

201229005A

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

アレルギー疾患感受性遺伝子である
ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子の発現抑制作用を
持つ天然物を用いる治療戦略に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福井 裕行

平成25(2013)年 5月

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

アレルギー疾患感受性遺伝子である

ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子の発現抑制作用を

持つ天然物を用いる治療戦略に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

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

アレルギー疾患感受性遺伝子であるヒスタミン H₁ 受容体遺伝子の
発現抑制作用を持つ天然物を用いる治療戦略に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 福井 裕行

平成 25 (2013) 年 6 月

目 次

I. 総括研究報告	
アレルギー疾患感受性遺伝子であるヒスタミンH ₁ 受容体遺伝子の発現抑制作用を持つ天然物を用いる治療戦略に関する研究	5
福井裕行	
II. 分担研究報告	27
1. アレルギー疾患感受性遺伝子であるヒスタミンH ₁ 受容体遺伝子の発現亢進分子機構解明、天然物由来ヒスタミンH ₁ 受容体遺伝子発現抑制薬の同定、及び、その分子薬理機構解明に関する研究	28
福井裕行、武田憲昭、荻野 敏、水口博之、柏田良樹、根本尚夫	
2. マウス喘息モデルにおける苦参抽出物の作用に関する研究に関する研究	38
斎藤博久、大保木啓介	
3. 苦参熱抽出物の細菌感染炎症への作用に関する研究に関する研究	43
中山勝文、小笠原康悦	
4. 天然物による細胞分化抑制を介した治療戦略に関する研究に関する研究	46
有信洋二郎、出原賢治、白石裕士	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53

I. 総括研究報告

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）

アレルギー疾患感受性遺伝子であるヒスタミン H₁ 受容体遺伝子の
発現抑制作用を持つ天然物を用いる治療戦略

研究代表者：福井 裕行	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
研究分担者：武田 憲昭	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	教授
研究分担者：荻野 敏	大阪大学大学院医学系研究科	教授
研究分担者：水口 博之	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	准教授
研究分担者：柏田 良樹	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	准教授
研究分担者：根本 尚夫	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	准教授
研究分担者：斎藤 博久	国立成育医療研究センター研究所	副研究所長
研究分担者：中山 勝文	東北大学・加齢医学研究所 生体防御学	助教
研究分担者：有信 洋二郎	九州大学病院 遺伝子・細胞療法部	助教
研究協力者：大保木啓介	国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー研究部	研究員
研究協力者：小笠原 康悦	東北大学・加齢医学研究所 生体防御学	教授
研究協力者：出原 賢治	佐賀大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野	教授
研究協力者：白石 裕士	佐賀大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野	助教

研究要旨： 花粉症患者の症状は、患者鼻粘膜ヒスタミン H₁ 受容体 (H₁R) mRNA レベルと相関し、H₁R 遺伝子はアレルギー疾患感受性遺伝子であることが強く示唆される。抗アレルギー和漢薬の苦参は、抗ヒスタミン薬と同程度に、鼻過敏症モデルラットの鼻症状改善作用と鼻粘膜 H₁R mRNA レベル上昇に対する抑制作用を示した。H₁R 刺激による H₁R 遺伝子発現亢進機構は、PKC- δ ・HSP90 複合体がゴルジ体に移動し、MEK、ERK、PARP-1 を経て、プロモーター第 1 領域への AP-1、Ets-1 の結合と、第 2 領域に結合している Ku70/Ku86 複合体の解離により、引き起こされることが明らかとなった。H₁R 遺

伝子発現抑制物質として、苦参由来の(-)Maaciain ((-)MKN)、抗アレルギー天然物に見られる Apigenin (AGN)、Quercetin (QCN) の同定に成功した。(-)MKN、及び、AGN は HSP-90 を標的分子とし、PKC- δ ・HSP90 複合体解離により、ゴルジ体移行を阻害した。HSP90 抑制薬である Celastrol は鼻過敏症モデルラットの鼻症状を改善し、鼻粘膜 H1R mRNA 上昇を抑制した。

鼻過敏症における H1R 遺伝子発現機構解明の結果を踏まえて、本疾患症状を高度改善させるための PKC- δ シグナルに続く第二のシグナルの同定に成功した。第二のシグナルを抑制する抗アレルギー天然物、及び、天然物由来活性物質の同定に成功し、抗ヒスタミン薬との併用投与により、鼻過敏症モデルラットにおいて 90%以上の高度症状改善に成功した。

本研究班の研究代表者によって、toluene-2, 4-diisocyanate (TDI) 曝露によるアレルギー性鼻炎モデル鼻粘膜において、苦参抽出物がヒスタミン H1 受容体の発現、ヒスチジン脱炭酸酵素活性や IL-4、IL-5 mRNA の発現を抑制し、くしゃみなどの鼻アレルギー症状を軽減すること (J Pharmacol Sci. 2009; 109 (4) : 606-17.) が示されている。初年度は苦参抽出物が急性喘息のマウスモデルの病態を改善することを確認したが、次年度は苦参由来成分である Maaciain ((-)MKN) が及ぼす影響について同様の OVA を用いたマウス喘息モデルを用いて検討し、若干の炎症抑制効果を認めた。このとき、用量の問題と同時に、(-)MKN は成立した喘息病態を抑制するのか、或いは感作成立過程に作用するのか、経時的な作用点についての未解決の問題が明らかとなった。創薬を考える上で、一義的には成立した病態を抑制する効果が求められる場合も多く、動物モデルでは薬剤の抑制効果が、感作過程、エフェクター過程どちらに有効なのかを重要視され、病態成立過程での作用点を明らかにする必要がある。また動物モデルのアレルギー炎症ではこれまで主として IgE 値の上昇や T 細胞の反応をエンドポイントとした解析が主であったが、近年のナチュラルヘルパー細胞等の新しいアレルギー炎症関連細胞の発見により、獲得免疫に依存しない、即ち自然免疫を介するアレルギー炎症を評価できるモデルの必要性が高まっている。本年度は、アレルギー炎症への影響が示唆される天然物由来成分が、自然免疫によって駆動されるアレルギー炎症にも効果を有するかどうかを調べることができる簡便なモデルの作成と、その特徴を調査した。

