

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06772

研究課題名(和文) 疾患の司令塔、肥満細胞が放つ新たなシトクロムP450代謝抑制とその仕組みの解明

研究課題名(英文) Mast cell-regulated cytochrome P450 metabolism and its mechanism in allergic diseases

研究代表者

谷野 公俊 (TANINO, TADATOSHI)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：90236703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満細胞欠損マウスで 型アレルギー誘発による薬物体内動態変動を引き起こすメカニズム解明を試みた。その結果、アレルギー疾患の司令塔、肥満細胞が放出する一酸化窒素が、肝の薬物代謝酵素シトクロムP450 (CYP) 1A2, 2C, 2E1と3Aを不可逆的に阻害したが、CYP2D6代謝はまったく影響されなかった。このことが、in vivo実験で肝代謝律速型薬物の体内消失を遅延させることが判明した。さらに、血中一酸化窒素濃度の上昇が急性期や慢性期のアレルギー疾患による薬物動態変動を予測できる生体内マーカーに利用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎、気管支喘息や花粉症のアレルギー疾患を罹患した患者は世界的に多く、生活習慣病という認識が強くなってきており、日本国民では全人口の50%を超えている。これまでに急性や慢性アレルギー疾患(Th2優位)での薬物動態変動や動態予測に関する報告は、ほとんどない。本研究は世界に先駆け、急性型アレルギー疾患が不可逆的に薬物動態変化させることを見出し、さらに慢性アレルギー疾患で体内動態予測するとき、血中一酸化窒素が生体内マーカーに利用できると考えられる。今回、ニワトリ卵白アルブミンによる型アレルギー発症に関する研究であるが、他のアレルギーでも薬物消失の遅延が起こることを警告する。

研究成果の概要(英文)：Immunoglobulin (Ig) E-sensitized mast cells elicit sustained nitric oxide (NO) production. We investigated the participation of mast cell-released NO and cytokine-derived iNOS activation in type 1 allergy-suppressed hepatic cytochrome P450 (CYP) metabolism. Our data suggest that mast cell-released NO participates in type 1 allergy-suppressed CYP1A2, CYP2C, CYP2E1, and CYP3A metabolism.

Our data also showed that the onset of IgE-mediated allergy alters the pharmacokinetics of major P450-metabolic capacity-limited drugs except for CYP2D6 drugs.

研究分野：薬物動態学

キーワード：アレルギー 薬物動態 薬物代謝 一酸化窒素 肥満細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬物-病態相互作用機序には、“サイトカイン依存的経路”が定説となっている。リポポリサッカライドで惹起される急性肝炎動物(Th1 優位な疾患)では、クッパー細胞がサイトカイン依存的な相互作用で中心的な役割を担っている。培養細胞系では、一酸化窒素依存的な薬物相互作用を報告する研究グループがいるが、いまだに疾患モデル動物での立証に至っていない。“一酸化窒素依存的経路”の相互作用では、クッパー細胞、肥満細胞または肝細胞周辺に僅かに発現する誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)を誘導しなければならない。

先進国で増加の一途をたどるアレルギー疾患の画一的な治療を目指す私たちの研究グループは疾患モデルマウスで、シトクロム P450 (CYP) やフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)の遺伝子発現とタンパク発現に影響を与えず、転写後に低下する代謝能が薬物消失を大きく遅延させる『まったく新しい薬物-病態相互作用:一酸化窒素依存性経路』を発見している(Tanino et al., Drug Metab, Dispos., 2016, 2017)。急性肝炎に関する研究では、サイトカインが介入する CYP 活性抑制は、mRNS やタンパク発現量を劇的に低下させる。これまでに Th2 優位な疾患に関する薬物動態学研究が十分に行われていないため、我々の発見は、相互作用回避や好んで健康補助食品を併用するアレルギー疾患患者や社会ストレス併発患者の重篤な副作用回避に一翼を担える。

### 2. 研究の目的

本研究では、私たちの発見を発展させ、I 型アレルギー発症肥満細胞欠損マウスを用い、アレルギー発症・悪化に大きく寄与する顆粒球の肥満細胞が連続産生できる一酸化窒素(NO)による新たな薬物-病態相互作用の分子的な機序を探求する。また、アレルギー疾患時での薬物動態変動を予測できる生体内マーカーを見出す。

### 3. 研究の方法

a) 感作は、ニワトリ卵白アルブミンを雌性 ICR マウスと肥満細胞欠損マウス(WBB6F1/Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup> (-/-))の腹部(初感作)に投与し、その後8日目に静脈内に投与(再感作)した。I 型アレルギー誘発を確認するために、血中 IgE 濃度を測定した。選択的に iNOS を阻害するアミノグアニジン(AG)または非特異的 NO 合成酵素阻害剤 N-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル(L-NAME)を初感作後2日目から腹腔内に1日回、連続投与した。初感作後7日目および再感作後7日目の肝臓を採取し、肝ミクロソームを作製した。肝ミクロソーム中の CYP1A2, 2C, 2D6, 2E1 と 3A および FMO (1 と 3) 活性は特異的なプローブを用い、NADPH 共存下で評価した。生成された代謝物は、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)で定量した。血中総 NO (NO<sub>x</sub>) 濃度は市販キットで測定した。

b) ICR マウスと肥満細胞欠損マウスに初感作と再感作後、肝組織内サイトカイン(TNF-alpha, IL-1beta, IFN-gamma)、F4/80 細胞陽性細胞(kupffer/macrophage 等)と NO 合成酵素(iNOS と eNOS)発現は real time-PCR で調べた。

c) ICR マウスに初感作と再感作後、単離した肝細胞および肝 9000xg 中の総 NOS 活性を測定した。同時に、肝組織内に局在する肥満細胞(c-kit)は、real-time PCR で調べた。

