

程雷、山崎暁子、清水麻貴子、 広田朝光、赤星光輝、松田彰、 玉利真由美、白川太郎	日本人喘息患者における ADAM33, TGF β 遺伝子多型を含む 最近の研究結果	アレルギー科	17	364-373	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	41	643-648	2004
柳原行義	IgEの産生調節機構	分子呼吸器病	8	177-184	2004
柳原行義	IgE産生の分子調節機構	日本内科学会雑誌	93	2649- 2655	2004
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	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	可溶化Fc ϵ RI α と抗IgE抗 体のIgE産生抑制機序	臨床免疫	41	219- 222	2004
加藤善一郎、白川昌宏、近藤 直実	インターロイキンの構造生物 学	蛋白質核酸酵素 PNE	49(1)	11-17	2004
下澤伸行、長瀬朋子、 船戸道徳、近藤直実、 鈴木康之	ペルオキシソーム病の臨床と 病理	病理と臨床	22	50-56	2004
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 学会誌	18(1)	1-12	2004
近藤直実、浅野勉、吉川かお り、長瀬朋子、橋本和幸、山 本裕、李愛蓮、面屋健太郎、 近藤應、館林宏治、松隈英治	喘息の候補遺伝子解析	アレルギー・免疫	11(1)	116-124	2004
近藤直実	IL-18	医学のあゆみ	208(9)	769-770	2004
加藤善一郎、面屋健太郎、松 隈英治、近藤直実	IL-18の立体構造とそのレセプ ター結合様式	臨床免疫	41(2)	205-209	2004
川本典生、寺本貴英、面家健 太郎、久世文也、水田啓介、 岡田富貴夫、金子英雄、近藤 直実	症例解説 MRIが確定診断に有 用であった気管支異物の1例	小児科	45	142	2004
近藤直実	小児気管支喘息治療・管理ガ イドライン2002をどう読むか 第3章小児気管支喘息の危険因 子とその予防	日本小児アレルギー 学会誌	18(1)	87-91	2004
近藤直実、松井永子	β 2刺激薬	medicina	41(3)	400-403	2004

近藤直実	小児の気管支喘息の病因・病態- up-to-date	小児内科	36(4)	525-530	2004
近藤直実	不明熱	小児救急の手引き	31	1-8	2004
近藤直実	アトピー素因とアレルギーマ ーチの免疫学的俯瞰	アレルギー・免疫	11(6)	78-88	2004
近藤直実, 川本典生, 張改 秀, 山田桂太郎, 服部里美, 堀越啓子	花粉症の一次予防の可能性	アレルギー科	17(1)	90-94	2004
篠田紳司, 寺本貴英, 伊上良輔, 金子英雄, 近藤直実	免疫機能軽度低下を有する5症 例に対する予防接種の検討	日本小児アレルギー 学会	18(2)	176-183	2004
近藤直実, 松井永子, 寺本貴 英, 館林宏治, 面屋健太郎, 近藤應, 松隈英治, 松尾直 樹, 船戸道徳, 川本典生, 白 春栄	IL-12	アレルギーの臨床	24(8)	33-37	2004
近藤直実	食物アレルギーの免疫学的機 序	小児科診療	67(7)	1061- 1068	2004
松井永子, 金子英雄, 青木美 奈子, 吉川かおり, 館林宏 治, 白春栄, 笠原貴美子, 近 藤直実	IL-12, IFN- γ	喘息	17(3)	36-42	2004
篠田紳司, 福富悌, 青木美奈 子, 伊上良輔, 寺本貴英, 松 井永子, 近藤直実	食物除去試験と食物負荷試験	小児科診療	67(7)	1092- 1099	2004
金子英雄, 近藤直実	Dominant negative AID遺伝子 変異により常染色体優位遺伝 形式をとる高IgM症候群	臨床免疫	42(1)	30-35	2004
近藤直実	アレルギー疾患の病態研究 アレルギー疾患発症とHygiene hypothesis	診断と治療	92(8)	1405- 1411	2004
近藤直実	アレルギーにおけるテーラー ド治療法	アレルギー科	18(3)	258-262	2004
近藤直実	アレルギー疾患の遺伝子診断 の可能性	日本内科学会雑誌	93(10)	68-75	2004
近藤直実, 金子英雄	免疫不全症におけるサイトカ イン異常	小児内科	36(11)	1725- 1730	2004
金子英雄, 深尾敏幸, 近藤直実	Ataxia-telangiectasia	小児内科	36(11)	1763- 1770	2004

寺本貴英, 篠田紳司, 青木美奈子, 松井永子, 加藤善一郎, 深尾敏幸, 金子英雄, 近藤直実	アトピー性皮膚炎における遺伝因子と環境因子の関与とその対策	日本小児皮膚科学会雑誌	23(2)	59-62	2004
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	われらがMolecular Research	分子呼吸器病	7(4)	373-374	2003
出原賢治	サイトカイン遺伝子とアレルギーの病態	Allergy 21st Century.	12	7-9	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
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, 玉利真由美, 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

山本ひとみ、柳原行義	喘息とリンパ球	THE LUNG perspectives	11	460-463	2003
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
出原賢治	IL-13研究の新展開	最新医学	58(2)	240-244	2002
出原賢治	アレルギー疾患治療薬としての試み 可溶性IL-4レセプターと可溶性IL-13レセプター	Molecular Medicine.	39(5)	586-590	2002
有馬和彦、出原賢治	気管支喘息とIL-13遺伝子多型	アレルギー・免疫	9(10)	78-83	2002
有馬和彦、出原賢治	IL-13/IL-13Rの遺伝子多型とその機能	アレルギー科	14(5)	380-387	2002
有馬和彦、出原賢治	アトピー候補遺伝子	Allergy Update	14(2)	7-7	2002
有馬和彦、出原賢治	IL-13および受容体遺伝子	喘息	15(3)	43-47	2002
有馬和彦、出原賢治	気管支喘息とIL-13遺伝子多型	アレルギーの臨床	22(1)	33-38	2002
安永晋一郎、出原賢治	アレルギーの病態における遺伝子発現変化	臨床検査	46(2)	205-207	2002
有馬和彦	IL-13の遺伝子多型	臨床免疫	38(2)	157-163	2002
柳原行義	アトピー体質と遺伝	アレルギー・免疫	9	74-80	2002
柳原行義	IgE産生とアレルギー性炎症におけるサイトカインの役割	耳鼻免疫アレルギー	20	29-36	2002
山本ひとみ、品澤美樹、梶原景一、柳原行義	アトピー遺伝子の同定とその機能解析	アレルギー・免疫	9	1174-1180	2002
梶原景一、山本ひとみ、柳原行義	成熟B細胞におけるIL-4応答性細胞とIL-13応答性細胞	アレルギー科	14	120-126	2002
梶原景一、品澤美樹、山本ひとみ、柳原行義	AIDの遺伝子多型とその機能	アレルギー科	14	403-407	2002
小林民代、水道裕久、竹内明、牧野武利、田中敏郎、長岡利	ラットにおけるブロッコリーの血清コレステロール低減作用	日本栄養食糧学会誌	55	275-228	2002
平野亨、比嘉慎二、田中敏郎	IL-18遺伝子の多型性と機能	アレルギー科	14	400-402	2002

Chapter 18

IL-13

出原賢治・有馬和彦

IL-13はいわゆるTh2型サイトカインの一つで、IL-4と受容体あるいはシグナル伝達機構を共有している部分が大きく、その結果IL-4と非常に似通った生理活性を持っている。また、IL-13遺伝子はTh2型サイトカイン遺伝子がクラスターを形成している第5番q31(ヒト)、第11番染色体(マウス)上に位置しており、特にIL-4遺伝子と隣接していることから進化的にこれら二つの遺伝子は遺伝子重複により生じたと考えられている。

しかし、最近、気管支喘息発症におけるIL-13の重要性が示唆され、IL-4とは異なる生体内での役割を持っていると考えられるようになってきた。このため、アレルギー疾患に対する分子標的治療の有望な対象としても考えられている。

発見の経緯

マウスのIL-13 cDNAは、Th2型細胞株であるC1.Ly-1⁺2⁻/9に高発現しているmRNAとしてDNAX研究所のグループにより同定され、P600と名付けられたが、その生理活性は不明なままであった¹⁾。その後、三つのグループにより別々にヒトのIL-13が同定された。

