

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006 年度～2008 年度
 課題番号：18390167
 研究課題名(和文) ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現機構を標的とする新規アレルギー治療法
 研究課題名(英文) Novel treatment method targeting the mechanism of histamine H₁ receptor gene expression
 研究代表者 福井 裕行(FUKUI HIROYUKI)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
 研究者番号：90112052

研究成果の概要：

鼻過敏症モデルラット鼻粘膜において、過敏症発作とそれに伴うヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現の亢進は抗ヒスタミン薬(抗アレルギー薬)、スプラタスト、及び、乳酸菌、小青竜湯、緑茶、苦参などの天然物医薬の早期からの連続投与により強力に抑制された。この遺伝子発現抑制は抗アレルギー薬の初期療法の分子機構に関連することが示唆された。また、ヒスタミン H₁ 受容体シグナルと IL-4 シグナルの間にそれぞれの遺伝子発現を亢進させるクロストークが存在し、鼻過敏症症状の悪化機構の存在が示唆された。以上の結果から、ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子は疾患感受性遺伝子であり、この遺伝子発現を抑制する治療法は新たなアレルギー疾患治療戦略として有意義であることが明らかとなった。一方、ヒスタミン H₁ 受容体刺激によるヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現亢進の分子機構を明らかにした。即ち、H₁ 受容体刺激は蛋白キナーゼ C- δ (PKC- δ) の活性化を引き起こし、PKC- δ の活性化シグナルは AP-1、Ets-1、及び、Ku70- Ku86-poly(ADP-ribose)polymerase 1 複合体の 3 つの転写調節因子を介して H₁ 受容体遺伝子プロモーターの活性化を引き起こすことを明らかにした。この機構は上に述べた薬物を含めてヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現抑制を引き起こす薬物の分子薬理機構解明に有用である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	11,600,000	0	11,600,000
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	1,230,000	16,930,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：ヒスタミン受容体、アレルギー、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の主症状はヒスタミン H₁受容体を介して引き起こされ、抗ヒスタミン薬(ヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬)はアレルギー疾患の主要治療薬である。しかし、臨床

的に抗ヒスタミン薬による症状改善は不十分であり、新規治療薬の開発は必須である。その理由のひとつとして、抗ヒスタミン薬は血中濃度が高い場合、ヒスタミンシグナルを遮断し、症状を抑制できるが、濃度が低下するに従って症状が出現する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

ヒスタミン H₁ 受容体が単にヒスタミンシグナルを仲介するのみならず、受容体遺伝子発現亢進に対応したヒスタミンシグナル上昇機構を明らかにした。そして、アレルギーモデル動物において、H₁ 受容体 mRNA と受容体レベルが著名に上昇することを見いだした。そこで、H₁ 受容体遺伝子発現機構を抑制し、受容体レベルを持続的に抑制することにより、アレルギー疾患の症状も持続的に抑制できるのではないかと考えた。本研究はヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現機構に対して抑制する薬物を見いだし、その抑制機構を明らかにすると共に、受容体レベルの持続的な抑制による治療法の有効性を明らかにし、新規治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 用いた薬物

デキサメサゾン、抗アレルギー薬（ヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬）、トシル酸スプラタスト、乳酸菌、緑茶、小青竜湯、苦参、アユルベータ医薬の *Albizzia lebeck* を用いた。

(2) 鼻過敏症モデルラットを用いる研究

ブラウンノルウェイラットの鼻前庭にトルエン 2, 4-ジイソシアネート (TDI) を連日 5 日塗布し、2 日間の間隔を空けて同様の塗布を再度行い、9 日空けた後、TDI で過敏症発作を誘発した。症状をくしゃみ回数と鼻汁、鼻の腫れをスコア化して測定し、一方、鼻粘膜の疾患関連遺伝子 mRNA をリアルタイム PCR により測定した。

