

- contributes to the pathogenesis of atopic dermatitis by inducing TSLP production from keratinocytes. *Allergology Int* **61**: 563-572, 2012.
- 39) Ishida I, Ohra N, Suzuki Y, Kakehata S, Okubo K, Ikeda H, Shiraishi H, Izuhara K. Expression of pendrin and periostin in allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis. *Allergology Int* **61**: 589-595, 2012.
- 40) Yamaguchi Y, Izuhara K, Ono J, Ohta S, Masuoka M, Ikezawa Z, Aihara M, Takahashi K. Serum periostin levels correlate with the progressive skin sclerosis in patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* **168**: 717-725, 2013.
- 41) Tajiri T, Matsumoto H, Hiraumi H, Ikeda H, Morita K, Izuhara K, Ono J, Ohta S, Ito I, Oguma T, Nakaji H, Inoue H, Iwata T, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Ito J, Niimi A, Mishima M. Efficacy of omalizumab in eosinophilic chronic rhinosinusitis patients with asthma. *Ann Allerg Asthma Im*, in press.
- 42) Ohta N, Watanabe T, Ito T, Kubota T, Suzuki Y, Ishida A, Kakehata S, Aoyagi M, Matsubara A, Izuhara K. Clinical and pathological characteristics of organized hematoma. *Int J Otolaryngol*, in press.
- 43) Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwahara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. *J Allergy Clin Immunol*, in press.
- 44) 出原賢治、太田昭一郎、白石裕士、有馬和彦、鈴木章一。間質性肺炎の血清マーカーとしてのペリオスチン。検査と技術。40:157-160, 2012.
- 45) 出原賢治、有馬和彦、鈴木章一、白石裕士、太田昭一郎。気管支喘息におけるサイトカイン研究の最近の話題。呼吸と循環。60:179-187, 2012.
- 46) 出原賢治、有馬和彦、白石裕士、鈴木章一、太田昭一郎。ペリオスチンによる気管支喘息の病態形成機序。臨床免疫・アレルギー科。57:104-110, 2012.
- 47) 出原賢治。IFCC 教育委員会活動報告—我ら国境なき臨床化学者たち—。臨床化学。41:101-103, 2012.
- 48) 増岡美穂、出原賢治。アトピー性皮膚炎の新しい治療薬の期待。日本医事新報。4611:48-49, 2012.
- 49) 出原賢治、有馬和彦、鈴木章一、太田昭一郎。アレルギーに対するサイトカイン IL-13。アレルギー・免疫。19:1884-1891, 2012.
- 50) 増岡美穂、出原賢治。アトピー性皮膚炎の原因タンパク質。DENTAL DIAMOND。38:86-90, 2013.
- 51) 増岡美穂、出原賢治。知っておきたい基礎用語—ペリオスチン—。日本小児皮膚科学会雑誌。32:71-73, 2013.
- 52) 増岡美穂、出原賢治。アトピー性皮膚

炎の慢性化とペリオスチン. 感染・炎症・免疫. 43:10-19, 2013.

53) 太田昭一郎、谷口一登、有馬和彦、鈴木章一、白石裕士、増岡美穂、出原賢治. オーダーメイド医療を目指したアレルギー疾患における病因診断システムの確立—アトピー性皮膚炎の新規バイオマーカーの同定と血中濃度解析—. 臨床病理. 61:247-255, 2013.

54) 増岡美穂、出原賢治. 慢性アレルギー性炎症におけるペリオスチンの役割. 化学と生物. 51:274-276, 2013.

2. 学会発表

1) Hiroyuki Fukui. Suppression of allergic disease sensitive gene expression by Maackiain, a novel lead for the therapeutics of allergy. Plenary Lecture, 12th International Congress of Ethnopharmacology (Science City, Kolkata, India), 2012.

2) Masashi Hattori, Hiroyuki Mizuguchi, Chiyo Matsushita, Hitoshi Niino, Yuko Sagesaka, Keisuke Masuyama, Hiroyuki Fukui. Identification of anti-allergic compound from green tea that suppresses the expression of histamine H₁ receptor gene. 12th International Congress of Ethnopharmacology (Science City, Kolkata, India), 2012.

