

## 2 学会発表

- 1) 柳原行義 アレルギーと感染—hygiene hypothesisを含めて— 第40回日本小児アレルギー学会, 2003
- 2) 柳原行義 新規TNFスーパーファミリー分子によるIgE産生の誘導機序 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 3) 山本ひとみ、梶原景一、品澤美樹、柳原行義 IL-4/IL-13による気道平滑筋細胞muscarinic M3Rの発現増強作用 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 4) 山本ひとみ、梶原景一、品澤美樹、柳原行義 気道平滑筋細胞における各種メディエーター受容体の発現に対するpoly I Cの作用 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 5) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、山本ひとみ、生澤公一、谷口正美、秋山一男、柳原行義 B lymphocyte stimulator (BLyS)とIgEクラススイッチ (1) 樹状細胞におけるBLyS発現とその機能解析 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 6) 梶原景一、品澤美樹、森嶋大貴、山本ひとみ、生澤公一、柳原行義 B lymphocyte stimulator (BLyS)とIgEクラススイッチ (2) 可溶性BLySを用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 7) 森嶋大貴、梶原景一、品澤美樹、山本ひとみ、釣木澤尚美、谷口正美、秋山一男、柳原行義 CpG ODNによるIgE産生の調節作用 (1) 末梢血単核細胞を用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 8) 品澤美樹、梶原景一、森嶋大貴、山本ひとみ、柳原行義 CpG ODNによるIgE産生の調節作用 (2) B細胞を用いた検討 第53回日本アレルギー学会総会, 2003
- 9) 山本ひとみ、梶原景一、柳原行義 気道平滑筋細胞における各種メディエーターレセプターの発現に対するIL-4/IL-13とpoly I Cの影響 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003
- 10) 梶原景一、山本ひとみ、生澤公一、柳原行義 新規TNF様リガンドであるBLySとAPRILによるIgEクラススイッチの誘導 第33回日本免疫学会総会・学術集会, 2003

## 2 実用新案登録

- なし
- 3 その他  
なし

## G. 知的所有権の出願・取得状況

- 1 特許取得  
なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

アレルギー疾患の遺伝的要因と環境要因の相互作用に関する研究  
アレルギー発症における遺伝と環境 —特に RNA プロセッシングの関与—

分担研究者 近藤直実 岐阜大学医学部小児病態学教授

研究協力者 松井永子 金子英雄 深尾敏幸 寺本貴英 浅野 勉 舘林宏治 笠原貴美子  
(岐阜大学医学部小児病態学)

研究要旨 アレルギー疾患は、遺伝的要因と環境要因とが絡み合って発症する。このうち遺伝的要因には種々の遺伝子が関わっていることが明らかにされつつある。これら遺伝子および関連分子およびその発現に種々の環境要因がどのように直接的に関わっているかは不明である。遺伝子の発現段階の重要な 1 つに RNA プロセッシングがある。今回は、アレルギー関連遺伝子の RNA プロセッシングのうち特に RNA editing を中心に検討した。何人かのアレルギー患者（20.6%）において IL-12R $\beta$ 2 鎖 cDNA でエクソン 13 に、塩基番号 2451 で C から U に変わる変化（2451 C to U）がみられた。この変化によりアミノ酸 604 番目が Ala から Val に変化する（Ala 604 Val）。これはゲノム DNA 上にはみられなかったことなどから、RNA editing によっていると考えられた。更なる検討の結果から、IL-12R $\beta$ 2 鎖の 2451 C to U（Ala 604 Val）の RNA プロセッシング（特に RNA editing）により IL-12 情報伝達系に障害が生じ、その結果 IFN- $\gamma$  の産生が低下し、過剰な IgE 産生系の抑制が不十分になること、ひいてはこのことがアレルギー発症に関わることが示された。

#### A. 目的

アレルギー疾患は、遺伝的要因と環境要因とが絡み合って発症する。このうち遺伝的要因には種々の遺伝子が関わっていることが明らかにされつつある。IgE 産生はインターロイキン 4 (IL-4) を中心とするシステムにより誘導される一方、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を中心とするシステムにより産生制御されている。IFN- $\gamma$  はその上位でインターロイキン 12 (IL-12) やインターロイキン 18 (IL-18) により産生誘導される。従って IL-12 や IL-18 の情報伝達系に異常があると IFN- $\gamma$  の産生低下が起こり、ひいては過剰な IgE 産生を制御できない。著者らは IL-12 レセプター (IL-12R)  $\beta$ 2 鎖遺伝子変異を明らかにした。これら遺伝子および関連分子およびその発現に種々の環境要因がどのように直接的に関わっているかは不明である。遺伝子の発現段階の重要な 1 つに RNA プロセッシングがある。今回は、アレルギー関連遺伝子のうち IgE 産生抑制系の IL-12 情報伝達系 (図 1) の中の重要な IL-12R  $\beta$ 2 鎖遺伝子の RNA プロセッシングのうち特に RNA editing を中心に検討した。

#### B. 方法

アレルギー患者、および健康人の末梢血より末梢血単核球分画 (以下 PBMCs) を分離し 1) 無刺激、IL-12、IL-18、PHA にて刺激し、24 時間培養後、培養上清中の IFN- $\gamma$  を ELISA 法で測定した。2) またそれらの症例についてゲノ

