

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790700
 研究課題名 (和文) 重症気管支喘息における PAF 受容体を介したヒト肺マスト細胞活性化の関与
 研究課題名 (英文) Involvement of human lung mast cell activation through PAF receptor in severe asthma
 研究代表者
 梶原 直樹 (KAJIWARA NAOKI)
 順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員
 研究者番号：70453917

研究成果の概要 (和文)：本研究において、ヒトの肺マスト細胞は PAF 受容体を強く発現しており、PAF に応答して気道収縮作用を有するヒスタミンを遊離することが証明された。また、ヒトの肺マスト細胞と同程度に PAF 受容体を強く発現している末梢血由来ヒト培養マスト細胞の解析結果より、ヒトマスト細胞における PAF 受容体のシグナル伝達機構が解明された。本研究成果は、PAF 受容体を介したヒト肺マスト細胞の活性化が気管支喘息の発症に寄与していることを示唆しており、PAF 受容体を標的とした新規気管支喘息治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we demonstrated for the first time that PAF induces histamine release from human lung mast cells but not human skin mast cells. PAF receptor on human peripheral blood-derived cultured mast cells coupled to pertussis toxin-sensitive Gi protein and activated PLC・2 and PLC・1 in response to PAF. These observations have important implications for our understanding of the mechanisms of acute allergic diseases, in particular asthma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：マスト細胞、血小板活性化因子受容体、ヒスタミン、脱顆粒、アレルギー

1. 研究開始当初の背景

現在、気管支喘息に関する研究は、重症気管支喘息に対する治療法の確立が最重要課題である。重症気管支喘息は、気道リモデリングの進行した非アトピー型に多く、IgE 非

依存性と考えられているが、その病態形成機序は未だ明らかにされていない。

マスト細胞は高親和性 IgE 受容体 (Fc ϵ RI) を発現し、IgE 依存性の気管支喘息において重要なエフェクター細胞である。一方、非アトピー型気管支喘息患者においても気道粘

膜マスト細胞が活性化されていることが示されており (*J Immunol.* 158: 3539-3544; 1997)、気道粘膜マスト細胞は $Fc\epsilon RI$ 以外の経路でも活性化されることが想定される。しかしながら、非アトピー型気管支喘息患者における気道粘膜マスト細胞の活性化機構は不明である。臨床では、ウイルスや細菌の感染が非アトピー型重症気管支喘息でよく見られることから、感染が非アトピー型重症気管支喘息の病態形成に何らかの影響を及ぼすものと考えられている。

血小板活性化因子 (PAF) は、Zymosan、Lipopolysaccharide などの細菌構成成分による刺激や、Respiratory Syncytial Virus (RSV) の感染によってマクロファージなどの様々な細胞から産生されるリン脂質メディエーターである (*Biochem J.* 292: 617-629; 1993, *Biochim Biophys Acta.* 1346: 120-130; 1997, *J Biol Chem.* 266: 5472-5479; 1991)。PAF は、G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) である PAF 受容体を介して血管透過性の亢進、多形核白血球の遊走など様々な生理的、病理的作用を引き起こし、気管支喘息の病態形成に深く関与する (*Prog Lipid Res.* 39: 41-82; 2000)。実際、気管支喘息モデルにおいて、PAF 受容体欠損マウスはムスカリンに対する気道過敏性が低下し、逆に PAF 受容体トランスジェニックマウスはムスカリンに対する気道過敏性が亢進していることが示されている (*J Immunol.* 172: 7095-7102; 2004, *Am J Respir Crit Care Med.* 156: 1621-1627; 1997)。また、臨床研究において、血中の PAF レベルが気管支喘息患者で増加していること (*Allergy.* 49: 60-63; 1994)、軽症の気管支喘息患者に PAF を吸入させると呼吸抵抗が上昇すること (*Am J Respir Crit Care Med.* 150: 369-373; 1994)、PAF 分解酵素である PAF acetylhydrolase の遺伝子多型が気管支喘息の重症度と相関することが報告されている (*J Clin Invest.* 103: 989-997; 1999)。現在までに、PAF はヒト皮膚マスト細胞の脱顆粒反応を惹起しないが (*Clin Exp Allergy.* 20: 377-382; 1990)、臍帯血由来ヒト培養マスト細胞には走化性因子として作用することが示されている (*Immunology.* 99: 314-319; 2000)。近年、ヒトマスト細胞には組織特異性があることが明らかにされつつあるが (*Allegol Int.* 55: 173-179; 2006)、ヒト肺マスト細胞における PAF 受容体の発現や、PAF がヒト肺マスト細胞の脱顆粒を惹起するかどうかについては未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトマスト細胞における PAF