一つのグループは、マウスIL-13をもとにして活性化ヒトT細胞のライブラリーより単離し、その蛋白産物は単球に対してMHCクラスII抗原あるいはCD23の発現を誘導するとともに、B細胞に対して抗IgM抗体あるいは抗CD40抗体と協調して増殖を誘導することを明らかにした²⁾。別のグループは、抗CD28抗体により刺激した末梢血

単核球において高発現しているmRNAとして単離し、その蛋白産物は活性化単球に対して炎症抑制作用を引き起こすとともに、大顆粒リンパ球に対してIFN γ 産生を誘導することを明らかにした³⁾。さらに、もう一つのグループは、活性化された末梢血リンパ球由来のcDNAライブラリーから、IL-4、IL-5遺伝子を含むゲノムDNAをプローブとしてcDNAの部分配列を同定した⁴⁾。

こうして、独立して同定された分子が同一のサイトカインであると認識され、IL-13と命名された。

蛋白構造

ヒトIL-13蛋白質は20アミノ酸のシグナル配列につづく112アミノ酸から構成されており、SDS-PAGE上での分子量は10kDa程度である。シグナル配列を18アミノ酸と予測している文献も存在するが²⁾、IL-13 cDNAを強制発現させた酵母およびCOS7細胞の培養上清中に分泌されるIL-13のN末シーケンスの結果から20アミノ酸と考えられている。N型糖鎖結合可能部位が4カ所存在するが、COS7細胞にて強制発現させた場合、糖鎖修飾はほとんど起こらない^{3,5)}。

一次構造上は他のサイトカインとの相同性は低く、最も近縁のIL-4ともアミノ酸レベルで25%程度の同一性しか示さない。しかし、高次構造上はIL-3、IL-4、IL-5、GM-CSFといった短鎖サイトカインと同じく、4本の α ヘリックスからなる「up-up-down-down」型の4-helix bundle構造を示す(図1)⁶⁾。

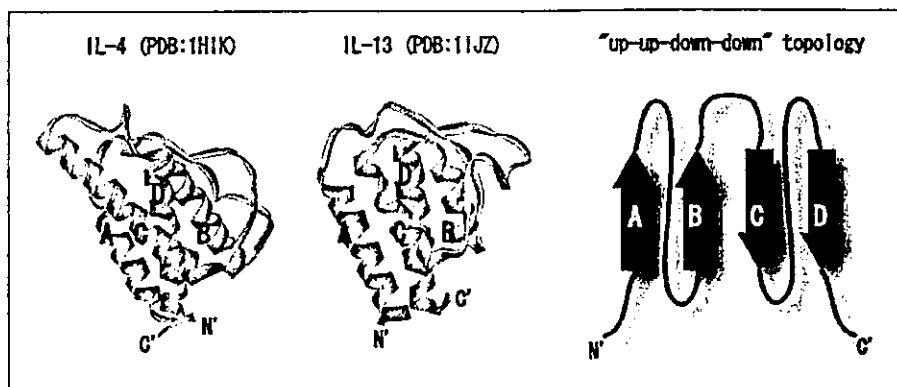


図1 IL-4, IL-13の立体構造比較

4本の α ヘリックスからなるIL-4, IL-13の立体構造を示している。

ヒト以外の複数の種においてもIL-13が同定されており、アミノ酸の相同性はウシ71%, ラット62%, マウス58%である。ヒトIL-13の立体構造はNMR法により決定されており、IL-4との高度な構造の類似性が認められている^{7,8)}。分子内に存在する四つのシステイン残基は二つの分子内ジスルフィド結合を形成している。また、分子内面には多数の疎水性コアを形成するアミノ酸残基が存在しており、Leu16, Phe94, Thr87といったアミノ酸残基は他の短鎖サイトカインとの間でよく保存されている。さらに、多くのサイトカインで保存されている最初の α ヘリックス中の溶媒面に露出した酸性アミノ酸残基は、IL-13においては活性発現に必須な残基であるGlu11として保存されている⁹⁾。

ヒトIL-13には気管支喘息と関連する一塩基多型Arg110Glnが存在する。このアミノ酸残基はC末から数えて3番目のアミノ酸であり、変異によってIL-13受容体 $\alpha 2$ 鎖(IL-13R $\alpha 2$)との親和性に差を生じることが明らかにされている^{10,11)}。

受容体

IL-13受容体(IL-13R)はIL-13受容体 $\alpha 1$ 鎖(IL-13R $\alpha 1$)とIL-4受容体 α 鎖(IL-4R α)で構成されるヘテロ二量体よりなり、これはIL-4受容体(IL-4R)としても機能している^{12,13)}(図2)。IL-13のシグナル伝達経路においては、IL-4と同じようにJAK/STAT経路とPI3キナーゼ経路が活性化される。JAK/STAT経路においては、JAKファミリーのなかのTYK2とJAK1が活性化され、

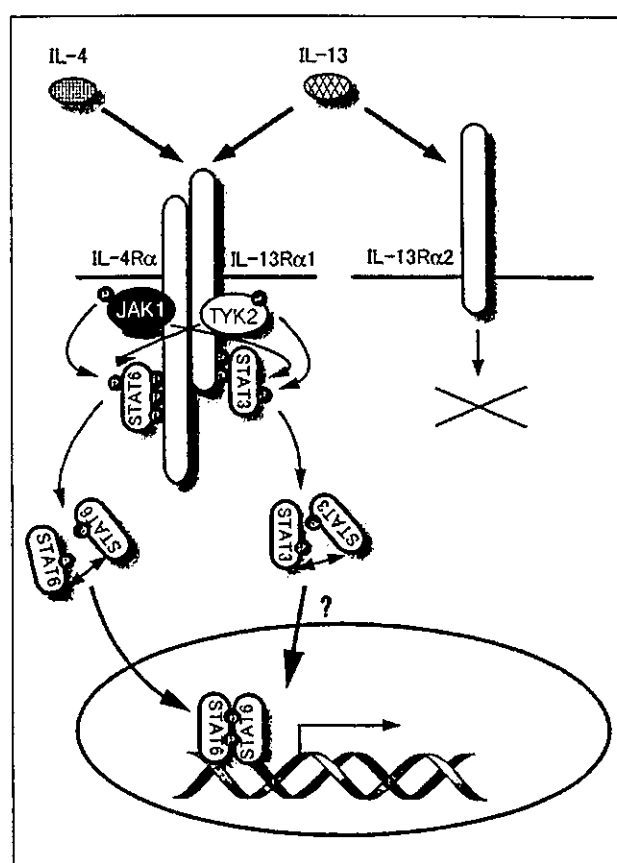


図2 IL-13の受容体とシグナル伝達経路

IL-13受容体としてIL-13R $\alpha 1$ とIL-4R α で構成されるヘテロ二量体とIL-13R $\alpha 2$ を示している。また、IL-13のシグナル伝達経路におけるJAK/STAT経路を示している。

引きつづきSTATファミリーのなかのSTAT6とSTAT3が活性化される。IL-4とIL-13のどちらもSTAT6を活性化するために、この両者は共通した生理活性を持っていると考えられている。

IL-13R $\alpha 1$ とは別にIL-13と結合する分子とし

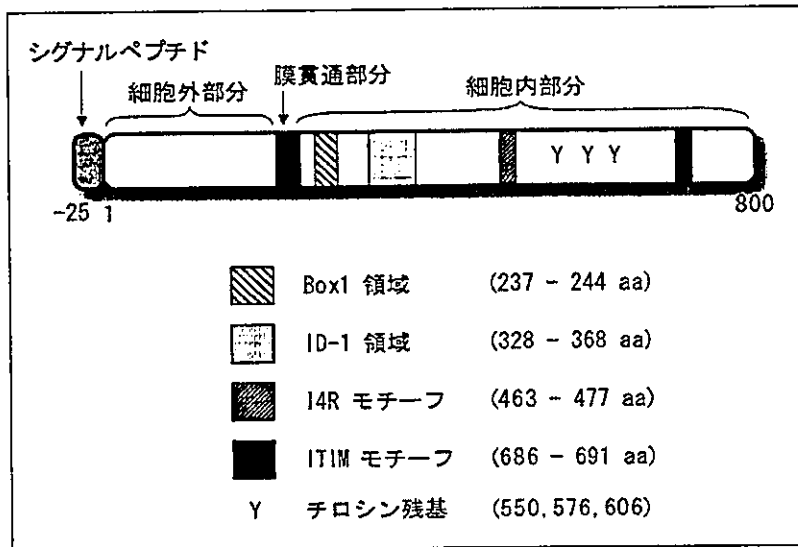


図3 IL-4R α の機能マッピング

IL-4R α 上の機能的ドメインを示している。数字は成熟蛋白質のN末からのアミノ酸残基数を、Yはチロシン残基をあらわしている。

てIL-13R α 2が同定されているが、その細胞内ドメインは短くBox1モチーフを持たないためシグナル伝達分子の会合は起こらず、「おとり受容体」として働いていると考えられている。

