

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14990

研究課題名(和文) 侵害刺激受容体TRPA1チャネル活性化から予測するアジュバント化学物質の研究

研究課題名(英文) Studies on adjuvant chemicals predicted by activation of a nociceptive receptor TRPA1

研究代表者

今井 康之 (Imai, Yasuyuki)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：80160034

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)：アレルゲンの抗原感作を促進する作用(アジュバント作用)を持つ化学物質の検索のため、知覚神経刺激との関連性に着目して研究を実施した。知覚神経の侵害刺激受容体の一つTRPA1の作動活性、蛍光物質FITCを感作ハプテンとしたマウス接触性皮膚炎におけるアジュバント作用を調べた。フタル酸エステル類とならんで、代替可塑剤のアジピン酸ジイソプロピル、防腐剤のブチルパラベン、マレイン酸ジブチル、トリグリセリドの一種であるトリブチリンに両活性を見出した。別のTRP受容体TRPV1の作動活性があるピペリンにアジュバント作用を見出した。TRP受容体刺激とアジュバント作用の関連性をさらに追究することができた。

研究成果の概要(英文)：We studied chemicals that help sensitization to other allergens (adjuvant effect) in relation to the skin irritation. We examined activation of a nociceptive receptor of sensory neurons, transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channels by chemicals. We also examined adjuvant effects of chemicals by means of mouse contact hypersensitivity against fluorescein isothiocyanate (FITC). Both activities were found not only in phthalate esters but also in an alternative plasticizer adipate ester, butyl paraben, dibutyl maleate and tributylin, which is a triglyceride. We also found both activities in piperine, a TRPV1 agonist. We could further extend our knowledge of a relationship between TRP channel stimulation and adjuvant activity on skin sensitization.

研究分野：免疫学、微生物学

キーワード：環境衛生学 アレルギー・ぜんそく 免疫学 薬学 神経科学

1. 研究開始当初の背景

環境中の化学物質の複合作用がアレルギーの引き金となる場合、他のアレルゲンによる感作を助長する作用(アジュバント作用)を持つ物質の系統的な検出と証明には困難が伴う。可塑剤として使用されている様々なフタル酸エステルを使った比較研究や、TRPA1 作動活性のある天然物を用いた研究から、知覚神経に発現する TRPA1 カチオンチャネル刺激活性と、化学物質過敏症における抗原感作促進作用の間の相関関係および因果関係を明らかにしてきた。なお、フタル酸エステルは可塑剤として広く用いられて来たが、近年生殖毒性をはじめいくつかの点で健康への影響が懸念されている。フタル酸ジブチル(DBP)などの小児への曝露を低減させる方向性が示されている。そこで、脂肪族のアルコールエステルを代替可塑剤として使用するため、それらの生産が増加する傾向が現れていた。

2. 研究の目的

脂肪族の代替可塑剤の一つであるアジピン酸エステルの TRPA1 作動活性を評価するとともに、接触性皮膚炎の感作過程におけるアジュバント作用とその機構を調べる。代替可塑剤の研究結果をふまえ、構造類似性から予測した化学物質を用いて、TRPA1 作動活性からアジュバント活性の予測を実現できるかどうかを精査する。一方、フタル酸エステルはジカルボン酸エステルであるが、カルボン酸とアルコールの関係性が逆向きとなった、多価アルコールの脂肪酸ジエステルの活性を評価する。具体的には、短鎖脂肪酸の一つである酪酸のグリセロールジエステルであるジブチリンの活性を評価する。さらに、知覚神経に発現するもう一つの TRP チャネルである TRPV1 作動物質のアジュバント作用を評価する。

評価対象とした化学物質を以下に列挙する。

- (1) 代替可塑剤のアジピン酸ジイソプロピル (DIA)
- (2) マレイン酸ジブチル (DBM)
- (3) ブチルパラベン
- (4) ジブタノイルグリセロール (ジブチリン)
- (5) トリブタノイルグリセロール(トリブチリン)
- (6) TRPV1 作動性ピペリン
- (7) タイ国薬用植物 *Piper Chaba* 種子抽出物