ム DNA あるいは cDNA を用いて遺伝子変異の有無について検討した。3) これらの成績をもとに RNA editing について検討した。4) *in vitro* で IgE 産生系について検討した。5) 情報伝達系分子のリン酸化について検討した。

#### C. 結果

アレルギー患者と健康人を対象に、IL-12R $\beta$ 2 鎖の cDNA (mRNA 転写物) についてゲノム DNA と比較しながら検討したところ、何人かのアレルギー患者において cDNA でエクソン 13 に、塩基番号 2451 で C から U に変わる変化 (2451 C to U) がみられた (図 2)。この変化によりアミノ酸 604 番目が Ala から Val に変化する (Ala 604 Val)。これはゲノム DNA 上にはみられなかったことなどから、RNA editing によっていると考えられた。

そこで例数を増やして検討したところアレルギー患者 102 名中 21 名 (20.6%) にこの変化がみられた (表 1)。一方、非アレルギーの 104 名では 4 名 (3.8%) にしかこの変化はみられなかった。

さらに PBMCs を用いて調べた結果、2451 C to U のみられた群はみられなかった群に比して IL-12 刺激による IFN- $\gamma$  の産生が有意に低下していた (表 2)。また *in vitro* の IgE 産生系の抑制や (図 3)、Stat4 のリン酸化の検討から IL-12 情報伝達系の障害が示された。

**D. 考察および結論**

IL-12R $\beta$ 2鎖の2451 C to U (Ala 604 Val) のRNA プロセッシング (特に RNA editing) により IL-12 情報伝達系に障害が生じ、その結果 IFN-gamma の産生が低下し、過剰な IgE 産生系の抑制が不十分になること、ひいてはこのことがアレルギー発症に関わることが示された。

現在このような RNA プロセッシングがどのような環境変化で誘導されるかについても検討を進めており、興味ある成績が得られてきている。

**E. 研究発表**

<論文発表>

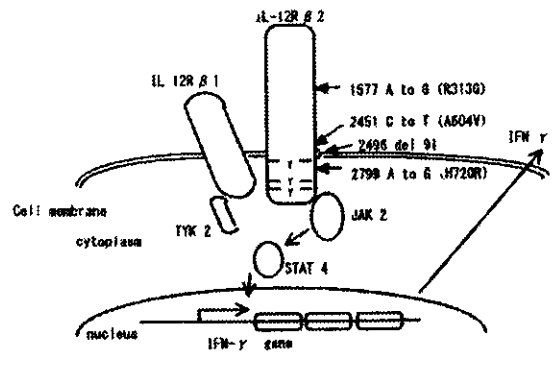
- (1) **Kondo, N.**, Matsui, E, Kaneko, H, Aoki, M, Kato, Z, Fukao, T, Kasahara, K., Mornmoto, N RNA editing of interleukin-12 receptor  $\beta$ 2, 2451 C-to-U (Ala 604 Val) conversion, associated with atopy Clin Exp Allergy (in press) (2003)
- (2) Kato, Z, Jee, J, Shikano, H, Mishima, M., Ohki, I, Ohnishi, H, Li, A., Hashimoto, K, Matsukuma, E, Omoya, K, Yamamoto, Y, Yoneda, T, Hara, T, **Kondo, N.**, Shirakawa, M. Structure of interleukin-18 and the binding mode Nature Struct Biol 10, 966-971 (2003)
- (3) Ohnishi, H, Kato, Z, Watanabe, M, Fukutomi, O, Ito, R, Teramoto, T, **Kondo, N.** Interleukin-18 is associated with the severity of atopic dermatitis Allergology International 52,123-130 (2003)
- (4) Aoki, M, Matsui, E, Kaneko, H, Inoue, R, Fukao, T, Watanabe, M, Teramoto, T, Kato, Z, Suzuki, K, Suzuki, Y, Kasahara, K., **Kondo, N.** A novel single-nucleotide substitution, Leu 467 Pro, in the interferon-gamma receptor 1 gene associated with allergic diseases Int J Mol Med 12,185-191 (2003)

<学会発表>

- (1) **近藤直実** 会長講演 アレルギーのオーダーメイド治療と21世紀型ポストゲノム 日本小児アレルギー学会 (第40回) (2003年10月3日, 岐阜)
- (2) **近藤直実**, 松井永子, 加藤善一郎, 金子英雄, 深尾敏幸, 伊上良輔, 寺本貴英, 福富悌, 篠田紳司, 青木美奈子, 大西秀典, 笠原由貴子, 山本裕, 吉川かおり, 浅野勉, 長瀬朋子, 橋本和幸, 李愛蓮, 松尾直樹, 面家健太郎, 近藤應, 舘林宏治, 船戸道徳, 松隈英治 シンポジウム IgE 産生抑制系の遺伝子解析とその応用 日本アレルギー学会総会 (第

53回) (2003年10月25日, 岐阜)

(3) **近藤直実** シンポジウム 司会 司会の言葉 アレルギーのゲノム解析とその臨床応用. 日本アレルギー学会春季臨床大会 (第15回) (2003年5月12日, 横浜)



A Alanine G Glycine, H Histidine R Arginine, V valine, Y Tyrosine  
図1 IL-12情報伝達系

