

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860605

研究課題名(和文) 活性化プロテインCによるアレルギー性疾患新規治療法基盤の開発

研究課題名(英文) Activated protein C for the therapy of allergic diseases

## 研究代表者

高木 健裕 (Takagi, Takehiro)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・リサーチアソシエイト

研究者番号：70585174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアレルギー性疾患に対するトロンボモジュリン(TM)及び活性化プロテインC(APC)の抑制効果を検討した。組換えヒトTM投与群のアレルギー性喘息マウスでは、非投与群にくらべ、気道過敏性と好酸球浸潤は有意に低下した。また、コントロール投与群にくらべ、組換えヒトTM投与群のアレルギー性喘息マウスでは、肥満細胞の脱顆粒化が有意に減少した。さらに、*in vitro*実験ではコントロールにくらべ、APC投与によりマウス骨髄由来樹状細胞の成熟が抑制された。以上の結果より、アレルギー性喘息に対するTMとAPCが有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Activated protein C (APC) is a natural anticoagulant that can also play an important role in the modulation of inflammatory, immune and allergic responses. APC results from the activation of protein C by the thrombin and thrombomodulin (TM) complex. TM can also exhibit anti-inflammatory and anti-allergic properties. The present study was undertaken to assess whether recombinant human (rh) TM can inhibit the allergic responses of mast cells and eosinophils, and whether APC can block the maturation of dendritic cells. This study showed that rhTM suppresses airway hyperresponsiveness, infiltration of eosinophils and degranulation/activation of mast cells in an allergic bronchial asthma mouse model. In addition, this study demonstrated that APC can inhibit the activation and maturation of mouse bone marrow-derived dendritic cells. Overall, these results suggest the potential usefulness of both rhTM and APC for treating allergic diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アレルギー 凝固制御因子 肥満細胞 好酸球 喘息 活性化プロテインC トロンボモジュリン

1. 研究開始当初の背景

外部からの抗原の取り込みによって樹状細胞等の抗原提示細胞がナイーブT細胞に抗原提示を行いTh2細胞へと分化させ、更にTh2細胞はB細胞を形質細胞へと分化させ、形質細胞によってIgEが産生される。このIgEが肥満細胞や好塩基球と結合し、更にそのIgE上に抗原が提示され架橋する事によって肥満細胞や好塩基球はヒスタミンやロイコトリエンなどの化学伝達物質を放出する。この伝達物質により気管支の粘膜分泌が増加し、炎症が引き起こされ、平滑筋は収縮し、慢性的な気道狭窄が起こる。アレルギー性喘息を含めた呼吸器疾患における凝固制御因子である活性化プロテインC (APC) 組み換えヒトトロンボモジュリン (rhTM) の果たす役割についてはこれまでに少しずつ明らかにされてきており、間質性肺炎などの肺疾患患者の気管支肺胞洗浄液中でAPC活性が低下しており、その病態と相関する事や、気管支喘息モデルマウスにおいてIgE、Th2サイトカイン、好酸球浸潤、気道過敏性をAPCが抑制する事、気管支喘息患者ではAPC活性の減少がIgE、Th2サイトカインの濃度と逆相関し、APC機能の低下が炎症と密接に関係している事などが知られている。しかしながらAPCやTMが直接免疫系細胞(肥満細胞、好酸球、樹状細胞)の機能、分化・増殖にどのような影響を与えるかは報告が少ない。

2. 研究の目的

本研究の目的はアレルギー性喘息におけるAPCとrhTMの免疫系細胞に対する作用を明らかにすることである。

3. 研究の方法

a) 肥満細胞、好酸球におけるIgE抗原刺激に対するrhTMの役割。ヒト好酸球細胞株(Eo1-1)と正常ヒト由来好酸球を用いてそれぞれをrhTM処理群と非処理群に分け、eotaxinで刺激させた後炎症性サイトカイン、マイグレーション等を比較検討した。  
 b) アレルギー性喘息モデルマウスの気道過敏性と好酸球浸潤に及ぼすrhTM投与の影響。BALB/cマウスにトリ卵白アルブミン(OVA)を腹腔内投与することで感作させ、2回目の感作より1週間後にrhTMを気管内投与し、投与直後にマウス専用噴霧装置を用いてOVA曝露を行った。肥満細胞はトルイジンブルーで染色した。  
 c) マウス骨髄由来細胞をFlt3Lの存在下で1週間培養する事でマウス骨髄由来樹状細胞とし、樹状細胞の成熟に対するAPCの抑制効果を検討した。