3) Sayaka Yamamoto, Hiroyuki Mizuguchi, Islam Mohammed Nurul, Masum Shahriar, Pichairajan Venkatesh, Kazutaka Maeyama, Pulok K. Mukherjee, Masashi Hattori, Mohamed Sahabuddin

Kabir Choudhuri, Noriaki Takeda, Hiroyuki Fukui. Albizia Lebbeck alleviated allergy symptom by inhibiting histamine signaling at the transcriptional level. 12th International Congress of Ethnopharmacology (Science City, Kolkata, India), 2012.

4) Hiroyuki Fukui. Allergic disease sensitive gene. Lecture, 2nd International Seminar on Recent Development in Pharmaceutical Education and Research. (Calcutta Institute of Pharmaceutical Technology and Allied Science, West Bengal, India), 2012.

5) Hiroyuki Mizuguchi, Hiroyuki Fukui. Exploring the drug targets using natural resources-derived anti-allergic compounds that suppress up-regulation of allergic diseases sensitive gene expression. シンポジウム: Frontier of intracellular drug target research、第85回日本薬理学会年会(京都国際会議場、京都), 2012.

6) 成相祐希、水口博之、永井浩章、金山知代、加藤周平、吉村好之、柏田良樹、根本尚夫、高石喜久、武田憲昭、福井裕行. Identification of the target molecule of the new anti-allergic compound, maackiain from Kujin. 第85回日本薬理学会年会(京都国際会議場、京都), 2012.

7) 永井浩章、水口博之、成相祐希、吉村好之、武田憲昭、福井裕行. Apigenin suppresses histamine H₁ receptor gene expression by interaction with HSP90. 第85回日本薬理学会年会(京都国際会議場、

京都), 2012.

8) 水口博之、Shrabanti Dev、Asish K Das、馬場嘉信、福井裕行. 和漢薬苦参はヒスタミンシグナル抑制を介した FAT10/NF- κ B シグナルの抑制により抗アレルギー作用を示す。日本薬学会第 132 年会 (北海道大学、札幌), 2012.

9) 小野将平、水口博之、福井裕行. ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現に対する抗ヒスタミン薬インバースアゴニスト活性の影響。第 121 回日本薬理学会近畿部会 (あわぎんホール、徳島市), 2012.

10) 福井裕行、成相祐希、水口博之、武田憲昭. 苦参由来ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現抑制物質、マーキアインの分子薬理機構。第 29 回和漢医薬学会学術大会 (北里大学、東京都), 2012.

11) 福井裕行、水口博之、北村嘉章、柏田良樹、根本尚夫、武田憲昭. 抗ヒスタミン薬のアレルギー疾患症状改善に関する薬理機構。第 63 回日本薬理学会北部会 (朱鷺メッセ、新潟市), 2012.

12) 大岸弘敬、水口博之、北村嘉章、近藤勇人、黒田若菜、吉田陽香、宮本裕子、服部将史、武田憲昭、福井裕行. 花粉症におけるアレルギー疾患感受性遺伝子群。第 16 回日本ヒスタミン学会 (岡山プラザホテル、岡山市), 2012.

13) 水口博之、福井裕行. ヒスタミンシグナルを標的とする天然物由来抗アレルギー化合物を用いた細胞内創薬ターゲットの探索。第 16 回日本ヒスタミン学会 (岡山プラザホテル、岡山市), 2012.

14) 福井裕行. 抗アレルギー漢方薬、苦参の分子薬理機構。第 28 回日本耳鼻咽喉科漢方研究会学術集会 (The Grand Hill : 品川

グランドタワー、東京都), 2012.

15) 福井裕行. 疾患感受性遺伝子発現の亢進抑制によるアレルギー疾患治療戦略。第 64 回日本皮膚科学会西南支部学術大会 (広島国際会議場、広島市), 2012.

16) 水口博之、成相祐希、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行. 苦参由来抗アレルギー性化合物マーキアインの標的タンパク質の同定。第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (島根県民会館・サンラポーむらくも、松江市), 2012.