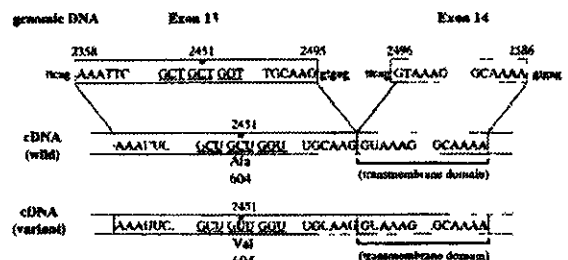


図2 IL-12R $\beta$ 2鎖cDNA上の変化

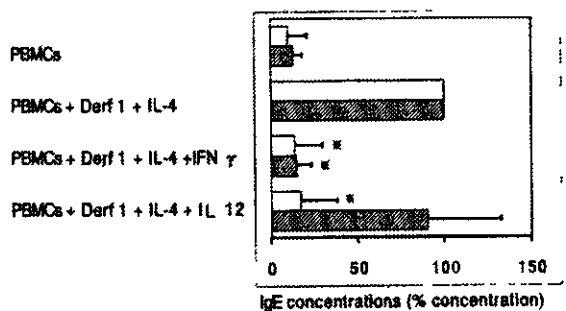


図3 in vitro IgE産生系

表1 IL-12Rβ2鎖cDNA上の2451 C to Tの頻度

IL-12Rβ2 chain cDNA responsible for atopy

C-to-U conversion of nucleotide 2451 in IL-12Rβ1 chain cDNA				
	n	-	+	p value
nasal mucosal subject	104	100	4 (3.8%)	} <0.001
simple patients	102	81	21 (20.6%)	

p value was calculated by  $\chi^2$ -test

Sequence analysis of genomic DNA of the IL-12Rβ2 chain showed no 2451 C to-T (Ala 604 Val) mutation in any of the subjects tested.

表3 FBM患者のサイトカイン濃度

	IFN- $\gamma$ concentration (pg/ml) †		p value ‡
	without C-to-U conversion § (n=109)	with C-to-U conversion § (n=25)	
stimulated			
with IL-12	154.7 ( 34.9~ 685.9)	69.3 ( 14.9~ 266.3)	0.013
with IL-18	68.6 ( 11.9~ 398.7)	57.3 ( 9.8~ 364.5)	0.902
with PBA	1568.2 (383.1~6224.3)	1578.1 (711.8~3498.6)	0.976

† Geometric mean are shown, and the ranges of SD are shown in parenthesis.

§ as nucleotide 2451 (Ala 604 Val) in IL-12Rβ2 chain cDNA.

‡ p values were calculated by Mann-Whitney's U test.

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

アレルギー疾患の遺伝要因と環境要因の相互作用に関する研究  
—アレルギー疾患発症遺伝要因としての IL-18 遺伝子多型および  
環境要因としてのフラボノイドの作用—

分担研究者 田中敏郎 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座助手  
研究協力者 比嘉慎二 (NTT 西日本大阪病院内科)  
平野亨、有光潤介 (大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学)

研究要旨 喘息、花粉症、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患は、アトピー素因などの遺伝要因と環境要因が相互作用することで発症するものと考えられている。遺伝要因として、昨年 IL-18 構造遺伝子の多型 IL-18-105A/C が喘息の発症と連鎖することを示したが、本年度は、この多型がアトピー性皮膚炎にも連鎖するのか、喘息発症に IL-18-105A/C が他の遺伝子多型と相互作用するのか検討した。環境要因として、昨年フラボノイドの抗アレルギー作用（好塩基球からのヒスタミン、IL-4、IL-13 産生抑制）を報告したが、本年度、さらに類似構造を有する代表的なフラボノイドの活性を検討し、作用のための基本骨格を明らかとした。IL-18-105A/C は、アトピー性皮膚炎発症と連鎖傾向 ( $p=0.07$ ,  $OR=1.61$ ) が認められた。フラボノイドの中で、luteolin、apigenin と fisetin は、 $IC_{50}=2.4\text{--}5.7\mu\text{M}$  で好塩基球からの IL-4 や IL-13 の産生を抑制し、その抑制活性に必要なフラボノイドの基本骨格が明らかとなった。

## A. 目的

昨年、case-control study により IL-18-105A/C 遺伝子多型が、喘息発症に関与することを報告した ( $OR=1.83$ )。この多型が、アトピー性皮膚炎にも連鎖するのか、また喘息発症において、IL-18-105A/C と他の遺伝子多型 (SOCS3-514Phe/Leu、IL-12p40-1188A/T、 $\beta 2\text{ADR-16Arg/Gly}$ 、 $\beta 2\text{ADR-27Gln/Glu}$ ) の相互作用が認められるのか検討した。また、環境要因として diet に注目し、フラボノイドの *in vitro* における抗アレルギー作用と動物モデルでの *in vivo* の効果に関して報告してきたが、今後アレルギーに対してフラボノイドの適当な摂取が、補完代替療法や予防法につながるのか、さらに検討を加えた。

## B. 方法

1 遺伝子の多型性の解析 遺伝子解析は、倫理委員会承認後、インフォームドコンセントにて協力が得られたアレルギー患者（喘息、アトピー性皮膚炎）さん末梢血より DNA を抽出した。遺伝子多型は、PCR-RFLP に解析した。  
2 Buffy coat より正常好塩基球を精製後、抗 IgE 抗体刺激時のフラボノイドのサイトカイン (IL-4、IL-13) 産生、ロイコトリエン C4 産生に対する抑制効果を ELISA 法にて検討した。また抗 CD3 抗体による T 細胞からの IL-4 産生に対するフラボノイドの抑制についても調べた。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、対象とする患者及び対照から提供される検体には担当医師から研究の必要性及び有用