4. 研究成果

a) 非投与群の細胞にくらべ、rhTM投与群のEo1-1細胞ではマイグレーション促進とeosinophil peroxidase (EPO)の分泌濃度が有意に高値であり(図1)、正常ヒト由来好

酸球ではIL-13とTNF- $\alpha$ の分泌が有意に上昇した(図2)。

b) rhTM投与群のアレルギー性喘息マウスでは、非投与群にくらべ、気道過敏性と好酸球浸潤は有意に低下した(図3)。

c) また、コントロール投与群にくらべ、rhTM投与群のアレルギー性喘息マウスでは、肥満細胞の脱顆粒化が有意に低下した(図4)。

d) コントロール投与群にくらべ、APCはマウス骨髄由来樹状細胞の成熟を抑制した。(図5)。

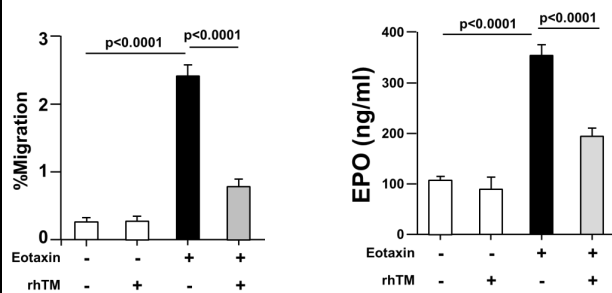


図1. Eo1-1好酸球細胞株のマイグレーションと脱顆粒化に対するrhTMの抑制効果

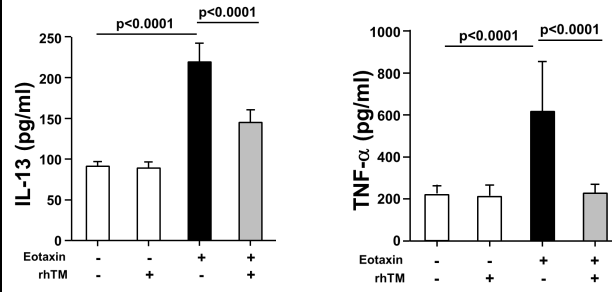


図2. 好酸球細胞のIL-13とTNF- $\alpha$ 分泌に対するrhTMの抑制効果

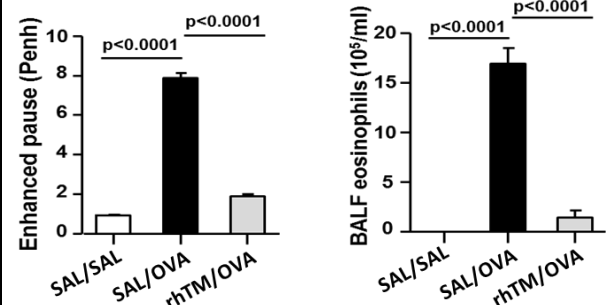


図3. 喘息に対するrhTMの抑制効果。

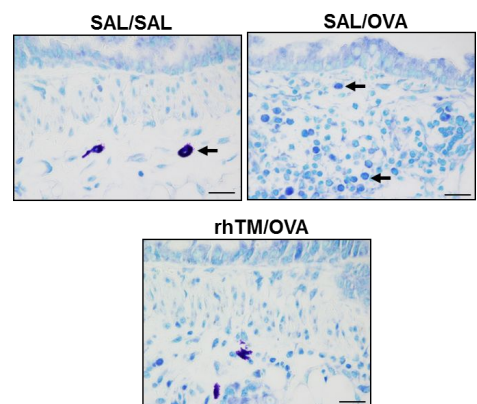


図4. 喘息マウス肥満細胞に対するrhTMの抑制効果

抑制効果。

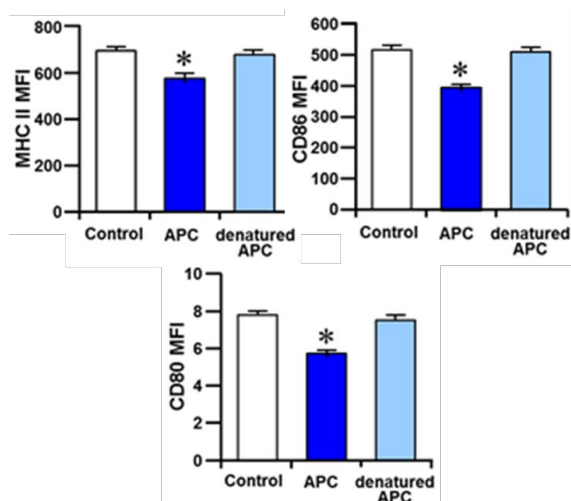


図 5. マウス骨髄由来樹状細胞の成熟に対する APC の抑制効果。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Kobayashi H, Naito M, Masuya M, Maruyama M, Urata K, Takahashi Y, Tomaru A, Fujiwara K, Ohnishi M, Takagi T, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Urawa M, Gabazza EC, Taguchi O, Takei Y. Circulating fibrocytes correlate with the asthma control test score. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2016, in press 査読有り
2. Toda M, D'Alessandro-Gabazza CN, Takagi T, Chelakkot-Govindalayathila AL, Taguchi O, Roen Z, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Gabazza EC, Morser J. Thrombomodulin modulates dendritic cells via both antagonism of high mobility group protein B1 and an independent mechanism. *Allergol Int* 63:57-66, 2014 査読有り

[学会発表](計 9 件)

1. Tomaru A, Gabazza E, Kobayashi T, Kobayashi H, Taguchi O, Takagi T, Onishi M, Fujiwara K, D'Alessandro Gabazza C, Takahashi Y, Urata K. Matrix metalloproteinase-2 is protective in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. International Conference of the European Respiratory Society, Amsterdam(Netherlands), September 26-30, 2015
2. Fujiwara K, Urata K, Tomaru A, Takahashi Y, Onishi M, Takagi T, Kobayashi H, D'Alessandro Gabazza CN, Gabazza EC, Taguchi O, Kobayashi T. Lung overexpression of matrix metalloproteinase-2 protects against bronchial asthma. International Conference of the European Respiratory Society, Amsterdam(Netherlands), September 26-30, 2015
3. Takahashi Y, Urata K, Tomaru A, Fujiwara K, Onishi M, Takagi T, Kobayashi H, D'Alessandro-Gabazza C, Gabazza E, Osamu Taguchi O, Kobayashi T. The immunomodulatory activity of protein S protects against allergic airway inflammation. International Conference of the European Respiratory Society, Amsterdam(Netherlands), September

26-30, 2015

4. 大西 真裕、小林 哲、浦田 健太郎、高橋 佳紀、都丸 敦史、藤原 研太郎、高木 健裕、小林 裕康、ガバザ エステバン、田口 修。新規 COPD 誘発マウスモデルの検討。第 55 回日本呼吸器学会学術講演会。東京国際フォーラム(東京都・千代田区)2015 年 4 月 17 - 19 日
5. 都丸 敦史、浦田 健太郎、高橋 佳紀、藤原 研太郎、大西 真裕、高木 健裕、小林 哲、小林 裕康、ガバザ エステバン、田口 修。マウスモデルにおけるマトリックスメタロプロテアーゼ 2(MMP-2)の肺線維化抑制効果の検討。第 55 回日本呼吸器学会学術講演会。東京国際フォーラム(東京都・千代田区)2015 年 4 月 17 - 19 日
6. 高木健裕、高橋佳紀、都丸敦史、藤原研太郎、大西真裕、小林哲、小林裕康、ガバザ・エステバン、田口 修。気管支喘息における樹状細胞に対する活性化プロテインCの役割。第 54 回日本呼吸器学会。大阪国際会議場(大阪府・大阪市) 2014 年 4 月 26 日
7. Kobayashi T, Toda M, D'Alessandro- Gabazza CN., Takagi T, Chelakkot-Govindalayathil AL, , Roen Z, Urawa M, Onishi M, Fujiwara K, Tomaru A, Taguchi O, Gabazza E. The lung microbiome using mouse disease model. The 43 回日本免疫学会学術集会。国立京都国際会館(京都市・京都市) 2014 年 12 月 10 日 - 12 日
8. 小林 裕康、北岡 一樹、浦田 健太郎、高橋 佳紀、都丸 敦史、藤原 研太郎、大西 真裕、高木 健裕、小林 哲、ガバザ エステバン、田口 修。非結核性抗酸菌に対する自然免疫について。第 55 回日本呼吸器学会学術講演会。東京国際フォーラム(東京都・千代田区)2015 年 4 月 17 - 19 日
9. 藤原 研太郎、小林 哲、浦田 健太郎、都丸 敦史、高橋 佳紀、大西 真裕、高木 健裕、小林 裕康、Esteban C Gabazza、田口 修。気管支喘息におけるマトリックスメタロプロテアーゼ 2 の役割。54 回日本呼吸器学会。大阪国際会議場(大阪府・大阪市) 2014 年 4 月 26 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木健裕 (Takagi, Takehiro)  
三重大学・医学(系)研究科(研究院)・  
リサーチアソシエイト  
研究者番号: 70585174

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: