

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 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658089

研究課題名（和文） 亜鉛シグナルを標的にした新規肥満細胞スタビライザーによるアレルギー性疾患の克服

研究課題名（英文） Amelioration of allergosis by new mast cell stabilizer targeting zinc ion signaling.

研究代表者

堀 正敏 (HORI MASATOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70211547

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規開発中の遊離亜鉛イオンキレーターIPZ-010を用いて、肥満細胞を標的とした家畜やヒトのアレルギー疾患の新たな治療戦略の基盤を構築した。具体的には、きわめて短時間にしかも再現性良く作製可能な、肥満細胞が病態発生に関与する術後腸麻痺モデルをアレルギーモデルの代替モデルとして用いて解析し、結果、IPZ-010は経口投与と皮下投与の両者において、肥満細胞に作用して術後腸麻痺による消化管炎症を抑制すること、すなわちアレルギー疾患の新たな治療薬のシードとなることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we established a foundation for a new therapeutic strategy of allergosis of domestic animals and human by using a new zinc ion chelator, IPZ-010, targeting mast cells. In particular, we used mast cells derived post-operative ileus model mice. This animal model can be made in a breeze, in a short period of time, and with high repeatability. Results indicated that IPZ-010 significantly ameliorated inflammation by post-operative ileus with oral or subcutaneous administration via mast cells stabilization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,100,000	480,000	3,580,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：薬理

1. 研究開始当初の背景

亜鉛 (Zn^{2+}) は生体内に必須の元素であり、300以上の酵素の活性や転写因子の高次構造維持に必要である。従って、生体内においてZnはほとんどが標的タンパク質と結合した形で存在しており、遊離の Zn^{2+} は $10^{-13}M$ ほどしか存在しない。ところが近

年、肥満細胞においてこの遊離 Zn^{2+} がセカンドメッセンジャーとして機能していることがわかり (Cancer Sci, 2008, 99: 1515-1522)、抗原刺激により肥満細胞内の遊離 Zn^{2+} 濃度が上昇し (Zn^{2+} wave)、脱顆粒やサイトカイン分泌に関与することが明らかになった。

これまで多くのアレルギーモデル動物が作出されてきたが、その病態発症に時間がかかること、症状の程度が安定しないこと、動物種差が多いことなどの問題を抱えている。本研究で提案する術後腸麻痺モデルはアレルギー応答の中心的役割を担う肥満細胞の活性化がその病態発症に必須であり、疑似手術 (Intestinal manipulation; IM) 後 24 時間という短時間で評価ができること、得られる炎症性細胞浸潤測定や小腸運動性低下が極めて安定的、かつ、定量的に解析できることから、アレルギーモデル動物に替わる肥満細胞を標的とする薬物の抗アレルギー効果の In vivo アッセイ系として応用可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究は、生命維持に必須の微量元素である亜鉛 (Zn^{2+}) に着目し、新規開発中の生体内易代謝性の選択的低分子 Zn^{2+} キレーター (IPZ-010) を武器に、様々な病態に重要な役割を担う肥満細胞の脱顆粒や分泌抑制による、家畜やヒトのアレルギーや炎症性疾患の新たな治療戦略の基盤を構築することを目指すことにある。

3. 研究の方法

(1) 肥満細胞の活性化が病態発症に必須である術後腸麻痺モデルマウスの作製。

IPZ-010 は原液を 3 回投与分秤量後、 $10 \mu L$ のエタノールで溶解し、これに 1% Tween 20 を $5 \mu L$ 加えてよく混和した。その後 $485 \mu L$ の滅菌生理食塩水を加えて、氷零下でソニケーション (Max power で 10sec を 3 回) して懸濁液とした。投与前に再度ソニケーション 1 回を行い、皮下投与あるいは経口投与でマウスに薬物を投与した (溶媒の最終濃度: エタノール 2%, Tween 20 0.01%)。IPZ-010 の投与は疑似手術処置 1 時間前、処置後 2 時間と 4 時間の計 3 回、それぞれ 30 mg/kg を経口投与、あるいは皮下投与でおこなった。

(2) HE 染色、免疫染色による形態学的解析。

(3) 蛍光ラベル食塊投与 1 時間の小腸輸送能解析。

(4) RT-PCR によるサイトカイン発現解析。

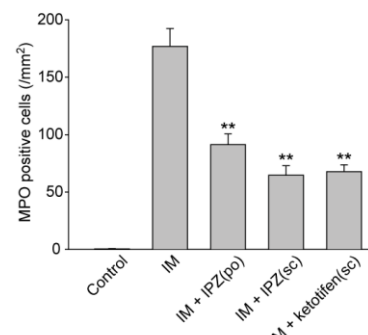
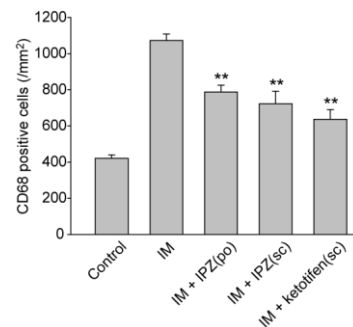
4. 研究成果