IL-4R α

ヒトとマウスのIL-4R α はそれぞれ825, 810個のアミノ酸よりなり(シグナル配列を含む)、アミノ酸レベルで50%の相同性を示す。IL-4R α 遺伝子はヒト、マウスでそれぞれ第16番p11-12, 7番染色体上に位置する。IL-4R α にはスプライシング産物である可溶型が存在する。IL-4R α はサイトカインレセプタースーパーファミリーに属し、細胞外部分には位置的に保存された4個のシステイン残基とWSXWSモチーフが存在する。細胞内部分には膜貫通部分に近いところにBox1モチーフがあり、ここにJAKファミリーに属するJAK1が結合する。細胞内部分にはさらにID-1部位、insulin receptor substrate-1/2が結合するI4Rモチーフ、STATファミリーに属するSTAT6が結合するチロシン残基、抑制性シグナルを持つITIMモチーフといったシグナル伝達に重要な部位が存在する(図3)。

IL-4R α はIL-4RとIL-13Rの共通成分であるため、IL-4とIL-13の両方のシグナルに重要であると考えられており、そのためIL-4R α ノック

アウトマウスでは、IL-4あるいはIL-13ノックアウトマウスにくらべて寄生虫感染防御においてより高度な障害を示す^{14,15)}。また、IL-4R α 遺伝子上にアレルギー疾患の発症と遺伝学的に相関を示す一塩基多型の存在が報告されており、IL-4R α はアレルギー疾患の原因遺伝子の一つだと考えられている^{10,16)}(図4)。このうち細胞外領域のIle50Valは、日本人集団においてアトピー性気管支喘息、総IgE値との相関が示されている。細胞内のGln551Argはアトピー性皮膚炎や高IgE症候群との相関が報告されたものの否定的な報告もある。

本受容体鎖の発現はほとんどの組織・細胞において認められる。気道組織においては、IL-4R α は恒常的に気管支上皮細胞、気管支平滑筋細胞に発現しており¹⁷⁾、IL-4やIL-13の刺激はこの発現レベルに影響しない。

IL-13R α 1

ヒトとマウスのIL-13R α 1はそれぞれ427, 424個のアミノ酸よりなり(シグナル配列を含む)、アミノ酸レベルで76%の相同性を示し、ヒト、マウスでそれぞれXq24染色体、X染色体上に位置する。IL-13R α 1にもIL-4R α と同様にスプライシング産物である可溶型が存在する。IL-13R α 1もサイトカインレセプタースーパーファミリーに属

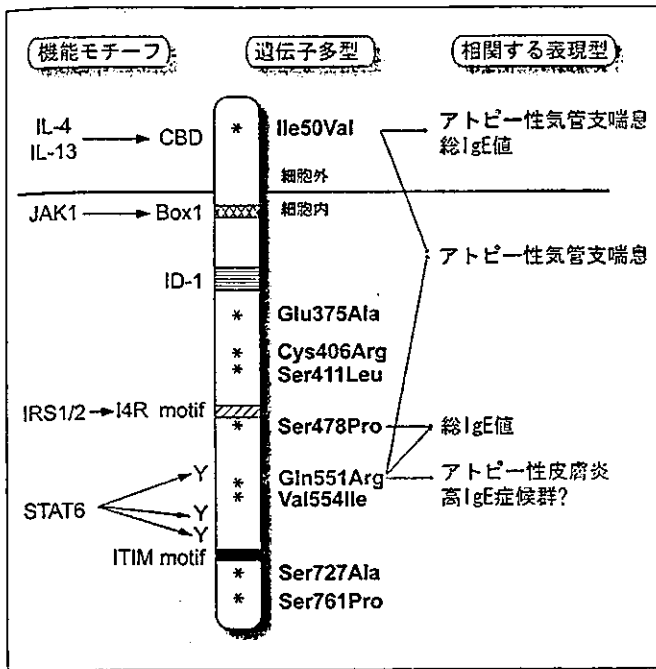


図4 ヒトIL-4R α 鎖の遺伝子多型による

アミノ酸変異ヒトIL-4R α 鎖上に存在する9個のアミノ酸変異を伴う塩基多型と、それらと相関するアレルギー疾患の表現型を示している。

し、細胞外部分には位置的に保存された4個のシステイン残基とWSXWSモチーフが存在する。細胞内部分には膜貫通部分に近いところにBox1モチーフがありTYK2が結合する。細胞内部分にはさらにSTAT3が結合するためのチロシン残基が存在する^{18,19)}。

マウスIL-13R α 1のmRNAは筋肉以外の多くの組織に発現しており、また、ヒトIL-13R α 1のmRNAは筋肉も含めて多くの組織で発現が認められている。B細胞では休止状態でIL-13R α 1はほとんど発現していないためIL-13シグナルは弱くしか伝達されないが、抗IgM抗体や抗CD40抗体でB細胞が活性化されるとIL-13R α 1の発現が増強されIL-13のシグナル伝達が増大するようになる²⁰⁾。

気道組織においては、IL-13R α 1はIL-4R α と同様に恒常的に気管支上皮細胞、気管支平滑筋細胞に発現しており¹⁷⁾、IL-4やIL-13の刺激はこれらの構成成分の発現レベルには影響しない。

IL-13R α 2

ヒトとマウスのIL-13R α 2はそれぞれ380、

383個のアミノ酸よりなり(シグナル配列を含む)、アミノ酸レベルで58%の相同性を示し、ヒト、マウスでそれぞれXq13-28染色体、X染色体上に位置する。細胞外ドメインには4個のシステイン残基とWSXWSモチーフが保存され、サイトカインレセプタースーパーファミリーに属する。しかし、IL-13R α 1と異なり細胞内ドメインは17個のアミノ酸よりなる短いものであるとともに、Box1モチーフも保存されていない。他の蛋白質との相同性はヒトIL-5R α と最も高く27%である。

IL-13R α 2を強制発現させた細胞においては、IL-4/IL-13によるSTAT6活性化が阻害されることから、IL-13R α 2は「おとり受容体」として働いていると考えられている^{21,22)}。また、気管支上皮細胞や肝細胞では、IL-4あるいはIL-13刺激によりIL-13R α 2の発現が誘導され、これらの細胞におけるIL-13シグナルに対するネガティブフィードバック機構として機能していると考えられている^{23,24)}。リンパ球では発現は認められない。

遺伝子

ヒト、マウスともにIL-13遺伝子の長さは約4.5kbにわたり、4個のエクソンと3個のイントロンより構成されている。ヒトでは染色体5番q31に、マウスではヒト5番染色体長腕とシンテニー領域である11番染色体に位置している。この領域には、主にTh2型のサイトカイン遺伝子がクラスターを形成しており、セントロメア側からIL-3、GM-CSF、IL-5、IL-13、IL-4遺伝子の順に位置している(図5)。これらのサイトカインのエクソン-イントロン構造はヒト、マウスともによく保存されており、共通の祖先遺伝子からの遺伝子重複によって生じたと考えられている²⁵⁾。

IL-13とIL-4遺伝子は近接しており、遺伝子間の距離はわずか12.5kbである。この領域内には、哺乳類間でよく保存されたDNA配列(conserved noncoding sequences: CNS)が存在する。なかでもIL-13、IL-4遺伝子間に存在するCNS-1は、ヒトとマウス間で401bpにわたり84%の一致率を示し、IL-4、IL-13、IL-5の転写において重要なDNAシスエレメントとして機

