

Fig 4 RSV-inducible CC chemokine genes

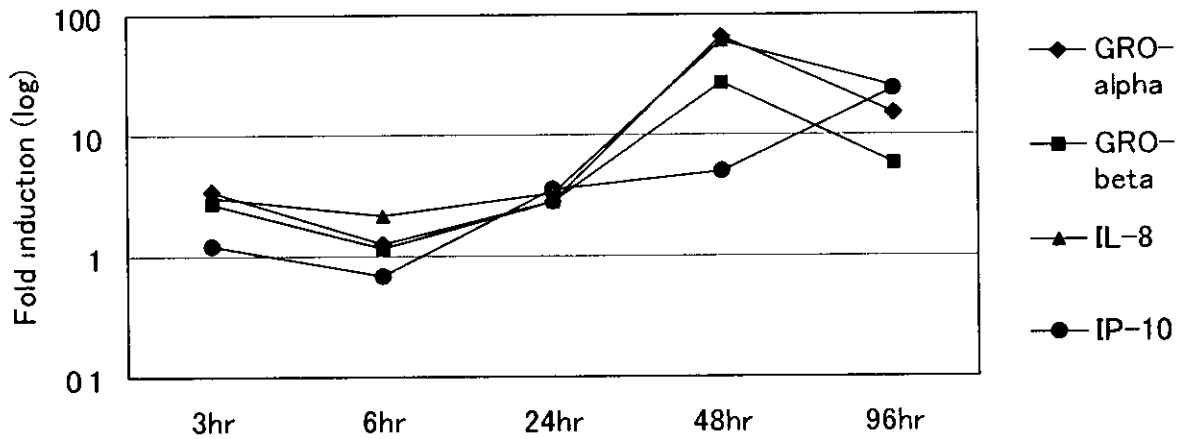


Fig 5 RSV-inducible CXC chemokine genes

厚生省科学研究補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
研究課題名 アレルギー疾患に係わる胎内、胎外因子同定に関する研究
分担課題名 エオタキシン発現制御機構と胎内・胎外因子
IFN- γ やオゾンによる Th1 活性化の影響

分担研究者 荒川 浩一 群馬大学小児科・講師

研究要旨

1) 胎外因子 Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 は、気道上皮細胞でのエオタキシン産生を誘導し、炎症性サイトカインである TNF- α はその産生を増強させる作用を有している。一方、Th1 サイトカインである IFN- γ は、その産生を抑制することか報告されている。今回、これら上皮傷害をきたす重要因子であるエオタキシン産生制御機構に関して、ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B や肺線維芽細胞を用いて、エオタキシンのプロモーターアッセイを行い、炎症性サイトカインと IFN- γ との関連を検討した。その結果、IL-4、TNF- α は濃度依存的にエオタキシンのプロモーターを活性化し、同時添加で相加効果が認められた。また、エオタキシンプロモーター活性化は、IFN- γ の前処理により抑制された。また、オゾン曝露は、IL-4 によるプロモーター活性化を増強した。

2) 胎内因子 母親の妊娠中における要因が児のアレルギー疾患発症と関連するかを前方視的に検討する。さらに、臍帯血のサイトカインやケモカイン、増殖因子などを測定し、その後のアレルギー疾患発現の有無を検討する。現在、生後1年目のアレルギー発症の有無をアンケートにて調査中である。

研究協力者

杉山 幹雄 群馬大学大学院生
滝沢 琢己 群馬大学大学院小児生体防御学
村松 一洋 群馬大学大学院小児生体防御学

A 研究目的

1) 胎外因子の検討 気管支喘息は、近年、病理学的には慢性好酸球性気道炎症性疾患であると認識されるようになった。CCケモカインであるエオタキシンは気道上皮や線維芽細胞から産生され、CCR3受容体を介して気道への好酸球集積に寄与していると考えられている。これによって、好酸球性炎症が導かれ、喘息における特徴的な気道炎症が起こると考えられている。これまで Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 は、気道上皮細胞でのエオタキシン産生を誘導し、炎症性サイトカインである TNF- α はその産生を増強させる作用を有していると報告されている。また、エオタキシンは、IL-4