性を十分に説明した後、同意が得られた場合のみ、検体を提供していただき、解析を行った。同意が得られなかった患者さんが不利益を被らないこととした。

## C. 結果

1 IL-18-105A/C は、喘息群で有意に A の遺伝子頻度が上昇していた ( $p=0.006$ ,  $OR=1.83$ ) が、アトピー性皮膚炎群では上昇傾向 ( $p=0.07$ ,  $OR=1.61$ ) を示した。現在までの解析において、喘息発症と関与する IL-18-105A/C の有意な他の遺伝子多型の組み合わせは存在しない。

2 抗 IgE 抗体刺激による好塩基球からの IL-4 と IL-13 産生に対する代表的な 18 種のフラボノイドの抑制活性を比較すると、luteolin、apigenin と fisetin に強い抑制活性が認められた ( $IC_{50}=2.4\text{--}5.7\mu\text{M}$ )。次いで、scutellarein、3-hydroxyflavone、kaempferol、quercetin、eriodictyol、fustin、7-hydroxyflavone に中等度の抑制活性が見られたが、myricetin や rutin には抑制活性は観察されなかった。分子構造と IL-4 産生抑制活性に比較により、活性に必要な基本骨格が明らかとなった。一方、これらのフラボノイドは、ロイコトリエン C4 の産生には影響を与えなかった。抗 CD3 抗体刺激による T 細胞からの IL-4 の産生抑制に関しては、luteolin、apigenin と fisetin で  $IC_{50}=10.8\text{--}19.1\mu\text{M}$  であった。

3 抗 IgE 抗体+IL-3 の刺激による好塩基球細胞からの IL-4 産生は、抗 IL-18 抗体により抑制されることより、IL-18 依存性の可能性がある。

## D. 考察

抗原提示細胞からの単独の IL-18 産生もしくは IL-18+IL-12 の産生は、T 細胞分化のみならず免疫応答を方向付ける可能性があり、その遺伝要因が IL-18 と IL-12 遺伝子およびそのシグナル伝達を調節する SOCS3 分子遺伝子の多型の重なりによって影響されるのかさらに検討を要する。

最近フラボノイド高摂取群では、喘息発症が少なかったというコーホート研究の結果が報告された。現在までの解析で、フラボノイドの抗アレルギー活性（好塩基球や肥満細胞からのサイトカインやヒスタミン分泌抑制）、その作用機序、動物モデルでの臨床効果に関して報告してきたが、今後、*in vitro* の抑制活性のヒエラルキーを踏まえて、フラボノイドを量的に質的に適切に摂取することが、真にアレルギーの補完代替療法や予防法につながるのか、検討を進めたい。

## E. 結論

- 1 IL-18-105A/C は、喘息と同様にアトピー性皮膚炎の発症と関与する可能性がある。
- 2 luteolin, apigenin と fisetin は、IC<sub>50</sub>=2.4-5.7μM で好塩基球からの IL-4 や IL-13 の産生を抑制する。その抑制活性に必要なフラボノイドの基本骨格が明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1 論文発表

- 1 Higa S, M. Kotani, M. Matsumoto, A. Fujita, T Hirano, M Suemura, I Kawase and T. Tanaka 2003 Administration of anti-interleukin-18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga Br J Dermatol 149 39-45
- 2 Tanaka T, S Higa, T Hirano, M Kotani, M Matsumoto, A. Fujita, and I Kawase 2003 Flavonoids as potential anti-allergic substances Curr Med Chem-Anti-Inflammatory & anti-allergy agents 2 57-65
- 3 Higa S, T Hirano, M Mayumi, M. Hiraoka, Y Ohshima, M Nambu, E Yamaguchi, N Hizawa, N Kondo, E Matsui, Y Katada, A. Miyatake, I Kawase, and T. Tanaka 2003 Association between IL-18 gene polymorphism 105A/C and asthma Clin Exp Allergy 33 1097-1102
- 4 Higa S, T Hirano, M. Kotani, M Matsumoto, A Fujita, M Suemura, I Kawase, and T. Tanaka 2003

Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils J Allergy Clin Immunol 111 1299-1306