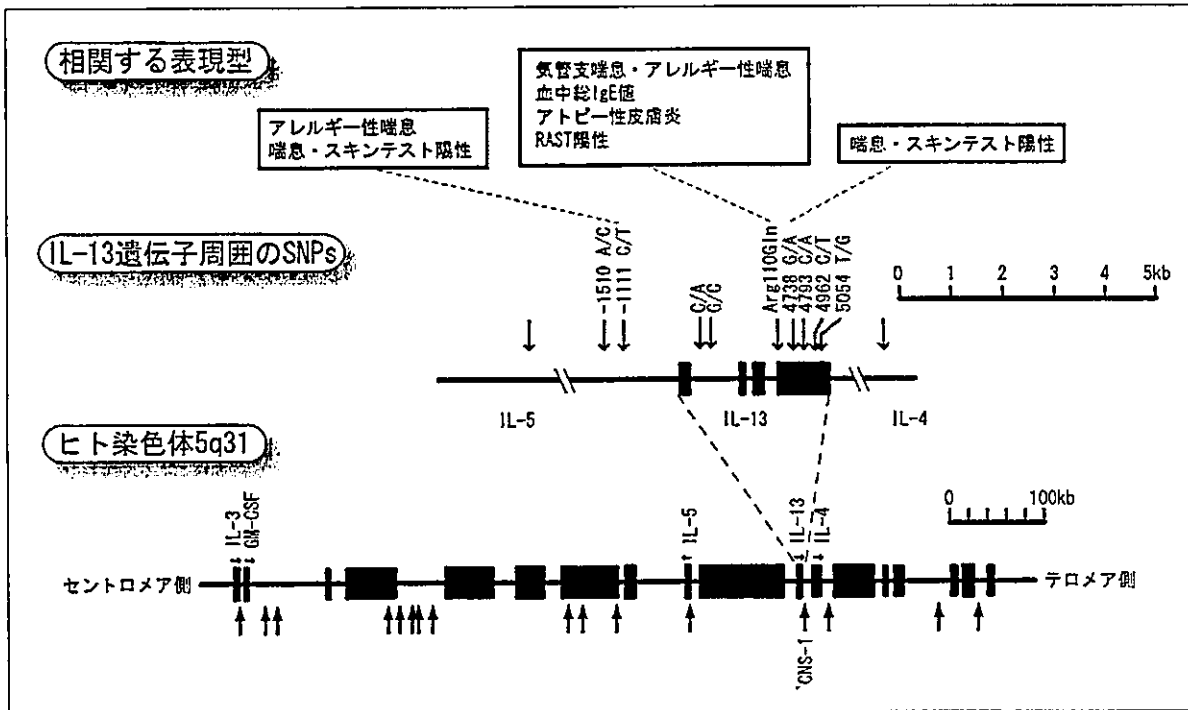


図5 ヒト IL-13 遺伝子の構造と一塩基多型

ヒト染色体5番q31におけるIL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-13 遺伝子の位置を示している。この領域に多数存在する CNS のうち、特にヒトとマウスの間で高度に保存されている 16 カ所を上向き矢印で示すとともに、Th2型サイトカインの転写において DNA シスエレメントとして機能する CNS-1(*) を示している。中段には、IL-13 遺伝子周囲に見出されている主要な一塩基多型(下向き矢印)と、それらと相関するアレルギー疾患の表現型を示している。

能することが示されている²⁶⁾。

IL-13 遺伝子にはこれまでに少なくとも9個の一塩基多型が存在することが知られており、5'非翻訳領域の多型を除く他の多型は高度に連鎖不均衡にあることが示されている(図5)。これらのうち、-1111(-1055)C/T多型はアレルギー性喘息やスキントテスト陽性と、Arg110Gln多型は気管支喘息・アレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎、血中総IgE値、抗原特異的IgE値と、4738G/A多型は喘息・スキントテスト陽性との相関が示されている²⁷⁾。非翻訳領域の遺伝子多型のうち、-1111(-1055)C/T多型はNFAT結合配列に隣接しており、多型により核蛋白質の結合量が変わることが示されていることから、IL-13 遺伝子の転写に影響を及ぼしている可能性が示唆されている。翻訳領域の遺伝子多型のうち、アミノ酸変化を伴う唯一の多型 Arg110Gln は翻訳産物の受容体結合に影響を与えることが示されている¹¹⁾。

発現細胞

IL-13を発現することが確認されているのは、CD4⁺T細胞、NK細胞、NKT細胞、肥満細胞、好塩基球、好酸球である^{25,26)}。

CD4⁺T細胞のうち、いわゆるTh2型細胞が分泌し、これがIL-4, IL-5, IL-9, IL-10などとともにIL-13がTh2型サイトカインとよばれるゆえである。

発現制御

IL-13はIL-4やIL-5などとともにTh2型サイトカインに属しているが、発現機構としては他のTh2型サイトカインと共通している点と異なっている点とが存在する。

共通な点として、GATA3の発現を必要とすることがあげられる。これは、機能欠失型のGATA3を発現させたマウスにおいて、IL-4やIL-5とともにIL-13の発現低下が生じたことから

示されている²⁹⁾。GATA3が結合しうるGATA3反応性部位(CGRE)はIL-13遺伝子の1.6kbp上流に存在し、この部位にGATA3とともにヒストンアセチルトランスフェラーゼ、CBP/p300、RNAポリメラーゼIIが結合し、Th2型細胞特異的なヒストンアセチル化とともにIL-13遺伝子の発現誘導を引き起こすことが確認されている³⁰⁾。また、このGATA3発現にはNF- κ BとSTAT6の活性化が必要であることも示されている^{30,31)}。

異なる点としては、IL-4発現に必須であるc-MafをIL-13発現は必要としないことがあげられる。これはc-Mafノックアウトマウスによって確認され、IL-5やIL-10といった他のTh2型サイトカインもc-Mafを必要としない³²⁾。さらに、NFAT1の発現によりIL-13発現が誘導されることがJurkat細胞を用いた解析により示されているが、IL-4と異なりAP-1との協調作用を必要としない³³⁾。

生理活性

ヒトIL-13は、IL-4と同様にB細胞に対してIgE、IgG4(マウスではIgG1)へのクラススイッチング、CD23、MHCクラスII抗原の発現増強の誘導を引き起こし、単球に対しては抗炎症作用を示す²⁵⁾(表1)。しかし、T細胞にはIL-13R α 1が発現していないためIL-4と異なり増殖作用、Th2分化といった作用は示さない。肥満細胞に対する活性化作用もIL-4ほど明らかではない。一方、マウスIL-13はB細胞に対する作用を持たないが、単球に対してはヒトIL-13と同じ作用を持っている²⁵⁾。

免疫系細胞に関する解析に遅れて、非免疫系細胞に対する作用についても解析が進められてきた。特に気管支喘息との関連性から気道組織における局所細胞(resident cell)に対する作用について、詳細な解析が行われている。気道上皮細胞に対しては、TGF β ^{34,35)}やeotaxin-3などの産生³⁶⁾、塩素イオンチャンネルであるヒトCLCA1(マウスCLCA3)の誘導³⁷⁾、ムチン産生³⁸⁾などを引き起こし、線維芽細胞に対してはeotaxinの産生³⁹⁾、インテグリンの誘導⁴⁰⁾、増殖作用⁴¹⁾などを示し、平滑筋細胞に対してはeotaxin産生^{42,43)}、収縮機能

表1 IL-4とIL-13の生理活性

	IL-4	IL-13
Th2型細胞誘導	+	-
T細胞増殖	+	-
IgE産生	+	+
単球抗炎症作用	+	+
肥満細胞活性化	+	-~±
粘液産生	+	++
基底膜肥厚化	+	++
平滑筋肥大	+	++

の亢進^{44,45)}を引き起こす。このようにIL-13の非免疫系細胞に対する作用は非常に多様であることが判明した。

生体内において、IL-4と同様に寄生虫感染に対する生体防御に重要な役割を果たしていると考えられており、IL-13ノックアウトマウスでは寄生虫に対して易感染性を示す⁴⁶⁾。

疾患との関連

IL-13の発現が気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎患者の局所病変部位において亢進していることから、IL-13はこれらのアレルギー疾患の発症に関与していることが示唆されている¹³⁾。特に、気管支喘息の発症にIL-13が重要な役割を果たしていることが、モデルマウスの解析より示されている^{47~50)}。また、IL-13遺伝子上に存在する一塩基多型とアレルギー疾患の間には、前述したように遺伝学的な相関が認められている^{11,17)}(図5)。

従来、アレルギー疾患の発症機序におけるIL-13の役割としては、B細胞に作用することによるIgE産生の誘導を介したものと考えられていた。しかし、喘息モデルマウスを用いた実験により、特異的にIL-13の作用を阻害することにより、IgE産生や好酸球浸潤が影響を受けずに気道過敏性の亢進、粘液産生がほぼ完全に抑えられ、RAG1ノックアウトマウスでの解析によりこの効果はリンパ球非依存的であることが示された^{47,48)}。こうしてIL-13が直接気道の末梢組織に存在する局所細胞に作用して喘息の発症に関与していると考えられるようになった。この考えは、IL-13を