(3) 培養細胞を用いる研究

ヒスタミン H₁ 受容体を自然に発現する HeLa 細胞を用いて、H₁ 受容体刺激による H₁ 受容体遺伝子発現亢進に至る分子機構解析に用いた。

4. 研究成果

(1) 鼻過敏症モデルラット鼻粘膜の遺伝子発現亢進に対する各種薬物の抑制作用

モデルラット鼻粘膜のヒスタミン H₁ 受容体、ヒスチジン脱炭酸酵素、IL-4 などの遺伝子発現亢進が過敏症発作誘発により引き起こされた。そして、H₁ 受容体発現量の増加、

ヒスチジン脱炭酸酵素活性とヒスタミン含量の増加が引き起こされた。デキサメサゾン、抗アレルギー薬、スプラタスト、乳酸菌、緑茶、小青竜湯、及び、苦参に上に述べた疾患関連遺伝子発現亢進抑制作用を見いだした。

(2) ヒスタミン H₁ 受容体を介する H₁ 受容体遺伝子発現亢進

鼻過敏症モデルラット鼻粘膜 H₁ 受容体 mRNA 増加を抗アレルギー薬は部分的ではあるが抑制した。そこで、H₁ 受容体を自然に発現する HeLa 細胞をヒスタミンで刺激したところ、H₁ 受容体 mRNA 増加に引き続いて H₁ 受容体の増加が引き起こされた。この機構には PKC- δ の関与が明らかとなった。PKC- δ の下流で AP-1、Ets-1、及び、Ku70-Ku86-poly(ADP-ribose)polymerase 1 複合体の 3 つの転写調節因子を介して H₁ 受容体遺伝子プロモーター活性が制御されることを明らかにした。

(3) 各種薬物、及び、天然物医薬エキスによる HeLa 細胞ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現抑制

デキサメサゾン、抗アレルギー薬、緑茶エキス、苦参エキス、*Albizzia lebeck* エキス、及び、つくしエキスは HeLa 細胞のヒスタミン刺激による H₁ 受容体遺伝子発現亢進を抑制した。

(4) 緑茶エキス、苦参エキス、及び、つくしエキスのヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現抑制物質

HeLa 細胞の H₁ 受容体遺伝子発現亢進に対する抑制作用を指標にして緑茶、及び、苦参エキに含まれる有効成分の単離・精製。化学構造決定を行った。その結果、緑茶成分のエピガロカテキンガレートにヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現抑制作用があることを見いだした。一方、苦参エキスの有効成分の同定にも成功し、現在まで活性の知られていない化学物質であることが明らかとなった。本物質は新規治療薬シーズとして有望であり、特許申請を準備している。更に、アレルギー疾患の症状改善に有効であるつくしエキスのヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現亢進に対する抑制作用を調べたところ、強い抑制作用を見いだした。H₁ 受容体遺伝子発現亢進の抑制作用を指標にして有効成分の単離・精製、及び、化学構造決定を行ったところ、有効成分はアピゲニンであることが明らかとなった。

(5) PKC- δ シグナルを標的とする薬物群の意義

ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現亢進シグナルを抑制する薬物の分子薬理機構は PKC-

δシグナルの抑制薬であることが示唆された。これらの薬物の化学構造は共通性が無く、標的部位はそれぞれ異なることが考えられる。そこで、作用部位の異なる薬物の相乗作用を利用してそれぞれを低用量で併用することにより、有害作用を減らして有効作用を期待することができる。また、ヒトの鼻過敏症は多因子疾患として治療に有効な標的部位がそれぞれの患者により異なることが考えられる。即ち、個別化医療が必要である。本研究の成果により、PKC-δシグナルを異なる標的部位で抑制する薬物を個別化医療により使い分ける場合において有用であると考えられる。更に、PKC-δシグナルはヒスタミンH₁受容体遺伝子発現亢進シグナルのみならず、細胞増殖作用に働くことが明らかにされている。そこで、エピガロカテキンガレート、及び、アピゲニンを投与することにより、子宮頸癌由来培養細胞であるHeLa細胞の増殖抑制作用が認められた。この結果は上記の2つの薬物がPKC-δシグナルの抑制を介するがんの治療薬シーズとしても有用であることを示唆する。