- 5 Iwashige K, K Kouda, M Kouda, K Hornuchi, M. Takahashi, A. Nagano, T. Tanaka, H and Takeuchi 2004 Calorie restricted diet and urinary pentosidine in patients with rheumatoid arthritis J Physiol Anthropol Appl Human Sci 23 19-24
- 6 Tanaka T, S Higa, T Hirano, J Arimitsu, and I Kawase 2004 The cytokine network in allergic disorders Curr Drug Targets-Inflammatory & Allergy in press
- 7 Hirano T, S Higa, J Arimitsu, T Naka, Y Shima, S Ohshima, M. Fujimoto, T Yamadori, I Kawase, and T. Tanaka 2004 Flavonoids such as luteolin, fisetin and apigenin are inhibitors of IL-4 and IL-13 production by activated human B cells Int Arch Allergy Immunol in press
- 8 田中敏郎、比嘉慎二、平野亨 2003 フラボノイドによるアレルギーの予防 Pharma Medica 21 Suppl 7-15
- 9 高井許子、水道裕久、田中敏郎、小谷麻由美、藤田晃人、竹内明、牧野武利、澄川一英、折笠秀樹、辻啓介、中島光好 2003 ブロッコリー キャベツを配合した野菜 果物混合飲料による高コレステロール血症者の血清 LDL-コレステロール低下作用 臨床病理 51 1073-1083
- 2 学会発表
- 1 藤田きみえ、藤田麻里、中野直子、長坂行雄、比嘉慎二、渡邊大、田中敏郎、宮武明彦 プデソニド タービュヘイラー(BUD)の吸入コンプライアンスの検討 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003, 5, 横浜
- 2 加藤元一、平田一人、東田有智、井上義一、岩崎吉伸、紙森隆雄、田中敏郎、寺川和彦、西村善博、藤田悦夫、前田恵治、南方良章、関庚火華、吉川雅則、五十嵐敢 近畿喘息 閉塞性肺疾患研究グループ 成人喘息の長期管理薬物療法の検討 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003, 5, 横浜
- 3 石井優、筒井広美、東直人、大河原知治、酒谷邦康、田中敏郎、佐伯行彦、片田圭宣 特発性門脈圧亢進症(IPH)をきたした強皮症の一例 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003, 5, 横浜
- 4 渡邊大、江副幸子、藤本穰、立花功、松村到、田中敏郎、金倉譲、川瀬一郎、岸本忠三、仲哲治 血球系腫瘍細胞における SOCS-1 の silencing 第 100 回日本内科学

会総会 2003

- 5 Tanaka T., S Higa, T Hirano, and I Kawase Role of interleukin-18 in the development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI Vancouver, Canada Sep 2003
- 6 Hirano T, S Higa, Y Katada, A. Miyatake, I Kawase, and T. Tanaka Association between IL-18 gene polymorphism 105A/C and asthma World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI Vancouver, Canada Sep 2003
- 7 Higa S, T Hirano, I Kawase, and T. Tanaka Flavonoids as potential anti-allergic substances World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI Vancouver, Canada Sep 2003
- 8 Takai M., H Sudo, T. Tanaka, M. Kotani, A. Fujita, A. Takeuchi, T Makino, K Sumikawa, and M. Nakashima LDL-cholesterol-lowering effects of a mixed green vegetable and fruit beverage containing broccoli and cabbage in hypercholesterolemic subjects XIII International Symposium on Atherosclerosis Kyoto, Sep 2003
- 9 Sudo H, A. Takeuchi, T Makino, and T. Tanaka Serum cholesterol-lowering effects of broccoli and cabbage mixture in rats XIII International Symposium on Atherosclerosis Kyoto, Sep 2003
- 10 藤田きみえ、藤田麻里、渡邊大、田中敏郎、比嘉慎二、中野直子、長坂行雄、宮武明彦 Budesonide turbuhaler の安全性について 第53回日本アレルギー学会総会 2003、10、岐阜

**G. 知的所有権の出願・取得状況**

なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）  
分担研究報告書

アレルギー疾患の遺伝要因と環境要因の相互作用に関する研究  
—ダニ抗原が TGF- $\beta$  の活性化に及ぼす作用についての研究—

分担研究者 中尾篤人 山梨大学大学院医学工学総合研究部免疫学講座教授

研究協力者 岡本篤司（山梨大学大学院医学工学総合研究部耳鼻咽喉科学講座）  
高井敏朗（順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター）

**研究要旨** 本研究で我々は TGF- $\beta$  の潜在型から活性型への変換に Derf1 が関与する可能性について検討した。潜在型 TGF- $\beta$  を、Derf1 と混合し試験管内で反応させた後、潜在型 TGF- $\beta$  から活性型 TGF- $\beta$  への変換をウエスタンブロット法で検討したところ活性型 TGF- $\beta$  が検出された。また潜在型 TGF- $\beta$ /Derf1 混合液を TGF- $\beta$  感受性の細胞であるミンク肺上皮細胞(Mv1Lu)ならびにヒト培養気管支上皮細胞に加えたところこの混合液はそれぞれの細胞の増殖を有意に抑制した。以上から Derf1 がインビトロで潜在型 TGF- $\beta$  を活性型に変換する可能性が示唆された。

### A. 目的

わが国におけるアレルギー疾患に罹患する患者数の増加とともに、治療難治性のアレルギー疾患患者数も増加しており、現在のアレルギー疾患臨床における緊急の課題の1つである。アレルギー疾患の治療難治性には、喘息の気道リモデリングやアトピー性皮膚炎の苔せん化といったアレルギー疾患の慢性化病態が深く関係していると考えられており、アレルギー疾患の慢性化病態の機序について分子レベルで解明することは、難治性アレルギー疾患患者さんの治療法を考えるうえで重要である。

アレルギー疾患の慢性化病態に関与するサイトカインの1つである TGF- $\beta$  は、潜在型として細胞から分泌され細胞外においてプロテアーゼによる分解を経て活性型に変換されると考えられている。しかしながら、どのようなプロテアーゼが生体内において実際に関与しているかについてはほとんど明らかにされていない。

一方、ダニ抗原の主要抗原の1つである Derf1 はシステインプロテアーゼ活性をもつタンパクであることが判明しそのプロテアーゼ活性がアレルギー疾患の病態に関与する可能性が示唆されている。