表2 現在開発中のIL-13拮抗薬一覧

化合物名	製造会社	IL-4 阻害作用	IL-13 阻害作用
可溶性IL-13受容体	Wyeth/Genetic Institute 社	-	+
IL-4/IL-13トラップ	Regeneron 社	+	+
IL-4 mutein	Bayer 社	+	+
抗IL-13 R α 1抗体	AMRDA 社	?	+

気道上皮細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウス⁴⁹⁾や気道上皮細胞特異的にSTAT6発現を回復させたSTAT6ノックアウトマウスの解析によりさらに支持されている⁵⁰⁾。

局所細胞に対するIL-13の作用による気道過敏性亢進の誘導機序については、現在解析が進められているが、塩素イオントランスポーターであるヒトCLCA1(マウスCLCA3)や補体分子であるC3などの分子の関与が示唆されている^{27,51)}。

薬剤開発の現況

気管支喘息の発症にIL-13が重要であることから、種々のIL-13に対する拮抗薬が開発されている⁵²⁾(表2)。

可溶性IL-13受容体

可溶性サイトカイン受容体を投与してサイトカインの作用を阻害することにより、気管支喘息の治療に結びつけようとする試みとして可溶性IL-4R α が先行して試みられているが、可溶性IL-13Rを人工的に作製して気管支喘息の治療に用いる試みもなされている。このような受容体の候補として、可溶性IL-13R α 1と可溶性IL-13R α 2の二つが存在するが、IL-13との親和性はIL-13R α 1(Kd=1~数nM)よりもIL-13R α 2(Kd=100~数100pM)のほうが約100倍程度高いため、可溶性IL-13R α 2のほうが治療薬として有用であると考えられている。

Wyeth/Genetics Institute社が可溶性IL-13R α 2を開発しており、現時点ではマウスやモルモットの喘息誘発モデルに対して効果を示したことを報告しているが^{48,53)}、患者に対する治験結果はまだ報告されていない。また、Regeneron社は、複数の可溶性サイトカイン受容体鎖をタンデムに結

合させてサイトカインシグナルを阻害する系を開発したが、この系を用いた可溶性IL-4R α と可溶性IL-13R α 1を連結させたIL-4/IL-13トラップが、現在米国で軽症喘息に対する第I相臨床治験中である。

その他のIL-13拮抗薬

可溶性IL-13R以外で現在考えられているIL-13拮抗薬としては、Bayer社が治療薬として開発中のIL-4 muteinがあげられる。これはIL-4の124番目のアミノ酸残基であるチロシンをアスパラギン酸に置換した変異体(Y124D)⁵⁴⁾、さらに121番目のアミノ酸残基であるアルギニンをアスパラギン酸に置換した変異体(R121D/Y124D)であり⁵⁵⁾、IL-4とIL-13の共通した受容体に結合するものの細胞内にシグナルを伝達できないため、IL-4シグナルのみならずIL-13シグナルに対しても拮抗薬として働く。

その他にAMRAD社が抗IL-13R α 1抗体を治療薬として開発中である。

また、拮抗薬ではないが、脳腫瘍や腎細胞がんといったある種のがん細胞にIL-13Rが高発現していることから、これらの細胞を選択的に死滅させるべくIL-13Rに緑膿菌外毒素を融合させた組換え蛋白質(IL13-PE38QQR; Neopharm社)が開発されており、米国では脳腫瘍に対する第I/II相の臨床治験において一定の有効性が報告されている⁵⁶⁾。

文 献

- 1) Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.
- 2) McKenzie AN, Culpepper JA, de Waal Malefyt R et al.: Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3735-3739, 1993.

- 3) Minty A, Chalon P, Derocq J-M et al. : Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 362: 248-250, 1993.
- 4) Morgan JG, Dolganov GM, Robbins SE et al. : The selective isolation of novel cDNAs encoded by the regions surrounding the human interleukin 4 and 5 genes. *Nucleic Acids Res.* 20 : 5173-5179, 1992.
- 5) Minty A, Asselin S, Bensussan A et al. : The related cytokines interleukin-13 and interleukin-4 are distinguished by differential production and differential effects on T lymphocytes. *Eur. Cytokine Netw.* 8 : 203-213, 1997.
- 6) Bazan JF : Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 6934-6938, 1990.
- 7) Moy FJ, Diblasio E, Wilhelm J et al. : Solution structure of human IL-13 and implication for receptor binding. *J. Mol. Biol.* 310 : 219-230, 2001.
- 8) Eisenmesser EZ, Horita DA, Altieri AS et al. : Solution structure of interleukin-13 and insights into receptor engagement. *J. Mol. Biol.* 310 : 231-241, 2001.
- 9) Oshima Y, Puri RK : Characterization of a powerful high affinity antagonist that inhibits biological activities of human interleukin-13. *J. Biol. Chem.* 276 : 15185-15191, 2001.
- 10) Shirakawa T, Deichmann KA, Izuhara K et al. : Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol. Today* 21 : 60-64, 2000.
- 11) Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y et al. : Upregulation of IL-13 concentration *in vivo* by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109 : 980-987, 2002.
- 12) Nelms K, Keegan AD, Zamorano J et al. : The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 17 : 701-738, 1999.
- 13) Izuhara K, Umeshita-Suyama R, Akaiwa M et al. : Recent advances in understanding how interleukin-13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 48 : 505-512, 2000.
- 14) McKenzie GJ, Fallon PG, Emson CL et al. : Simultaneous disruption of interleukin(IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J. Exp. Med.* 189 : 1565-1572, 1999.
- 15) Mohrs M, Ledermann B, Köhler G et al. : Differences between IL-4-and IL-4 receptor α -deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. *J. Immunol.* 162 : 7302-7308, 1999.
- 16) Izuhara K, Shirakawa T : The signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int. J. Mol. Med.* 3 : 3-10, 1999.
- 17) Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M et al. : Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum. Mol. Genet.* 9 : 549-559, 2000.
- 18) Orchansky PL, Kwan R, Lee F et al. : Characterization of the cytoplasmic domain of interleukin-13 receptor- α . *J. Biol. Chem.* 274 : 20818-20825, 1999.
- 19) Umeshita-Suyama R, Sugimoto R, Akaiwa M et al. : Characterization of IL-4 and IL-13 signals dependent on the human IL-13 receptor α chain 1: redundancy of requirement of tyrosine residue for STAT3 activation. *Int. Immunol.* 12 : 1499-1509, 2000.
- 20) Ogata H, Ford D, Kouttab N et al. : Regulation of interleukin-13 receptor constituents on mature human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273 : 9864-9871, 1998.
- 21) Kawakami K, Taguchi J, Murata T et al. : The interleukin-13 receptor α 2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood* 97 : 2673-2679, 2001.
- 22) Bernard J, Treton D, Vermot-Desroches C et al. : Expression of interleukin 13 receptor in glioma and renal cell carcinoma : IL13R α 2 as a decoy receptor for IL13. *Lab. Invest.* 81 : 1223-1231, 2001.
- 23) Chiaramonte MG, Mentink-Kane M, Jacobson BA et al. : Regulation and function of the interleukin 13 receptor α 2 during α T helper cell type 2-dominant immune response. *J. Exp. Med.* 197 : 687-701, 2003.
- 24) Zheng T, Zhu Z, Liu W et al. : Cytokine regulation of IL-13R α 2 and IL-13R α 1 *in vivo* and *in vitro*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 : 720-728, 2003.
- 25) Zurawski G, de Vries JE : Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol. Today* 15 : 19-26, 1994.
- 26) Loots GG, Locksley RM, Blankespoor CM et al. : Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. *Science* 288 : 136-140, 2000.
- 27) Wills-Karp M, Chiaramonte M : Interleukin-13 in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 9 : 21-27, 2003.
- 28) Woerly G, Lacy P, Younes AB et al. : Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. *J. Leukocyte Biol.* 72 : 769-779, 2002.
- 29) Zhang DH, Yang L, Cohn L et al. : Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of GATA-3. *Immunity* 11 : 473-482, 1999.
- 30) Yamashita M, Ukai-Tadenuma M, Kimura M et al. : Identification of a conserved GATA3 response element upstream proximal from the interleukin-13 gene locus. *J. Biol. Chem.* 277 : 42399-42408, 2002.
- 31) Das J, Chen CH, Yang L et al. : A critical role for NF- κ B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* 2 : 45-50, 2001.
- 32) Kim JI, Ho IC, Grusby MJ et al. : The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10 : 745-751, 1999.
- 33) Macian F, Garcia-Rodriguez C, Rao A : Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J.* 19 : 4783-4795, 2000.
- 34) Richter A, Puddicombe SM, Lordan JL et al. : The contribution of interleukin(IL)-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25: 385-391, 2001.
- 35) Wen FQ, Kohyama T, Liu X et al. : Interleukin-4-and