と TNF- α の作用は相乗的に発現する事か報告され、それは、Stat6 や NF- κ B の活性に依存していることか示された。一方、IFN- γ は感染により発現する重要な Th1 サイトカインであるが、エオタキシンの発現は IFN- γ によって制御されていることが報告されている。例えば、IFN- γ の細胞内シグナルである Stat1 欠損マウスからの気道上皮細胞では、野生型マウスの上皮と比較してエオタキシンの産生は 1.7 倍であり、IFN- γ かエオタキシンの発現を Stat1 依存性に抑制することを示している。このように、エオタキシンの発現に IL-4、TNF- α や IFN- γ が相互に関連して作用していることか示している。しかしながら、この分子機序に関しては明らかにされていない。

乳幼児期の喘息発症に関連するといわれているRSウイルスは、最近、細胞表面に発現する Toll-like receptor 4 (TLR-4) により細胞へ侵入することがあきらかとな

った。TLR-4 の細胞内信号伝達経路は、最終的にはNF- κ B であることが明らかにされている。オゾンは、細胞へ直接侵襲を来すものであり、自然界においては感染とともに上皮障害を来す重要な因子と考えられる。オゾン曝露は細胞内の酸化ストレスをもたらすNF- κ B を介した作用も想定されている。今回、正常ヒト肺線維芽細胞におけるIL-4 によるエオタキシン産生とIFN- γ によるその抑制機構、およびオゾンによる影響を検討することを目的とした。これにより、環境因子である感染、大気汚染であるオゾンと遺伝子発現という胎内因子との係わりを明らかにできると考えられる。

2) 胎内因子の検討 アレルギー発症に係わる胎内因子を同定する目的に、母親の妊娠中における要因が児のアレルギー疾患発症と関連するかを前方視的に検討する。

B 研究方法

1) 胎外因子 ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B、線維芽細胞に、ルシフェラーゼ遺伝子上流にエオタキシン-1 のプロモーター領域を挿入したプラスミドを導入し、IL-4、TNF- α 、及び2者の同時添加にて刺激後に、ルシフェラーゼ活性を測定する。さらに、細胞をIFN- γ あるいはオゾンで前処理しルシフェラーゼ活性への影響を検討した。

2) 胎内因子

対象および方法 群馬県内の開業産科婦人科医院で

2002年 7月～2003年 5月までに出生した健康新生児224名（男児106名、女児118名）、
在胎週数 39.2 \pm 1.6 週

出生体重 3051 \pm 399 g

検討項目は、母親の妊娠中の因子として、アレルギーの既往、喫煙歴、職業の有無と内容、ペットの飼育歴、家族構成などを調査し、保存してある臍帯血中の各種サイトカイン、ケモカインの測定およびRS ウイルス抗体価を検討する。臨床的には、1カ月健診で、実際に湿疹の有無を確認するとと

もに、1歳時点において、アンケート調査を行い、アトピー性皮膚炎や喘鳴性疾患の有無を明らかにする。

C 研究結果

1) 胎外因子 既報通り、肺線維芽細胞においてIL-4 の刺激によりエオタキシンの産生がRT-PCR にて確認された。また、IL-4 は濃度依存的にエオタキシンのプロモーターを活性化した。また、IL-4 の刺激には細胞内転写因子であるstat6 のリン酸化が関与していた。エオタキシンプロモーターのstat6 結合部位に変異を加えると、プロモーター活性が低下することより、stat6 が転写に関連することが明らかとなった。エオタキシンプロモーター活性化は、IFN- γ の4～8時間前の前処理により抑制され、さらに、リン酸化stat6 の低下が認められた。オゾンの曝露は、エオタキシンプロモーターを活性化し、IL-4 と相加的に作用した。

2) 胎内因子 現在、1歳時のアンケートを郵送にて送付し、約50%の回収が出来ている。今後、回収率を上昇させ、統計的な処置ならびに臍帯血の各種因子を測定する予定である。

D 考察

IFN- γ は、転写制御のレベルでIL-4 によるエオタキシン発現を抑制した。さらに、IFN- γ によるエオタキシン発現抑制、さらにオゾン曝露の分子メカニズムに関しては今後検討する予定である。

