

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10786

研究課題名(和文) 鼻粘膜におけるロイコトリエンE4受容体-GPR99の役割と新しい治療への応用

研究課題名(英文) Leukotriene E4 receptor in human nasal mucosa-the role of GPR99 and the clinical application for upper airway diseases.

研究代表者

白崎 英明 (SHIRASAKI, HIDEAKI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30260772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：システイニルロイコトリエン(CysLTs)は日常臨床で用いられているCysLT1受容体により鼻閉症状が改善するため重要なケミカルメディエーターであると考えられている。まだ臨床応用されていないCysLT2受容体についても最近の我々の研究により局在が明らかになっている。近年第3のCysLT受容体の存在が示唆されており、LTE4と結合するGPR99受容体が有力視されている。本研究によって鼻粘膜におけるGPR99の局在は主に血管系に発現することが明らかになった。培養血管内皮細胞をLTE4にて刺激すると細胞内カルシウムイオンの上昇が引き起こり、第3のCysLT受容体を介した反応である事が示唆された

研究成果の概要(英文)：The cysteinyl leukotrienes (CysLTs) are lipid mediators that have been implicated in the pathogenesis of allergic rhinitis. CysLT1 receptor is sensitive to the CysLT1 receptor antagonist currently used to treat allergic rhinitis and asthma. Recent studies have begun to uncover receptors selective for LTE4: GPR99. To clarify the expression of GPR99 receptor in human nasal mucosa, we investigated immunohistochemical localization of GPR99 receptor in human nasal mucosa, and intracellular calcium influx in vitro. The immunohistochemical study revealed that vascular smooth muscle and vascular endothelial cells showed intense immunoreactivity for GPR99 receptor. LTE4 caused a rapid increase of the intracellular Ca²⁺ concentration. Both CysLT1 and CysLT2 receptor antagonists did not affect the LTE4-induced intracellular Ca²⁺ response. These results suggest that a potential third CysLT receptor such as GPR80/99 receptor may contribute LTE4-induced activation of nasal vascular cells.

研究分野：鼻アレルギー

キーワード：ロイコトリエンE4 GPR99 P2Y12 鼻粘膜 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

システイニルロイコトリエン(CysLTs)は鼻アレルギー局所で遊離され、日常臨床で用いられているCysLT1受容体拮抗薬により鼻閉症状が改善するため重要なケミカルメディエーターであると考えられている。以前に我々は、ヒト下鼻甲介におけるCysLT1受容体とCysLT2受容体の発現と局在を報告した。それら受容体の親和性についてはCysLT1受容体では $LTD_4 > LTC_4 > LTE_4$ の順であり、CysLT2受容体においては $LTC_4 = LTD_4 > LTE_4$ とCysLT1受容体とCysLT2受容体は、生体内で最も安定な LTE_4 に対する親和性はほとんどない。 LTE_4 は、これを気道に投与すると気道過敏性亢進と好酸球浸潤を引き起こるため、好酸球性気道炎症に何らかの役割を演じていると考えられていたが、その特異的な受容体の存在は明らかにされていなかった。2013年に米国のグループが受容体ノックアウトマウスを用いた手法で、GPR99受容体が LTE_4 受容体として作用することが確認された。

2. 研究の目的

ヒト上気道における第3のCysLT受容体の役割を確認する目的として、ヒト鼻粘膜のGPR99受容体の発現と局在を明らかにする。さらに培養細胞を用いて LTE_4 の鼻粘膜や好酸球性炎症に対する作用とGPR99受容体の役割をin vitroの系で明らかにする。

3. 研究の方法

1) ヒト鼻粘膜の GPR99 受容体の発現と局在について、免疫染色とウエスタンブロット法で、その発現と局在について解析した。さらに通年性アレルギー性鼻炎と非アレルギー性鼻炎の発現量の違いの有無に関してウエスタンブロット法を用いて半定量した。
2) 培養好酸球細胞株(EoL-1細胞)をbutyric acid とサイトカイン(IL-3, IL-5, GM-CSF)刺激でヒト末梢血好酸球様に分化させた後、 LTE_4 刺激を行い細胞遊走が引き起こるかど

