

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07933

研究課題名(和文)ステロイドのヒスタミンH1受容体遺伝子発現抑制の分子機構解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of steroids for the suppression of histamine H1 receptor signaling.

研究代表者

水口 博之(Mizuguchi, Hiroyuki)

大阪大谷大学・薬学部・教授

研究者番号：40247838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：H1R遺伝子発現シグナルとステロイドシグナルに共通のシグナル分子としてヒートショック蛋白90(Hsp90)を同定した。本課題では、ステロイド及びH1R遺伝子発現抑制化合物マーキアインのH1Rシグナル及びステロイドシグナルへの影響について検討した。その結果、ステロイドのH1Rシグナル抑制効果は動物実験での結果ほど明確ではなかった。一方、マーキアインはステロイドシグナルを介した抗炎症性遺伝子発現を増強した。以上の結果から、ステロイドのH1Rシグナル抑制効果は間接的であり、また、マーキアインはヒスタミンシグナルの抑制に加えステロイドの抗炎症作用の増強により抗アレルギー効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The expression level of an allergic disease-sensitive gene is correlated with the symptoms severity. We demonstrated that histamine H1 receptor (H1R) gene is a pollinosis-sensitive gene. Maackiain was isolated as an anti-allergic compound that suppresses H1R signaling, and Hsp90 was identified as its intracellular target molecule that was common to the steroid signaling. We examined the effect of steroids on the H1R signaling. We also investigated the effect of maackiain on the steroid signaling. Suppression of H1R signaling by steroids was ambiguous compared to the results from the animal experiments. Maackiain increased steroid-stimulated up-regulation of anti-inflammatory gene expression. These data suggest that steroids might suppress H1R signaling indirectly through the histamine-cytokine network. Data also suggest that maackiain show the anti-allergic effect through not only the suppression of H1R signaling but also reinforcement the anti-inflammatory effect of steroids.

研究分野：分子薬理学

キーワード：ヒスタミンH1受容体遺伝子発現シグナル ステロイドシグナル PKC Hsp90

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、花粉症治療薬としてステロイド点鼻薬が頻用されている。ステロイドはステロイド受容体 (GR) と結合し、転写因子としてグルココルチコイド応答配列 (GRE) または negative GRE に結合し標的遺伝子群の転写を促進または抑制する。また、AP-1 や NF- $\kappa$ B と結合することでその作用を抑制する。このような機序によりステロイドは強力な抗炎症・免疫抑制作用を発揮すると考えられている。しかし、花粉症におけるステロイドの効果の作用機序については不明である。我々は、toluene 2,4-diisocyanate (TDI) 感作アレルギーモデルラットにおいて、デキサメタゾンが TDI により誘発される鼻過敏症状を抑制し、同時に、鼻粘膜ヒスタミン H1 受容体 (H1R) 遺伝子発現亢進も抑制することを見出した (Kitamura et al. *Acta Otolaryngol.* 2004)。一方、HeLa 細胞において、デキサメタゾンは、ヒスタミンもしくはホルボールエステルである PMA 刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進を抑制した (Das, Mizuguchi et al. *J Pharmacol Sci.* 2007; Nurul, Mizuguchi et al. *Int. Immunopharmacol.* 2011)。これらの結果から、花粉症におけるステロイドの作用機序が H1R 遺伝子発現抑制である可能性が示唆されたが、その分子機構は明らかでない。我々は、スギ花粉症患者において、H1R 遺伝子発現レベルが症状の重篤性と強く連関することを証明した (Mizuguchi et al. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2010)。また、抗アレルギー効果が伝承される機能性食品や漢方薬、アユルベエダ医薬などの天然物から同定した H1R 遺伝子発現抑制化合物が、アレルギー症状を軽減することを明らかにした (Dev, Mizuguchi et al. *J Pharmacol Sci.* 2008; Matsushita, Mizuguchi et al. *J Trad Med.* 2008; Mizuguchi et al. *Allergology Int.* 2009; 特願 2009-284069;

PCT/KR2010/008995)。さらに、苦参から同定した H1R 遺伝子発現抑制化合物マーキアインの作用機構解明からマーキアインの標的蛋白として Hsp90 を同定した。また、Hsp90 阻害薬が H1R 遺伝子発現亢進を抑制し、アレルギー症状を軽減することを世界で初めて示した (論文投稿中)。これらの結果から、Hsp90 が H1R 遺伝子発現シグナルとステロイドシグナルに共通のシグナル分子であり、Hsp90 を標的とする化合物により両シグナルが制御可能であると考えられた。しかし、これまで、アレルギー疾患治療薬の開発において、Hsp90 に着目した研究はほとんどないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では以下のことを明らかにする。