3. 研究の方法

皮膚感作の促進作用は、フルオレッセインイソチオシアネート(FITC)をハプテンとしたマウス接触性皮膚炎モデルを用いた。FITC を含有する感作溶媒に、対象とする化学物質を添加してマウスを感作し、FITC で誘導され

るマウス耳介腫脹反応にて感作の成立を評価した。抗原感作のプロセスでは、FITC を抗原提示した樹状細胞の所属リンパ節への移動が免疫応答の開始に必要な。皮膚感作の 24 時間後にマウスより所属リンパ節を摘出した。リンパ節細胞浮遊液を調製し、樹状細胞の表面抗原である CD11c に対する蛍光抗体で染色した後、フローサイトメリーにて解析した。FITC 陽性かつ CD11c 陽性細胞を皮膚局所から移動した FITC を提示した樹状細胞とし、対象化学物質の共存による移動促進作用として評価した。さらに、FITC で感作したマウスの所属リンパ節細胞を培養し、上清中に放出されたサイトカイン量を ELISA で定量した。ところで、評価対象化学物質のうちジブチリンには光学異性体が存在する。そこで天然型である S 体(1,2 ジブタノイル-*sn*-グリセロール)および非天然型の R 体を光学異性体として化学合成した。TRPA1 作動活性の測定では、TRPA1 を強制発現させた CHO 細胞に Ca²⁺感受性の蛍光プローブである Fluo-4 を取り込ませ、検体を加えた後の細胞内 Ca²⁺濃度の時間変化を蛍光強度として自動的に測定した。TRPV1 作動活性は、TRPV1 を強制発現させた HEK293T 細胞を用いて同様に行なった。

4. 研究成果

(1) 代替可塑剤のアジュバント作用

代替可塑剤の一つであるアジピン酸ジイソプロピル(DIA)は、脂肪族のジカルボン酸のアルコールエステルである。TRPA1 作動活性を示し、TRPA1 選択的アンタゴニストの HC-030031 で活性が阻害された。DIA は、FITC 誘導マウス接触性皮膚炎モデルでアジュバント作用を示した。アジュバント作用機構として、FITC を抗原提示した樹状細胞の所属リンパ節への移動促進作用が明らかとなった。一方、DIA は所属リンパ節 T 細胞からのインターロイキン 4 (IL-4) 産生促進作用を示さなかったが、一方でインターフェロン γ (IFN-γ) 産生促進作用を示した。従って、FITC 誘導接触性皮膚炎が必ずしも 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) によって主導されているとは限らず、共存する化学物質の影響を受けることが新たに判明した。

(2) DBP との構造類似性から予測したジカルボン酸のアルコールエステルによるアジュバント作用

DBP の構造の一部を共有するマレイン酸ジブチル(DBM)は、二重結合を持つ脂肪族のジカルボン酸エステルである。DBM は FITC 誘導マウス接触性皮膚炎モデルでアジュバント作用を示し、FITC を抗原提示した樹状細胞の所属リンパ節への移動促進作用を示した。DBM は所属リンパ節 T 細胞からの IL-4 および IFN-γ 産生促進作用を示した。

(3) パラベンの評価

化粧品などで汎用される防腐剤パラベンは、パラオキシ安息香酸エステルである。ブチルエステルであるブチルパラベンは、TRPA1 刺激作用と、FITC 誘導マウス接触性皮膚炎モデルでのアジュバント作用の両方を示した。エチルパラベンは、TRPA1 を活性化したものの活性化に高濃度が必要であり、アジュバント作用は示さなかった。

