

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390031

研究課題名(和文) TRPチャネルを経由した化学物質による接触感作促進(アジュバント)機構の解明

研究課題名(英文) Adjuvant effect of chemicals on contact hypersensitivity through transient receptor potential channels

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) 10,300,000円、(間接経費) 3,090,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質アレルギーにおいて、抗原感作を強める作用(アジュバント作用)の機構には不明な点が多い。マウス接触性皮膚炎モデルにおけるフタル酸エステルのアジュバント機構について、侵害刺激受容チャネルTRPA1の重要性を明らかにした。作動活性のある既知の天然物、アンタゴニストを用いた実験結果も上記の機構を支持した。アジュバント物質の予測において、TRPA1作動活性の検索が有用であることを、化粧品や薬剤処方に汎用されている代替可塑剤を題材として明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Adjuvant mechanisms of chemicals in allergy are largely unknown. We demonstrated that TRPA1 channels are involved in the adjuvant activity of phthalate esters using a contact hypersensitivity mouse model. This conclusion was supported by the presence of adjuvant activity in TRPA1 agonistic natural products as well as by experiments using a TRPA1 antagonist. TRPA1 activation was found to be useful for the prediction of adjuvant effect using alternative plasticizers that are widely used for cosmetics and drug formulation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：フタル酸エステル 接触性皮膚炎 TRPチャネル 知覚神経 代替可塑剤 アジュバント

1. 研究開始当初の背景

(1) 生活環境や職場環境中には、人工的に作り出された化学物質や天然物に由来する化学物質が混在し、アレルギーの原因となる可能性がある。複数の化学物質が複合的に働く場合や、間接的な影響を發揮する化学物質についてなど、原因となる化学物質の特定が困難である場合も多い。特に、それ自身には抗原性がないが、他の化学物質アレルゲンによる感作を促進する作用(アジュバント作用)がある場合には、直接の証明が困難である。

未知の化学物質によるアジュバント作用は近年問題となっている。医薬品関連について言えば、貧血の治療薬であり biologics でもある組換え型エリスロポエチン (Eprex) において、薬剤を投与された患者にエリスロポエチンに対する中和抗体が誘導され、治療の続行が困難となったばかりか、内因性エリスロポエチンも不活性化される重大な有害事象がヨーロッパで起こった。薬剤の可溶化に用いられていた界面活性剤の作用によって、注射に用いるシリンジのゴムから何らかのアジュバント化学物質が溶出したことが疑われている(*Nature* 449, 274-76, 2007)。その後の danger signal を解析する通常の免疫学的検索ではアジュバント化学物質の同定に至っていない(*J. Pharm. Sci.* 98, 3548-61, 2009)。化学物質のアジュバント作用の本質を解明するための新たなアプローチを追求することは、医薬品の安全性の面からも重要な意義があると考えている。

(2) 研究代表者は、接触性皮膚炎のマウスモデルを用い、抗原性を証明できないフタル酸ジブチル(DBP)が、抗原性のある低分子ハプテンであるフルオレッセインイソチオシアネート (FITC)の接触皮膚感作を促進すること(アジュバント作用)を見出した。皮膚に塗布されたハプテンの FITC は、宿主タンパク質と結合して皮膚の樹状細胞に取り込まれる。樹状細胞は、リンパ管を通して所属リンパ節に移動し、血管を介してリンパ節にホーミングして来た T 細胞に抗原提示する。その結果 FITC に特異的な T 細胞による免疫応答が誘導される。FITC を提示した樹状細胞の移動を促進することが、DBP によるアジュバント作用の一環であることを示してきた。

フタル酸エステルは、プラスチックの可塑剤、塗料、壁紙、化粧品、ゴム製品、防虫スプレーなど生活環境中で広く用いられている。構造の異なるフタル酸エステルについて比較し、アジュバント作用と樹状細胞の移動促進効果の相関を見出した(*Imai, Y., et al., Clin. Exp. Allergy* 36, 1462-1468, 2006)。

(3) 研究代表者は、知覚神経の侵害刺激受容体の一つである TRPV1 作動性のカプサイシンや、TRPA1 作動性のアリルイソチオシアネートを皮膚局所に塗布して知覚神経をあらかじめ脱感作すると、DBP によるアジュバント

