

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月17日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22591232

研究課題名（和文） アスピリンによる炎症反応増悪化機構の解明

研究課題名（英文） analysis of the mechanism for aspirin modulation of IgE-dependent mast cell activation

研究代表者

落合 豊子 (OCHIAI TOYOKO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40133425

研究成果の概要（和文）：アスピリン不耐性の分子的基盤を明らかにする目的で、その主要なエフェクター細胞であるマスト細胞に着目して研究を行った。アスピリン不耐性患者ではマスト細胞におけるロイコトリエン(LT) C₄/D₄/E₄産生の過剰産生が見られ、これらは、強力な炎症性メディエーターで、平滑筋収縮や血管透過性の上昇などを引き起こすことから、この産生の亢進がアスピリン不耐性の病態形成において重要な役割を果たすと考えられているが、その機序はいまだ明らかではない。われわれは以前に、マスト細胞の LTC₄産生には、主要なカルシウム流入経路であるストア依存性カルシウムチャネルとは異なるカルシウムチャネルが関与し、これをアスピリンが増強することを初めて明らかにした。本研究では、その分子的実体の解明を目指し、これがL型カルシウムチャネルであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Aspirin induces immunological side effects, which are collectively referred to as aspirin intolerance. Aspirin intolerance is a disorder that induces urticaria, asthma and anaphylaxis in response to oral administration of the drug. One key clinical feature of aspirin intolerance is overproduction of LTC₄, LTD₄ and LTE₄ in mast cells, which are all sequentially synthesized from arachidonate. These cysteinyl LTs (cys-LTs) are potent proinflammatory mediators and cause smooth muscle contraction and increased vascular permeability. Recently, we showed that aspirin and salicylates upregulate IgE-mediated Ca²⁺ responses and LTC₄ secretion in mast cells (Togo et al., 2009; Suzuki et al., 2010; Suzuki et al., 2010). Strikingly, however both drugs inhibited rather than facilitated the activation of store-operated Ca²⁺ channels, the major pathway for Ca²⁺ influx and LTC₄ secretion. Instead, they facilitated the activation of a non-SOCC. In the present study, we attempted to identify the molecular entity of the aspirin-sensitive Ca²⁺ channels and clarify the molecular mechanisms underlying their activation by aspirin. Our data show that aspirin and salicylates facilitate secretion responses through Ca_v1.2 L-type Ca²⁺ channel (LTCC) activation and suggest that both drugs exert the effects via mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and depolarization.

交付決定額

(金額単位:4,290,000円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科

キーワード：アスピリン・マスト細胞・L型カルシウムチャンネル・ $\alpha 1c$ (Cav1.2)

1. 研究開始当初の背景

アスピリンは非ステロイド系消炎鎮痛薬として虚血性心疾患の予防として、近年ますます使用量が増加している。アスピリンの作用機序については1971年Vaneによってアラキドン酸代謝経路に関与する律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)活性の阻害理論が提唱され、現在もこれが支持されている。しかし、アスピリンの作用機序についてCOX活性の阻害では説明のつかない様々な病態がある。そのひとつがアスピリン不耐症である。本疾患ではアスピリンを投与することによって気管支喘息などの過敏症状が誘発され、システニル化型ロイコトリエン(cys-LTs)が生体内に過剰産生され、ショック症状などを引き起こし、临床上重大な問題となっている。また、アスピリン不耐症ではcys-LTs合成酵素細胞のほとんど(>80%)がマスト細胞であると報告されていることから、アスピリン不耐症にマスト細胞が関連していることが示唆されている。このcys-LTsの過剰産生は、アスピリンがCOX活性を阻害することによってアラキドン酸代謝反応のうちプロスタグランディン産生経路が選択的に抑制され、リポキシゲナーゼを介するcys-LTs産生に傾くためと説明されている。しかしアスピリン不耐症患者ではアスピリン非内服時にも尿中のLTE4値が高く、本症の病態はCOX阻害説では説明がつかない。

また食物依存性アスピリン誘発性アナフィラキシーは、特異的IgE陽性の食物摂取のみでは発症しないが、食物摂取とともにアスピリンを内服するとアナフィラキシーを起こす。アスピリン単独に対する特異的IgEは陰性であり、IgE非依存性アスピリンによるマ