17) 宮城恒平、水口博之、寺尾拓馬、坂本典子、山脇洋輔、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行. ヒトヒスタミン H₁ 受容体発現シグナルにおける Ku86 の関与。第 122 回日本薬理学会近畿部会 (千里ライフサイエンスセンター、豊中市), 2012.

18) 福井裕行、水口博之、北村嘉章、武田憲昭. 抗アレルギー和漢薬苦参由来 PKC δ 抑制薬、(-)マーキアインの分子薬理機構。第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (大阪国際会議場、大阪市), 2012.

19) Hiroyuki Mizuguchi, Hiroyuki Fukui. Heat shock protein 90 is a novel therapeutic target for allergic diseases. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (神戸国際会議場他、神戸市), 2012.

20) Hiroyuki Fukui. Anti-allergic mechanism of antihistamines. Invited speaker. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (Loisir Hotel & Spa Tower Naha, Naha), 2012.

21) 福井裕行. 抗ヒスタミン薬のアレルギー疾患症状改善機構。招待講演。第 31 回日

本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（倉敷市
芸文館、倉敷市），2013.

22) 服部将史、水口博之、馬場祐子、小野
将平、張倩、小林誠、石丸直澄、北村嘉章、
武田憲昭、福井裕行. ストレプトゾトシン
投与型糖尿病モデルマウスに対するケルセ
チンの効果. Effect of quercetin on
streptozotocin-induced diabetic mice. 第
86 回日本薬理学会年会（福岡国際会議場、
福岡市），2013.

23) 水口博之、服部将史、馬場祐子、張倩、
小林誠、小野将平、石丸直澄、北村嘉章、
武田憲昭、福井裕行. タンパクキナーゼ C δ
シグナル抑制化合物ケルセチンのストレプ
トゾトシン誘発脾 B 細胞破壊に対する効果.
日本薬学会第 133 年会（パシフィコ横浜、
横浜市），2013.

24) Hiroyuki Fukui, Hiroyuki Mizuguchi,
Yoshiaki Kitamura, Noriaki Takeda.
Clinical significance of histamine H₁
receptor- PKC delta-HSP90 signaling in
allergic symptoms. 42nd European
Histamine Research Society Annual
Meeting. (Ambassador Centrum Hotel,
Łód (Lodz), Poland), 2013.

25) Maki Michioki, Hiroyuki Mizuguchi,
Hirotaka Ogishi, Yoshiaki Kitamura,
Noriaki Takeda, Hiroyuki Fukui.
Exploring transcriptional network
causally associated with pollinosis by
tokuene-2,4-diisocyanate-sensitized rats.
42nd European Histamine Research
Society Annual Meeting. (Ambassador
Centrum Hotel, Łód (Lodz), Poland),
2013.

26) Tomohiro Nakano, Hiroyuki

Mizuguchi, Masashi Hattori, Yuko Baba,
Shohei Ono, Qian Zhang, Yohei Sasaki,
Makoto Kobayashi, Yoshiaki Kitamura,
Noriaki Takeda, Hiroyuki Fukui.
Quercetin inhibits transcriptional
up-regulation of histamine h1 receptor
via suppressing protein kinase
C- δ /extracellular signal-regulated
kinase/poly(ADP-ribose)polymelase-1
signaling pathway in HeLa cells. 42nd
European Histamine Research Society
Annual Meeting. (Ambassador Centrum
Hotel, Łód (Lodz), Poland), 2013.

27) 大保木啓介. IL-33 とアレルギー疾患、
シンポジウム 15. 日本アレルギー学会（大
阪市），2012.

28) Nakayama M, Takeda K,
Nakamura K, and Ogasawara K.
Trogocytosis-mediated generation of
regulatory MHCII-dressed NK cells. 第
41 回 日本免疫学会総会（神戸市），
2012.

29) Kusaka T, Nakayama M,
Nakamura K, and Ogasawara K.
Effect of particle size of silica on
macrophage inflammatory responses.
第 41 回 日本免疫学会総会（神戸市），
2012.