受容体の発現と機能を解明し、非アトピー型重症気管支喘息における PAF 受容体を介したヒト肺マスト細胞活性化の臨床的意義を解明することを目的とする。

本研究の具体的な達成目標は以下の4点である。

- (1) ヒト肺マスト細胞が PAF 受容体を特異的に発現していることを *in vitro* 及び *in vivo* で明らかにする。
- (2) ヒトマスト細胞における PAF 受容体の機能とシグナル伝達経路を解明する。
- (3) アトピー型、非アトピー型の気管支喘息患者 (軽症、中等症、重症) の発作時及び非発作時の喀痰及び血清中の PAF 濃度を測定することにより、どのようなタイプの気管支喘息で PAF が多量に産生されているのかを明らかにする。
- (4) 単球に RSV を感染させた時に産生される PAF によって、ヒトマスト細胞の脱顆粒が惹起されるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ヒト肺マスト細胞が PAF 受容体を特異的に発現していることを *in vitro* 及び *in vivo* で明らかにする。

In vitro の検討としては、ヒトの肺、皮膚のマスト細胞を PAF で刺激した時のヒスタミン遊離率の変動を検討する。供与して頂いた組織を細切片化、酵素処理した後に、c-kit 陽性細胞を Magnetic cell sorting により分離・精製する。それらの細胞を PAF で刺激し、上清と細胞中のヒスタミン含量をヒスタミン ELISA kit を用いて測定し、ヒスタミン遊離率を算出する。また、ヒトの肺、皮膚のマスト細胞から RNA を抽出し、それらの細胞における GPCR の発現をマイクロアレイにより網羅的に解析する。

In vivo の検討としては、気管支喘息患者の生検組織をヒトの PAF 受容体とトリプターゼに対する抗体で免疫染色し、ヒト肺マスト細胞に PAF 受容体が発現しているかどうかを検討する。

- (2) ヒトマスト細胞における PAF 受容体の機能とシグナル伝達経路を解明する。

PAF 受容体の機能解析には、末梢血由来ヒト培養マスト細胞を用いて、PAF 刺激によってヒスタミン遊離やプロスタグランジン D_2 (PGD_2) 産生、種々のサイトカイン産生が惹起されるかどうかを検討する。ヒスタミン遊離率、 PGD_2 産生量やサイトカイン産生量は ELISA kit を用いて定量・算出する。

PAF 受容体のシグナル伝達経路の解析は、PAF 刺激によるヒスタミン遊離が PAF 受容体拮抗薬や種々のシグナル伝達分子の阻害剤処置によって抑制されるかどうかを検討することによって行う。また、PAF 刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の変動への阻害剤の影響も検討する。細胞内カルシウムイオン濃度の変動は、Fluo-3 を用いて観察する。さらに、シグナル伝達分子のリン酸化や細胞膜移行を Western blot を用いて調べるとともに、short hairpin RNA (shRNA) を用いたノックダウンを行い、候補となるシグナル伝達分子が本当に PAF 受容体のシグナル伝達に関与するかどうかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析の結果、PAF 受容体はヒト肺マスト細胞や末梢血由来ヒト培養マスト細胞で強く発現しており、ヒト皮膚マスト細胞では PAF 受容体の発現レベルが低いことが明らかになった。また、気管支喘息患者の生検組織の二重染色を行った結果、トリプターゼ陽性キマーゼ陰性のヒト肺マスト細胞に PAF 受容体の発現が認められた。

(2) ヒト肺マスト細胞や末梢血由来ヒト培養マスト細胞を PAF で刺激したところ、濃度依存的なヒスタミン遊離が観察された (図 1 A, C)。一方、ヒト皮膚マスト細胞ではいずれの濃度の PAF 刺激でもヒスタミン遊離は観察されなかった (図 1 B)。末梢血由来ヒト培養マスト細胞を PAF で刺激した場合、ヒスタミン遊離に加えて、IgE/anti-IgE 刺激時と同程度の PGD₂ 産生が認められた (図 1 D)。また、IL-8、PAI-1 の産生も認められた (図 1 E, F)。

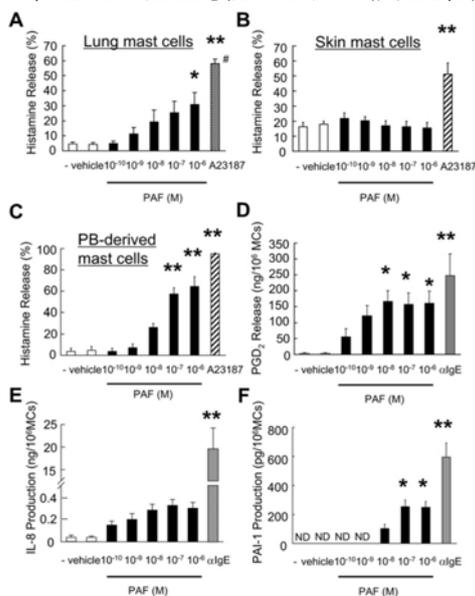


図 1 PAF 刺激によってヒトマスト細胞から遊離されるメディエーター

(3) マイクロアレイを用いて、PAF 刺激時と IgE/anti-IgE 刺激時のサイトカイン発現を比較した結果、PAF 刺激時には CCL1、CCL3、CXCL3、EREG、IL-8 などの発現が亢進していたが、それらの遺伝子は IgE/anti-IgE 刺激時にも発現が亢進しており、PAF 刺激でのみ発現が亢進する遺伝子は認められなかった。また、PAF 刺激によるこれらサイトカインの発現亢進は一過性であった (図 2)。