喘息等のアレルギー疾患に対する治療薬として様々な漢方薬が期待されるが、その有効性や作用機序について不明な点が多く残されている。最近、喘息の代表的アレルゲンの一つであるカビに対するアレルギーの発症メカニズムとして菌体成分の β -glucan による Dectin-1 を介した炎症性応答が引き金となっていることが明らかになりつつある。そこで本研究では、研究班代表者の福井らにより新規 HSP90 抑制フラボノイドとして同定された(-)MKN、Apigenin (AGN)、および Quercetin (QCN) の β -glucan 刺激マクロファージ炎症応答に対する抑制効果について解析した。 β -1,3-glucan の Curdlan で刺激したマウス骨髄マクロファージは IL-6 および TNF- α といった炎症性サイトカインを産生したが、(-)MKN、AGN、QCN いずれもそれら炎症性サイトカイン産生を濃度依存的に抑制した。さらにいずれのフラ

た。さらに(-)MKN、AGNはERKリン酸化を、QCNはNF- κ Bの活性化をそれぞれ抑制した。興味深いことに、マクロファージによる β -glucan粗抽出物質Zymosanの貪食作用については、いずれのフラボノイドも抑制しなかった。これらの結果は、(-)MKN、AGN、およびQCNは、 β -glucan刺激によるマクロファージの炎症応答を抑制するが、貪食機能(病原体排除機能)を抑制しないことを示唆し、これら新規HSP90抑制フラボノイドはカビアレルギーに対する治療薬として期待できる。

苦参はマメ科クララの根(Sophorae Radix)を材料とする生薬である。最近、苦参抽出物は鼻過敏症モデルラットの鼻アレルギー症状を改善すると報告されたが、その作用メカニズムは、依然として不明な点が多い。本研究において我々は、苦参の作用メカニズムを明らかにすることを目的に、喘息モデルマウスを用い、苦参と同様の薬理作用を持つことが明らかになったCelastrolの抗アレルギー作用について検討した。同時に、皮膚炎に対する苦参やCelastrolの薬理作用を正確に評価することを目的に、in vitro皮膚炎モデルの構築を試みた。Celastrolの投与にて喘息モデルマウスでの好酸球性炎症は著明に抑制され、喘息病態に対しCelastrolは有効であることが示された。また、3次元air-liquid interface共培養系を用いたin vitro皮膚炎モデルの構築に成功し、苦参やCelastrolの薬理作用を正確に評価することが可能となった。

A. 研究目的

アレルギー疾患の満足レベルの高い症状改善のために、新規治療戦略が期待される。抗ヒスタミン薬はアレルギー疾患の主要治療薬であるが、本疾患の症状改善機構解明は不十分である。また、抗ヒスタミン薬はアレルギー疾患の症状改善において、満足レベルは高いとは言えない。そこで、抗ヒスタミン薬のアレルギー疾患の症状改善機構を明らかにすることにより、満足レベルの高い新規治療戦略への道筋が見いだされることが考えられる。

ヒスタミンH₁受容体(H1R)遺伝子は、H1R刺激によりプロテインキナーゼC- δ (PKC- δ)シグナルを活性化させ、H1R遺伝子発現を亢進させ、H1Rアップレギュレーションを引き起こす機構を持つ。一方、多くの抗アレルギー天然物にH1R刺激に

よるH1R遺伝子発現亢進に対する抑制作用を見いだした。抗アレルギー天然物の鼻過敏症モデルラットの鼻症状改善作用、及び、鼻粘膜H1R遺伝子発現亢進に対する抑制作用が、抗ヒスタミン薬の鼻症状改善作用、及び、H1R遺伝子発現抑制作用と類似することを見いだした。そこで、抗ヒスタミン薬がH1R遺伝子発現抑制を介しての本疾患の症状改善を引き起こすのではないかと考えた。

本研究において、H1R刺激がPKC- δ 活性化、及び、PKC- δ ・HSP90複合体のゴルジ体移行を引き起こし、ゴルジ体からのMEK、ERK、PARP-1シグナルが核に伝わり、プロモーター第1領域へのAP-1、Ets-1の結合と、第2領域に結合しているKu70/Ku86複合体の解離により、H1R遺伝子発現亢進を引き起こすこと引き起こすこと

を報告する。

次いで、抗アレルギー和漢薬、苦参に含まれる H1R 遺伝子発現抑制物質が (-)Maaciain ((-)MKN) であり、(-)MKN の標的分子が HSP90 であり、(-)MKN が HSP90 と結合することにより、PKC- δ ・HSP90 複合体が解離し、PKC- δ の活性化とゴルジ体移行を阻止することを報告する。更に、HSP90 抑制薬であるセラストロールが鼻過敏症モデルラットの鼻症状を改善し、鼻粘膜 H1R mRNA 上昇を抑制することを報告する。以上の研究結果から、H1R 遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子として、アレルギー疾患症状に強く関与し、抗ヒスタミン薬の本疾患症状改善作用が H1R 遺伝子発現亢進の抑制によることを明らかにする。

抗ヒスタミン薬の薬効発現機構を解明することにより、PKC- δ シグナル以外の未同定のアレルギー疾患症状に関与するシグナルの存在が考えられた。そして、天然物 A に含有され、細胞内シグナル B 抑制薬 C の同定に成功した。

本研究班の研究代表者(福井)によって、toluene-2, 4-diisocyanate (TDI) 曝露によるアレルギー性鼻炎モデルにおいて、苦参抽出物が鼻粘膜における H1R の発現、ヒスチジン脱炭酸酵素活性 (HDC) や IL-4、IL-5 mRNA の発現を抑制し、くしゃみなどの鼻アレルギー症状を軽減することが見出された (J Pharmacol Sci. 2009; 109 (4) : 606-17.)。スギ花粉症患者への予防的抗ヒスタミン薬投与によって IL-5 mRNA の発現が抑制され臨床症状も緩和されるが、喘息関連遺伝子として知られる IL-33 mRNA の発現が抑制されないこと (Acta