30) 久本仁美、有信洋二郎、永尾奈津美、
廣崎友里、植木尚子、上田彰、綾野雅宏、
大田俊一郎、田中 淳、上田尚靖、古川牧緒、
井上靖、新納宏昭、塚本 浩、堀内孝彦、赤
司浩一. 当科における膠原病性肺高血圧症
の治療成績. 第 56 回日本リウマチ学会総
会・学術集会（東京都），2012.

31) 續 啓史、有信洋二郎、大田俊一郎、
植木尚子、Jabbazadeh Tabrizi Siamak、
赤星光輝、新納宏昭、塚本 浩、堀内孝彦、

- 赤司浩一. IL-33 受容体を発現する骨髄球系前駆細胞の同定. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術集会 (大阪市), 2012.
- 32) Izuhara K. Importance of the interaction between immune and non-immune cells in the pathogenesis of allergic diseases. KAAACI (The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology) Annual International Congress (Invited Lecture), Soul (Korea), 2012.
- 33) Izuhara K. Serum periostin levels are correlated with decline of pulmonary function in asthma patients. 29th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum (Workshop), Jeju (Korea), 2012.
- 34) Izuhara K. Pharmacogenetics. IFCC C-CMBC Committee Activity in Malaysia "MOLECULAR DIAGNOSTICS FOR BEGINNERS"2012 (Lecture), Kuala Lumpur (Malaysia), 2012.
- 35) Kotobuki Y, Otsuka K, Shiraishi H, Serada S, Kudo A, Conway SJ, Katayama I, Izuhara K, Naka T. Periostin, a matricellular protein, accelerates wound repair by activating dermal fibroblasts. Keystone symposia Conferences 2012 meetings (D1)(Poster), Big Sky (USA), 2012.
- 36) Taniguchi K, Arima K, Masuoka M, Shiraishi H, Ohta S, Otsuka K, Suzuki S, Hamasaki Y, Izuhara K. The IL-1a/periostin/IL-6 axis contributes to the keratinocyte proliferation and differentiation in atopic dermatitis. 29th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, 2012, Jeju (Korea), 2012.
- 37) 出原賢治. 間質性肺炎の新規バイオマーカー: ペリオスチン (教育講演). 第 52 回日本臨床化学会年次学術集会 (盛岡市), 2012.
- 38) 出原賢治, 宮本昭正. アレルギー疾患の診断・治療における特異的 IgE 抗体の微量および高値測定の意義—基礎的性能評価— (シンポジウム). 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (大阪市), 2012.
- 39) 出原賢治. アレルギー炎症の慢性化における IL-4/IL-13-ペリオスチン経路の重要性 (シンポジウム). 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (大阪市), 2012.
- 40) Izuhara K. Periostin, a matricellular protein, promotes chronicity of allergic skin inflammation (シンポジウム). 第 41 回日本免疫学会学術集会 (神戸市), 2012.
- 41) 赤坂圭一、関梨沙子、若山知薫、水口真理、高山賢哉、笛木直人、出原賢治、相良博典. びまん性肺疾患における血清ペリオスチン値の検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 (東京都), 2012.
- 42) 金光禎寛、松本久子、出原賢治、東田有智、他 20 名. 吸入ステロイド治療下喘息患者における呼吸機能低下に関与する因子の検討. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (大阪市), 2012.
- 43) 太田伸男、倉上和也、鈴木祐輔、石田晃弘、和気貴祥、出原賢治. IgG4 関連硬化性疾患におけるペリオスチンおよび TGF- β の発現. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (大阪市), 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（審査中）

(1) 制御性 T 細胞の製造方法（特開 2010-004853）

(2) アトピー素因判定マーカー、アレルギー性皮膚疾患素因判定マーカー及びそれらの使用法（特開 2010-207200）

II. 分担研究報告

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

研究報告書

分担項目：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亢進分子
機構解明、天然物由来ヒスタミン H₁ 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

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 複合体がゴルジ体へ移動し、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(-)マキアイン ((-)MKN)、抗アレルギー天然物に見られるアピゲニン、ケルセチンの同定に成功した。(-)MKN、及び、アピゲニンは 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 抑制薬であるセラストロール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。