(4) ジアシルグリセロールの評価

上記までの検索対象物質には、ジカルボン酸のアルコールエステルとしての共通点がある。逆に、多価アルコールの脂肪酸エステルの作用を調べるため、ジアシルグリセロールを評価することとした。ジアシルグリセロールは、生理活性物質として細胞内シグナル伝達での働きが良く知られている。短鎖脂肪酸を有するジアシルグリセロールの一種としてジブチリンについて検討した。天然型の S-ジブチリン、非天然型の R-ジブチリンともに TRPA1 活性化作用を示したが、活性化に高濃度が必要であった。また、FITC 誘導マウス接触性皮膚炎モデルでアジュバント作用を示さなかった。

(5) トリブチリンの作用

ジブチリンには顕著な活性が見られなかったが、対照として用いたトリグリセリドであるトリブチリンに予想外の活性が認められた。トリブチリンは TRPA1 を活性化し、FITC 誘導マウス接触性皮膚炎モデルでアジュバント作用を示した。

(6) TRPV1 アゴニストの効果

知覚神経には、TRPA1 以外の侵害刺激受容体として TRPV1 の発現が知られている。さらに、マウス後根神経節由来の神経細胞を用いた検討から、TRPV1 発現神経の一部は TRPA1 を同時に発現していることが分かっている(Shiba T, Imai Y 他, *J. Neuroimmun.* 207, 66-74, 2009)。そこでまず、TRPV1 アゴニストとして知られているコショウ科植物のアルカロイドのピペリンを用いて、TRPV1 アゴニスト活性を確認した。さらに、ピペリンが FITC 誘導マウス接触性皮膚炎モデルでアジュバント作用を示すことが分かった。

(7) タイ国の伝承医薬に含まれる天然物の作用

タイ国の伝承処方に含まれるコショウ科植物の一つである *Piper Chaba* Hunt. の種子抽出物には、ピペリンが含まれていることが知られている。TRPV1 活性化作用および FITC 誘導マウス接触性皮膚炎モデルでのアジュバント作用を見出した。

以上の研究結果より、TRPA1 作動活性から接触性皮膚炎の感作促進作用を予測することの妥当性を示す具体例を蓄積できた。一方、

TRPV1 作動活性についても注視する必要があることが分かった。

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 3 件)

- (1) Takeshi Matsuoka, Kohta Kurohane, Wakana Suzuki, Erina Ogawa, Kamiyu Kobayashi, and Yasuyuki Imai: Dibutyl maleate and dibutyl fumarate enhance contact sensitization to fluorescein isothiocyanate in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 39, 272-277 (2016) 査読有
DOI: 10.1248/bpb.b15-00683
- (2) Chie Kobayashi, Kohta Kurohane, and Yasuyuki Imai: Lack of impact of high dietary vitamin A on T helper 2-dependent contact hypersensitivity to fluorescein isothiocyanate in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 38, 1827-1830 (2015) 査読有
DOI: 10.1248/bpb.b15-00534
- (3) Kohta Kurohane, Ayako Kimura, Rie Terasawa, Yurina Sahara, Kamiyu Kobayashi, Wakana Suzuki, Takeshi Matsuoka, Tatsuo Watanabe, and Yasuyuki Imai: Adjuvant effect of an alternative plasticizer diisopropyl adipate on a contact hypersensitivity mouse model: link with sensory ion channel TRPA1 activation. *Biol. Pharm. Bull.*, 38, 1054-1062 (2015) 査読有
DOI: 10.1248/bpb.b15-00199

〔学会発表〕(計 13 件)

- (1) 関口皓太、小川衿菜、堤正人、望月成美、遠藤由貴奈、黒羽子孝太、今井康之：短鎖・中鎖脂肪酸を有するトリグリセリドによる接触性皮膚炎の感作促進作用 日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 27 日、仙台市
- (2) 遠藤由貴奈、松岡毅、鈴木若菜、小川衿菜、関口皓太、黒羽子孝太、今井康之：FITC 誘導接触性皮膚炎における皮膚感作促進作用：パラベンの評価 日本薬学会第 137 年会 2017 年 3 月 27 日、仙台市
- (3) Kohta Kurohane, Chie Kobayashi, Yasuyuki Imai: Differential effects of high dose dietary vitamin A and B₆ on contact hypersensitivity response in mice. The 12th China-Japan Symposium on Health Sciences 2017 年 2 月 10-11 日、Hangzhou, China
- (4) Kota Sekiguchi, Erina Ogawa, Hideyuki Konishi, Kei Manabe, Yukina Endo, Masato Tsutsumi, Narumi Mochizuki, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: Adjuvant effect of short chain fatty acid glycerol esters during sensitization phase of contact hypersensitivity. The 12th China-Japan