(6) 抗アレルギー薬による初期治療の有効性を支持する基礎研究

鼻過敏症モデルラットを用いる研究において、抗アレルギー薬の前処置による症状改善作用、及び、遺伝子発現亢進抑制作用を検討した。即ち、抗アレルギー薬投与を発作誘発直前、3日前、1週間前、3週間前、及び、5週間前から発作直前まで連日投与した。その結果、1週間以上の前処置から発作直前まで投与した場合、3日前、及び、発作直前などのより短い投与期間に比べて顕著な症状改善とヒスタミンH₁受容体、及び、IL-4の遺伝子発現亢進抑制を見いだした。以上の結果より、抗アレルギー薬の初期治療はヒスタミンH₁受容体遺伝子、及び、IL-4遺伝子などの疾患感受性遺伝子の発現亢進に対する抑制作用を通じた症状改善作用が示唆される。

(7) 鼻過敏症におけるヒスタミンとIL-4のシグナルクロストークによる疾患増悪機構

抗アレルギー薬の早期からの前投与により、ヒスタミンH₁受容体、及び、IL-4遺伝子発現がより強く抑制された。また、2つの遺伝子は互いに類似したプロファイルで抑制された。これらの結果から、この2つのシグナルにクロストークの存在することが予想された。そこで、ラット鼻前庭へのヒスタミン投与によるIL-4遺伝子発現亢進、及び、IL-4投与によるヒスタミンH₁受容体遺伝子発現亢進を見いだした。更に、培養細胞(HeLa細胞)を用いる研究において、IL-4受容体刺激によるヒスタミンH₁受容体遺伝子発現亢

進機構の存在証明した。この機構においてはJAK(3)-STATシグナルが関与する。そして、ヒスタミン刺激とIL-4刺激によるヒスタミンH₁受容体遺伝子発現亢進は相加的に引き起こされることが明らかとなった。

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11件)

1. Dev S, Mizuguchi H, Das AK, Maeyama K, Horinaga S, Kato S, Tamada M, Hattori M, Umehara H, Fukui H. Kujin suppresses histamine signaling at transcriptional level in toluene 2,4-diisocyanate-sensitized rats. J Pharmacol Sci 109 (4), 606-617, 2009. (査読有り)

2. Das AK, Mizuguchi H, Kodama M, Dev S, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Sho-seiryu-to suppresses histamine signaling at the transcription level in TDI-sensitized nasal allergy model rats. Allergol Int 58 (1), 81-88, 2009. (査読有り)

3. Mizuguchi H, Hatano M, Matsushita C, Umehara H, Kuroda W, Kitamura Y, Takeda N, Fukui H. Repeated pre-treatment with antihistamines suppresses transcriptional up-regulations of histamine H₁ receptor and interleukin-4 genes in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. J Pharmacol Sci 108 (4), 480-486, 2008. (査読有り)

4. Matsushita C, Mizuguchi H, Nino H, Sagesaka Y, Masuyama K, Fukui H. Identification of epigallocatechin-3-O-gallate as an active constituent in tea extract that suppresses transcriptional up-regulation of the histamine H₁ receptor and interleukin-4 genes. J Trad Med 25 (5/6), 133-142, 2008. (査読有り)

5. Dev S, Mizuguchi H, Matsushita C, Das AK, Maeyama K, Umehara H, Ohtoshi T, Kojima J, Nishida K, Takahashi K, Fukui H. Suppression of histamine signaling by probiotic Lac-B: a possible mechanism of its anti allergic effect. J Pharmacol Sci 107 (2), 159-166, 2008. (査読有り)

6. Fukui H. Progress in allergy signal research on mast cells: up-regulation of histamine signal-related gene expression in allergy model rats. J Pharmacol Sci 106 (3) 325-331, 2008. (査読有り)

7. Miyoshi K, Kawakami N, Umehara H, Fujimoto K, Horio S, Fukui H. Down-regulation of histamine H₁ receptor by β₂-adrenoceptor-mediated inhibition of H₁ receptor gene transcription. J Pharm Pharmacol 60 (6), 747-752, 2008. (査読有り)

8. Miyoshi K, Kawakami N, Das AK, Fujimoto K, Horio S, Fukui H. Heterologous up-regulation of the histamine H₁ receptor by M₃ muscarinic receptor-mediated activation of H₁ receptor gene transcription. J Pharm Pharmacol 59 (6), 843-848, 2007. (査読有り)

9. Das AK, Yoshimura S, Mishima R, Fujimoto K, Dev S, Wakayama Y, Kitamura Y, Horio S, Mizuguchi H, Takeda N, Fukui H. Stimulation of histamine H₁ receptor up-regulates histamine H₁ receptor itself through activation of receptor gene transcription. J Pharmacol Sci 103 (4), 374-382, 2007. (査読有り)

10. Kitamura Y, Das AK, Murata Y, Maeyama K, Dev S, Wakayama Y, Kalbi B, Takeda N, Fukui H. Dexamethasone suppresses histamine synthesis by repressing both transcription and activity of HDC in allergic rats. Allergol Int 55 (3), 279-286, 2006. (査読有り)

11. Miyoshi K., Das AK, Fujimoto K, Horio S, Fukui H. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: regulation of histamine H₁ receptor signaling by changing its expression level. J Pharmacol Sci 101 (1), 3-6, 2006. (査読有り)

[学会発表] (計 49 件)

特別講演・招待講演

国際学会 2 件

国内学会 : 1 件

1. Hiroyuki Fukui. Histamine H₁ receptor gene expression in allergy and its suppression by natural medicines. International Herbal Conference. 2009.2.27, Bangalore, India

2. 福井裕行. ヒスタミン受容体とアレルギー疾患. 第 26 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会. 2008 年 2 月 21 日. ホテル阪神、大阪市

3. Hiroyuki Fukui. Histamine H₁ receptor gene as an allergic disease-sensitive gene. 59th Indian Pharmaceutical Congress. 2007.12.22. Varanasi, India

シンポジウム

国内学会 : 7 件

1. 福井裕行、水口博之、堀尾修平、北村嘉章、武田憲昭. ヒスタミンと IL-4 のクロストークを標的とする抗ヒスタミン薬の初期療法の分子機構. 第 82 回 日本薬理学会年会、シンポジウム : アレルギー疾患の背景を形成する免疫・アレルギーネットワークの異常を是正する新規アレルギー疾患治療戦略. 2009 年 3 月 18 日. パシフィコ横浜・横浜市

2. 水口博之、福井裕行. HeLa 細胞におけるヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現調節. 第 36 回薬物活性シンポジウム/第 12 回日本ヒスタミン学会. 2008 年 10 月 25 日. 徳島大学長井記念ホール、徳島市

3. 福井裕行 (2007) アレルギーモデルラットにおけるヒスタミンシグナル関連遺伝子発現. シンポジウム : アレルギー炎症反応におけるヒスタミンと抗ヒスタミン薬. 日本薬学会第 127 年会. 2007 年 3 月 29 日. 富山国際会議場他、富山市

4. 福井裕行. 鼻過敏症モデルラット鼻粘膜におけるヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現亢進とその機構. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会、イブニングシンポジウム : 上下気道連関から見たアレルギー性鼻炎の治療戦略. 2006 年 11 月 2 日. 東京国際フォーラム、東京都

一般発表

国際学会 : 5 件

国内学会 : 34

1. 水口博之、Masum, Shahriar, Mukherjee, Pulok Kumar, 福井裕行. Albizzia lebeck は toluene 2,4-diisocyanate 感作アレルギーモデルラットにおいてヒスタミンシグナルを転写レベルで抑制する. 第 82 回 日本薬理学会年会. 2009 年 3 月 18 日. パシフィコ横浜、横浜市

2. 松下知世、水口博之、新納 仁、提坂裕子、福井裕行. 鼻過敏症モデルラットにおける緑茶成分のアレルギー疾患関連遺伝子発現抑制作用. 第 36 回薬物活性シンポジウム/第 12 回日本ヒスタミン学会. 2008 年 10 月 23 日. 徳島大学長井記念ホール、徳島市