Otolaryngol. 2012; 132 (4) :434-8.) が示され、人間の病態におけるヒスタミン経路抑制効果の選択的性質も明らかにされている。苦参抽出物成分についても成立した喘息病態を抑制するのか、或いは感作成立過程に作用するのかを明らかにする必要がある。さらに、ナチュラルヘルパー細胞に代表される新しいアレルギー性炎症関連細胞の発見により、獲得免疫に依存しない、即ち自然免疫を介するアレルギー炎症を評価できるモデルの必要性が高まっている。本年度は、アレルギー炎症への効果が示唆される天然物由来成分が、自然免疫によって駆動されるアレルギー炎症にも効果を有するかどうかを調べることができるようモデル作成と、その特徴を調査した。

本研究班代表者(福井)らは、苦参熱水抽出物の(-)MKN や多くの植物に含まれる Quercetin (QCN) といったフラボノイドは熱ショックタンパク HSP90 を標的として PKC- δ シグナルを抑制することを見出した (Int. Immunopharmacol., 15, 232-239, 2013; H23 福井班厚労科研報告書) ため、これらフラボノイドは PKC- δ 活性化が関わるアレルギーを抑制することが期待できる。最近、カビアレルギーの発症メカニズムとして、菌体細胞壁成分の β -glucan がマクロファージに発現する C 型レクチン受容体の Dectin-1 を刺激して炎症性サイトカインを産生させることが報告されている (J. Immunol., 189, 3653-3660, 2012)。さらに Dectin-1 の炎症シグナルには PKC- δ が関与すること (Immunity, 36, 32-42, 2012) から、本年度は、福井らによって単離・同定された新規 HSP90 阻害フラボノイドである(-)MKN、QCN、および

Apigenin (AGN) の β -glucan 刺激マクロファージ炎症応答に対する抑制効果について解析した。

マメ科クララの根 (Sophorae Radix) を材料とする生薬である苦参は、鼻過敏症モデルラットの鼻アレルギー症状を改善することが知られている。我々は、苦参の抗アレルギー作用のメカニズムを明らかにすることを目的に、喘息モデルマウス、皮膚炎モデルマウスを用いた解析を行ってきた。昨年度までに、苦参抽出物は、好酸球分化過程での CCR3 発現を抑制することにより、喘息モデルマウスの肺胞洗浄液中への好酸球の浸潤を抑制することを示した。また、ダニ抽出物誘導性皮膚炎モデルマウスの構築に成功し、苦参投与により、皮膚炎症状が改善する傾向にあることを報告した。

本年度は (1) 苦参と同様の薬理作用を有することが明らかになった Celastrol の効果を、喘息モデルマウスにて検証すること (2) 皮膚炎の改善効果を期待する薬剤の評価を正確に行うための *in vitro* 皮膚炎モデルを構築することを目的とした。

B. 研究方法

1. HeLa 細胞を用いる実験

H1Rを自然発現するHeLa細胞を用いて、H1R刺激によるH1R遺伝子発現機構解明を行った。PKC- δ シグナル活性化の検出を、サンプルのSDS-PAGEによる展開後、リン酸化PKC δ (Tyr³¹¹) 抗体、及び、リン酸化ERK抗体によるWestern-blot法によるPKC δ 、及び、ERKのリン酸化の測定により行った。PKC- δ の細胞内移行は、抗PKC δ

抗体、及び、抗Golgi抗体を用いる免疫組織学的方法により、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。遺伝子転写調節因子の同定は、H1R遺伝子の上流2.1-kb DNA fragmentを用いて、AP-1, Ets-1, 及び、poly (ADP-ribose)

polymerase-1(PARP-1)/Ku86/Ku70などの転写調節機構について、ゲルシフトアッセイ、スーパーシフトアッセイなどにより行った。(-)MKNの標的分子同定のために、HeLa細胞から抽出した蛋白質を陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーで分画後、(-)MKNの存在により蛍光をクエンチングさせる分画を見だし、同分画のSDS-PAGEによる展開後、主要蛋白質の1次構造を決定し、候補タンパク質と(-)MKNの結合を(-)MKN固定化ビーズにより証明した。

2. 鼻過敏症モデルラットを用いる実験

6週齢Brown-Norway系雄性ラットの鼻前庭に toluene 2,4-diisocyanate (TDI) により感作した。感作ラットを TDI により過敏症発作を誘発し、症状スコアの測定と mRNA 測定用鼻粘膜サンプルを採取した (Mizuguchi H et al. *J Pharmacol Sci* 108 (4), 480-486, 2008.)。抗アレルギー作用の検討を行う天然物エキス、及び、物質については、TDI 感作と同時に連日、1日1回、発作誘発直前まで投与する。

3. mRNA 測定

培養細胞、及び、鼻過敏症モデルラット鼻粘膜サンプルに含まれる mRNA 測定は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems)

を用いて cDNA 合成を行い、Fast Start Universal Probe Master を含む試薬により、Sequence Detector (GeneAmp 7300 Sequence Detection System、Applied Biosystems) を用いて real-time PCR 反応による mRNA 測定を行った(Mizuguchi H et al. *J Pharmacol Sci* **108** (4), 480-486, 2008.)。

4. 自然免疫型のアレルギー気道炎症モデルを用いる実験

自然免疫型のアレルギー気道炎症モデルを作成する外来因子として、ヒョウヒダニ主要抗原 Der f 1 と相同性の高い植物由来のシステインプロテアーゼ型アレルゲンである papain を用いた。実験には C57BL/6N 雌、BALB/cA 雌を使用した。感作を行わず、1, 2, 3 日目にそれぞれ 100 μ g/20 μ l の papain を経鼻吸入させることで気道炎症モデルを作成した。最終吸入日から経時的に (day 1, 7, 14) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、BALF 中の炎症細胞数とサイトカイン濃度を評価した (各時点 N=4-5)。また、吸入後の短時間の炎症動態を調べる目的で、C57BL/6N 雌マウスに 100 μ g/20 μ l の papain を上記と同様 3 回経鼻吸入したのち、6H、24H、48H、72H 後 (各時点 N=4-5) に気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、BALF 中の炎症細胞数とサイトカイン濃度を評価した。