- Symposium on Health Sciences 2017年2月11日、Hangzhou, China
- (5) Yasuyuki Imai, Kohta Kurohane, Ayako Kimura, Rie Terasawa, Yurina Sahara, Kamiyu Kobayashi, Wakana Suzuki, Takeshi Matsuoka, Tatsuo Watanabe: Enhancing effect of an alternative plasticizer on a contact hypersensitivity mouse model: involvement of TRPA1 activation. The 12th China-Japan Symposium on Health Sciences 2017年2月10日、Hangzhou, China
- (6) Yasuyuki Imai, Kohta Kurohane, Sumalee Panthong, Arunporn Itharat : Immunomodulation through transient receptor potential (TRP) channels. 20th World Congress on Clinical Nutrition 2016年12月14日、Bangkok, Thailand
- (7) 関口皓太、小川衿菜、小西英之、眞鍋 敬、遠藤由貴奈、黒羽子孝太、今井康之：短鎖脂肪酸グリセロールエステルによる接触性皮膚炎の感作促進作用 フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー 2016年9月10-11日、東京都
- (8) 小川衿菜、関口皓太、遠藤由貴奈、黒羽子孝太、今井康之：接触性皮膚炎における Tributyrin の感作促進作用日本薬学会東海支部総会・大会 2016年7月9日、名古屋市
- (9) 関口皓太、鈴木若菜、小川衿菜、黒羽子孝太、今井康之：代替可塑剤の免疫促進作用と Thymic Stromal Lymphopoietin 産生の関係 日本薬学会東海支部総会・大会 2016年7月9日、名古屋市
- (10) 黒羽子孝太、松岡毅、鈴木若菜、小川衿菜、小林香美結、今井康之：FITC 誘導接触性皮膚炎におけるマレイン酸ジブチルのアジュバント作用 日本薬学会第136年会 2016年3月27-29日、横浜市
- (11) Wakana Suzuki, Kamiyu Kobayashi, Takeshi Matsuoka, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: The role of thymic stromal lymphopoietin in FITC-induced contact hypersensitivity. 第44回日本免疫学会 2015年11月18-20日、札幌市
- (12) Takeshi Matsuoka, Kohta Kurohane, Wakana Suzuki, Kamiyu Kobayashi, Yasuyuki Imai: Adjuvant effect of dibutyl maleate in an FITC-induced contact hypersensitivity mouse model. 第44回日本免疫学会 2015年11月18-20日、札幌市
- (13) 黒羽子孝太、松岡 毅、小林香美結、鈴木若菜、小川衿菜、渡辺達夫、今井康之：代替可塑剤による FITC 誘導性接触性皮膚炎の増悪化 フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー 2015年9月17-18日、神戸市

〔その他〕
ホームページ等
<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/bisei/>

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
今井 康之 (IMAI Yasuyuki)
静岡県立大学・薬学部・教授
研究者番号：80160034
- (2)研究分担者
黒羽子 孝太 (KUROHANE Kohta)
静岡県立大学・薬学部・講師
研究者番号：90333525
- (3)連携研究者
渡辺 達夫 (WATANABE Tatsuo)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：10210915
- (4)研究協力者
眞鍋 敬 (MANABE Kei)
小西 英之 (KONISHI Hideyuki)
Sumalee Panthong, Ph.D.
Arunporn Itharat, Ph.D.