E 結論

肺線維芽細胞におけるIL-4 誘導性エオタキシン発現がIFN- γ により転写のレベルで抑制された。オゾンは、エオタキシン発現を増強し、IL-4 と相加的に作用した。今後、詳細な分子メカニズムについて、更に検討する予定である。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

論文発表

- 1) Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, Tokuyama K, Morikawa A Linkage and association studies of Stat6 gene polymorphisms and allergic diseases *Int Arch Allergy Immunol* 131 33-38, 2003
- 2) Takizawa T, Kato M, Suzuki M, Tachibana A, Motegi Y, Fujii T, Kimura H, Arakawa H, Mochizuki H, Tokuyama K, Morikawa A Distinct isoforms of protein kinase C are involved in human eosinophil functions induced by platelet-activating factor *Int Arch*

Allergy Immunol 131 Suppl 1 15-9, 2003

- 3) Kobayashi Y, Arakawa H, Suzuki M, Takizawa T, Tokuyama K, Morikawa A Polymorphisms of interleukin-4-related genes in Japanese children with minimal change nephrotic syndrome *Am J Kidney Dis* 42 271-6, 2003

学会発表

- (1) 滝沢琢己、荒川浩一、鈴木道子、松倉聡、加藤政彦、望月博之、徳山研一、森川昭廣 サイトカインによるヒト正常肺線維芽細胞からのエオタキシン発現制御機構、日本アレルギー学会(第53回)(2003年10月23日~10月25日、岐阜)