5. C57BL/6 マウス骨髄細胞より M-CSF により分化誘導したマクロファージを用いる実験

C57BL/6 マウス骨髄細胞より M-CSF により分化誘導したマクロファージを

β -1,3-glucan (Curdlan : 50 mg/ml) で刺激し、12 時間後の培養上清中の IL-6 および TNF- α を ELISA 法により測定した。このとき、このマクロファージを次の阻害剤で 30 分間前処理することにより抑制効果を評価した : (-)MKN (1~300 mM)、AGN (0.3~100 mM)、QCN (0.3~100 mM)、Celastrol (CLS : 3 nM~1 mM)。また、マクロファージの PKC- δ 、NF- κ B および MAPK 経路の活性化については、抗リン酸化 PKC- δ 抗体、I κ B- α 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体を用いた Western blotting 法により解析した。

6. 喘息モデルマウスを用いる実験

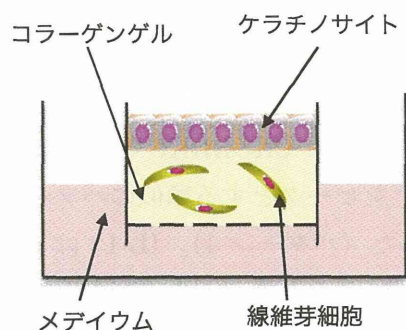
C57BL/6 mouse を用い、OVA 50 μ g+ Alum 1mg 腹腔内投与による感作 (Day0, 8)、1% OVA aerosol 吸入による曝露 (Day16, 18, 20) により喘息誘導を行った。Day0 から Day20 までの間の隔日に、Celastrol (50 μ g/mouse) を腹腔内投与した。Day21 に、アレルギー性炎症に与える影響として、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数を評価した。また、骨髄球系細胞の血液分化に与える影響として、骨髄中の骨髄球系共通前駆細胞 (CMP)、顆粒球・単球系前駆細胞 (GMP)、好酸球前駆細胞 (EoP) の数、及び末梢血の白血球分画を評価した。

7. in vitro 皮膚炎モデルを用いる実験

In vitro での評価系として、3次元 air-liquid interface 共培養系を構築した (下図参照)。

ここでは、コラーゲンゲル内に線維芽細胞を混合し、その上でケラチノサイトを培養した。この系では線維芽細胞やケラチノ

胞を混合し、その上でケラチノサイトを培養した。この系では線維芽細胞やケラチノサイトから分泌される液性因子がコラーゲンを介して作用し合えるとともに、ケラチノサイトの上側が空気に接して生理的環境に近い状態での培養が可能となった。



ケラチノサイトや線維芽細胞の細部数などを検討して、細胞の増殖・分化やサイトカイン産生について検討を行った。

C. 研究結果

1. HeLa 細胞における H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進の分子機構

HeLa 細胞の H1R 刺激による H1R mRNA 上昇、及び、H1R プロモーター活性化は、rottlerin (PKC- δ 特異的阻害薬)で抑制された。H1R 刺激は、PKC- δ リン酸化レベル (Tyr³¹¹, Thr⁵⁰⁵) を上昇させ、H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇は、siRNA による PKC- δ 発現量の減少により低下し、PKC- δ の過剰発現により上昇した。H1R 刺激、及び、PKC- δ 活性化は、PKC- δ の Golgi への移行を引き起こし、rottlerin の処置により移行は抑制された。H1R 刺激による ERK のリン酸化は、rottlerin によ

り抑制された。H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇、及び、H1R プロモーター活性化は、R0126 (MEK 阻害薬)、及び、DPQ (PARP-1 阻害薬)により抑制された。H1R 遺伝子プロモーターに対する転写調節部位は、領域 A、及び、領域 B に分布した。領域 A には、2ヶ所の AP-1、及び、1ヶ所の Ets-1 結合部位が存在した。領域 A の活性化には、3ヶ所の転写調節部位の全ての結合部位への結合が必要であった。領域 B には Ku86/Ku70 複合体が抑制的に結合し、PARP-1 の活性化により、Ku86/Ku70 複合体が領域 B から解離し、抑制が解かれ、プロモーター活性化が引き起こされることが明らかとなった。

2. 抗アレルギー天然物有効成分の分子薬理学

抗アレルギー和漢薬、苦参の有効成分、(-)MKN は HeLa 細胞の H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇を抑制した。RBL-2H3 細胞 (マウス好塩基性白血病細胞) の IgE 受容体刺激による IL-4 mRNA レベル上昇に対しても抑制作用を示した。

HeLa 細胞から抽出した蛋白質溶液を陰イオン交換カラム (HiTrap Q FF, GE Healthcare) を用いる HPLC により分画し、(-)MKN の添加により蛋白質の蛍光が強くクエンチされる分画の SDS 電気泳動を行い、泳動ゲルから蛋白質を回収し、一次構造決定により蛋白質の同定を行い、(-)MKN の標的となる蛋白質の検索を行った。その結果、HSP90 が候補と考えられた。そして、(-)MKN 固定化ビーズを作成し、(-)MKN と HSP90 の結合を証明した。

H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇、

及び、PKC- δ の Golgi 体移行は、17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG、HSP90 抑制薬) により抑制された。

アピゲニン¹は抗アレルギー天然物に含有されるフラボノイドである。アピゲニンに H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用が見いだされた。そして、HSP90 がアピゲニンの標的分子であることを明らかにした。

3. 鼻過敏症モデルラットに対する HSP90 抑制薬投与による症状改善

TDI 感作鼻過敏症モデルラットに対する cetastrol (HSP90 抑制薬) の投与により、鼻症状の改善、及び、H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用が見いだされた。

4. 鼻過敏症症状に関与する PKC- δ シグナルと異なる第 2 の細胞内シグナルの検索

鼻過敏症モデルラットの症状は抗ヒスタミン薬投与による改善度から、PKC- δ シグナルの症状に対する関与は約 60% であると考えられる。そこで、抗ヒスタミン薬と併用投与することにより、鼻過敏症モデルラットの鼻症状を高度に改善する抗アレルギー性天然物抽出液の検索を行い、天然物 A の同定、及び、細胞内シグナル B を抑制する物質 C の同定に成功した (特許申請準備中)。