スト細胞活性化が即時型アレルギーの増強因子として作用することが推測されているが、その機序は十分解明されていない。

研究分担者は一貫してマスト細胞の活性化の分子機構を研究して多くの成果を上げてきた(Suzuki Y. *Chem Immunol Allergy* 2005;87:32-42 総説他)。特に最近、マスト細胞には、これまで神経、心筋細胞などの興奮性細胞に特有であると考えられてきたL型カルシウムチャンネル(L-type Ca^{2+} channels LTCCs)が発現しており、抗原刺激により細胞内カルシウムストア非依存的に活性化され、細胞の活性化を制御することを初めて明らかにした(Suzuki Y et al. *Biochem pharmacol* 75, 1492-1503, 2008; Yoshimaru et al. *Mol Immunol* 46, 1267-1277, 2009)。

さらにマスト細胞にはLTCCsのサブタイプの一つである $\alpha 1c$ (Cav1.2)が主に発現していることを明らかにした。また研究代表者らはアスピリンによるマスト細胞活性化の修飾機序に関する共同研究を行い、低濃度のアスピリンがジヒドロピリジン(DHP)感受性チャンネルを選択的に活性化して、IgEを介するマスト細胞のcys-LTs産生を増強することを明らかにした(Togo et al. *Clin Immunol* 131, 145-156, 2009; Suzuki and Ra, *J Pharmacol Sci.* 110, 237-244, 2009.)。興奮性細胞のLTCCs α サブユニットはDHP受容体として知られている。

2. 研究の目的

これまでの研究代表者の研究からアスピリンは、マスト細胞のDHP感受性チャンネルを介するカルシウム流入を促進させて、カルシウム依存性に活性化される細胞質ホスホリパゼ

A₂(PLA₂)とリポキシゲナーゼ(LOX)により Cys-LTs産生を増強するという作業仮説が想定される。本研究では、この仮説をもとにして、マスト細胞における発現が確認された LTCCsのサブタイプのひとつである

Cav1.2LTCCsがアスピリンのマスト細胞活性化修飾作用に関与するかどうか検討し、アスピリンがI型アレルギー反応を増悪化させる分子機序を明らかにする。

本研究の目的が達成されると、未だ解明されていないアスピリンによるマスト細胞の機能調節機構の理解に大いに寄与し、基礎医学的なブレイクスルーとなるばかりでなく、アスピリン不耐症などの機序の解明、カルシウムチャンネル等を標的にした新規薬剤の開発にもつながり、臨床的に大きな意義がある。

3. 研究の方法

アスピリンによるCaV1.2 LTCCs 活性化機構を分子レベルで証明するために、Cav1.2 LTCCsのノックダウン細胞を作成してその作用を解析し、小胞体カルシウムストア依存性であるCRACチャンネルのノックダウン細胞を用いた解析と比較する。その結果、アスピリンのCRACチャンネルへの関与が否定的で、Cav1.2 LTCCs がアスピリンの作用を媒介していることが示された場合は、フーサイトメトリー、ウエスタンブロット法などで、その分子機構を解明する。さらにシクロオキシゲナーゼ1(COX1)ノックダウン細胞を用いて、アスピリンによるマスト細胞の活性化機構に関してCOX1 が関与しているか否かを検証する。

(1) Cav1.2 LTCCs ノックダウン細胞を用いた解析

アスピリンによるCavLTCCs活性化機構を分子レベルで証明するためにCav1.2LTCCsノックダウン細胞でアスピリンの作用を解析する。まずコントロールおよびCav1.2LTCCsノックダウン細胞でアスピリンのストア非依存性カ

ルシウムシグナルに対する影響を調べる。次に、アスピリンによりcys-LTs産生増強が見られるかどうかを検討する。その結果、もしこの細胞ではアスピリンによるカルシウムシグナルとcys-LTs産生増強が認められないならば、Cav1.2LTCCsがその作用を媒介していることになる。