#### (1) HeLa 細胞における PMA 刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進に対するステロイドの抑制効果の分子機構解明

これまで、PMA 刺激に伴う H1R 遺伝子発現シグナル経路について明らかにした。そこで、ステロイドがどのシグナル蛋白を標的にするのかを明らかにする。

#### (2) Hsp90 を標的とする天然物由来 H1R 遺伝子発現抑制化合物のステロイドシグナルへの影響

これまで、H1R 遺伝子発現抑制化合物としてマーキアイン、ケルセチン、アピゲニンなどを同定した。そこで、GRE を組み込んだルシフェラーゼレポーターアッセイにより、これらの化合物のステロイドシグナルへの影響を明らかにする。また、GR と Hsp90 の相互作用に対する化合物の影響について抗体を用いた共免疫沈降法により明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) HeLa 細胞における PMA 刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進に対するステロイドの抑制効果の分子機構解明

HeLa 細胞において、PMA 刺激に伴い H1R 遺伝子発現が亢

進し、そのシグナル経路の詳細について明らかにした。また、デキサメタゾンがPMA刺激に伴うH1R遺伝子発現亢進を抑制することを見出している。そこで、以下の手法によりデキサメタゾンの作用部位を明らかにする。

#### (2) Hsp90を標的とする天然物由来H1R遺伝子発現抑制化合物のステロイドシグナルへの影響

有機合成したマーキアインを用いて以下の手法により、ステロイドシグナルへの影響を明らかにする。(a) GR/Hsp90複合体に対するH1R遺伝子発現抑制化合物の効果：HeLa細胞にステロイドシグナルに必要なGR $\alpha$ が発現していることをウエスタンブロット法により確認している。そこで、マーキアインのGR/Hsp90複合体の解離及び、GR $\alpha$ の核への移行への影響を免疫沈降法及び蛍光免疫染色法により明らかにする。(b) H1R遺伝子発現抑制化合物のGREシグナルへの影響：GREを組み込んだレポータープラスミドを構築する。これをHeLa細胞にトランスフェクションし、デキサメタゾン刺激に伴うルシフェラーゼ活性上昇へのマーキアインの影響を検討する。(c) 生体においてGREによる転写調節を受ける遺伝子には炎症に関連する遺伝子とそうでない遺伝子がある。そこで、各々の遺伝子についてデキサメタゾン刺激に伴う遺伝子発現亢進に対するマーキアインの影響を検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) HeLa細胞におけるPMA刺激に伴うH1R遺伝子発現亢進に対するステロイドの抑制効果

**分子機構説明**：デキサメタゾンのヒスタミンH1受容体遺伝子発現への影響を検討したところ、ステロイドの濃度により遺伝子発現を抑制または上昇させるという二面的な効果があることがわかった。しかし、動物実験で得られたヒスタミンH1受容体遺伝子発現効

果と比較してその効果は顕著ではなかった。

これは、in vivoにおいてはステロイドがヒスタミン-サイトカインネットワークを介してヒスタミンH1受容体遺伝子だけでなく、サイトカイン遺伝子の発現にも影響した相乗効果が見られているためと考えられた。また、ステロイドシグナルの抗アレルギー効果は大きく分けて(1)ステロイド受容体・ステロイド複合体の2量体がGREに結合し転写活性を上昇または抑制するシグナル、(2)単量体ステロイド受容体・ステロイド複合体がAP-1などの転写活性を抑制することによるが、マーキアインは(2)への影響はないことが明らかとなった。

##### (2) Hsp90を標的とする天然物由来H1R遺伝子発現抑制化合物のステロイドシグナルへの影響

Hsp90阻害薬のゲルダナマイシンは、Hsp90のATP結合部位に結合することで、Hsp90を阻害する。(-)マーキアインはHsp90とゲルダナマイシンの結合に対し競合したが、そのIC<sub>50</sub>値(IC<sub>50</sub> = 11  $\mu$ M)はATP結合部位に結合することが知られている別のHsp90阻害薬の17-AAGのIC<sub>50</sub>値(IC<sub>50</sub> = 0.64  $\mu$ M)よりも17倍大きかった。このことから、(-)マーキアインがHsp90のATP結合部位ではなく、その近傍に結合することが明らかとなった。また、(-)マーキアインはHsp90のATPアーゼ活性を阻害しなかった。以上の結果から、(-)マーキアインはゲルダナマイシンや17AAGとは異なる結合様式でHsp90に結合し、PKC $\delta$ とHsp90との相互作用を阻害することが明らかとなった。次にマーキアインのステロイドシグナルへの影響について検討した。ステロイド受容体(GR $\alpha$ )は刺激のない状態ではHsp90と結合して細胞質に安定に存在する。この結合をHsp90阻害薬の17-AAGにより阻害するとGR $\alpha$ は分解される。しかし、(-)マーキアイン処理によりHsp90は分解されなかった。また、ステロイド刺激に伴い、GR $\alpha$ /ステロイド複合体は核内へ移行するが、(-)マーキアインは、GR $\alpha$ の核