5. papain 吸入 C57BL/6N マウスにおける各種サイトカインの変動

C57BL/6N マウスに papain を吸入させることによって、7日後を最大とする BALF 中への好酸球優位の炎症細胞の増加が認め

られた。一方で BALB/cA マウスでは papain の吸入を行っても好酸球性の気道炎症は認められず、マクロファージの微増のみが認められた。

ヒト大規模 GWAS で再現性の高い喘息関連遺伝子である IL-33 の BALF 中での上昇を認めなかったため、papain 吸入後のより早い時間帯でのサンプリングを行った。その結果、IL-33 の産生は papain 吸入後 6H を最大とする一過性のピークを特徴とすることが判明した。IL-33 と同様に IL-5、IL-6、G-CSF、IL-25、CXCL1/KC も papain 吸入後 6H をピークとする類似のパターンを有していた (パターン 1)。IL-13 は 6H と 72H にピークがあり (パターン 2)、TNF、CXCL10/IP10、CCL20/MIP-3a は papain 吸入後 6H と 7 日目にピークがある二峰性のパターンを示した (パターン 3)。IL-4 は 72H 後に単一のピークがあり、他のどの因子とも類似性がなかった (パターン 4)。7 日目に単一のピークを示すものは CCL12/MCP-5、CCL19/MIP-3b、CCL21c/Exodus-2/SLC、CCL22/MDC であった (パターン 5)。CCL17/TARC と CX3CL1/Fractalkine はそれぞれ 7 日目、6H にピークとなるものの、早期から炎症収束まで高値を示した (パターン 6 および 7)。また、papain 吸入回数により気道炎症細胞の構成が変化し、それに並行して BALF サイトカインの濃度パターンも変動していた。

6. 活性化マクロファージにおけるサイトカインの変動に対する抗アレルギーフラボノイドの影響

カビ細胞壁成分 β -1,3-glucan の Curdlan でマクロファージを刺激すると顕著な IL-6

および TNF- α のサイトカイン産生が認められたが、これらの産生は(-)MKN、AGN、あるいは QCN によって濃度依存的に抑制された。Curdlan による炎症性サイトカイン産生はその受容体である Dectin-1 を介すること、さらに Dectin-1 はその細胞内領域で Syk と会合してその下流の PKC- δ の活性化を介して炎症シグナルを伝えることが報告されていることから、次に我々は Curdlan 刺激 10-30 分後のマクロファージの PKC- δ 、NF- κ B、および ERK 活性化を測定し、各フラボノイドの抑制効果を検討した。その結果、AGN および(-)MKN は PKC- δ および ERK のリン酸化を抑制し、QCN は PKC- δ のリン酸化および NF- κ B の活性化を抑制した。

HSP90 阻害剤として既に報告されている CLS の Curdlan によるマクロファージ炎症応答に対する抑制作用についても解析した結果、CLS も濃度依存的に Curdlan による IL-6 および TNF- α 産生を抑制し、さらに NF- κ B および ERK の活性化を抑制することが判明した。

Dectin-1 は β -1,3-glucan を含む菌体粒子を貪食する機能があるため、(-)MKN、AGN、QCN、および CLS が、その貪食作用を阻害するか否かを検討した。マクロファージは AF488 蛍光標識した Zymosan (crude β -1,3-glucan) を効率良く貪食したが、いずれのフラボノイドもその貪食作用を全く抑制しなかった。以上の結果は、これらフラボノイドは Dectin-1 の炎症性サイトカイン産生は抑制するが、貪食作用は抑制しないことを示唆する。

7. 喘息モデルマウスにおける HSP90 抑制薬の影響

Celastrol の腹腔内投与により、気管支肺胞洗浄液中への好酸球浸潤は著明に抑制され

た。一方、骨髄中の CMP、GMP、EoP 数、腹腔内肥満細胞数、末梢血の白血球分画には影響を与えなかった。

8. in vitro 皮膚炎モデルにおけるサイトカイン産生

ケラチノサイトはマウスの新生仔から準備した。ケラチノサイトの細胞数をプレート当たり 2×10^6 個から 4×10^6 個で、線維芽細胞の細胞数をプレート当たり 6×10^4 個から 2×10^6 個で検討した結果、ケラチノサイトの細胞数は 2×10^6 個が、線維芽細胞の細胞数は 2×10^5 個が最も適切にケラチノサイトの増殖・分化を誘導させる条件であることがわかった。また、この際にケラチノサイトから TSLP、TNF、GM-CSF、IL-1 α などの炎症性サイトカインの産生を確認することができた。

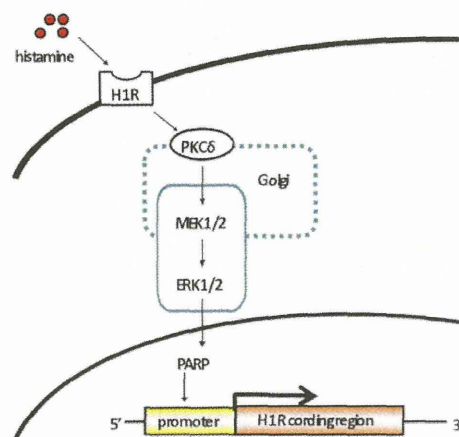


図1. H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構 (1)

D. 考察

花粉症患者の鼻過敏症症状は、H1R 遺伝

子の発現亢進が関与することを明らかにしたが、H1R 刺激から H1R 遺伝子発現亢進に至る分子機構を解明した。

図1は、H1R 刺激から H1R 遺伝子プロモーターの直前である PARP-1 までのシグナルの模式図である。H1R 刺激により PKC 活性化が引き起こされるが、H1R 遺伝子発現亢進を引き起こすシグナルは PKC- δ サブタイプを介することが明らかとなった。

PKC- δ サブタイプは活性化に伴って、Golgi 体に移行することが興味深い。そして、Golgi 体から核へのシグナルは、PKC- δ /ERK/PARP-1 を介することが明らかとなった。

H1R 遺伝子プロモーターの転写調節部位はかなり複雑であることが明らかとなった。

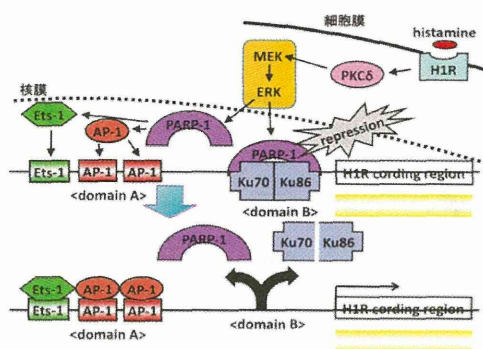


図2. H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構 (2)