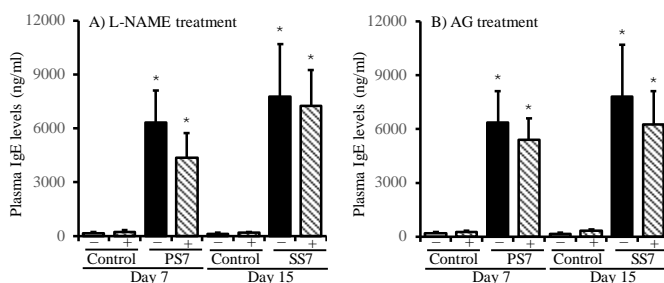
d) 肝代謝律速型および肝血流律速型薬物を感作 ICR マウスに尾静脈内投与したのち、薬物の血中濃度を HPLC 分析した。

e) 慢性感作は、ニワトリ卵白アルブミンを雌性 ICR マウス腹部に7日毎に投与した。I 型アレルギー誘発は、血中 IgE 濃度上昇を指標にした。感作後7日毎に肝臓を採取し、作製した肝ミクロソーム中の CYP1A2, 2C, 2D6, 2E1 と 3A 活性は特異的なプローブを用い、NADPH 共存下で評価した。生成された代謝物は、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)で定量した。血中 NO<sub>x</sub> 濃度は市販キットで測定した。

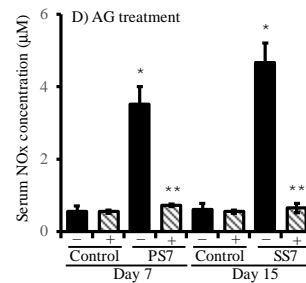
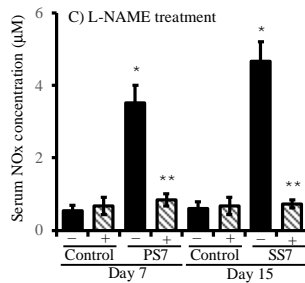
### 4. 研究成果

a) AG および L-NAME を投与した感作 ICR マウスの血中 NO 濃度変化

NOS 阻害剤(AG と L-NAME)を感作後に連続投与しても、高い血中 IgE 濃度が得られた(右図 A と B)。このことは、Th2 介在の免疫応答が正常に機能すると示された。しかし AG と L-NAME は、血清中総 NO (NO<sub>x</sub>)

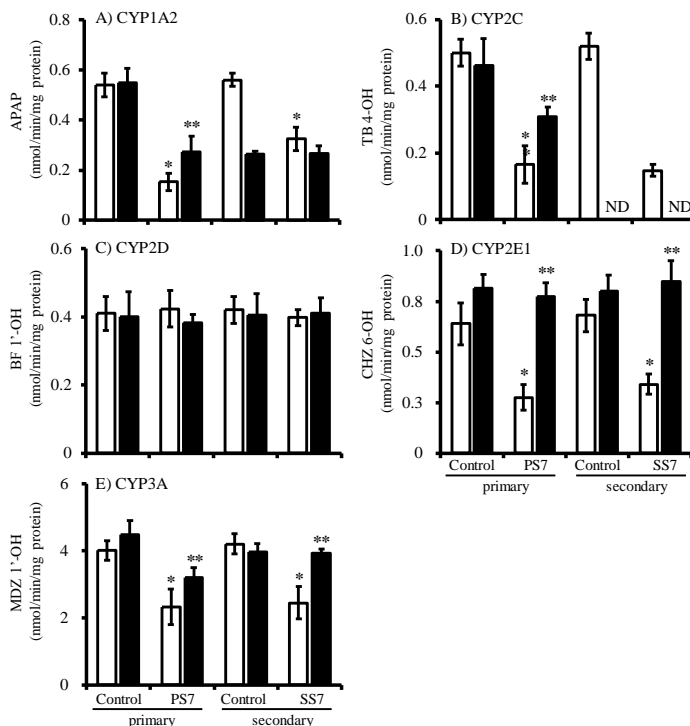


濃度を劇的に抑制した。非特異的な L-NAME による血清中 NO 濃度抑制効果は、特異的な AG の効果とよく一致（右図 C と D）したことから、初感作（PS7）および再感作（SS7）では誘導型 iNOS が活性化されたのち、血中に NO が放出されることが示された。



