

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月25日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16970

研究課題名(和文) PGD2およびヒスタミンを介したかゆみの分子機序解明とその治療薬開発

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of itching caused by prostaglandin D2 and histamine and its therapeutic drug development

研究代表者

守田 裕希子 (MORITA, Yukiko)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30725669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経成長因子(NGF)存在下において、PC12細胞の神経突起伸張作用に対するプロスタグランジンD2(PGD2)単独刺激、PGD2/ヒスタミン併用刺激の影響、およびこれら刺激に対するエピナスチンの効果を検討した。PGD2は神経突起伸張作用の有意な増加を示したが、ヒスタミンでは作用を認めなかった。PGD2/ヒスタミン併用では、PGD2単独より神経突起伸張細胞率の更なる増加を認めた。PGD2とPGD2/ヒスタミン併用による神経突起伸張細胞率の増加はエピナスチンにより有意に抑制された。エピナスチンはPGD2単独およびPGD2/ヒスタミン併用刺激による神経突起伸張作用促進を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロスタグランジンD2とヒスタミンは相乗作用により、PGD2単独よりもPC12細胞における神経細胞伸張作用を促進することがわかった。また、エピナスチンはPGD2単独およびPGD2/ヒスタミン併用刺激による神経突起伸張作用促進を抑制することが明らかとなり、エピナスチン使用時に掻痒感の自覚症状が速やかに改善しているのは、PGD2に対するエピナスチンの抑制作用が関与している可能性がある。本研究において、かゆみの原因であるPGD2やヒスタミン、その相乗作用が掻痒感の増悪をもたらし、それらをターゲットとした新たな治療薬の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the presence of nerve growth factor (NGF), the effects of prostaglandin D2 (PGD2) stimulation alone, PGD2 / histamine combination stimulation on neurite outgrowth of PC12 cells, and the effect of epinastine on these stimulations were examined. PGD2 showed a significant increase in neurite outgrowth but no effect on histamine. PGD2 / histamine combination further increased neurite outgrowth cell rate than PGD2 alone. The increase of neurite outgrowth rate by PGD2 and PGD2 / histamine combination was significantly suppressed by epinastine. Epinastine was found to suppress the promotion of neurite outgrowth by PGD2 alone and PGD2 / histamine combination stimulation.

研究分野：眼科

キーワード：アレルギー性結膜炎 プロスタグランジンD2 エピナスチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性結膜炎では花粉やダニ、ハウスダストなどを原因抗原とし、I型アレルギー反応が関与している。厚生省アレルギー総合事業疫学調査班の報告(1993年)によると、人口の約15~20%がアレルギー性結膜疾患を有すると推定されており、近年ではさらにアレルギー性結膜疾患を有する患者が増加していると考えられる。アレルギー性結膜炎では、他覚所見として結膜充血、結膜浮腫、自覚症状としては掻痒感を生じる。掻痒感は日常生活の質を著しく損ねる症状であり、いかに掻痒感をコントロールすることができるかということがアレルギー性結膜炎において臨床上の問題点となる。

アレルギー性結膜炎では、涙液中に外界から飛入したアレルゲンが結膜組織中のマスト細胞上の抗原特異的IgE抗体を架橋することで脱顆粒が起こり、ヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーターが結膜局所に遊離される。主にヒスタミンが結膜の血管に作用し結膜充血、血管浮腫を来し、またヒスタミンは三叉神経のC線維の自由終末に存在するヒスタミンH1受容体に結合し、かゆみの原因となる。

I型アレルギー反応での脱顆粒の際には、ヒスタミンと同様、ロイコトリエンやプロスタグランジンD₂(PGD₂)も遊離する。PGD₂のアレルギー炎症における機能については不明な点が多かったが、近年PGD₂はおもに受容体(DP受容体とCRTH2)を介してアレルギー炎症に促進的に働くことが報告されてきた(Science, 2000)。しかしながら、アレルギー性炎症モデルにおいても、血管内皮細胞や知覚神経の一種である三叉神経に対してPGD₂がどのように関与しているかは不明である。

