKANASHI, Masakatsu)  
東京医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80312007

### (3) 須藤 カツ子 (SUDO, Katsuko)

東京医科大学・医学部・兼任講師  
研究者番号：50126091

(4)上田 しのぶ(UEDA Shinobu)  
東京医科大学・医学部・助手  
研究者番号：00521874