3. 水口博之、坂本典子、山脇洋輔、堀尾修平、藤本勝巳、福井裕行. PMA-induced transcription of histamine H₁ receptor gene in HeLa cells is controlled by multiple transcription factors. 第 81 回日本薬理学会年会. 2008 年 3 月 19 日. パシフィコ横浜、横浜市

4. 松下知世、Shrabanti Dev, Asish K. Das, 前山一隆、大田隆行、西田清隆、水口博之、小嶋 純、福井裕行. 乳酸菌によるアレルギー性鼻炎改善作用. 第 11 回日本ヒスタミン学会. 2007 年 12 月 15 日. 富山市民プラザ、富山市

5. 福井裕行. 抗ヒスタミン薬によるヒスタジン脱炭酸酵素遺伝子発現抑制を介する新規治療戦略. 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会. 2007 年 11 月 2 日. パシフィコ横浜、横浜市

6. Hiroyuki Fukui. Suppression of histamine H₁ receptor mRNA elevation in nasal mucosa of allergy model rats by prolonged pretreatment of antihistamines. XXXVI Annual Meeting of European Histamine Research Society. 2007.5.11, Military Centre of Florentine Forensic Medicine, Florence, Italy

7. 秦野昌弥、松下知世、Masum Shahriar、黒田若菜、北村嘉章、Asish Kumar Das、Shrabanti Dev、水口博之、武田憲昭、福井裕行. 抗ヒスタミン薬早期投与によるトルエン24-ジオシアネート誘発 H₁ 受容体およびインターロイキン-4 遺伝子発現上昇への抑制効果. 第 80 回日本薬理学会年会. 2007 年 3 月 15 日. 名古屋国際会議場、名古屋市

8. Fukui H. Up-regulation of histamine H₁ receptors in nasal mucosa of allergy model rats and elucidation of the mechanism. 15th World Congress of Pharmacology. 2006.7.4. Beijing, P.R.China

9. Fukui H, Das AK, Yamawaki Y, Yoshimura S, Mishima R. Histamine H₁ receptor-mediated activation of histamine H₁ receptor gene expression. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2007.6.21. Kyoto, Japan

10. Kitamura Y, Hatano M, Takeda N, Fukui H. Suppression of histamine H₁ receptor mRNA elevation by early treatment of antihistamines. RCAI-JSI International Symposium on Immunology 2006. 20036.6.16. Yokohama, Japan

〔図書〕(計 4 件)

1. 福井裕行、先端医学講座「ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現のアレルギーにおける意義」、アレルギーの臨床、北隆館、印刷中

2. 福井裕行、アレルギー性鼻炎のプレーヤーたち「新しいヒスタミン H₁ 受容体機能」、鼻アレルギーフロンティア、メディカルレビュー社 9 (2), 30-34, 2009

3. 福井裕行、ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子発現機構を標的とするアレルギー疾患治療薬の意義、YAKUGAKU ZASSHI 127, 15-25, 2007.

4. 福井裕行、アレルギー疾患関連遺伝子としてのヒスタミン H₁ 受容体遺伝子. アレルギー科 21, 425-432, 2006.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

2008.3、「有機物質直接吸着超微粒子およびその複合体」、福井裕行、竹田篤、小駒益弘、見尾光庸、前山一隆、特願 2008-074548

2006.12.26、「抗ヒスタミン作用を有する医薬」、福井裕行、小島純、西田清隆、日本、特願 2005-374523、及び、国外、PCT/JP2006/325862

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 裕行 (FUKUI HIROYUKI) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：90112052

(2) 研究分担者

武田 憲昭 (TAKEDA NORIAKI) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：30206982

前山 一隆 (MAEYAMA KAZUTAKA) 愛媛大学大学院医学系研究科・教授 研究者番号：00157158

川添 和義 (KAWAZOE KAZUYOSHI) 徳島大学医学部・歯学部附属病院・准教授 研究者番号：00248296

(3) 連携研究者

水口 博之 (MIZUGUCHI HIROYUKI) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授 研究者番号：40247838

柏田 良樹 (KASHIWADA YOSHIKI) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授 研究者番号：30169429

根本 尚夫 (NEMOTO HISAO) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授 研究者番号：30208293