作用および樹状細胞の移動促進が抑制されることを見出した。すなわち DBP の作用点として TRP チャネルの関与が初めて示唆された(*Maruyama, T., Imai, Y., et al. Int. Arch. Allergy Immunol.* 143, 144-154, 2007)。それを裏付ける結果として、マウス後根神経節から採取した神経細胞、TRPA1 もしくは TRPV1 を強制発現させた培養細胞を用いて、DBP の TRPA1 と TRPV1 に対する作動活性を証明した(*Shiba, T., Imai, Y., et al., J. Neuroimmunol.* 207, 66-74, 2009)。さらに、9 種類のフタル酸エステルについて、TRPA1 と TRPV1 作動活性と、アジュバント作用、樹状細胞移動促進作用の相関性を見出した。

(4) FITC 以外のハプテンとして、食品成分であるフェネチルイソチオシアネート(PEITC)をハプテンとする接触性皮膚炎モデルを構築した。DBP やフタル酸ジブチル(DPP)が PEITC による接触感作を促進することを見出した(*Matsuda, T., Imai, Y., et al., Food Chem. Toxicol.*, 48, 1704-1708, 2010)。このことは、モデルハプテンのみならず、実際に生活環境中に存在するハプテンについても、フタル酸エステルがアジュバント作用を發揮することを示している。

2. 研究の目的

(1) FITC 誘導接触性皮膚炎モデルにおいてアジュバント作用のあるフタル酸エステルに TRPA1 作動活性を認めただので、逆に既知の TRPA1 アゴニストにアジュバント作用があるかどうかを精査する。

(2) TRPA1 や TRPV1 以外の TRP チャネルについて評価するため、TRPM8 を強制発現させた細胞株を樹立し、フタル酸エステルによる TRPM8 作動活性を評価する。

(3) サプリメントの過剰摂取が免疫系に与える影響の一環として、利用頻度の高いビタミンの一つであるビタミン B6 を過剰摂取させた場合の FITC 誘導接触性皮膚炎への影響を調べる。

(4) フタル酸エステルに代わって用いられている代替可塑剤について、TRPA1 作動活性およびアジュバント作用を並行して調べ、フタル酸エステル以外の化学物質についても本研究から得られた仮説の拡張を試みる。

3. 研究の方法

(1) FITC による接触皮膚感作の評価: BALB/c マウスの皮膚にフタル酸エステルなどの被験化学物質の存在下あるいは非存在下で FITC を塗布して接触感作を行い、耳介に FITC を塗布して炎症を惹起した。耳介腫脹反応によって感作促進作用を評価した。なお、ビタミン B6 の過剰摂取の検討においては、通常飼料の 30 倍量のビタミン B6 (120 mg/Kg 飼

料)を含有する特殊飼料を 3 週間マウスに摂取させた。

(2) FITC を提示した樹状細胞のトラフィックキング：FITC の蛍光性を利用し、FITC 感作 24 時間後に所属リンパ節を摘出し、細胞浮遊液を調製した。樹状細胞マーカーの抗 CD11c 抗体で蛍光染色後、フローサイトメトリーで FITC 陽性 / CD11c 陽性細胞を計数して、樹状細胞のトラフィックキング促進作用を調べた。

(3) FITC 感作後の所属リンパ節からのサイトカイン産生の測定：BALB/c マウスを FITC で初回感作後 7 日目に再び感作した。その 24 時間後に所属リンパ節から細胞を回収して培養した。培養上清中に放出されたサイトカインを、ELISA によって定量的に測定した。

(4) TRPM8 作動活性の測定：マウスの後根神経節から RT-PCR 法で TRPM8 の全長 cDNA をクローニングした。発現プラスミドに cDNA をサブクローニングして、CHO 細胞の安定発現株を構築した。カルシウム指示蛍光試薬の Fluo-4 を取り込ませた後、フタル酸エステル等を添加し、多検体蛍光検出装置を用いて細胞内カルシウム応答を経時的に観察した。TRPA1 作動活性については、すでに樹立した TRPA1 強制発現 CHO 細胞を用いた。