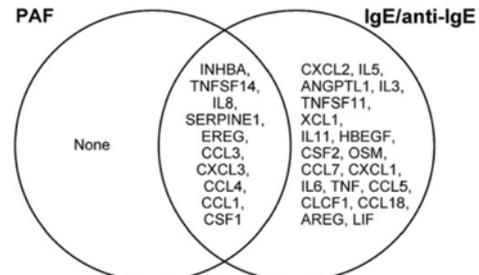


図 2 PAF または IgE/anti-IgE 刺激時のサイトカイン発現プロファイル

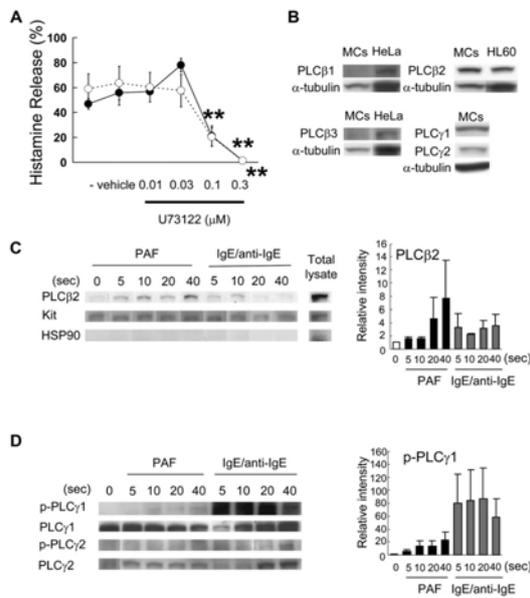
(4) PAF 刺激は、末梢血由来ヒト培養マスト細胞において、細胞内カルシウムイオン濃度の増加を引き起こした。PAF 刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の増加は、PAF 受容体拮抗薬である CV6209 の前処置によって抑制された。

(5) PAF によるヒスタミン遊離は刺激 5 秒後にピークに達した。一方、IgE/anti-IgE によるヒスタミン遊離は刺激 40 秒後にピークに達し、PAF によるヒスタミン遊離と IgE/anti-IgE によるヒスタミン遊離は異なる経時変化を示した。

(6) PAF 刺激によるヒスタミン遊離は、PAF 受容体拮抗薬である CV6209、Gi の不活性化剤である百日咳毒素、ホスホリパーゼ C 阻害剤である U73122 (図 3A)、細胞内カルシウムの選択的キレート剤である BAPTA-AM、PKC 阻害剤である Go6976 処置によって顕著に抑制された。

(7) 末梢血由来ヒト培養マスト細胞においては、PLC・2、PLC・1、PLC・2 の発現が認められた (図 3B)。末梢血由来ヒト培養マスト細胞を PAF で刺激すると、PLC・2 の細胞膜移行や PLC・1 のリン酸化が観察された (図 3C, D)。また、shRNA により PLC・2 や PLC・1 をノックダウンしたところ、PAF 刺激によるヒスタミン遊離が有意に抑制された。

図3 PAFによる末梢血由来ヒト培養マスト細胞の活性化におけるPLC・2、PLC・1の関



与

(8) 本研究の成果より、PAFはヒト肺マスト細胞に発現しているPAF受容体を介してヒスタミン遊離を引き起こすことが明らかになった。また、ヒトマスト細胞におけるPAF受容体の活性化は、Gi-PLC・2、PLC・1-PKCの活性化を介してヒスタミン遊離を惹起することが明らかになった。PAFによるヒト肺マスト細胞の活性化は非アトピー型の重症気管支喘息などの病態形成に寄与している可能性が示唆され、PAFを標的とした新しい気管支喘息治療薬の開発が期待される。

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1件)

- (1) Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, Saito H, Ra C, Okayama Y. Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor. *J Allergy Clin Immunol.* 2010; 125(5): 1137-1145. e6. 査読有り

[学会発表] (計2件)

- (1) Okayama Y, Kajiwara N, Saito H, Ra C. Activation of platelet-activating factor receptor-coupled G・i leads to degranulation via phospholipase C・2 activation in human mast cells. 第38回日本免疫学会総会・学術集会、平成20年(2008)12月3日、京都
- (2) Okayama Y, Kajiwara N, Ono Y, Saito H,

Ra C. PAF causes degranulation via PLC・2 activation in human mast cells. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会、平成20年(2008)11月27日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶原 直樹 (KAJIWARA NAOKI)

順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号：70453917

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岡山 吉道 (OKAYAMA YOSHIMICHI)

日本大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80292605