図2は H1R 遺伝子プロモーターにおける転写調節部位の分布を示す。2ヶ所の AP-1、及び、1ヶ所の Ets-1 により調節される領域 A、及び、Ku86/Ku70 複合体により調節される領域 B から成立する。領域 A 及び、領域 B はシグナルのほぼ半分ずつを

受け持つ。領域の Ku86/Ku70 複合体による調節機構がユニークであるが、更に、Ku86/Ku70 複合体が非刺激の状態では抑制的に結合する機構に関する新しい知見である。この機構の病理学的意義は興味深い。

H1R 遺伝子以外に、ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子、IL-4 遺伝子、及び、IL-5 遺伝子が同一グループに属する疾患感受性遺伝子であると考えられる。HDC 遺伝子、IL-4 遺伝子、及び、IL-5 遺伝子の発現機構は十分に解析されていないが、興味深い。

抗アレルギー和漢薬の苦参、及び、苦参の有効成分である(-)MKN は、花過敏症モデルラットに対して、抗ヒスタミン薬と類似した症状改善作用と H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用を示した。(-)MKN の標的分子として、HSP90 であることを明らかにした。そして、HSP90 抑制薬は、HeLa 細胞における H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用、TDI 感作鼻過敏症モデルラットにおける症状改善作用、及び、鼻粘膜 H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用を示した。

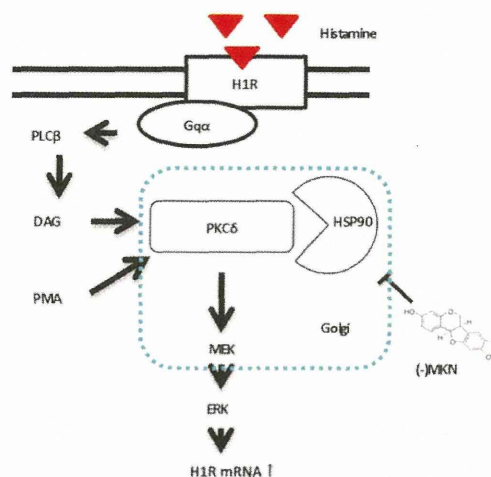


図3. (-)MKN の分子薬理機構

図3は(-)MKNの標的分子であるHSP90がPKC- δ に作用して、H1R遺伝子発現亢進を引き起こす機構の模式図である。(-)MKNが、PKC- δ ・HSP90複合体に作用して、複合体を解離させ、PKC- δ のGolgiへの移行、及び、PKC- δ の活性化を抑制する機構はアレルギー疾患症状発現との関連で重要であると考えられる。

また、HSP90は糖質コルチコイド受容体と複合体を形成することが知られており、非常に興味深い機能蛋白である。

抗ヒスタミン薬はアレルギー疾患の主要治療薬である。本研究成果により、抗ヒスタミン薬の薬効発現機構が明らかになったと考えられる。そして、本研究成果により、PKC- δ /H1R遺伝子発現亢進シグナル以外のアレルギー疾患症状発現シグナルの同定の必要性が明らかとなった。そこで、新たなアレルギー疾患症状発現シグナルとして、細胞内シグナルBの同定に成功した。このシグナルを抑制する抗アレルギー天然物Aの同定、及び、天然物Aに含有される有効成分Cの同定にも成功した(特許出願準備中)。これらの研究成果から、アレルギー疾患症状の高度改善を実現する新規治療戦略の開発が可能であると考えられる。

自然免疫型アレルギー気道炎症モデルのBALFにおけるサイトカイン・ケモカイン動態が明らかになった。このモデルは著しい系統差があったことから、遺伝背景に原因があると考えられる。papain吸入後のBALFにおけるサイトカイン・ケモカイン発現パターンは、7つに分類可能であった。中でも喘息関連遺伝子であるIL-33を初め、好酸球機能と関連の深いIL-5、杯細胞過形成を誘導するIL-13、喘息病態モデルや

GWASによる喘息関連遺伝子IL-6、上皮由来のサイトカインIL-25がpapain吸入後、類似パターンで短時間での誘導が起きることから、気道におけるこれらの早期の誘導が喘息病態に重要であると考えられた。

IL-13がpapain吸入後6時間と72時間の二峰性パターンを示したことや、papain吸入後72時間でBALF中のIL-4が初めて上昇することが観察された。これらはpapain吸入後の肺へのIL-4、IL-13産生細胞の流入が示唆し、アレルギー性炎症の一次免疫応答に関連する現象と考えた場合、感染時の一次免疫応答との異同を検討する上で大変興味深い。Th2細胞誘導ケモカインとされるCCL17/TARC、CCL22/MDCの連続的な高値、その他のケモカインが7日目をピークとすることなどが判明し、機能的示唆に富むモデルである。

Papainは本研究で明らかにした自然免疫系による炎症だけではなく、獲得免疫系も駆動する(特異的IgE産生に至る)ことが報告される(私信)。これら各種因子の動態を総合すると、本モデルは喘息成立の自然史をある程度反映すると考えられることに加え、天然物由来成分の機能評価や喘息メカニズムの研究に良いモデルとなることが示唆される。

本研究から、新規HSP90抑制フラボノイドの(-)MKN、AGN、およびQCNが β -1,3-glucan刺激マクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。 β -1,3-glucanはカビの細胞壁成分であり、マクロファージ受容体のDectin-1のリガンドである。カビは喘息のアレルゲンの一つでもあり、カビアレルギーの発症メカニズムは長い間不明であった。

最近になって β -1,3-glucan の Dectin-1 刺激による炎症性サイトカイン産生が、カビアレルギーの引き金となることが報告されたため、そのシグナルを抑えることは、その治療を考える上で極めて重要である。しかしながら菌体の貪食を担う Dectin-1 の細胞内シグナルを全て抑えてしまうと、病原体の排除に異常をきたし、アレルギーを増悪させてしまう危険性も考えられる。特筆すべき本研究成果は、(-)MKN、AGN、および QCN のいずれのフラボノイドも Dectin-1/Syk の下流に位置する PKC- δ の活性化を抑制するが、貪食シグナルは全く抑制しないことである。これらのことから、(-)MKN、AGN、および QCN は病原体の排除機構には影響を与えることなく、炎症のみを選択的に抑え、カビアレルギーの新たな治療薬として期待できる。

喘息モデルマウスについて、Celastrol の投与にて、喘息モデルマウスでの肺の好酸球性炎症は抑制されることが示された。一方、GMP \rightarrow EoP \rightarrow 末梢血好酸球への分化は影響を受けなかった。これらは、一昨年、苦参で示した結果と全く同様であり、期待通り Celastrol は苦参と同様の薬理効果を示すと考えられた。Celastrol も、昨年苦参で示した様に、好酸球分化における CCR3 発現抑制効果を介し、好酸球炎症抑制作用を示す可能性が考えられた。

in vitro 皮膚炎モデルについて、今回確立した 3 次元 air-liquid interface 共培養系は、生理的状況に近い環境で、ケラチノサイトや線維芽細胞の培養を可能とした。この系にアトピー性皮膚炎を改善すると期待される薬剤を加えて、その効果を評価することが可能となった。今後、苦参や Celastrol

を含めたさまざまな薬剤の評価を行う予定である。

E. 結論

鼻過敏症症状に関与する主要シグナルは H1R/PKC- δ ・HSP90/ERK/PARP-1/転写調節因子 (AP-1, Ets-1, Ku86/Ku70 複合体/H1R 遺伝子発現亢進に至るシグナルであることが明らかとなった。また、H1R 遺伝子に加えて、HDC、IL-4、及び、IL-5 の遺伝子が疾患感受性遺伝子群を形成することを明らかにしている。

抗アレルギー天然物由来化学物質、(-)MKN、及び、アピゲニンは HSP90 を標的分子とし、PKC- δ ・HSP90 複合体を解離させ、PKC- δ の Golgo 体移行、及び、PKC- δ 活性化の抑制を引き起こし、PKC- δ シグナルによる H1R 遺伝子発現亢進を抑制する。

抗ヒスタミン薬と抗アレルギー和漢薬の苦参、及び、苦参含有有効成分である (-)MKN の TDI 感作鼻過敏症モデルラットの症状改善、及び、H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用は類似することから、抗ヒスタミン薬の薬効発現機構は、H1R 遺伝子発現亢進に対する抑制作用であることが示唆された。

PKC- δ /H1R 遺伝子発現亢進シグナルの抑制のみでは、鼻過敏症の症状を完全に抑制することは出来ないことが明らかとなった。天然物 A の有効成分 C による細胞内シグナル B の抑制による新規治療戦略により、高度のアレルギー疾患症状改善が期待される。

短時間で作成出来るマウス自然免疫型アレルギー気道炎症モデルはアレルギー関

連因子である IL-33、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13 や各種ケモカインの産生を伴い、最終的には獲得免疫系を駆動することから、天然物由来成分の投与時期を変えることにより、その機能評価や喘息メカニズムの研究に良いモデルとなることが示唆された。

新規 HSP90 抑制フラボノイドの (–)MKN、AGN、および QCN がマクロファージによる β -glucan の貪食機構を抑えることなく、その炎症性サイトカイン産生を選択的に抑制することが明らかとなった。

Celastrol は、喘息モデルマウスの好酸球性炎症を抑制し、苦参と同様に喘息病態に対し有効であった。また、3次元 air-liquid interface 共培養系を用いた皮膚炎の改善を目的とする化合物の評価系の構築に成功した。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

論文

1) Mizuguchi H, Ono S, Hattori M, Fukui H. Inverse agonistic activity of antihistamines and suppression of histamine H₁ receptor gene expression. *J Pharmacol Sci* **118** (1), 117-121, 2012.

2) Kitamura Y, Mizuguchi H, Ogishi H, Kuroda W, Hattori M, Fukui H, Takeda N. Pre-seasonal prophylactic treatment with antihistamines suppresses IL-5, but not IL-33 mRNA expression in the nasal

mucosa of patients with seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen. *Acta Otolaryngol*, **132**(4), 434-438, 2012.

3) Sarkar L, Bhuvaneshwari N, Samanta SK, Islam NM, Sen T, Fukui H, Mizuguchi H, Karmakar S. A report on anti-oedemogenic activity of *Byttneria herbacea* roots - possible involvement of histamine receptor (Type D). *J Ethnopharmacol* **140**(2), 443-446, 2012.

4) Mizuguchi H, Miyagi K, Terao T, Sakamoto N, Yamawaki Y, Adachi T, Ono S, Sasaki Y, Yoshimura Y, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. PMA-induced dissociation of Ku86 from the promoter causes transcriptional up-regulation of histamine H₁ receptor. *Scientific Reports* **2**:916 | DOI: 10.1038/srep00916, 1-11, 2012.

5) Hattori M, Mizuguchi H, Baba Y, Ono S, Nakano T, Zhang Q, Sasaki Y, Kobayashi M, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Quercetin inhibits transcriptional up-regulation of histamine H(1) receptor via suppressing protein kinase C- δ /extracellular signal-regulated kinase/poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling pathway in HeLa cells. *Int Immunopharmacol* **15**(2), 232-239, 2013.

6) Mizuguchi H, Ono S, Hattori M, Sasaki Y, Fukui H. Usefulness of HeLa cells to evaluate inverse agonistic activity of antihistamines. *Int Immunopharmacol* **15**(3), 539-543, 2013.