- interleukin-13-enhanced transforming growth factor- β_2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon- γ . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 : 484-490, 2002.
- 36) Banwell ME, Tolley NS, Williams TJ et al. : Regulation of human eotaxin-3/CCL26 expression : modulation by cytokines and glucocorticoids. *Cytokine* 17 : 317-323, 2002.
- 37) Zhou Y, Dong Q, Louahed J et al. : Characterization of a calcium-activated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25 : 486-491, 2001.
- 38) Zuhdi Alimam M, Piazza FM, Selby DM et al. : Muc-5/5ac mucin messenger RNA and protein expression is a marker of goblet cell metaplasia in murine airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22 : 253-260, 2000.
- 39) Hoeck J, Woisetschlager M : STAT6 mediates eotaxin-1 expression in IL-4 or TNF- α -induced fibroblasts. *J. Immunol.* 166 : 4507-4515, 2001.
- 40) Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C et al. : IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int. Immunol.* 10 : 1421-1433, 1998.
- 41) Kraft M, Lewis C, Pham D et al. : IL-4, IL-13, and dexamethasone augment fibroblast proliferation in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 : 602-606, 2001.
- 42) Moore PE, Church TL, Chism DD et al. : IL-13 and IL-4 cause eotaxin release in human airway smooth muscle cells : a role for ERK. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282 : L847-853, 2002.
- 43) Hirst SJ, Hallsworth MP, Peng Q et al. : Selective induction of eotaxin release by interleukin-13 or interleukin-4 in human airway smooth muscle cells is synergistic with interleukin-1 β and is mediated by the interleukin-4 receptor α -chain. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 : 1161-1171, 2002.
- 44) Laporte JC, Moore PE, Baraldo S et al. : Direct effects of interleukin-13 on signaling pathways for physiological responses in cultured human airway smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164 : 141-148, 2001.
- 45) Grunstein MM, Hakonarson H, Leiter J et al. : IL-13-dependent autocrine signaling mediates altered responsiveness of IgE-sensitized airway smooth muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282 : L520-528, 2002.
- 46) Bancroft AJ, McKenzie ANJ, Grecis RK : A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. *J. Immunol.* 160 : 3453-3461, 1998.
- 47) Grunig G, Warnock M, Wakil AE et al. : Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 282 : 2261-2263, 1998.
- 48) Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X et al. : Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282 : 2258-2261, 1998.
- 49) Zhu Z, Homer RJ, Wang Z et al. : Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.* 103 : 779-788, 1999.
- 50) Kuperman DA, Huang X, Koth LL et al. : Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat. Med.* 8 : 885-889, 2002.
- 51) Wills-Karp M : IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 : 9-18, 2001.
- 52) Izuhara K, Arima K, Yasunaga S : IL-4 and IL-13 : their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies. *Current Drug Targets Inflamm Allergy* 1 : 263-269, 2002.
- 53) Morse B, Sypek JP, Donaldson DD et al. : Effects of IL-13 on airway responses in the guinea pig. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 282 : L44-49, 2002.
- 54) Kruse N, Tony H-P, Sebald W : Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement. *EMBO J.* 11 : 3237-3244, 1992.
- 55) Tony HP, Shen BJ, Reusch P et al. : Design of human interleukin-4 antagonists inhibiting interleukin-4-dependent and interleukin-13-dependent responses in T-cells and B-cells with high efficiency. *Eur. J. Immunol.* 225 : 659-665, 1994.
- 56) Husain SR, Puri RK : Interleukin-13 receptor-directed cytotoxin for malignant glioma therapy : from bench to bedside. *J. Neurooncol.* 65 : 37-48, 2003.

2. IL-4/IL-13 誘導遺伝子とアレルギー疾患発症との関連

佐賀医科大学分子生命科学講座

出原 賢治

はじめに

ヒトゲノムプロジェクトの完了により、現在ではヒトゲノムの全配列に関する情報を得られるようになった。このゲノム情報の利用が可能となったポストゲノム時代における重要な課題として、機能ゲノム解析 (functional genomics) の推進があげられる (図 1)。機能ゲノム解析とは、各遺伝子がどのように機能するのか、そしてそれらが合わさってゲノム全体ではどのような生物機能の形を形成するのかを、組織的にかつハイスループットに解析する試みを指す。機能ゲノム解析を推進するうえでの強力な道具としてマイクロアレイがあげられる。マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロフィールに関する情報をもとに機能ゲノム解析を進めることにより、疾患に関連したバイオマーカーを同定したり、新規創薬の標的を定めることが可能になると期待される。しかし、これらの遺伝子発現に関する情報に加えて、古典的な遺伝子解析、プロテオーム解析、あるいはモデル動物における解析で得られる結果を統合することによって初めて、疾患の診断あるいは治療にとって本当に有用な遺伝子を選別することができるようになると考えられる。

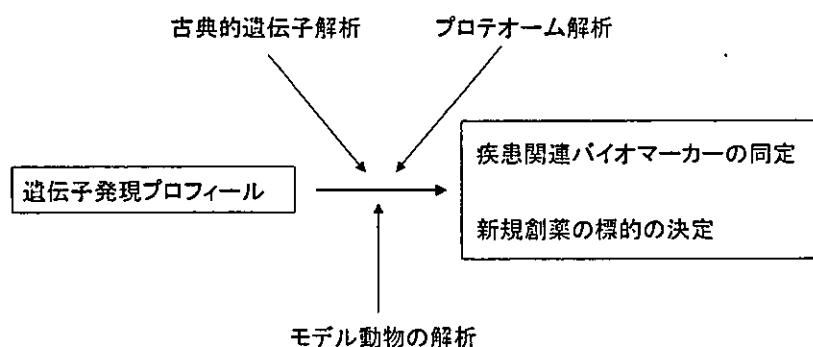


図1 機能ゲノム解析の流れ

機能ゲノム解析の流れを示す。マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロフィールに関する情報をもとにして、それに古典的な遺伝子解析、プロテオーム解析、あるいはモデル動物における解析で得られる結果を統合し、最終的に疾患に関連したバイオマーカーの同定、あるいは新規創薬の標的の決定を行う。

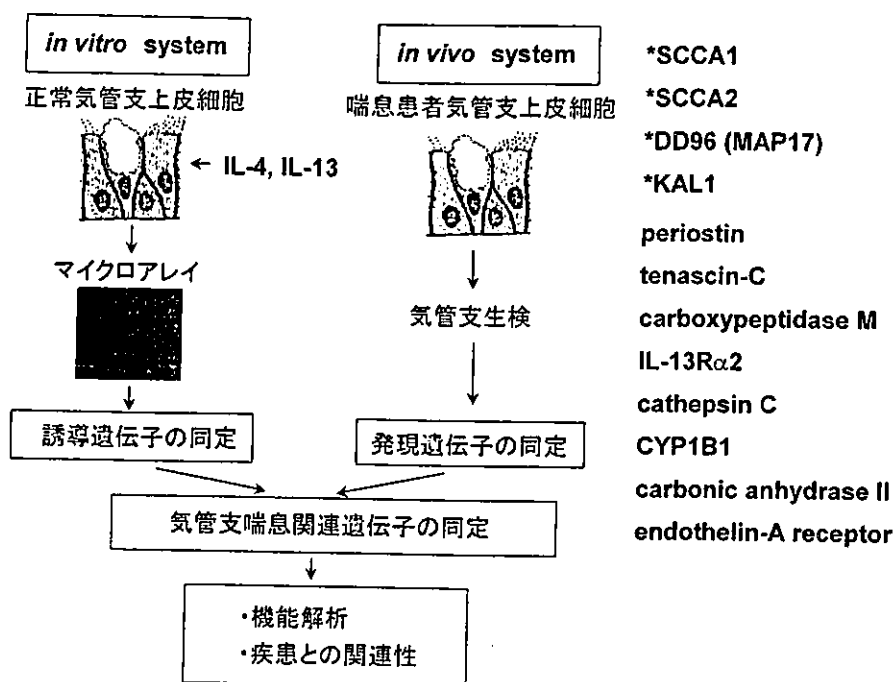


図2 気管支喘息関連遺伝子同定の戦略

気管支喘息関連遺伝子同定の戦略を示す。IL-4 あるいは IL-13 によりヒト気管支上皮細胞を刺激して、誘導遺伝子をマイクロアレイにて同定した。これとは別に気管支喘息患者の病変部位に発現している遺伝子を同定した。誘導遺伝子を示すとともに、気道組織においても発現が増強されている遺伝子を示している (*)。