現在、アレルギー性結膜炎に対してはI型アレルギー反応を抑制する抗アレルギー点眼薬による治療が主体となっている。抗アレルギー点眼薬としては、マスト細胞からメディエーター遊離を抑制するメディエーター遊離抑制点眼薬と、マスト細胞から脱顆粒したヒスタミンが血管や神経のヒスタミンH1受容体に結合するのを拮抗するヒスタミンH1受容体拮抗薬とに大別される。抗アレルギー点眼薬でも自覚症状、他覚症状のコントロールが不良な場合も多く、その場合には、ステロイドやシクロスポリン等の免疫抑制薬が必要となるが、これらには感染症の合併、ステロイド緑内障など種々の副作用を引き起こす可能性がある点が問題となる。

現在のところ、アレルギー性結膜炎においてPGD₂あるいはその受容体をターゲットとした治療薬の開発には至っておらず、またヒスタミンとPGD₂の相互作用等についてもいまだ解明されていない。

アレルギー性結膜炎モデルにおいて、PGD₂を介したかゆみの分子メカニズムを解明することにより、既存の治療で改善しないかゆみに対して、新たな治療法になり得るのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

アレルギー性結膜炎は、I型アレルギー反応により、結膜充血、結膜浮腫をきたす。アレルギー性結膜炎の自覚症状である掻痒感は、多くの患者のQOL低下を招いていることが臨床での大きな問題点となっている。現在アレルギー性結膜炎の誘因としてはヒスタミン以外に、プロスタグランジンD₂(PGD₂)が知られているが、アレルギー性結膜炎においてPGD₂の炎症における役割ならびに掻痒感のメカニズムについては、いまだ不明である。我々はPGD₂による炎症に伴う掻痒感の分子メカニズムの解明を行い、アレルギー性結膜炎の炎症に基づいた掻痒感に対する新たな治療薬の開発を行うことを本研究での最終目標とする。

3. 研究の方法

(1)細胞

ラット副腎褐色細胞腫由来のPC12細胞(ATCCより購入)を、10% horse serum、5% fetal bovine serum (Thermo Fischer Scientific Inc.)、100 U/ml penicillin G および 100 µg/ml streptomycin を含むRPMI1640培地(Thermo Fischer Scientific Inc.)で、5% CO₂と95% airの気相下、37℃で継代培養した。実験には継代から2日から3日間培養した細胞を使用した。

(2)神経突起形成の測定

PC12細胞をI型コラーゲンコートされたBioCoat™ Collagen 35mm Dish(コスモ・バイオ株式会社)に3×10⁴ cells/dishで2日間培養した後スターブを行い、50 ng/mL Nerve growth factor-2.5S (NGF, SIGMA-ALDRICH)存在下で、PGD₂(3 µM, Cayman chemical)あるいはヒスタミン(100 µM, SIGMA-ALDRICH)単独あるいは併用で刺激した。エピナスチン塩酸塩(100 µM, 東京化成工業株式会社)はこれら刺激の1時間前に処置した。3日後に3.7%ホルムアルデヒド水溶液で細胞を固定し、位相差顕微鏡を用いて細胞観察を行った。一視野あたり200個以上の細胞をカウントし、全細胞数に対する神経突起が認められた細胞数の割合(神経突起伸長細胞率)を算出し、平均値+標準偏差で示した。

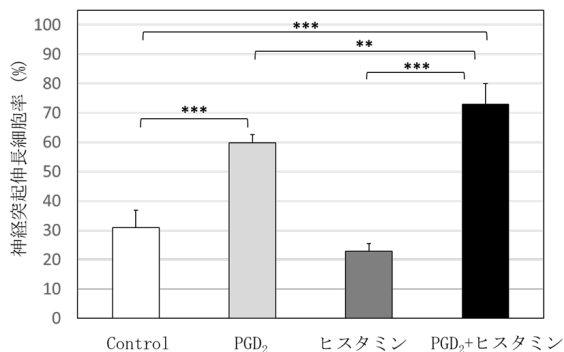
(3)統計学的処理

NGF処置群(control)、PGD₂刺激群、ヒスタミン刺激群およびPGD₂/ヒスタミン併用刺激群の神経突起伸長細胞率について、Tukeyの多重比較検定を行った。また、NGF処置群(control)、PGD₂刺激群およびエピナスチン塩酸塩前処置群の間、NGF処置群(control)、PGD₂/ヒスタミ

ン併用刺激群とエピナスチン塩酸塩前処置群の間で、それぞれ Tukey の多重比較検定を行った。
 $p < 0.05$ のとき統計学的に有意とした。

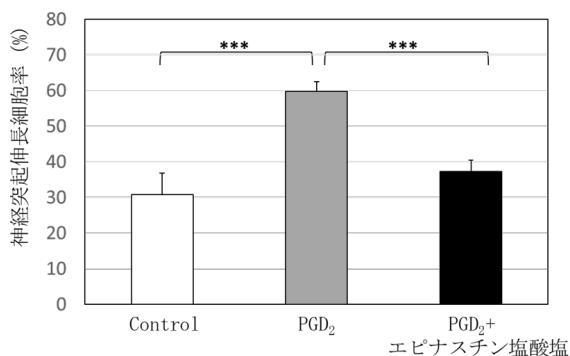
1. 研究成果

(1) PGD₂ 単独刺激、ヒスタミン単独刺激および PGD₂/ヒスタミン併用刺激による神経突起伸長 NGF (50 ng/mL) 存在下での control、PGD₂ 単独 (3 μM)、ヒスタミン単独 (100 μM)、PGD₂/ヒスタミン併用刺激による神経突起伸長細胞率を図 1 に示した。PGD₂ 刺激では control と比較して神経突起伸長細胞率の有意な増加を認めた。一方、ヒスタミン刺激では control と差異を認めなかった。PGD₂/ヒスタミン併用刺激では、control、PGD₂ 刺激あるいはヒスタミン刺激に比べ神経突起伸長細胞率の有意な増加を認めた。



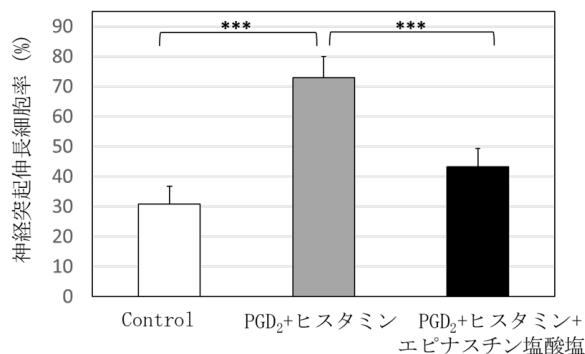
(2) PGD₂ 刺激による神経突起伸長におけるエピナスチン塩酸塩の抑制効果

NGF (50 ng/mL) 存在下での PGD₂ (3 μM) 刺激による神経突起伸長細胞率の増加に対するエピナスチン塩酸塩 (100 μM) の抑制効果を図 2 に示した。PGD₂ 刺激により control と比較して有意に増加した細胞突起伸長細胞率は、エピナスチン塩酸塩前処置により有意に低値を示し、エピナスチン塩酸塩は PGD₂ による神経突起伸長を抑制することが明らかとなった。



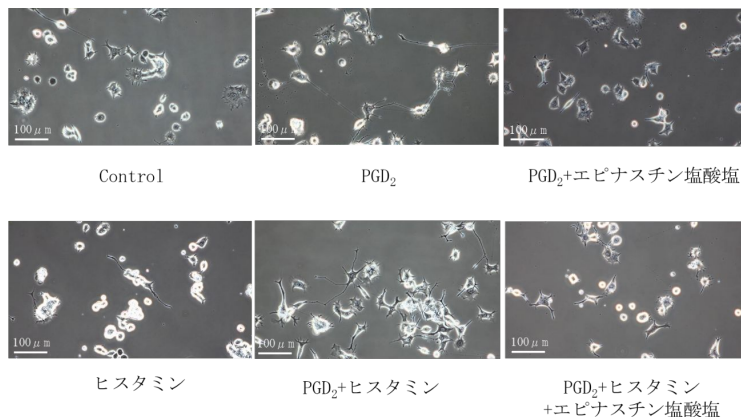
(3) PGD₂/ヒスタミン併用刺激による神経突起伸長におけるエピナスチン塩酸塩の抑制効果

NGF (50 ng/mL) 存在下での PGD₂ (3 μM) /ヒスタミン (100 μM) 併用刺激による神経突起伸長細胞率の増加に対するエピナスチン塩酸塩 (100 μM) の抑制効果を図 3 に示した。PGD₂/ヒスタミン併用刺激により control と比較して細胞突起伸長細胞率は有意に増加した。PGD₂/ヒスタミン併用刺激による神経突起伸長細胞率の増加は、エピナスチン塩酸塩前処置により有意に低値を示し、エピナスチン塩酸塩は PGD₂/ヒスタミン併用刺激による神経突起伸長作用を抑制することが明らかとなった。



(4) 各種刺激による PC12 細胞の形態変化 (NGF 存在下)

神経突起伸長に対する control (50 ng/mL NGF 単独群)、PGD₂ (3 μM) 刺激群、ヒスタミン (100 μM) 刺激群、PGD₂/ヒスタミン併用刺激群、エピナスチン塩酸塩 (100 μM) 前処置後 PGD₂ 刺激群およびエピナスチン塩酸塩前処置後 PGD₂/ヒスタミン併用刺激群の培養 3 日後の細胞形態を図 4 に示した。PGD₂ 刺激により神経細胞突起の伸長が認められ、ヒスタミン刺激では何ら変化を認めなかった。PGD₂ とヒスタミンを併用刺激することにより PGD₂ 単独刺



激よりもさらに伸長が増強された。また、エピナスチン塩酸塩の前処置は PGD₂ および PGD₂ / ヒスタミン併用刺激による神経突起伸長を抑制した。

本研究により、PGD₂ は NGF 存在下において神経突起の伸長促進作用を示すことが明らかになった。PGD₂ 代謝物の 15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ が NGF 存在下で神経突起伸長作用を有すること、15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ による作用には PGD₂ 受容体である CRTH2 が関与していることが報告されており、今回認められた PGD₂ による神経突起伸長作用は同様の機序で生じていると考えられた。本検討ではさらに、PGD₂ による神経突起の伸長促進作用がヒスタミン共存により増強されることが明らかとなった。モルモットから単離培養した三叉神経節細胞にヒスタミンあるいは PGD₂ を作用させると、単独で観察される神経細胞の活動電位の変化が併用により増強されると報告されている。今回の結果においても併用による神経突起伸長の増強が確認されたことから、PGD₂ とヒスタミンは何らかの作用機序を介して互いに神経細胞の活性化を増強し、アレルギー疾患の症状発現および増悪に重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究において、エピナスチン塩酸塩は PGD₂ による神経細胞突起伸長を有意に抑制した。エピナスチン塩酸塩点眼液は PGD₂ によるモルモットの眼引っ掻き行動を抑制することが既に報告されている。今回の試験結果はこの *in vivo* 結果と一致しており、エピナスチン塩酸塩が PGD₂ に対し抑制作用を有することが確認された。結果は提示していないが NGF 単独作用時に認められる神経突起伸長をエピナスチン塩酸塩は抑制しなかった。この結果もエピナスチン塩酸塩が PGD₂ に対して抑制作用を示すことを裏付けるものと考えられる。なお、本抑制作用におけるエピナスチン塩酸塩の作用機序については更なる詳細な検討が必要である。

今回、PGD₂ とヒスタミンの併用により、神経細胞の伸長に対して相乗作用が認められたことから、痒みの過敏反応においても PGD₂ とヒスタミンが何らかの相互作用を果たしている可能性が示唆された。アレルギー性結膜炎における神経線維伸長の関わりは十分に解明されていないが、ヒスタミンを点眼したときの結膜の過敏性は健康人に比してアレルギー性結膜炎患者で亢進しているとの報告がある。この結膜過敏反応には、PGD₂ による神経細胞のヒスタミン感受性増加に加えて、本検討で観察された神経突起伸長の増強が関与しているかもしれない。Mizoguchi らは、花粉症患者の初期療法においてエピナスチン塩酸塩点眼液がオロパタジン塩酸塩点眼液よりも自覚症状スコアを有意に低減させると報告している。エピナスチン塩酸塩点眼液の初期療法における自覚症状に対する優れた有効性は、PGD₂ に対する抑制作用が部分的に関与しているのかもしれない。

PGD₂ は NGF 存在下において神経突起の伸長促進を示し、その作用はヒスタミンとの併用により増強することが明らかとなった。また、エピナスチン塩酸塩は、PGD₂ 単独およびヒスタミン併用により増強された神経突起の伸長促進を抑制することが明らかになり、これらの作用がエピナスチン塩酸塩の抗アレルギー作用の一部を担っていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

太田 真実, 鈴木 克佳, 寺西 慎一郎, 白石 理江, 岩本 菜奈子, 能美 なな実, 徳久 佳代子, 守田 裕希子, 木村 和博: プロスタグランジン関連薬使用中の緑内障患者における上眼瞼溝深化の形状測定. 臨床眼科 73(1): 87-93, 2019. 査読有

DOI: <https://doi.org/10.11477/mf.1410213022>

守田 裕希子, 山田 直之, 西本 綾奈, 長野 敬, 中村 雅胤, 木村 和博: プロスタグランジン D2 単独刺激およびプロスタグランジン D2/ヒスタミン併用刺激による神経突起伸長に対するエピナスチン塩酸塩の抑制効果. アレルギー・免疫 25(11): 1466-1471, 2018. 査読有

DOI: <https://doi.org/10.20837/32018111466>

小林 由佳, 山田 直之, 岩本 菜奈子, 守田 裕希子, 園田 康平, 木村 和博: 広範な感染性角膜潰瘍に対して通常の深層層状角膜移植 (DALK) に三日月状の DALK を併施した1例. 臨床眼科 72(1): 91-99, 2018. 査読有

DOI: <https://doi.org/10.11477/mf.1410212567>

木村 和博, 守田 裕希子, 折田 朋子, 藤津 揚一朗, 小賀 厚徳: 眼窩原発 Merkel 細胞癌の1例. 日本眼科学会雑誌 121(12): 930-935, 2017. 査読有.

〔学会発表〕(計20件)

守田 裕希子, 富永 和花, 長谷川 実茄, 太田 真実, 山田 直之: 輪部に達する感染性角膜炎に対して治療的角膜移植の術式を工夫した2例. 角膜カンファランス 2019, 京都府 (ウェスティン都ホテル京都), 2019/02/07

吉本 拓矢, 富永 和花, 西本 綾奈, 芳川 里奈, 守田 裕希子, 山田 直之, 柳井 亮二, 木村 和博: 角膜混濁を伴う網膜剥離に対する PKP と硝子体の同時手術. 第132回山口県眼科医会秋季総会並びに集談会, 山口県 (翠山荘), 2018/11/18

植村 愛子, 守田 裕希子, 長谷川 実茄, 太田 真実, 山田 直之, 木村 和博: 糖尿

病動物モデルにおけるフィブロンectin部分ペプチド PHSRN 点眼の角膜上皮欠損治癒促進効果。第 132 回山口県眼科医会秋季総会並びに集談会，山口県（翠山荘），2018/11/18
山田 直之，富永 和花，長谷川 実茄，太田 真実，小林 由佳，守田 裕希子，木村 和博：当院における感染性角膜炎に対する治療的角膜移植の術式の種類とその適応。第 66 回山口眼科手術懇話会，山口県（霜仁会館），2018/11/10
西本 綾奈，富永 和花，吉本 拓矢，守田 裕希子，山田 直之，木村 和博：無虹彩症に水疱性角膜症を合併した症例に対して全層角膜移植術が有用であった一例。第 72 回日本臨床眼科学会，東京都（東京国際フォーラム），2018/10/13
富永 和花，吉本 拓矢，西本 綾奈，守田 裕希子，山田 直之，木村 和博：新規術式「PKP+partica LKP」の適応について。第 56 回六大学合同眼科研究会，福岡県（九州大学），2018/09/08
守田 裕希子：感染性角膜炎 手術する？しない？。第 1 回 CGC，山口県，2018/03/03
守田 裕希子，山田 直之，吉本 拓矢，徳田 和央，木村 和博：Prostaglandin D2 による神経細胞活性化に対する Epinastine の抑制作用。角膜カンファランス 2018，広島県（広島プリンスホテル），2018/02/15
小林 由佳，守田 裕希子，藤津 揚一朗，山田 直之，木村 和博：ムンプスによる角膜内皮炎の一例。角膜カンファランス 2018，広島県（広島プリンスホテル），2018/02/15
長谷川 実茄，柳井 亮二，山田 直之，守田 裕希子，東島 史明，木村 和博：レンズケース汚染が原因と考えられたオルソケラトロジー関連アカントアメーバ角膜炎。角膜カンファランス 2018，広島県（広島プリンスホテル），2018/02/15
東島 史明，守田 裕希子，山田 直之，木村 和博：新たに考案したマッシュルーム型全層角膜移植術を施行した 2 症例。角膜カンファランス 2018，広島県（広島プリンスホテル），2018/02/15
吉本 拓矢，守田 裕希子，折田 朋子，寺西 慎一郎，山田 直之，柳井 亮二，木村 和博：全層角膜移植術と硝子体手術を併施した症例。第 56 回日本網膜硝子体学会総会，東京都（東京国際フォーラム），2017/12/02
山田 直之，東島 史明，吉本 拓矢，守田 裕希子，木村 和博：Excel を用いた感染性角膜炎の原因微生物診断シートの作成と使用経験。第 130 回山口県眼科医会秋季総会並びに集談会，山口県（翠山荘），2017/11/19
永井 智彦，寺西 慎一郎，野田 健，播磨 希，守田 裕希子，山田 直之，鈴木 克佳，木村 和博：難治性モーレン角膜潰瘍に対しチューブシャント手術併用強角膜移植を再施行した一例。第 64 回山口眼科手術懇話会，山口県（霜仁会館），2017/10/26
吉本 拓矢，守田 裕希子，寺西 慎一郎，山田 直之，柳井 亮二，木村 和博：山口大学における角膜移植眼に対する硝子体手術の成績。第 64 回山口眼科手術懇話会，山口県（霜仁会館），2017/10/26
守田 裕希子，東島 史明，山田 直之，木村 和博：全層角膜移植後の感染性角膜炎の臨床像。第 71 回日本臨床眼科学会，東京都（東京国際フォーラム），2017/10/12
東島 史明，守田 裕希子，山田 直之，木村 和博：新たに考案したマッシュルーム型全層角膜移植術を施行した一例。第 55 回六大学合同眼科研究会，福岡県（九州大学），2017/09/09
小林 由佳，守田 裕希子，藤津 揚一朗，山田 直之，木村 和博：ムンプスによる角膜内皮炎の一例。第 129 回山口県眼科医会春季総会及び集談会，山口県（翠山荘），2017/05/28
内 翔平，森 賢一郎，小林 正明，波多野 誠，守田 裕希子，山田 直之，柳井 亮二，中野 聡子，外丸 靖浩，高瀬 博，杉田 直，清水 則夫，木村 和博：山口大学における眼感染症網羅的 PCR システムの有用性の検討。第 121 回日本眼科学会総会，東京（東京国際フォーラム），2017/04/07
寺西 慎一郎，徳田 和央，徳久 佳代子，白石 理江，守田 裕希子，徳田 信子，山田 直之，鈴木 克佳，木村 和博：点眼防腐剤によるテノン嚢線維芽細胞の角膜上皮細胞との共培養時における上皮間葉転換。第 121 回日本眼科学会総会，東京都（東京国際フォーラム），2017/04/06

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。