(1) マクロファージ浸潤に対する IPZ-010 皮下投与と経口投与の影響

IPZ-010 は皮下投与においても経口投与においても顕著に疑似手術 (IM) 処置によって小腸消化管壁に浸潤する CD68 陽性マクロファージ数を顕著に抑制した。また、肥満細胞スタビライザーであるケトチフェンの皮下投与も同様の抑制作用を示した。

(2) 好中球浸潤に対する IPZ-010 皮下投与と経口投与の影響

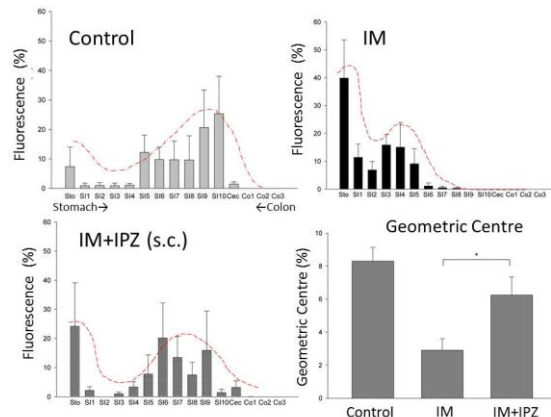
IPZ-010 は皮下投与においても経口投与においても顕著に IM 処置によって小腸消化管壁に浸潤する MPO 陽性マクロファージ数を顕著に抑制した。また、肥満細胞スタビライザーであるケトチフェンの皮下投与も同様の抑制作用を示した。



IPZ-010 の皮下投与 (sc) と経口投与 (po) はいずれも疑似手術処置 (IM) 24 時間後における CD68 陽性マクロファージ浸潤と MPO 陽性好中球浸潤を有意に抑制した。この抗炎症作用は既存の肥満細胞スタビライザーであるケトチフェン (sc) とほぼ同等であった。

(2) 小腸輸送能に対する IPZ-010 の影響

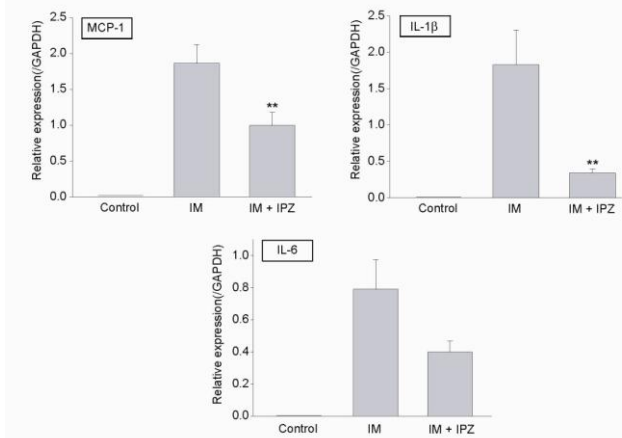
疑似手術処置 (IM) によりフェノールレッド溶液強制経口投与 1 時間での小腸輸送能は、対照群に比べて顕著に遅延し、その多くは胃内ならびに小腸上部にとどまっていた。IPZ-010 皮下投与群においては、小腸輸送能は回復し対照群の輸送能に近づき、フェノールレッド蛍光のピークは空回腸部位であった。これらを定量化した Geometric Center 値においても IM 処置で有意に小腸輸送能は低下し、IPZ-010 処置群では有意に回復していた。



フェノールレッド溶液強制飲水後 1 時間における移動度を測定し、小腸輸送能を解析した。コントロールに比べて疑似手術 (IM) 処置群では、顕著な小腸輸送能の低下が認められ、IPZ-010 処置群では輸送能の有意な回復が認められた。定量した Geometric center 値においても同等の定量結果が得られた。

(3) 術後腸麻痺によるサイトカイン mRNA 発現に対する IPZ-010 の影響

疑似手術 (IM) 処置 3 時間において、MCP-1、IL-1 β 、IL-6 の mRNA 発現が顕著に増加した。IPZ-010 処置群においては、いずれのサイトカイン、ケモカイン発現を有意に抑制した。



疑似手術 (IM) 処置 3 時間において、MCP-1、IL-1 β 、IL-6 の mRNA 発現は有意に上昇した。IPZ-010 処置群においてはこれらのケモカイン、サイトカイン mRNA 発現上昇は有意に抑制された。

(4) 術後腸麻痺モデルにおける好中球浸潤に対する既知の Zn²⁺ キレーターである TPEN の影響

遊離の Zn²⁺ だけでなく転写因子などのタンパク質に結合している Zn²⁺ にも結合する既知の Zn²⁺ キレーターである TPEN の効果について検討した。10 mg/kg TPEN の皮下投与により、IPZ-010 に比べてややその効果は弱いものの、同様に好中球浸潤の抑制作用が認められた。