内移行を抑制しなかった。さらに、GREを組み込んだレポータープラスミドをHeLa細胞にトランスフェクションし、デキサメタゾン刺激に伴うルシフェラーゼ活性上昇への(-)マーキアインの影響を検討した結果、(-)マーキアインはGR $\alpha$ の転写活性を増強することが明らかとなった。このマーキアインの効果が生体内においてもおこなっているかどうかを検討した。GREにより調節される遺伝子としてステロイドによる抗炎症作用を引き起こすタンパクの一つである DUSP1(dual specificity phosphatase 1)、及びステロイドの抗炎症作用とは関連しないSLC19A2 (solute carrier family 19 member 2)を用いて、それぞれの遺伝子におけるデキサメタゾン刺激に伴う遺伝子発現亢進に対するマーキアインの影響を検討した。その結果、ステロイドの抗炎症作用と関連のあるDUSP1においてマーキアインはデキサメタゾン刺激にともなう遺伝子発現亢進をさらに増強した。一方、SLC19A遺伝子発現亢進には影響しなかった。

#### 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10件)

- (1) 水口博之 Development of therapeutic strategy target for intracellular signaling molecules responsible for the pathogenesis of allergic diseases Nihon Yakurigaku Zasshi 2017; 150: 188-194. 10.1254/fpj.150.188. 査読有
- (2) 貞方久人、水口博之、福井裕行 ヒスタミンH1受容体のヒスタミン非依存的活性化による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に対するエピナスチンの抑制作用 アレルギー・免疫 2017; 24: 122-126. 査読有
- (3) Yamamoto K, Mizuguchi H, Tokashiki N, Kobayashi M, Tamaki M, Sato Y, Fukui H, Yamauchi A. Protein kinase C- $\delta$  signaling

regulates glucagon secretion from pancreatic islets. J Med Invest. 2017; 64: 122-128. 10.2152/jmi.64.122. 査読有

(4) Mizuguchi H, Das AK, Maeyama K, Dev S, Shahriar M, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Antihistamines suppress upregulation of histidine decarboxylase gene expression with potencies different from their binding affinities for histamine H1 receptor in toluene 2,4-diisocyanate-sensitized rats. J Pharmacol Sci. 2016; 130: 212-218. 10.1016/j.jphs.2016.02.002. 査読有

(5) Kitamura Y, Mizuguchi H, Okamoto K, Kitayama M, Fujii T, Fujioka A, Matsushita T, Mukai T, Kubo Y, Kubo N, Fukui H, Takeda N. Irradiation with narrowband-ultraviolet B suppresses phorbol ester-induced up-regulation of H1 receptor mRNA in HeLa cells. Acta Otolaryngol. 2016; 136: 409-413. 10.3109/00016489.2015.1129555. 査読有

(6) 福井裕行、水口博之、柏田良樹、根本尚夫、北村嘉章、武田憲昭 Molecular pharmacology of (-)-maackiain, from Kujin, an anti-allergic Kampo medicine. Nihon Yakurigaku Zasshi 2016; 147: 148-151. doi:10.1254/fpj.147.148. 査読有

(7) Shill MC, Mizuguchi H, Karmakar S, Kadota T, Mukherjee PK, Kashiwada Y, Kitamura Y, Nemoto H, Takeda N, Fukui H. A novel benzofuran, 4-methoxybenzofuran-5-carboxamide, from Tephrosia purpurea suppressed histamine H1 receptor gene expression through a protein kinase C- $\delta$ -dependent signaling pathway. Int Immunopharmacol. 2016; 30: 18-26. doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.021. 査読有

(8) Mizuguchi H, Nariai Y, Kato S, Nakano T, Kanayama T, Kashiwada Y, Nemoto H, Kawazoe K, Takaishi Y, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Maackiain is a novel antiallergic compound that suppresses transcriptional upregulation of the histamine H1 receptor and interleukin-4 genes. *Pharmacol Res Perspect* 2015; 3: 1-13. doi: 10.1002/prp2.166 査読有