うかについて Boyden チャンバー法を用いて解析した。

3) 臍帯由来培養血管内皮細胞(HUVECs)に細胞内 Ca^{2+} のトレーサーであるFluo-4を取り込ませて LTE_4 刺激にて細胞内カルシウムイオンの上昇が引き起こるかをリアルタイムに計測した。抗GPR99抗体を用いてウエスタンブロット法にてHUVECsにGPR99受容体のタンパクレベルの発現があるか解析した。

4. 研究成果

1) 抗GPR99受容体抗体を用いたウエスタンブロット法では、38kDaのバンドを確認した。通年性鼻アレルギー6症例と非アレルギー6症例の下鼻甲介のGPR99発現量をウエスタンブロット法で半定量したが、有意な差は認めなかった。ヒト下鼻甲介の免疫染色にて、血管平滑筋細胞と血管内皮細胞にGPR99受容体発現を認めしたが、予想に反し好酸球などの浸潤細胞には発現を認めなかった(図1)。

(Shirasaki H et al. *Auris Nasus Larynx*誌 2017にて報告)

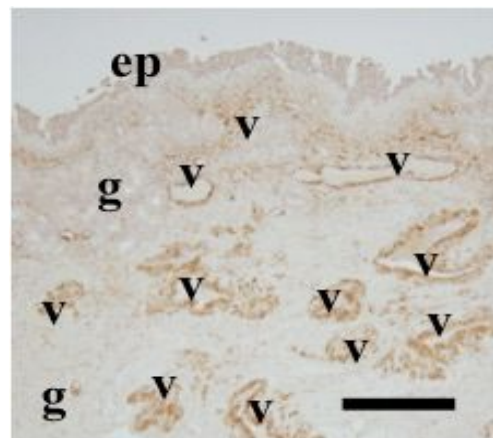


図1 ヒト鼻粘膜におけるGPR99受容体の免疫染色像。抗ヒトGPR99受容体抗体にて免疫染色を施行しDABにて発色させた。上皮(ep)と粘膜下腺組織(g)は染色されず、血管(v)が強く陽性に染色された。Scale bar=500 μ m

2) 好酸球細胞株(EoL-1細胞)にはCysLT 1 受容体とCysLT 2 受容体が発現していることをウエスタンブロット法にて確認した。LTD4刺激を行うと濃度依存性に細胞遊走が引き起こり、この反応はCysLT 1 受容体拮抗薬にて著明に抑制された。一方LTE4刺激では細胞遊走が起こらず、GPR99受容の発現もタンパクレベルでは確認できなかった(Shirasaki H et al. Heliyon誌 2017にて報告)

3) 培養血管内皮細胞(HUVECs)をLTE4にて刺激すると即時性の細胞内カルシウムイオンの上昇が確認された。この反応は、CysLT 1 受容体拮抗剤やCysLT 2 受容体拮抗剤では抑制されず、GPR99などの第3のCysLT受容体を介した反応である事が示唆された(図2)。(Shirasaki H et al. 米国アレルギー学会(AAAAI) 2018年3月の年次大会で発表)

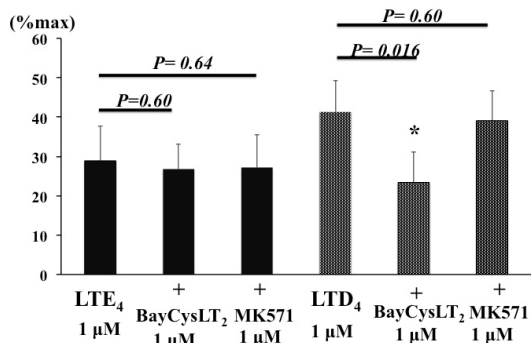


図2 培養血管内皮細胞(HUVECs)に対し、LTE4刺激を行うと即時性の細胞内カルシウムイオンの上昇が引き起こるが、この反応はCysLT1拮抗剤(MK571)やCysLT2拮抗剤(BayCysLT2)では影響を受けない(図2左)。一方、LTD4刺激による細胞内カルシウム上昇反応はCysLT2拮抗剤によって著明に抑制される(図2右)。

以上の結果より、ヒト鼻粘膜にはGPR99受容体が発現しているが主に血管平滑筋に限局しており好酸球などの浸潤細胞にはGPR99受容体は発現しておらず、in vitro

でLTE4刺激を行っても好酸球遊走作用は認めずネガティブな結果に終わった。平成24-26年度に行った研究課題“ヒト鼻粘膜におけるロイコトリエンE4受容体-P2Y12受容体の発現”では気道上皮細胞LTE4刺激を行うとP2Y12受容体を介するムチン分泌が引き起こることを確認した。好酸球等から放出されるLTE4は、おそらくP2Y12受容体を介して好酸球性鼻副鼻腔炎に特徴的な粘稠なムチン分泌を引き起こしていると推察されるが、本研究のターゲットとしたGPR99受容体は好酸球性炎症への関与は低いことが示唆される。鼻粘膜の血管平滑筋と血管内皮細胞に局在するGPR99受容体の役割については今回の研究期間内に明らかにすることができなかったが、これらの細胞が局在する部位は容積血管であるため鼻閉などの臨床症状に関与する可能性大である。LTE4を標的とした本受容体の拮抗薬は未だ開発されていないが、今後気道アレルギー疾患に対する新規治療薬の開発に結びつくような研究成果を獲得できるように発展させたい。

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)

Shirasaki H, Kanaizumi E, Himi T. Expression and localization of GPR99 in human nasal mucosa. *Auris Nasus Larynx* 44: 162-167, 2017. DOI: 10.1016/j.anl.2016.05.010
査読あり。

Shirasaki H, Kanaizumi E, Himi T. Leukotriene D4 induces chemotaxis in human eosinophilic cell line, EoL-1 cells via CysLT1 receptor activation. *Heliyon* 3: e00464, 2017. DOI: 10.2332/allergolint.12-OA-0496

査読あり。

〔学会発表〕(計5件)

Shirasaki H, Saikawa E, Himi T.
Expression of GPR80/99 receptor and leukotriene E₄-induced intracellular Ca²⁺ response in human vascular endothelial cells. 2018 AAAAI Annual Meeting Annual meeting. 2018年3月2 - 5日、フロリダ州オーランド(米国)。

白崎 英明、才川悦子、氷見徹夫。：好酸球細胞株を用いた脂質メディエーター受容体発現調節に関する検討、第66回日本アレルギー学会学術大会、2017年6月17-19日、東京国際フォーラム、東京都。

白崎 英明、才川悦子、菊池めぐみ、氷見徹夫。ミニシンポジウム：ロイコトリエンE₄による好酸球遊走作用の検討、第65回日本アレルギー学会学術大会、2016年6月17-19日、東京国際フォーラム、東京都。

Shirasaki H, Kanaizumi E, Fujita M, Sekioka T, Himi T. Effect of Cysteinyl Leukotriene Receptor Antagonists on Leukotriene D₄-Induced Chemotaxis of Human Eosinophilic Cell Line, EoL-1 Cells. 2016 AAAAI Annual Meeting Annual meeting. 2016年3月5 - 8日、カリフォルニア州ロサンゼルス(米国)。

白崎英明、才川悦子、菊池めぐみ、氷見徹夫：脂質メディエーターによる好酸球遊走作用に関する検討、第34回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2016年2月8日 鳥羽国際ホテル、三重県鳥羽市。

〔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：
出願年月日：
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

白崎 英明 (SHIRASAKI Hideaki)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30260772

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

該当なし

研究者番号：