7) Kuroda W, Kitamura Y, Mizuguchi H,

- Miyamoto Y, Kalubi B, Fukui H, Takeda N. Combination of leukotriene receptor antagonist with antihistamine has an additive suppressive effect on the up-regulation of H₁ receptor mRNA in the nasal mucosa of toluene 2,4-diisocyanate-sensitized rat. *J Pharmacol Sci*, in press.
- 8) Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2. *J Allergy Clin Immunol* doi:pii: S0091-6749(12)01466-2. 10.1016/j.jaci.2012.09.005, 2012.
- 9) Tamaoki J, Saito H. Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma. *Allergol Int* **61**(3):351-2, 2012.
- 10) Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Körner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, Matsumoto K, Nakae S. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. *J Immunol* **189**(7):3641-52, 2012.
- 11) Saito H, Heike T. Primary immunodeficiency and related diseases. *Allergol Int* **61**(2):181-2, 2012 .
- 12) Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Factors Associated with Steroid Phobia in Caregivers of Children with Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol* doi: 10.1111/j.1525-1470.2012.01808.x, 2012.
- 13) Nomura I, Morita H, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies: distinct differences in clinical phenotype between Western countries and Japan. *Curr Allergy Asthma Rep* **12**(4):297-303, 2012.
- 14) Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Salivary Cortisol Response to Stress in Young Children with Atopic Dermatitis. *Pediatr Dermatol*. 2012.
- 15) Matsuda A, Morita H, Unno H, Saito H, Matsumoto K, Hirao Y, Munechika K, Abe J. Anti-inflammatory effects of high-dose IgG on TNF- α -activated human coronary artery endothelial cells. *Eur J Immunol* **42**(8):2121-31, 2012.
- 16) Ohta K, Bousquet PJ, Akiyama K, Adachi M, Ichinose M, Ebisawa M, Tamura G, Nagai A, Nishima S, Fukuda T, Morikawa A, Okamoto Y, Kohno Y, Saito H, Takenaka H, Grouse L, Bousquet J. Visual analogue scale as a predictor of GINA-defined asthma control. The SACRA study in Japan. *J Asthma*, 2013.
- 17) Saito H. Allergy: from history to today.

Allergol Int **62**(1):1-2, 2013 .

18) Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergol Int* **62**(1):13-20, 2013.

19) Saito H, Ishizaka T, Ishizaka K. Mast cells and IgE: from history to today. *Allergol Int* **62**(1):3-12, 2013.

20) Fujishima H, Satake Y, Okada N, Kawashima S, Matsumoto K, Saito H. Effects of diesel exhaust particles on primary cultured healthy human conjunctival epithelium. *Ann Allergy Asthma Immunol* **110**(1):39-43, 2013.

21) Hide M, Saito H. Problems to be resolved in the management of urticaria. *Allergol Int* **61**(4):515-6, 2012.

22) Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Matsumoto K, Nakae S. ST2 requires Th2-, but not Th17-, type airway inflammation in epicutaneously antigen-sensitized mice. *Allergol Int* **61**(2):265-73, 2012.

23) Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, Hiramatsu K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Underhill DM, Aderem A, and Ogasawara K. Inhibitory receptor PIR-B is exploited by *Staphylococcus aureus* for virulence. *J Immunol* **189**:5903-5911, 2012.

24) Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada

S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, and Suzuki R. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *J Immunol Methods* **384**:81-91, 2012.

25) Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe J, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, and Tokura YA group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: possible immunological state of the intrinsic type. *J Dermatol Sci* **67**:37-43, 2012.

26) Sugita K, Kabashima K, Sawada Y, Haruyama S, Yoshioka M, Mori T, Kobayashi M, Ogasawara K, and Tokura Y. Blocking of CTLA-4 on lymphocytes improves the sensitivity of lymphocyte transformation test in a patient with nickel allergy. *Eur J Dermatol* **2**:268-269, 2012.

27) Tanaka A, Tsukamoto H, Mitoma H, Kiyohara C, Ueda N, Ayano M, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Niuro H, Horiuchi T, Akashi K. Serum progranulin levels are elevated in patients with systemic lupus erythematosus, reflecting disease activity. *Arthritis Res Ther* **14**:R244, 2012.

28) Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, Ayano M, Tanaka A, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Niuro H, Akashi K, Horiuchi T.

- The cytotoxic effects of certolizumab pegol and golimumab mediated by transmembrane tumor necrosis factor a. *Inflamm Bowel Dis* 1224-1231, 2013.
- 29) Izuhara K, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Suzuki S. The roles of Th2-type cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis (Atopic Dermatitis - Disease Etiology and Clinical Management). *InTech*:39-50, 2012.
- 30) 出原賢治、有馬和彦、鈴木章一、白石裕士、太田昭一郎. インターロイキン13)IL-13 (サイトカインのすべて) 科学評論社 臨床免疫・アレルギー科第 57 巻増刊号 27 : 91-96, 2012.
- 31) Izuhara K, Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S, Arima K. Periostin, an extracellular matrix protein, acts as a master switch for the onset of inflammation in atopic dermatitis (Translational Science: from Basic to Clinical Immunology and Allergy) Pacini Editore Medicina 211-214, 2012.
- 32) Ohta S, Shibata R, Nakao Y, Azuma Y, Taniguchi K, Arima K, Suzuki S, Shiraishi H, Iwasaka T, Izuhara K. The usefulness of combined measurements of squamous cell carcinoma antigens 1 and 2 in diagnosing atopic dermatitis. *Ann Clin Biochem* 49:277-284, 2012.
- 33) Uchida M, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Taniguchi K, Suzuki S, Okamoto M, Ahlfeld SK, Ohshima K, Kato S, Toda S, Sagara H, Aizawa H, Hoshino T, Conway SJ, Hayashi S, Izuhara K. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46: 677-686, 2012.
- 34) Ontsuka K, Kotobuki Y, Shiraishi H, Serada S, Ohta S, Tanemura A, Yang L, Fujimoto M, Arima K, Suzuki S, Murota H, Toda S, Kudo A, Conway SJ, Narisawa Y, Katayama I, Izuhara K, Naka T. Periostin, a matricellular protein, accelerates cutaneous wound repair by activating dermal fibroblasts. *Exp Dermatol* 21:331-336, 2012.
- 35) Ohta N, Kurakami K, Ishida A, Furukawa T, Saito F, Kakehata S, Izuhara K. Clinical and pathological characteristics of IgG4-related sclerosing sialadenitis. *The Laryngoscope* 122:572-577, 2012.
- 36) Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Aoki S, Toda S, Inagaki N, Kurihara Y, Hayashida S, Takeuchi S, Koike K, Ono J, Noshiro H, Furue M, Conway SJ, Narisawa Y, Izuhara K. Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *J Clin Invest* 122:2590-2600, 2012.
- 37) Nishizawa H, Matsubara A, Nakagawa T, Ohta N, Izuhara K, Shinkawa H. The role of periostin in eosinophilic otitis media. *Acata Oto-Laryngologica* 132: 838-844, 2012.
- 38) Shiraishi H, Masuoka M, Ohta S, Suzuki S, Arima K, Taniguchi K, Aoki S, Toda S, Yoshimoto T, Inagaki N, Conway SJ, Narisawa Y, Izuhara K. Periostin