(9) Shill MC, Das AK, Itou T, Karmakar S, Mukherjee PK, Mizuguchi H, Kashiwada Y, Fukui H, Nemoto H. The isolation and synthesis of a novel benzofuran compound from *Tephrosia purpurea*, and the synthesis of several related derivatives, which suppress histamine H1 receptor gene expression *Bioorg Med Chem* 2015; 23: 6869-6874. doi: 10.1016/j.bmc.2015.09.049. 査読有

(10) Nariai Y, Mizuguchi H, Ogasawara T, Nagai H, Sasaki Y, Okamoto Y, Yoshimura Y, Kitamura Y, Nemoto H, Takeda N, Fukui H. Disruption of heat shock protein 90 (Hsp90)-protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) interaction by (-)- maackiain suppresses histamine H1 receptor gene transcription in HeLa cells. *J Biol Chem*. 2015; 290: 27393-27402. doi: 10.1074/jbc.M115.657023. 査読有

〔学会発表〕（計10件）

(1) 中野友寛、北村紀子、内田勝幸、福井裕行、神沼 修、水口博之 疾患発症シグナルを標的とした花粉症治療戦略 第19回応用薬理シンポジウム 2017

(2) 小笠原健泰、水口博之、給田愛結美、河井真季子、岡島菜津希、藤野裕道、北村嘉章、武田憲昭、福井裕行 苦参由来抗アレルギー化合物(-)マーキアインのステロイドシグナル増強作用 第34回和漢医薬学会 2017

(3) Hiroyuki Fukui, Hiroyuki Mizuguchi, Yoshiyuki Kitamura, Noriaki Takeda Heat shock protein 90-protein kinase Cdelta; complex as a drug target for the therapy of allergic symptoms 第66回日本アレルギー学会学術大会 2017

(4) 山本清威、水口博之、渡嘉敷夏海、小林誠、佐藤陽一、藤野裕道、福井裕行、山内あい子 膵 $\alpha$ 細胞からのグルカゴン分泌に關与するPKCアイソザイムの同定日本薬学会第137年会 2017

(5) Okamoto K, Mizuguchi H, Fujii T, Yamada T, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Effect of narrow-band UVB on up-regulation of Histamine H1 receptor gene expression. The 45th Annual Meeting of the European Histamine Research Society 2016

(6) Wakugawa T, Mizuguchi H, Kadota T, Sawada A, Kominami T, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Treatment with antihistamines in combination with suplatast tosilate markedly alleviated nasal symptoms in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. The 45th Annual Meeting of the European Histamine Research Society 2016

(7) 江洲貴子、水口博之、浪花志帆、小西由貴、北村嘉章、武田憲昭、藤野裕道、福井裕行 小青竜湯によるアレルギー性鼻炎疾患感受性遺伝子発現抑制 第20回日本ヒスタミン学会 2016

(8) 小笠原健泰、水口博之、給田愛結美、河井真季子、岡島菜津希、北村嘉章、武田憲昭、藤野裕道、福井裕行 苦参由来抗アレルギー化合物 (-)マーキアインのステロイドシグナルへの影響 第130回日本薬理学会近畿部会 2016

(9) 水口博之 アレルギー性鼻炎発症に関する細胞内シグナルを標的とした治療戦略の開発 第89回日本薬理学会年会 2016

(10) Fukui H, Esu T, Mizuguchi H, Kitamura Y, Takeda N Clinical significance of antihistamines and kujin, an anti-allergic kampo medicine. 6th International Symposium on Molecular Allergology, ISMA. 2015

〔図書〕(計2件)

(1) Hiroyuki Fukui, Hiroyuki Mizuguchi, Hisao Nemoto, Yoshiaki Kitamura, Yoshiki Kashiwada and Noriaki Takeda. Histamine H<sub>1</sub> receptor gene expression and drug action of antihistamines. In: Handbook of Experimental Pharmacology, Histamine Receptors, ed. Martin Michel, 2017;241:161-169.  
DOI: 10.1007/164\_2016\_14 2016 (Springer Science, NewYork).

(2) Hiroyuki Fukui, Hiroyuki Mizuguchi, Yoshiaki Kitamura and Noriaki Takeda. Clinical significance of histamine H<sub>1</sub> receptor gene expression and drug action of antihistamines. In: Receptor series, "The Receptors", Histamine Receptors, ed. Giuseppe Di Giovanni. pp 157-172, 2016 (Springer Science, NewYork).

〔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  
水口 博之 (MIZUGUCHI HIROYUKI)  
大阪大谷大学・薬学部・教授  
研究者番号：40247838

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )