

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592576

研究課題名(和文) ヒト鼻粘膜におけるロイコトリエンE4受容体-P2Y12受容体の発現と役割

研究課題名(英文) Leukotriene E4 receptor in human nasal mucosa-the expression and the roles of P2Y12 receptor

研究代表者

白崎 英明 (SHIRASAKI, HIDEAKI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30260772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：システイニルロイコトリエン(CysLT)は鼻アレルギー局所で遊離され、日常臨床で用いられているCysLT1受容体拮抗薬により鼻閉症状が改善するため重要なケミカルメディエーターであると考えられている。近年第3のCysLT受容体の存在が示唆されており、LTE4と結合するP2Y12受容体とGPR99受容体が有力視されている。本研究によって鼻粘膜におけるP2Y12の局在が明らかとなり、鼻粘膜培養上皮細胞を用いた研究においてLTE4刺激のムチン分泌にP2Y12が部分的に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The cysteinyl leukotrienes (CysLTs) are lipid mediators that have been implicated in the pathogenesis of allergic rhinitis. CysLT1 receptor is sensitive to the CysLT1 receptor antagonist currently used to treat asthma and allergic rhinitis. Recent studies have begun to uncover receptors selective for LTE4:P2Y12. To clarify the expression of P2Y12 receptor in human nasal mucosa, we investigated immunohistochemical localization of P2Y12 receptor in human nasal mucosa, and mucus secretion by LTE4 in vitro. The immunohistochemical study revealed that epithelial cells, submucosal glands and vascular endothelial cells showed intense immunoreactivity for P2Y12 receptor. LTE4 significantly induced the release of MUC5AC mucin from airway epithelial cells. A P2Y12 receptor antagonist, partially inhibited the LTE4-induced release of MUC5AC protein in the airway. These results suggest that LTE4 may play some important roles in allergic mucus secretion partially via activation of P2Y12 receptor.

研究分野：鼻アレルギー

キーワード：ロイコトリエンE4 P2Y12 GPR99 鼻粘膜 鼻アレルギー ムチン

1. 研究開始当初の背景

すでにCysLT1受容体拮抗剤はアレルギー性鼻炎に臨床応用され、高い有効性を有することが知られている。ヒト鼻粘膜におけるCysLT1受容体の発現と局在については以前に我々が報告している。CysLT2受容体についても最近の我々の研究によりヒト鼻粘膜での局在が明らかになっている。近年第3のCysLT受容体の存在が示唆されており、LTE4と結合するP2Y12受容体が有力視されている。

2. 研究の目的

ヒト上気道における第3のCysLT受容体の役割を確認する目的として、ヒト鼻粘膜のP2Y12受容体の発現と局在を明らかにする。さらに培養細胞を用いてLTE₄の鼻粘膜に対する作用とP2Y12P受容体の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト鼻粘膜のP2Y12受容体の発現と局在について、免疫染色とウエスタンブロット法で、その発現と局在について解析した。さらに通年性アレルギー性鼻炎と非アレルギー性鼻炎の発現量の違いの有無をウエスタンブロット法を用いて半定量した。

培養気道上皮細胞株(NCI-H292細胞)に対しLTE4刺激を行い、粘液分泌(ムチン分泌)が引き起こるかどうかが、ELISA法などを用いて蛋白レベルで解析した。

4. 研究成果

1)抗P2Y12受容体抗体を用いたウエスタンブロット法では、50kDaのバンドを確認した。通年性鼻アレルギー6症例と非アレルギー6症例の下鼻甲介のP2Y12発現量をウエスタンブロット法で半定量したが、有意な差は認めなかった。ヒト下鼻甲介の免疫染色にて、上皮細胞と血管内皮細胞にP2Y12受容体発現を認めた。(Shirasaki H et al. Allergology International誌 2013にて報告)

2)上皮細胞株(NCI-H292細胞)と初代気管上皮培養細胞にはP2Y12受容体が発現していることをウエスタンブロット法にて確認した。NCI-H292細胞に対しLTE4刺激を行うと、濃度依存性に分泌型ムチン(MUC5AC)の分泌が引き起こることを確認した。この反応はP2Y12受容体拮抗薬にて約4割抑制された。

(Shirasaki H et al. Allergology International誌 2015にて報告)

以上1)2)の結果より、ヒト気道上皮細胞にはP2Y12受容体が発現しており、LTE4は部分的にP2Y12受容体を介して腺分泌を引き起こしていることが示唆された。一方、2013年に米国のグループが受容体ノックアウトマウスを用いた手法で、GPR99受容体もLTE4受容体として作用することを報告した。最終年度において、ヒト下鼻甲介におけるGPR99受容体の発現をウエスタンブロット法にて76kDaのバンドを確認し、ヒト下鼻甲介の免疫染色にて、上皮細胞と粘膜下腺細胞、局所に浸潤する好酸球にGPR99受容体発現を認めた。(現在英文誌に投稿中)。GPR99受容体は比較的新しくクローニングされた受容体なためか、その特異的拮抗薬はいまだに開発されていない。RNA干渉の手法を用いてGPR99受容体をノックダウンすることは可能である。今後はP2Y12受容体のみならずGPR99受容体に関しても研究を進め、気道アレルギー疾患に対する新規治療薬の開発に結びつくような研究成果を獲得できるように発展させたい。

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2件)

Shirasaki H, Kanaizumi E, Seki N, Himi

T. Leukotriene E4 induces MUC5AC release from human airway epithelial NCI-H292 cells. Allergology International 64: 169-174, 2015.

DOI: 10.1016/j.alit.2014.11.002

査読あり。

Shirasaki H, Kanaizumi E, Seki N, Kikuchi M, Himi T. Expression and localization of purinergic P2Y12 receptor in human nasal mucosa. Allergology International 62(2): 239-244, 2013.

DOI: 10.2332/allergolint.12-OA-0496

査読あり。

〔学会発表〕(計5件)

Shirasaki H, Kanaizumi E, Seki N, Himi T. Expression of leukotriene E4 receptor:GPR80/99 in human nasal mucosa. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress. 2014年6月7 - 11日、コペンハーゲン(デンマーク)。

白崎英明、才川悦子、菊池めぐみ、関伸彦、氷見徹夫。：ヒト鼻粘膜におけるもう一つのロイコトリエンE4受容体-GPR80/99の発現と局在、第26回日本アレルギー学会春季臨床大会、2014年5月9 - 11日、国立京都国際会館、京都市。

白崎英明、才川悦子、関伸彦、氷見徹夫：LTE4によるヒト気道上皮細胞からの分泌型ムチンの放出。第52回日本鼻科学会学術講演会、2013年9月26 - 28日、福井フェニックスプラザ、福井市。

Shirasaki H, Saikawa E, Seki N, Himi T. Leukotriene E4 induces release of mucin in human airway epithelial cells.16th Asian

Research Symposium in Rhinology. 2013年8月29 - 31日、京王プラザホテル、東京。

Shirasaki H, Kanaizumi E, Seki N, Kikuchi M, Himi T. Leukotriene E4 induces release of MUC5AC mucin in human airway epithelial (NCI-H292) cell. EAACI-WAO World Allergy & Asthma Congress. 2013年6月22 - 26日、ミラノ(イタリア)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

白崎 英明 (SHIRASAKI Hideaki)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30260772

(2)研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

該当なし

研究者番号：