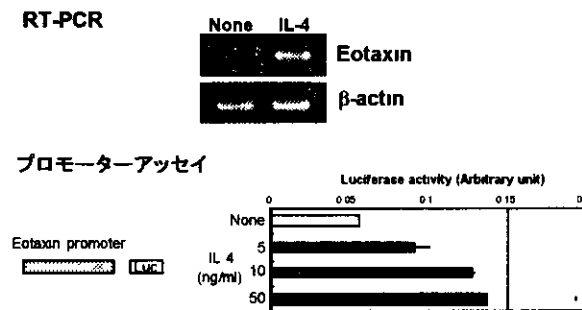


図1 IL-4による正常ヒト肺線維芽細胞でのエオタキシンの発現誘導

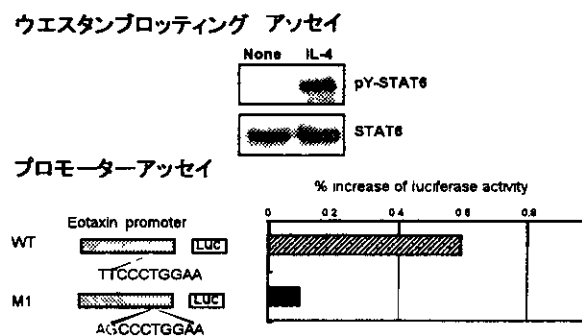


図2 IL-4によるエオタキシン発現誘導はStat6活性化を介している。

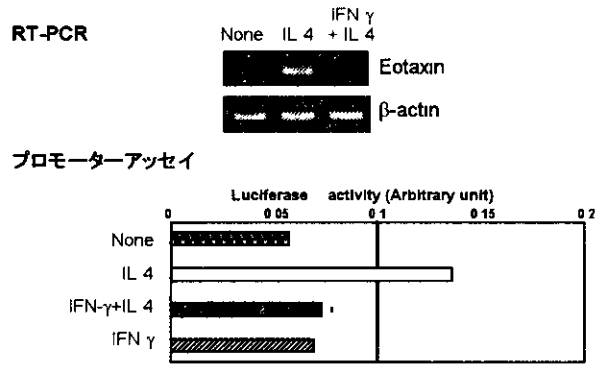


図 3 IFN- γ による IL-4 誘導性エオタキシン発現の抑制

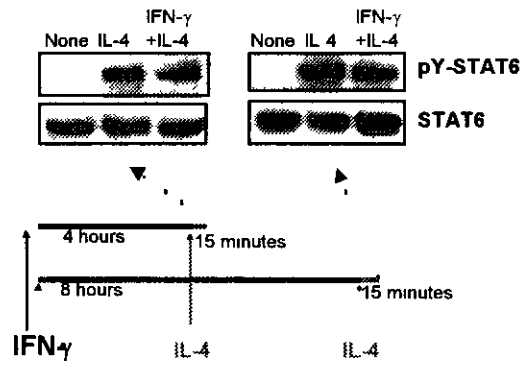


図 4 INF- γ の活性化への影響

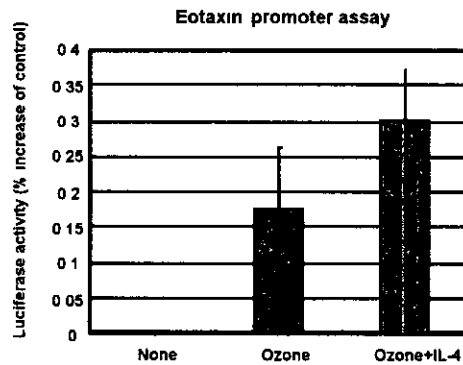


図 5 オゾン曝露によるエオタキシン産生への影響

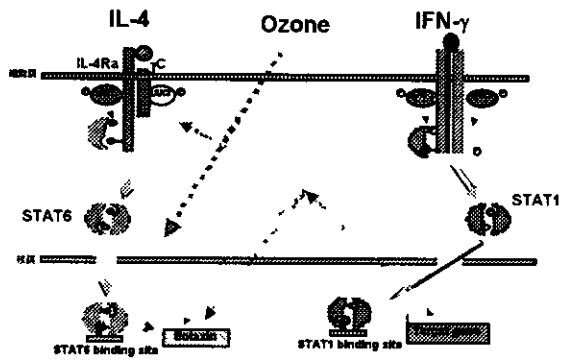


図6 想定されるエオタキシン産生の分子メカニズム

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kato Z, Iee J, Shikano H, Mishima M, Ohki I, Ohmishi H, Li A, Hashimoto K, Matsukuma E, Omoya K, Yamamoto Y, Yoneda T, Hara T, Kondo N, Shirakawa M	The structure and binding mode of interleukin-18	Nature Struct Biol	10	966-971	2003
Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al	Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils activation by Toll-like receptor 7 ligand	J Immunol	171	3977-3982	2003
Matsukura S, Kokubu F, Adachi M, Schleimer R P, et al	Differential regulation of eotaxin expression by IFN- γ in airway epithelial cells	J Allergy Clin Immunol	111	1337-1344	2003
Kawaguchi M, Kokubu F, Matsukura S, Huang SK, Adachi M, et al	Induction of CXC Chemokines, GRO- α expression and ENA-78 by ML-1(IL-17F) involves activation of Raf-1 MAPK ERK1/2 pathway	J Pharm Exp Ther	307	1213-1220	2003
川野 豊、森川みき、渡邊美砂、大柴晃洋、野間 剛、小田嶋博	1歳児のアレルギー疾患の発症に関与する因子に関する検討	日本小児アレルギー学会誌	17(3)	246-253	2003
徳山研一	小児気管支喘息のリモテリノクとアリーインターヘンノン-特集に寄せて	アレルギーの臨床	23(10)	758	2003
徳山研一	粘液分泌細胞	アレルギーと免疫	10(8)	119-125	2003
徳山研一	気道リモテリノク	最近話題の用語-知っておきたい豆知識(小児科増刊号)	44	137	2003
山田裕美、吉原重美、有坂 治	気道ウイルス感染と喘息発症	小児科診療	66	1347-1352	2003
吉原重美、山田裕美、有坂 治	下気道ウイルス感染と喘息発症	医学のあゆみ アレルギーの分子医学的研究と克服	207	512-517	2003
Tamura K, Suzuki M, Arakawa H, Tokuyama K, Morikawa A	Linkage and association studies of Stat6 gene polymorphisms and allergic diseases	Int Arch Allergy Immunol	131	33-38	2003

20030652

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

厚生労働科学研究研究費補助金
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

免疫アレルギー疾患に係わる
胎内・胎外因子の同定に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

発 行 平成16年3月
発 行 者 主任研究者 森川 昭廣
印 刷 有限会社 アル印刷