(2) CRACチャンネルのノックダウン細胞を用いた解析

(3) アスピリンによるCav1.2LTCCs活性化の分子機構の解明

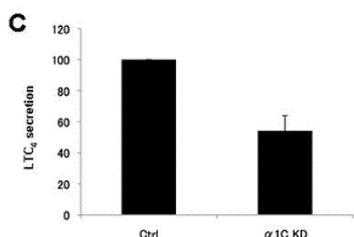
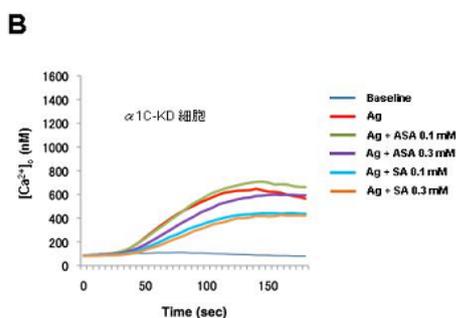
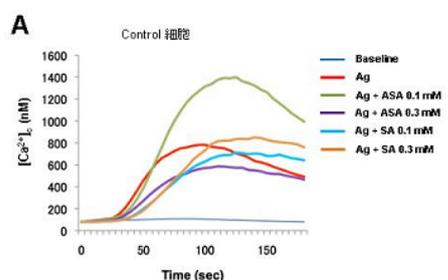
ノックダウン細胞を用いた研究により、アスピリンのCRACチャンネルの関与が否定的で、Cav1.2LTCCsがアスピリンの作用を媒介していることが示された場合に行う。

4. 研究成果

アスピリン不耐性患者ではマスト細胞におけるロイコトリエン(LT) C₄/D₄/E₄産生の過剰産生が見られ、これらは、強力な炎症性メディエーターで、平滑筋収縮や血管透過性の上昇などを引き起こすことから、この産生の亢進がアスピリン不耐性の病態形成において重要な役割を果たすと考えられているが、その機序はいまだ明らかではない。われわれは以前に、マスト細胞のLT₄産生には、主要なカルシウム流入経路であるストア依存性カルシウムチャンネルとは異なるカルシウムチャンネルが関与し、これをアスピリンが増強することを初めて明らかにした。本研究では、その分子実体の解明を目指し、これがL型カルシウムチャンネルであることを明らかにした。

図の説明

(A, B) $\alpha 1C$ 遺伝子ノックダウン RBL-2H3 cells ($\alpha 1C$ -KD 細胞)および Control 細胞を IgE 感作後、0.1, 0.3mM アスピリン(ASA)またはサリチル酸(SA)存在下または非存在下で抗原(30ng/ml TNP-BSA;Ag)で刺激して細胞内カルシウム濃度を microplate fluorescence reader で 3 分間刑事的に測定した。(C) $\alpha 1C$ -KD 細胞および Control 細胞を IgE 感作後、抗原(30ng/ml TNP-BSA)で 30 分間刺激して LTC₄ 産生を ELISA で測定した。



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 4 件)

- ① Suzuki Y, Inoue T, Ra C. Calcium signaling in mast cells: focusing on L-type calcium channels. In Calcium Signaling (Islam ed. *Adv Exp Med Biol.* 740) p955-77. Springer, 2012. 査読有.
- ② Suzuki Y, Inoue T, Ra C. NSAIDs, Mitochondria and Calcium Signaling: Special Focus on Aspirin/Salicylates. *Pharmaceuticals.* 2010 3(5):1594-1613. 査読有.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Mayumi Murai, Yoshihiro Suzuki Toshio Inoue, Miki Suzuki-Karasaki, Toyoko Ochiai, Chisei Ra Aspirin regulates Ca²⁺ influc in mast cells by modulating mitochondrial Ca²⁺ and reactive oxygen species signals. 14th International Congress of Immunology 2010. 8. 22 Kobe
- ② 村井真由美、落合豊子 他
アスピリンによるL型カルシウムチャネル (LTCC) を介したマスト細胞の活性化 第 15 回ラテックスアレルギー研究会 ラテックスアレルギー/OAS フォーラム 2010 2010. 7. 11 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 豊子 (OCHIAI TOYOKO)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：40133425

(2) 研究分担者

鈴木良弘 (SUZUKI YOSHIHIRO)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：80206549

研究分担者

羅 智靖(RA CHISEI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60230851