4. 研究成果

(1)既知の TRPA1 アゴニストのアジュバント活性

FITC による接触感作を促進するフタル酸エステルに TRPA1 作動活性を認めたことをふまえて、逆に既知の TRPA1 アゴニストのアジュバント活性を評価した。シンナムアルデヒド、メントール、カルバクロール共存下 FITC で感作すると、接触感作が促進された。さらに、これらの TRPA1 アゴニストが FITC を提示した樹状細胞の所属リンパ節へのトラフィックキングを促進することが分かった。

(2) DBP の TRPA1 作動活性およびアジュバント活性について、TRPA1 アンタゴニストを用いた検討

DBP が TRPA1 強制発現 CHO 細胞に誘導するカルシウム応答は、TRPA1 選択的アンタゴニストである HC-030031 によって阻害された。一方、HC-030031 を前投与してから FITC でマウスを接触感作すると、耳介腫脹反応が抑制された。以上より、DBP のアジュバント作用の原因として、TRPA1 の活性化があげられることが判明した。

(3)フタル酸エステルによる選択的な TRP チャネルの活性化

TRP チャネルは、多くのサブタイプからなる分子ファミリーを形成している。フタル酸エステルが TRPA1 および TRPV1 の両方を活性化することから、サブタイプ選択性の有無が

疑問点となった。さらに、メントールは TRPA1 のアゴニストであるとともに、TRPM8 のアゴニストでもあるため、メントールのアジュバント作用が TRPM8 を介している可能性も考えられた。種々のフタル酸エステルが TRPM8 を強制発現させた CHO 細胞のカルシウム応答を誘導するかどうかを調べたところ、誘導作用を認めなかった。陽性対照として、メントールまたは他の TRPM8 アゴニストのイシリンを用いるとカルシウム応答が誘導された。以下の表に、TRP チャネルの作動活性と、アジュバント活性を整理してまとめた。

種類	側鎖長	側鎖形状	TRPA1 活性化	TRPV1 活性化	TRPM8 活性化	DC 移動促進	接触感作促進
DMP	1		ND	ND	×	×	×
DEP	2			×	×	×	
DPP	3	直鎖			×		
DBP	4	直鎖			×		
DPNP	5	直鎖			×		
DHXP	6	直鎖			NT		
DHPP	7	直鎖	×	×			
DEHP	8	分岐	×	×	×	×	×
DINP	9	分岐	×	×	NT	×	×

ND: not definitive (非特異的な応答)

NT: not tested

: 高濃度でのみ軽度の反応

(4)ビタミン B6 過剰摂取における FITC 誘導接触性皮膚炎の応答

サプリメントとして利用の多いビタミンであるビタミン B6 については、過剰摂取による知覚神経の障害が報告されてきた。DBP のアジュバント作用が知覚神経刺激を経由するならば、知覚神経の機能低下が FITC に対する接触感作の低下として観察される可能性がある。ビタミン B6 を過剰に含む飼料を 3 週間摂取させたマウスでは、FITC に対する接触性皮膚炎応答が低下した。所属リンパ節におけるサイトカイン産生を調べると、IFN- γ 産生の更新が観察され、Th1 型へのヘルパー T 細胞への分極化が認められた。このことは、Th2 型の応答を必要とする FITC 誘導接触性皮膚炎の低下と一致した。さらに、Th1 型の応答を必要とするオキサゾロン誘導接触性皮膚炎については、逆にビタミン B6 の過剰摂取によって増強が認められた。

(5)代替可塑剤の TRPA1 作動活性およびアジ

ユバント作用

フタル酸エステルに代わる代替可塑剤として広く利用されているアジピン酸ジイソプロピル(DIA)およびセバシン酸ジイソプロピル(DIS)を取り上げた。DIA および DIS は、TRPA1 を強制発現させた CHO 細胞にカルシウム応答を誘導した。TRPA1 を発現させていない CHO 細胞には応答を誘導しなかった。DIA については、TRPA1 選択的アンタゴニストの HC-030031 がカルシウム応答を競合的に阻害した。DIA および DIS は、FITC 誘導接触性皮膚感作を促進した。また、皮膚局所から所属リンパ節への樹状細胞の移動を促進した。さらに、所属リンパ節細胞のサイトカイン (IFN- γ および IL-4) 産生を促進した。以上の結果は、代替可塑剤についても TRPA1 刺激活性の測定を利用して、アジュバント作用の予測が可能であったことを示している。

(6)国内外における位置づけとインパクトおよび今後の展望

本研究は、アレルギー学と神経科学の接点に位置づけられ、知覚神経刺激の側面から抗原感作の機構を明らかにする点にインパクトがある。特に TRP チャネルの役割を見出した点が国内外の研究者から革新性のある研究の切り口として評価されている。今回の研究期間においては、知覚神経障害の可能性が指摘されているビタミン B6 を過剰摂取させたマウスで、DBP 存在下での FITC 誘導接触性皮膚感作の低下を見出した。3 週間という比較的短期間でのビタミン B6 の過剰摂取が影響を与えたことは注目に値する。今後、サプリメントとして汎用されている他のビタミンについても検索をすすめる必要があるであろう。第二に、本研究はフタル酸エステルのアジュバント機構の解明をめざして開始し、TRPA1 の役割を見出して来たが、今回逆に TRPA1 作動活性のある既知の天然物にアジュバント作用を見出すことができた。このことは、TRPA1 作動活性をもとに、アジュバント化学物質の予測が可能ではないかということを示唆している。実際、試みに化粧品成分や製剤処方にも汎用されているアジピン酸エステルやセバシン酸エステルについて評価したところ、TRPA1 作動活性を見出した。さらに、FITC 誘導接触性皮膚炎におけるアジュバント作用を認め、フタル酸エステルと同様な樹状細胞の移動促進作用も認めた。この結果は、試験管内での TRPA1 の作動活性の検索が、アジュバント作用の予測に有用である可能性を示し、安全性評価における代替試験法に新たな標的を提供するものであると考えている。

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 3 件)

Kohta Kurohane, Yurina Sahara, Ayako Kimura, Masataka Narukawa, Tatsuo Watanabe, Takashi Daimon, Yasuyuki Imai: Lack of transient receptor potential melastatin 8 activation by phthalate esters that enhance contact hypersensitivity in mice. *Toxicol. Lett.*, **217**, 192-196 (2013) 査読有 DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.12.025
Takahiro Shiba, Takuma Tamai, Yurina Sahara, Kohta Kurohane, Tatsuo Watanabe, Yasuyuki Imai: Transient receptor potential ankyrin 1 activation enhances hapten sensitization in a T-helper type 2-driven fluorescein isothiocyanate-induced contact hypersensitivity mouse model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **264**, 370-376 (2012) 査読有 DOI: 10.1016/j.taap.2012.08.012
Chie Kobayashi, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: High dose dietary pyridoxine induces T-helper type 1 polarization and decreases contact hypersensitivity response to fluorescein isothiocyanate in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 532-538 (2012) 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/35/4/35_4_532/_article

[学会発表](計 4 件)

寺澤里恵、木村文子、小林香美結、鈴木若菜、松岡 毅、黒羽子孝太、今井康之: 接触性皮膚炎の感作過程における代替可塑剤のアジュバント作用機構. 日本病院薬剤師会東海ブロック / 日本薬学会東海支部合同学術大会 2013(鈴鹿市)講演要旨集 p. 93、2013 年 11 月 10 日

木村文子、佐原百合名、黒羽子孝太、渡辺達夫、今井康之: FITC 誘導接触性皮膚炎における代替可塑剤のアジュバント活性. 第 58 回 日本薬学会東海支部総会・大会(静岡市)、講演要旨集 p. 83、2012 年 7 月 7 日

黒羽子孝太、佐原百合名、木村文子、玉井琢磨、渡辺達夫、今井康之: 接触性皮膚炎に対するフタル酸エステル類のアジュバント活性における TRP channel の関与. 日本薬学会第 132 年会(札幌市) 2012 年 3 月 29 日

Yurina Sahara, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: Lack of TRPM8 involvement in the enhancement of skin sensitization to FITC. 第 40 回日本免疫学会(千葉市)、講演要旨集、P. 94、2011 年 11 月 27 日

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/bis/ei/>

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・助教

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