1. IL-4, IL-13 により誘導される気管支喘息関連遺伝子の同定

気管支喘息は遺伝要因と環境要因が組み合わさって起こる複雑な疾患である。多くの細胞や分子が関与しており、また個々人における多様性も存在するため、その病因の同定は困難であった。免疫学の進歩により気管支喘息においては体内の Th1/Th2 バランスが Th2 側に傾いており、その Th2 優位性が発症に重要だと考えられるようになった。Th2 型サイトカインの中では当初古典的メンバーである IL-4 と IL-5 の役割が注目されていたが、モデルマウスの解析結果に基づいて IL-13 が気管支喘息発症に中心的な役割を果たしているのではないかと考えられるようになった。われわれは IL-13 遺伝子の SNP が気管支喘息の発症と関連し、この SNP によるアミノ酸置換が機能的に IL-13 シグナルを増強することをすでに報告しており、ヒトにおける気管支喘息発症においても IL-13 が重要であることを示している。そこで次なる課題として、どのような機序でこの IL-13 が気管支喘息の発症に寄与しているかという点の解明があげられる。この点を明らかにする手がかりを得るために、われわれは気管支上皮細胞を IL-4 あるいは IL-13 で刺激した際に誘導される遺伝子をマイクロアレイ法を用いて同定し、その機能解析を行ってきた。

IL-4 あるいは IL-13 によりヒト気管支上皮細胞を刺激すると、IL-4 と IL-13 のどちらの刺激の場合でも刺激なしの場合に比べて 3 倍以上の誘導が示された遺伝子が 12 個存在した。この誘導遺

表1 SCCA 分子変異型の Der p 1 の酵素活性に対する阻害活性

SCCA 分子変異型の RSL 部分のアミノ酸配列とそれらの Der p 1 の酵素活性に対する阻害活性を示す。SCCA2-tm が SCCA2 よりも強い阻害活性を示すことに注目してほしい。

	6	5	4	3	2	1	1'	2'	3'	4'	5'	6'	活性
SCCA2	A	V	V	V	V	E	L	S	S	P	S	T	+
SCCA1	.	.	.	G	F	G	S	.	P	T	.	.	-
SCCA1-RSL2	+
SCCA2-RSL1	.	.	.	G	F	G	S	.	P	T	.	.	-
SCCA2-M1	.	.	.	G	-
SCCA2-M2	F	-
SCCA2-M4	G	++
SCCA2-M3	S	-
SCCA2-M5	P	T	.	.	++
SCCA2-M3+M5 (tm)	G	.	.	P	T	.	.	+++

伝子の中で最も誘導の程度が強かったのは、扁平上皮細胞抗原 (SCCA) 1 と SCCA2 であった (図 2)。この解析とは別に英国 Southampton General Hospital において Holgate 博士らのグループが 3~4 名の気管支喘息患者と正常者の気道組織を気管支鏡下で生検し、それぞれのグループの組織において発現している遺伝子を約 4000 ほど同定した。SCCA 由来のクローンは喘息患者グループでは 11 個認められたのに対し、正常者グループでは 3 個のみ認められ、気管支喘息患者の病変部位において SCCA の発現レベルが増加していることが確かめられた。さらに、小児気管支喘息患者と非喘息患者の血中 SCCA レベルを比較したところ、非喘息患者に比べて喘息患者で血中レベルが上昇しており、特に増悪期に著明な上昇がみられ、発作の緩解とともにそのレベルは低下していた。また、緩解期の血中 SCCA レベルと血中 IL-13 レベルの間に正の相関関係がみられた。これらのことから、SCCA は気管支喘息の新規のバイオマーカーになりうると考えられ、生体内における IL-13 の発現増強を反映している可能性が示唆された。

2. 気管支喘息の病態における SCCA1, SCCA2 の役割

そこで次なる疑問として、SCCA1 と SCCA2 は気管支喘息の病態においてどのような役割を果たしているかという点があげられた。SCCA1 と SCCA2 はセルピンと呼ばれるセリンプロテアーゼファミリーに属する分子であり、アミノ酸レベルで 91% と非常によく一致している。しかし、標的遺伝子は SCCA1 と SCCA2 との間で異なっており、SCCA1 はカテプシン S, K, L, パパインといったシステインプロテアーゼの活性を阻害し、SCCA2 はカテプシン G, マスト細胞キマーゼといったセリンプロテアーゼの活性を阻害することが知られている。一方、主要なアレルゲンの一つであるヤケヒョウヒダニ、コナヒョウヒダニ由来の精製抗原として、現在までに約 18 種類が同定されている。そのうちグループ I 抗原 (Der p 1, Der f 1) に対する抗体は抗ダニ抗体全体の半分以上を占

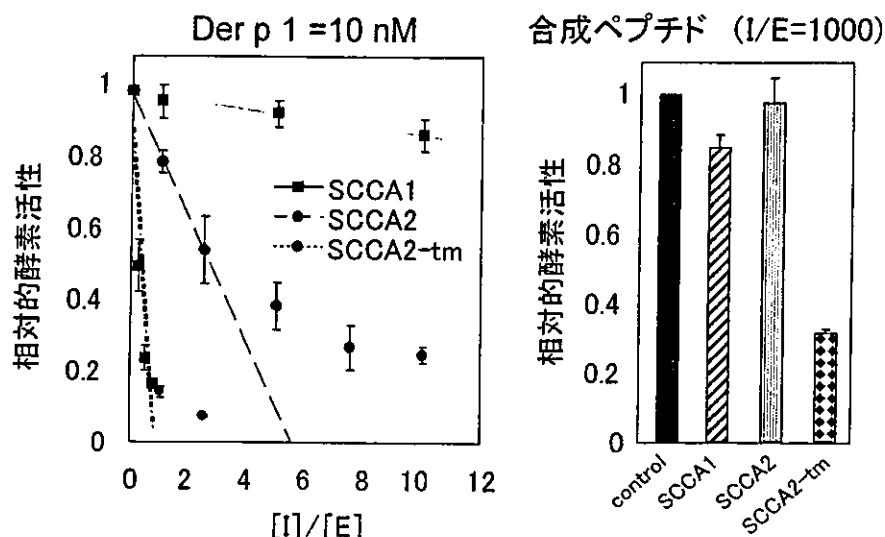


図3 SCCA2-tmのDer p 1の酵素活性に対する阻害活性
 左：Der p 1の濃度を10 nMに固定した場合のSCCA1, SCCA2, SCCA2-tmのDer p 1の酵素活性に対する阻害活性を示す。SCCA2-tmがSCCA2よりも強い阻害活性を示すことに注目してほしい。右：SCCA1, SCCA2, SCCA2-tmのRSL部分に相当する合成ペプチド(13 mer)のDer p 1の酵素活性に対する阻害活性を示す。SCCA2-tmのRSL部分に相当する合成ペプチドが活性を示すことに注目してほしい。

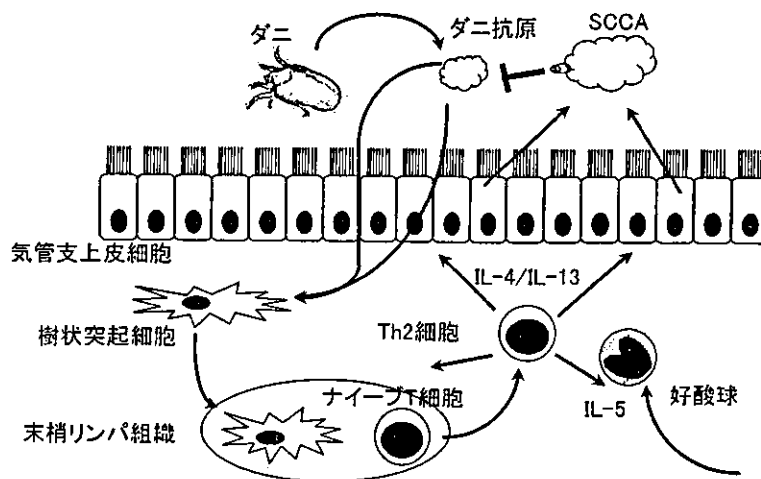


図4 SCCAによるダニアレルゲンに対する生体防御機構
 ダニなどのアレルゲンは生体内でTh2細胞分化を誘導する。このTh2細胞から分泌されるIL-4あるいはIL-13は気道上皮細胞に作用し、SCCA分子の産生を誘導する。SCCA分子はDer p 1の酵素活性を阻害し、ダニアレルゲンに対する生体防御機構の一つとして機能していると考えられる。

め、最も主要なダニ抗原だと考えられている。Der p 1, Der f 1はシステインプロテアーゼであり、その酵素活性により occludin, CD40, CD25, CD23 といった分子が切断され、その結果、生体にTh2型免疫反応が引き起こされることが知られている。われわれはSCCA1あるいはSCCA2が

Der p 1, Der f 1 の酵素活性を阻害する可能性を考え、この点について検討を行った。

まず SCCA1 と SCCA2 のリコンビナント蛋白質を大腸菌にて作製した。そして精製した SCCA1, SCCA2 を用いて Der p 1 あるいは Der f 1 の酵素活性に対する影響を調べた。その結果、Der p 1 あるいは Der f 1 は合成ペプチドあるいは細胞表面上の CD25 を基質としてそれらを切断するが、どちらの基質の場合でも SCCA2 が、また弱いながらも SCCA1 も Der p 1 あるいは Der f 1 の活性を阻害することを見出した (表 1)。このことは、IL-4 あるいは IL-13 がプロテアーゼインヒビターである SCCA 分子の発現を誘導して Der p 1, Der f 1 の生物活性を阻害する新規の生体防御機構が存在することを示していた (図 3)。

次に酵素活性阻害に重要なアミノ酸を同定するために、阻害活性に必須な SCCA2 の reactive site loop (RSL) 部分のアミノ酸を SCCA1 の RSL 部分に相当するアミノ酸と置換して、阻害活性に与える影響について解析した。その結果、353 番目のグルタミン酸、356 番目のセリン、357 番目のプロリンをそれぞれグリシン、プロリン、トレオニンに置換したところ、野生型 SCCA2 より強力な阻害活性をもつことが判明した (図 4)。この RSL 部分に相当する合成ペプチドを作製して解析しても、SCCA 分子全体を用いた場合と同様に変異型は野生型に比べて強い阻害活性を示した。モデリングの結果、変異型 SCCA2 は野生型 SCCA2 に比べて Der p 1 と強固な複合体を作ると想像され、これが強い阻害活性を示す原因だと考えられた。このことは、SCCA 分子自身、あるいは SCCA 分子と類似した低分子化合物が新規の抗アレルギー疾患治療薬となりうる可能性を示唆していた。

結 語

以上、プロテオーム解析を伴った機能ゲノム解析を気管支喘息へ適応した一例を示した。このような解析は気管支喘息に対する新規のバイオマーカーの同定、あるいは創薬開発に有用であると考えられた。

免疫沈降法

有馬和彦, 金地 佐千子, 金地泰典, 出原賢治

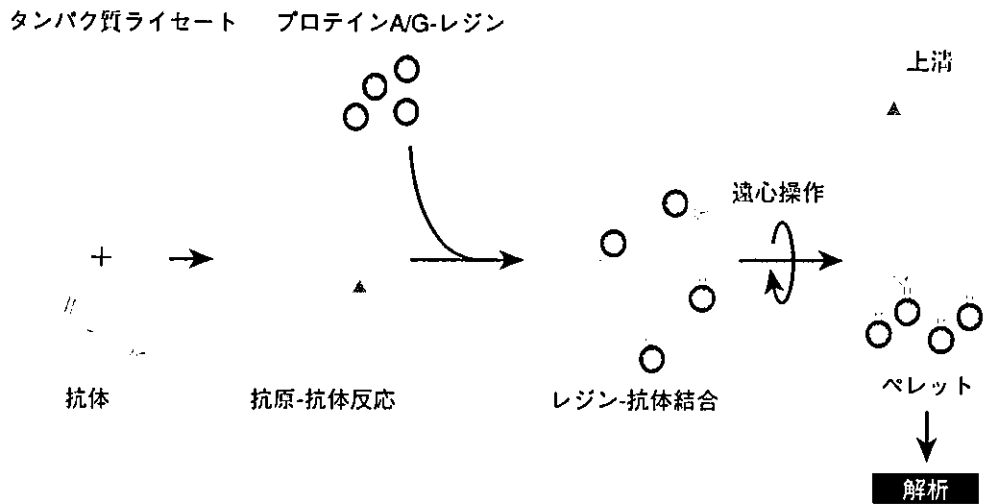
- ・注目する抗原物質をタンパク質混合液の中から分離・回収・濃縮する方法。
- ・共免疫沈降法により抗原と結合するタンパク質の同定を可能にする。

研究への応用のヒント

免疫沈降法（免沈, immunoprecipitation : IP）とは, 抗原-抗体反応を利用して注目する特定の抗原物質（多くの場合タンパク質）を細胞溶解液や組織ホモジネートなどのタンパク質混合液のなかから特異的に分離・回収する方法である。検出したい抗原タンパク質がサンプル中にごく微量にしか含まれず, 通常のウエスタンブロッティング法（3章-4, 参照）では特異的シグナルがバックグラウンドに埋もれてしまうような場合でも, サンプルを本法により処理することで十分な検出感度をもったウエスタンブロッティングを行うことが可能となる（IP-ウエスタン）。また, タンパク質の高次構造を保った条件で操作を行うため, 注目する抗原と結合するタンパク質も同時に回収することが可能である（共免疫沈降法, 共沈 : co-immunoprecipitation）。回収したタンパク質を評価するために, 多くの場合 SDS-PAGE にて展開後, タンパク質染色, ウエスタンブロッティング, オートラジオグラフィーのいずれかの方法で検出する。目的の抗原が特定の酵素活性を有している場合には SDS-PAGE を行わずに *in vitro* キナーゼアッセイを行うこともできる。共免疫沈降法は試験管内でのタンパク質間相互作用の有無を評価できるのみならず, 細胞内でのタンパク質間相互作用の証明や, さらにはアミノ酸シーケンサーや質量分析器を併用することにより目的の抗原タンパク質に対する未知の結合タンパク質の同定を行うことができる^{1) 2) 3)}。

原理

免疫沈降法は2つの原理により支えられている(1)。1つは抗体を用いることによって特異的な抗原を捕捉できるということであり, もう1つは用いた抗体をアガロースレジンなどの担体に特異的に結合させることで遠心により結合抗原とともに簡単に回収できる, という2点である。抗体の固相化はFc部分に対するプロテインA, プロテインG, 抗Fc抗体などとの親和性を利用し, 前もってこれらのタンパク質を共有結合させたビーズを使う方法が一般的である(2)。抗体とビーズとの結合は抗原抗体反応の前に行う方法と後に行う方法とがあるが, われわれは実験操作の簡便



免疫沈降法の原理

免疫沈降させたい抗原を星印にて示した。洗浄操作は省略した

各種動物の免疫グロブリンに対するプロテインA, Gの結合能 (参考文献2より改変引用)

産生宿主	抗体サブクラス	プロテインA	プロテインG
ヒト	IgG	++	++
マウス	IgG1	±	+
	IgG2a	++	++
	IgG2b	++	++
	IgG3	++	++
	IgM	-	-
	ラット	IgG1	±
ラット	IgG2a	-	++
	IgG2b	-	±
	IgG2c	++	++
	モルモット	IgG	++
ハムスター	IgG	+	+
ウシ	IgG	±	++
ウマ	IgG	±	++
ブタ	IgG	+	±
ヤギ	IgG	±	++
ウサギ	IgG	++	++
ヒツジ	IgG	±	++
サル	IgG	++	++
ロバ	IgG	+	++
ネコ	IgG	++	±
イヌ	IgG	++	±
ニワトリ	IgY	-	-

IgG: 総IgG, ++: 強い, +: 中程度, ±: 弱い, -: 結合能なし

さから抗体の固相化は通常抗原抗体複合体形成後に行っている。

本法の成功の可否は用いる抗体の性質にかかっている。一般に免沈に利用できる抗体はフローサイトメトリーやELISAなどに用いる抗体同様にタンパク質のネイティブな構造を認識する必要があるので変性構造を認識するような組織染色用やウエスタ

遺伝子・タンパク質を解析する