(5) 総括

以上の成績から、IPZ-010 は肥満細胞が病態発症に関与する術後腸麻痺モデルの炎症応答を経口投与、皮下投与のいずれにおいても抑制すること、その抑制作用は既存の Zn²⁺ キレーター TPEN よりも強く、既存の肥満細胞スタビラーであるケトチフェンと同等の効力を持つことが明らかになった。今後の課題として、IPZ-010 の標的細胞が肥満細胞であることの直接的証明や、抗炎症作用機序の詳細、さらには、実際のアレルギーモデルを用いた解析などを行わなくてはならない。

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 9 件)

- Oka T, Fujimoto M, Nagasaka R, Ushio H, Hori M and Ozaki H: Cycloartenyl ferulate, a component of rice bran oil-derived γ -oryzanol, attenuates mast cell degranulation. *Phytomedicine* (2010) 17:152-156
doi:10.1016/j.phymed.2009.05.013
- Nakamura T, Iwanaga K, Murata T, Hori M, Ozaki H: ATP induces contraction mediated by the P2Y₂ receptor in rat intestinal subepithelial myofibroblasts. *Eur J Pharmacol* (2011) 657:152-158.
doi:10.1016/j.ejphar.2011.01.047
- Iizuka M, Murata M, Hori M, Ozaki H: Increased contractility of hepatic stellate cells in cirrhosis is mediated by enhanced Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-sensitization pathways. *Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol)* (2011) 300:G1010-1021.
doi:10.1152/ajpgi.00350.2010
- Kobayashi K, Murata T, Hori M, Ozaki H: Prostaglandin E₂-prostanoid EP₃ signal induces vascular contraction via nPKC and ROCK activation in rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol.* (2011) 660:375-380.
doi:10.1016/j.ejphar.2011.03.032
- Maruyama T, Ayabe S, Murata T, Hori M, Ozaki H: Relaxant effect of prostaglandin D₂-receptor DP agonist on liver myofibroblast contraction. *J Pharmacol Sci.* (2011) 116:197-203.
doi:10.1016/j.ejphar.2008.06.037
- Ohara K, Kiyotani Y, Uchida A, Nagasaka R, Maehara H, Kanemoto S, Hori M, Ushio H: Oral administration of γ -aminobutyric acid and γ -oryzanol prevents stress-induced hypoadiponectinemia. *Phytomedicine* (2011) 18:655-660.
doi:10.1016/j.phymed.2011.01.003
- Mori D, Hori M, Murata T, Ohama T, Kishi H, Kobayashi S, Ozaki H: Synchronous phosphorylation of CPI-17 and MYPT1 is essential for inducing Ca²⁺ sensitization in intestinal smooth muscle. *Neuro-gastroenterol Motil* (2011) 23:1111-1122.
doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01799.x
- Iwanaga K, Okada M, Murata T, Hori M, Ozaki H: Prostaglandin E₂ promotes wound-induced migration of intestinal subepithelial myofibroblasts via EP₂, EP₃ and EP₄ activation. *J Pharmacol Exp*

- Ther (2012) 340:604-611.
doi.org/10.1124/jpet.111.189845
9. Tajima T, Murata T, Aritake K, Urade Y, Michishita M, Matsuoka, T, Narumiya S, Ozaki H, Hori M: EP2 and EP4 receptors on muscularis resident macrophages mediate LPS-induced intestinal dysmotility via iNOS upregulation through cAMP/ERK signals. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol) (2011) 302:G524-534.
doi:10.1152/ajpgi.00264.2011

[学会発表] (計 7 件)

1. 堀正敏 : 術後腸麻痺における消化管常在型マクロファージの病態生理と治療戦略. 第 149 回 日本獣医学会学術集会. 2010. 3. 26-29. 東京都
2. 太田康博、田島剛、村田幸久、堀正敏、尾崎博 : 腹膜炎時の消化管運動機能障害における NO/PGE2 の役割. 第 150 回 日本獣医学会学術集会. 2010. 9. 16-18. 帯広市
3. 堀正敏 : 消化管疾患における 5-HT₄ 受容体刺激による抗炎症作用. 第 53 日本平滑筋学会. 2011. 08. 03-04. 東京都
4. 堀正敏 : 消化管疾患における 5-HT₄ 受容体刺激による抗炎症作用. 第 53 日本平滑筋学会. 2011. 08. 03-04. 東京都
5. 中村達朗、神田秀憲、金田剛治、村田幸久、堀正敏、尾崎博 : UDP は P2Y₆ 受容体を介して腸管上皮細胞の創傷治癒過程を促進する. 第 13 回日本神経消化器病学会. 2011. 11. 5. 宇都宮市
6. 中村達朗、神田秀憲、金田剛治、村田幸久、堀正敏、尾崎博 : 腸管上皮細胞の創傷治癒過程における UDP による損傷回復応答. 第 8 回日本消化管学会学術集会. 2012. 02. 10-12. 仙台
7. Masatoshi Hori, Yasuaki Tsuchida, Masahiko Fujisawa, Fumihiko Hatao, Takahisa Murata, Yasuyuki Seto, Hiroshi Ozaki: 5-HT₄ receptor-mediated anti-inflammatory potency via nAChR in digestive irritation. 第 85 回日本薬理学会年会. 2012. 3. 14-16. 京都市

[その他]

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/yakuri/re-f-list.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 正敏 (HORI MASATOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授