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と考えられる。

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

一第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(-)マーキアイン((-)MKN)であり、(-)MKNの標的分子がHSP-90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。

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.)。

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ま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

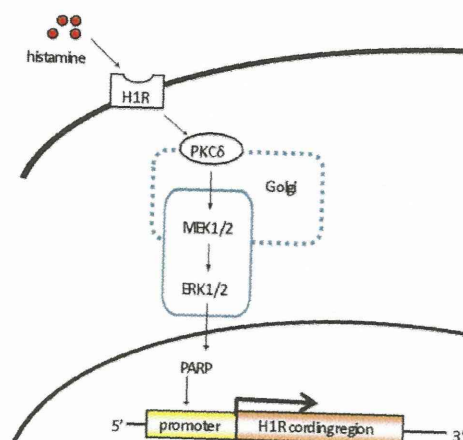
TDI 感作鼻過敏症モデルラットに対する celastrol (HSP90 抑制薬) の投与により、鼻症状の改善、及び、H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用が見いだされた。

4. 鼻過敏症症状に関与する PKC δ シグナルに続く第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)。

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. H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構 (1)

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 δ 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。

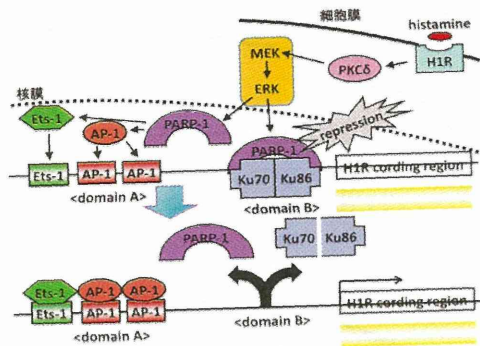


図 2. H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構 (2)

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。

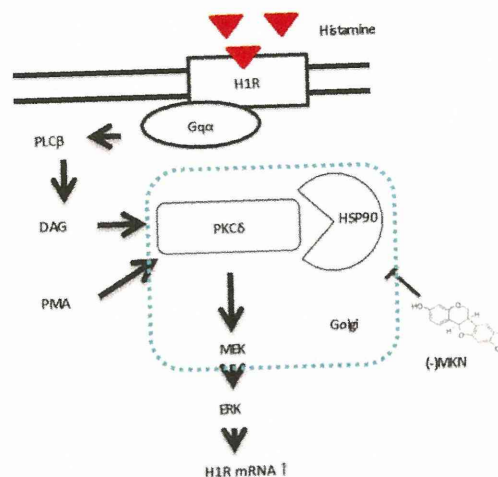


図 3. (-)MKN の分子薬理機構

図 3 は(-)MKN の標的分子である HSP90 が PKCδ 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、PKCδ・HSP90 複合体に作用して、複合体を解離させ、PKCδ の Golgi への移行、及び、PKCδ 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、PKCδ/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。

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、アピゲニンが 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。

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, Bhuvanewari 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 I). *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 H₁ 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.

2. 学会発表

1) Hiroyuki Fukui. Suppression of

allergic disease sensitive gene expression by Maackiain, a novel lead for the therapeutics of allergy. Plenary Lecture, 12th International Congress of Ethnopharmacology (Science City, Kolkata, India), 2012.

2) Masashi Hattori, Hiroyuki Mizuguchi, Chiyo Matsushita, Hitoshi Niino, Yuko Sagesaka, Keisuke Masuyama, Hiroyuki Fukui. Identification of anti-allergic compound from green tea that suppresses the expression of histamine H₁ receptor gene. 12th International Congress of Ethnopharmacology (Science City, Kolkata, India), 2012.

3) Sayaka Yamamoto, Hiroyuki Mizuguchi, Islam Mohammed Nurul, Masum Shahriar, Pichairajan Venkatesh, Kazutaka Maeyama, Pulok K. Mukherjee, Masashi Hattori, Mohamed Sahabuddin Kabir Choudhuri, Noriaki Takeda, Hiroyuki Fukui. Albizia Lebbeck alleviated allergy symptom by inhibiting histamine signaling at the transcriptional level. 12th International Congress of Ethnopharmacology (Science City, Kolkata, India), 2012.

4) Hiroyuki Fukui. Allergic disease sensitive gene. Lecture, 2nd International Seminar on Recent Development in Pharmaceutical Education and Research. (Calcutta Institute of Pharmaceutical Technology and Allied Science, West Bengal, India), 2012.

5) Hiroyuki Mizuguchi, Hiroyuki Fukui.

Exploring the drug targets using natural resources-derived anti-allergic compounds that suppress up-regulation of allergic diseases sensitive gene expression. シンポジウム : Frontier of intracellular drug target research、第 85 回日本薬理学会年会 (京都国際会議場、京都) , 2012.

6) 成相祐希、水口博之、永井浩章、金山知代、加藤周平、吉村好之、柏田良樹、根本尚夫、高石喜久、武田憲昭、福井裕行.

Identification of the target molecule of the new anti-allergic compound, maackiain from Kujin. 第 85 回日本薬理学会年会 (京都国際会議場、京都) , 2012.

7) 永井浩章、水口博之、成相祐希、吉村好之、武田憲昭、福井裕行. Apigenin suppresses histamine H₁ receptor gene expression by interaction with HSP90. 第 85 回日本薬理学会年会 (京都国際会議場、京都) , 2012.

8) 水口博之、Shrabanti Dev、Asish K Das、馬場嘉信、福井裕行. 和漢薬苦参はヒスタミンシグナル抑制を介した FAT10 / NF- κ B シグナルの抑制により抗アレルギー作用を示す。日本薬学会第 132 年会 (北海道大学、札幌) , 2012.

9) 小野将平、水口博之、福井裕行. ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現に対する抗ヒスタミン薬インバースアゴニスト活性の影響。第 121 回日本薬理学会近畿部会 (あわぎんホール、徳島市) , 2012.

10) 福井裕行、成相祐希、水口博之、武田憲昭. 苦参由来ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現抑制物質、マーキアインの分子薬理機構。第 29 回和漢医薬学会学術大会 (北里

大学、東京都) , 2012.

11) 福井裕行、水口博之、北村嘉章、柏田良樹、根本尚夫、武田憲昭. 抗ヒスタミン薬のアレルギー疾患症状改善に関する薬理機構。第 63 回日本薬理学会北部会 (朱鷺メッセ、新潟市) , 2012.

12) 大岸弘敬、水口博之、北村嘉章、近藤勇人、黒田若菜、吉田陽香、宮本裕子、服部将史、武田憲昭、福井裕行. 花粉症におけるアレルギー疾患感受性遺伝子群。第 16 回日本ヒスタミン学会 (岡山プラザホテル、岡山市) , 2012.

13) 水口博之、福井裕行. ヒスタミンシグナルを標的とする天然物由来抗アレルギー化合物を用いた細胞内創薬ターゲットの探索。第 16 回日本ヒスタミン学会 (岡山プラザホテル、岡山市) , 2012.

14) 福井裕行. 抗アレルギー漢方薬、苦参の分子薬理機構。第 28 回日本耳鼻咽喉科漢方研究会学術集会 (The Grand Hill : 品川グランドタワー、東京都) , 2012.

15) 福井裕行. 疾患感受性遺伝子発現の亢進抑制によるアレルギー疾患治療戦略。第 64 回日本皮膚科学会西南支部学術大会 (広島国際会議場、広島市) , 2012.

16) 水口博之、成相祐希、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行. 苦参由来抗アレルギー性化合物マーキアインの標的タンパク質の同定。第 51 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (島根県民会館・サンラポーむらくも、松江市) , 2012.

17) 宮城恒平、水口博之、寺尾拓馬、坂本典子、山脇洋輔、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行. ヒトヒスタミン H₁ 受容体発現シグナルにおける Ku86 の関与。第 122 回日本

薬理学会近畿部会（千里ライフサイエンスセンター、豊中市）, 2012.

18) 福井裕行、水口博之、北村嘉章、武田憲昭. 抗アレルギー和漢薬苦参由来 PKC δ 抑制薬, (-)マーキアインの分子薬理機構. 第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会（大阪国際会議場、大阪市）, 2012.

19) Hiroyuki Mizuguchi, Hiroyuki Fukui. Heat shock protein 90 is a novel therapeutic target for allergic diseases. 第 41 回日本免疫学会学術集会（神戸国際会議場他、神戸市）, 2012.

20) Hiroyuki Fukui. Anti-allergic mechanism of antihistamines. Invited speaker. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. (Loisir Hotel & Spa Tower Naha, Naha), 2012.

21) 福井裕行. 抗ヒスタミン薬のアレルギー疾患症状改善機構. 招待講演. 第 31 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会（倉敷市芸文館、倉敷市）, 2013.

22) 服部将史、水口博之、馬場祐子、小野将平、張倩、小林誠、石丸直澄、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行. ストレプトゾトシン投与型糖尿病モデルマウスに対するケルセチンの効果. Effect of quercetin on streptozotocin-induced diabetic mice. 第 86 回日本薬理学会年会（福岡国際会議場、福岡市）, 2013.

23) 水口博之、服部将史、馬場祐子、張倩、小林誠、小野将平、石丸直澄、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行. タンパクキナーゼ C δ シグナル抑制化合物ケルセチンのストレプトゾトシン誘発膵 β 細胞破壊に対する効果. 日本薬学会第 133 年会（パシフィコ横浜、

横浜市）, 2013.

24) Hiroyuki Fukui, Hiroyuki Mizuguchi, Yoshiaki Kitamura, Noriaki Takeda. Clinical significance of histamine H₁ receptor-PKC delta-HSP90 signaling in allergic symptoms. 42nd European Histamine Research Society Annual Meeting. (Ambassador Centrum Hotel, Łód (Lodz), Poland), 2013.

25) Maki Michioki, Hiroyuki Mizuguchi, Hirotaka Ogishi, Yoshiaki Kitamura, Noriaki Takeda, Hiroyuki Fukui. Exploring transcriptional network causally associated with pollinosis by tokuene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. 42nd European Histamine Research Society Annual Meeting. (Ambassador Centrum Hotel, Łód (Lodz), Poland), 2013.

26) Tomohiro Nakano, Hiroyuki Mizuguchi, Masashi Hattori, Yuko Baba, Shohei Ono, Qian Zhang, Yohei Sasaki, Makoto Kobayashi, Yoshiaki Kitamura, Noriaki Takeda, Hiroyuki Fukui. Quercetin inhibits transcriptional up-regulation of histamine h1 receptor via suppressing protein kinase C- δ /extracellular signal-regulated kinase/poly(ADP-ribose)polymelase-1 signaling pathway in HeLa cells. 42nd European Histamine Research Society Annual Meeting. (Ambassador Centrum Hotel, Łód (Lodz), Poland), 2013.

H. 知的財産権の出願登録状況

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）

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

分担研究報告書

分担研究項目：自然免疫型マウス喘息モデルにおけるサイトカイン・ケモカイン産生に関する研究

研究代表者 斎藤 博久 国立成育医療研究センター研究所 研究所副所長
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 上級研究員

研究要旨：本研究班の研究代表者によって、toluene-2, 4-diisocyanate 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 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、Maaciain 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が重要視され、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。

A. 研究目的

本研究班の研究代表者（福井）によって、toluene-2, 4-diisocyanate 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なモデル作成と、その特徴を調査した。

B. 研究方法

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 µg/20 µl 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 µg/20 µl 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。

C. 結果

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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1.

Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to T(H)2.

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.

J Allergy Clin Immunol. 2012 Oct 16. doi:pil: S0091-6749(12)01466-2.

10.1016/j.jaci.2012.09.005.

PMID: 23083674

2.

Diagnosis, evaluation and monitoring of asthma.

Tamaoki J, Saito H.

Allergol Int. 2012 Sep;61(3):351-2.

PMID: 23082326

3.

Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, Is crucial for murine asthma.

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,