本研究では TGF- $\beta$  の潜在型から活性型への変換に Derf1 が関与する可能性について検討した。

### B. 方法

(1) 潜在型 TGF- $\beta$  を、Derf1 と混合し37度で20分間反応させた後、活性型 TGF- $\beta$  に対する抗体を用いたウエスタンブロット法によって潜在型 TGF- $\beta$  から活性型 TGF- $\beta$  への変換が認められるかどうか検討した。

(2) 上記の方法で調整した潜在型 TGF- $\beta$ /Derf1 混合液

を TGF- $\beta$  感受性の細胞であるミンク肺上皮細胞(Mv1Lu)ならびにヒト培養気管支上皮細胞(HBE)に加え増殖反応に対する効果を検討した。

### C. 結果

潜在型 TGF- $\beta$  を Derf1 と混合し反応させると活性型 TGF- $\beta$  が検出されかつこの混合液は、Mv1Lu/HBE 細胞の増殖を有意に抑制した。

### D. 考察ならびに結論

Derf1 が潜在型 TGF- $\beta$  を生物活性を持つ活性型に変換する可能性がインビトロの系で示された。気道リモデリングのようなアレルギー疾患の慢性の病態形成にダニ抗原による直接的な TGF- $\beta$  の活性化が関与する場合もあるのかもしれない。今後インビボにおいても Derf1 が潜在型 TGF- $\beta$  を生物活性を持つ活性型に変換することが可能であるか否かについて検討する。

### E. 研究発表

- 1 Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, Sueyoshi N, Okumura K, Kaneko K, Yamashiro Y, Ogawa H, Nakao A Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction Kidney Int (in press)
- 2 Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Ogawa H Exogenous Smad3 accelerates wound healing in a rabbit dermal ulcer model J Invest Dermatol (in press)
- 3 Higashi K, Inagaki Y, Fujimori K, Nakao A, Kaneko



H, Nakatsuka I IFN- $\gamma$  interferes with transforming growth factor- $\beta$  signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3 J Biol Chem 278 43470-43479, 2003

4 Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fujii M, Yamauchi H, Nakao A, De Crombrughe B, Watanabe T, Okazaki I Interferon- $\alpha$  down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice Hepatology 38 890-899, 2003

5 Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Tsuboi R, Ogawa H Smads regulate collagen gel contraction by human dermal fibroblasts Br J Dermatol 149 464-70, 2003

**F. 知的所有権の出願・取得状況**

特になし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
出原賢治	インターロイキン4、インターロイキン4レセプター、インターロイキン13	永田和宏、 宮坂昌之、 宮坂信之、 山本一彦	分子生物学・ 免疫学キーワ ード辞典第2 版	医学書院	東京	2003	105-107 112-113
出原賢治、 有馬和彦	IL-13	笠倉新平、 松島綱治	サイトカイン・ケモカインのすべてー基礎から最新情報までー	日本医学館	東京		印刷中

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Izuhara K	The Role of interleukin-4 and interleukin-13 in the non-immunologic aspects of asthma pathogenesis	Clin Chem Lab Med	41(7)	860-864	2003
Yasunaga S, Yuyama N, Arima K, Tanaka H, Toda S, Maeda M, Matsui K, Goda C, Yang Q, Sugita Y, Nagai H, Izuhara K.	The negative-feedback regulation of the IL-13 signal by the IL-13 receptor $\alpha$ 2 chain in bronchial epithelial cells.	Cytokine	24	293-303	2003
Masumoto K, Sakata Y, Arima K, Nakao I, Izuhara K	Inhibitory mechanism of a cross-class serpin, the squamous cell carcinoma antigen 1	J Biol Chem	278 (46)	45296-45304	2003
Wongpiyabovorn J, Suto H, Ushio H, Izuhara K, Mitsuishi K, Ikeda S, Nakao A, Okumura K, Ogawa H	Up-regulation of interleukin-13 receptor $\alpha$ 1 on human keratinocytes in the skin of psoriasis and atopic dermatitis	J Dermatol Sci	33	31-40	2003
Yokoi F, Hiraishi H, Izuhara K	Molecular cloning of a cDNA for the human phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	J Biochem	133 (5)	607-614	2003

Sakata Y, Arima K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Suminami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, Izuhara K	The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1	J Biol Chem	279(7)	5081-5087	2004
Izuhara K, Arima K.	Signal transduction of IL-13 and its role in the pathogenesis of bronchial asthma	Drug News & Perspect			in press
Izuhara K, Arima K, Masumoto K, Kanaji S, Kanaji T	IL-4 and IL-13 Their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies-Update	Medical Chemistry Reviews - on line			in press.
Shimada T, Cheng L, Ide M, Fukeda S, Enomoto T, Shirakawa T	Effect of lysed enterococcus faecalis FK-23 (LFK) on allergen-induced peritoneal accumulation of eosinophils in mice.	Clin Exp Allergy	33	684-687	2003
Bottini N, Mao XQ, Borgiani P, Saccucci P, Stefanini L, Greco E, Fontana L, Hopkin JM, Shirakawa T	Genetic control of serum IgE level, a study of lowmolecular weight protein tyrosine phosphatase	Clin. Genet	63	228-231	2003
Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, Kishi F	Polymorphism of SLC11A1(formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease.	J Infect Dis	187	326-329	2003
Nakajima T, Iikura M, Okayama I, Matsumoto K, Uchiyama C, Shirakawa T, Yang X, Adra CN, Hirai K, Saito H	Identification of granulocyte subtype-selective receptors and channels by high-density oligonucleotide probearray	J Allergy Clin Immunol	113(3)	528-535	2004
Peisong G, Mao X-Q, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sin D, Hopkin JM	An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation	Genes Immunity	5	58-62	2004

Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Yaiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T	Allergy and serum antibodies against bacterial species of predominant commensal intestinal microflora in schoolchildren	J Adoles. Health			in press
Tanaka K, Roberts MH, Yamamoto N, Sugiura H, Uehara M, Mao X-Q, Shirakawa T, Hopkin JM	Heterogeneity of atopic eczema, a genetic variant of RANTES and high IgE level	Clin Exp. Allergy			in press
Hasegawa K, Hirota T, Obara K, Akahoshi M, Cheng L, Takahashi Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Mao X-Q, Tamaru M, Shirakawa T.	Association between genetic variation in the gene for ADAM33 and clinical severity of childhood asthma in the Japanese population	Hum Genet			in press
Yanagihara, Y.	Regulatory mechanisms of human IgE synthesis.	Allergol. Int	52	1-12	2003
Yamamoto, H, Yanagihara, Y.	Genetic variants of chemical mediator receptors in relation to asthma	Int. Rev Asthma.	5	60-66	2003
Fujii-Maeda, S, Kajiwara, K, Ikizawa, K, Shinazawa, M, Yu, B, Koga, T., Furue, M., Yanagihara, Y	Reciprocal regulation of thymus and activation-regulate d chemo-kine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon- $\gamma$ in HaCaT keratinocytes is mediated by alternations in E-cadherin distribution	J Invest Dermatol	122	20-28	2004

Kajiwara, K , Shinazawa, M , Morishima, H , Yanagihara, Y	Differential effect of IL-4 and IL-13 on the expression of recombination-activ ating genes in mature B cells from human peripheral blood	Cell Immunol			in press
Kato, Z , Jee, J , Shikano, H., Mishima, M , Ohki, I , Ohnishi, H., Li, A , Hashimoto, K., Matsukuma, E , Omoia, K , Yamamoto, Y , Yoneda, T , Hara, T , <u>Kondo,</u> <u>N</u> , Shirakawa, M	Structure of interleukin-18 and the binding mode	Nature Struct Biol	10	966-971	2003
Ohnishi, H , Kato, Z , Watanabe, M , Fukutomi, O , Ito, R , Teramoto, T , <u>Kondo, N</u>	Interleukin-18 is associated with the severity of atopic dermatitis	Allergology Internationa l.	52	123-130	2003
Aoki, M , Matsui, E , Kaneko, H , Inoue, R , Fukao, T , Watanabe, M., Teramoto, T , Kato, Z., Suzuki, K., Suzuki, Y., Kasahara ,K., <u>Kondo, N</u>	A novel single-nucleotide substitution, Leu 467 Pro, in the interferon-gamma receptor 1 gene associated with allergic diseases	Int J Mol Med.	12	185-191	2003
<u>Kondo, N</u> , Matsui, E , Kaneko,H , Aoki, M , Kato, Z , Fukao, T., Kasahara ,K., Morimoto, N	RNA editing of interleukin-12 receptor $\beta$ 2, 2451 C-to-U (Ala 604 Val) conversion, associated with atopy	Clin Exp Allergy			in press
Higa S , M. Kotani, M Matsumoto, A Fujita, T. Hirano, M. Suemura, I. Kawase and <u>T</u> <u>Tanaka.</u>	Administration of anti-interleukin-18 antibody fails to inhibit development of dermatitis in atopic dermatitis-model mice NC/Nga	Br J Dermatol	149	39-45	2003

Tanaka T, S Higa, T Hirano, M Kotani, M Matsumoto, A Fujita, and I Kawase	Flavonoids as potential anti-allergic substances	Curr Med Chem-Anti-Inflammatory & anti-allergy agents	2	57-65	2003
Higa S, T Hirano, M Mayumi, M. Hiraoka, Y. Ohshima, M Nambu, E Yamaguchi, N Hizawa, N. Kondo, E Matsui, Y Katada, A Miyatake, I Kawase, and T. Tanaka	Association between IL-18 gene polymorphism 105A/C and asthma.	Clin Exp Allergy	33	1097-1102	2003
Higa S., T Hirano, M Kotani, M. Matsumoto, A. Fujita, M Suemura, I Kawase, and T. Tanaka	Fisetin, a flavonol, inhibits TH2-type cytokine production by activated human basophils	J Allergy Clin Immunol	111	1299-1306	2003
Iwashige K., K Kouda, M Kouda, K Horiuchi, M Takahashi, A Nagano, T. Tanaka, H and Takeuchi	Calorie restricted diet and urinary pentosidine in patients with rheumatoid arthritis	J Physiol Anthropol Appl Human Sci	23	19-24	2004
Tanaka T, S Higa, T Hirano, J. Arimitsu, and I. Kawase	The cytokine network in allergic disorders	Curr Drug Targets-Inflammatory & Allergy			in press
Hirano T, S. Higa, J. Arimitsu, T Naka, Y Shima, S Ohshima, M Fujimoto, T Yamadori, I. Kawase, and T. Tanaka	Flavonoids such as luteolin, fisetin and apigenin are inhibitors of IL-4 and IL-13 production by activated human B cells	Int Arch Allergy Immunol			in press
Higashi K, Inagaki Y, Fujimori K, Nakao A, Kaneko H, Nakatsuka I	IFN- $\gamma$ interferes with transforming growth factor- $\beta$ signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3	J Biol Chem	278	43470-43479	2003

Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fuji M, Yamauchi H, Nakao A, Crombrughe B, Watanabe T, Okazaki I	Interferon- $\alpha$ down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice	Hepatology	38	890-899	2003
Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Tsuboi R, Ogawa H	Smads regulate collagen gel contraction by human dermal fibroblasts	Br J Dermatol	149	464-470	2003
Inazaki K, Kanamaru Y, Kojima Y, Sueyoshi N, Okumura K, Kaneko K, Yamashiro Y, Ogawa H, Nakao A	Smad3 deficiency attenuates renal fibrosis, inflammation, and apoptosis after unilateral ureteral obstruction	Kidney Int			in press
Sumiyoshi K, Nakao A, Setoguchi Y, Okumura K, Ogawa H	Exogenous Smad3 accelerates wound healing in a rabbit dermal ulcer model	J Invest Dermatol			in press
出原賢治	アレルギー疾患の病因 とその診断	臨床化学	32 (1)	15-17	2003
有馬和彦、出原賢治	ヒトIL-4受容体と気管 支喘息	International Review of Asthma	5 (3)	72-79	2003
出原賢治	サイトカインを標的と した治療法	医学のあゆみ	207(8)	570-573	2003
有馬和彦、坂田資 尚、出原賢治	プロテアーゼインヒビ ターによるアレルギー 治療戦略	アレルギー科	16(4)	351-356	2003
出原賢治	われら Molecular Research	分子呼吸器病	7(4)	373-374	2003

出原賢治、有馬和彦、安永晋一郎	アレルギー疾患における遺伝因子の機能的解析とその臨床応用 - IL-13を中心に -	Inflammation and Regeneration	23(1)	23-28	2003
出原賢治	IL-13研究の新展開	最新医学	58(2)	240-244	2003
出原賢治	分子標的治療の現状と将来	Asthma Frontier 2003	2(1)	47-53	2003
有馬和彦、出原賢治	IgE産生と遺伝因子	喘息	17(1)	27-32	2004
坂田資尚、有馬和彦、高井敏朗、櫻井濟、増本清成、松尾洋、出原賢治	IL-4/IL-13 が誘導するタンパク質分解酵素阻害物質による主要ダニ抗原 Der p1 の阻害	呼吸	23(2)	S26-S28	2004
福田早苗、白川太郎	プロバイオティクスによるアレルギー予防の試み	最新医学	58(2)	88-92	2003
程雷、榎本雅夫、Hopkin JM、白川太郎	Th1 誘導物質を用いたアレルギー治療と予防の試み	最新医学	58(2)	82-87	2003
中島加珠子、井手亜里、白川太郎	微量元素の動態から見たアレルギー	最新医学	58(2)	77-81	2003
赤星光輝、王利真由美、白川太郎	アレルギー疾患における最近の話題 - オーバービュー -	最新医学	58(2)	7-14	2003
程雷、笹原祐介、三好彰、白川太郎	アレルギーはなぜ増えているのか。	日本小児難治喘息アレルギー疾患学会誌	1(1)	7-14	2003



赤星光輝, 玉利真由美, 清水麻貴子, 高橋尚美, 広田朝光, 小原和彦, 福田早苗, 中島加珠子, 笹原祐介, 程雷, 白川太郎.	アレルギー疾患でのポストゲノム(テーラーメイド医療)	アレルギーの臨床	23(1)	82-86	2003
柳原行義	CD40 に依存しない免疫グロブリンクラススイッチ	臨床免疫	39	623-628	2003
柳原行義	IgE 産生の分子機構	アレルギー・リウマチ・膠原病	19	109-116	2003
山本ひとみ、柳原行義	喘息とリンパ球.	THE LUNG perspectives	11	460-463	2003
柳原行義	IgE 産生とアレルギー性炎症	喘息	17	2-6	2004
梶原景一、柳原行義	IgE 産生のメカニズム	喘息	17	21-25	2004
柳原行義	IgE 抗体産生の調節	総合アレルギー学		81-87	2004
柳原行義	アレルギーと感染-hygiene hypothesis を含めて.	小児アレルギー学会誌	18	14-18	2004
梶原景一、羅智靖、柳原行義	可溶性 FcεRIα と抗 IgE 抗体の IgE 産生抑制機序.	臨床免疫	41	219-222	2004
梶原景一、森嶋大貴、柳原行義	BLyS と免疫グロブリンのクラススイッチ	臨床免疫			印刷中
柳原行義	IgE 産生の調節機構	分子呼吸器病			印刷中

柳原行義	IgE 産生の分子調節機構	日本内科学雑誌			印刷中
田中敏郎、比嘉慎二、平野亨	フラボノイドによるアレルギーの予防	Pharma Medica	21 Suppl	7-15	2003
高井許子、水道裕久、田中敏郎、小谷麻由美、藤田晃人、竹内明、牧野武利、澄川一英、折笠秀樹、辻啓介、中島光好	ブロッコリー キャベツを配合した野菜・果物混合飲料による高コレステロール血症者の血清LDL-コレステロール低下作用	臨床病理	51	1073-1083	2003