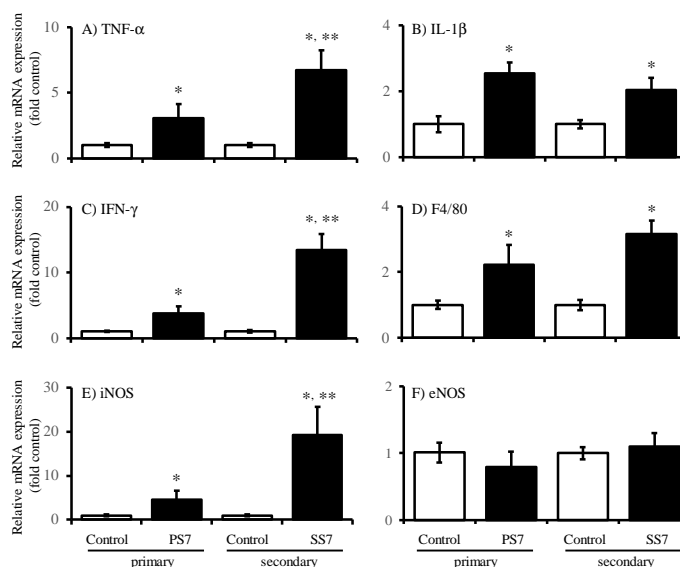
**b) AG 処理した感作 ICR マウスの肝 CYP 活性変化**

AG 処理された初感作（PS7）および再感作（SS7）マウスの肝 CYP 分子種活性を測定した。その結果、PS7 で AG は、CYP2E1 活性をほぼ完全にコントロールレベルまで回復させ（右図 D）また CYP1A2, 2C と 3A 活性は有意に回復した（右図 A, B と E）。SS7 では、AG は CYP1A2 と CYP2C 活性回復を大きく阻んだ（右図 A と B）が、CYP2E1 と 3A 活性は、完全に回復させた（右図 D と E）。CYP2D6 は、初感作や再感作で活性を全く抑制されなかった（右図 C）。これは、酵素の分子構造が他の CYP と大きく異なるのが原因であると考えられる。



**c) 感作による ICR マウス肝組織内サイトカイン、iNOS、eNOS と F4/80 陽性細胞の発現変化**

初感作 PS7 と再感作 SS7 は、肝組織内 TNF-alpha と IFN-gamma の mRNA 発現量を 5 倍～10 倍有意に高めた（右図 A と C）。これに対して、IL-1beta と F4/80 陽性細胞（kupffer 細胞等）発現は約 2 倍程度の上昇であった（右図 B と D）。肝臓に局在する NOS 発現量を調べると、iNOS が 5 倍～20 倍と劇的に増加することが示された（右図 E）。eNOS は、mRNA レベルで変化は全く認められなかった（右図 F）。



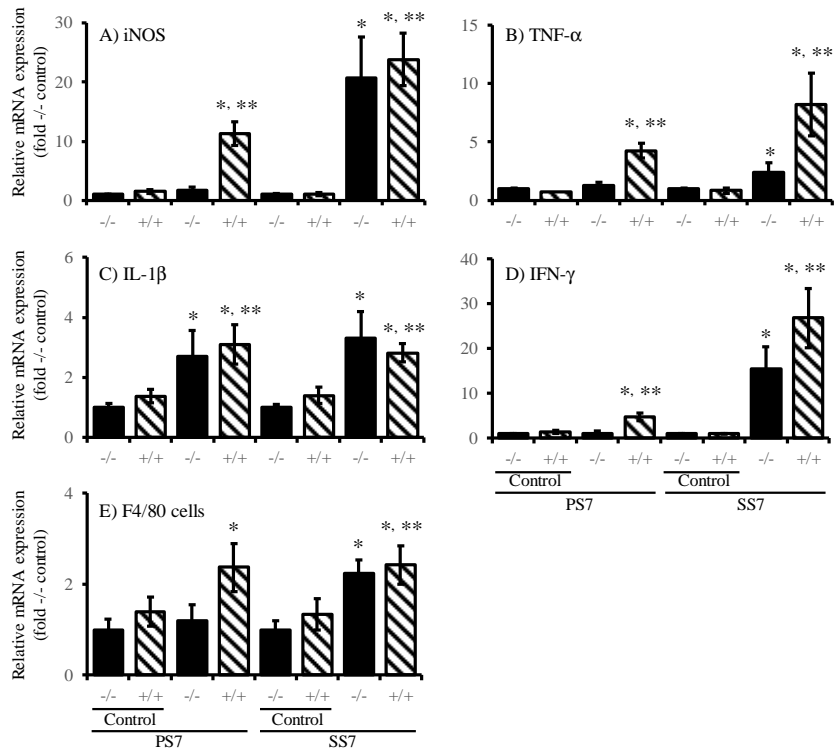
**d) 感作した肥満細胞欠損マウスの血中 IgE と NOx 濃度変化**

肥満細胞欠損マウスを初感作および再感作すると、ICR マウスと同様に血中 IgE 濃度の上昇が確認された。

感作した肥満細胞欠損マウスの血清中 NOx 濃度は、ICR マウスのコントロールレベルと同程度であった。このことから、血中 NOx 上昇に、肥満細胞が関与していると考えられた。

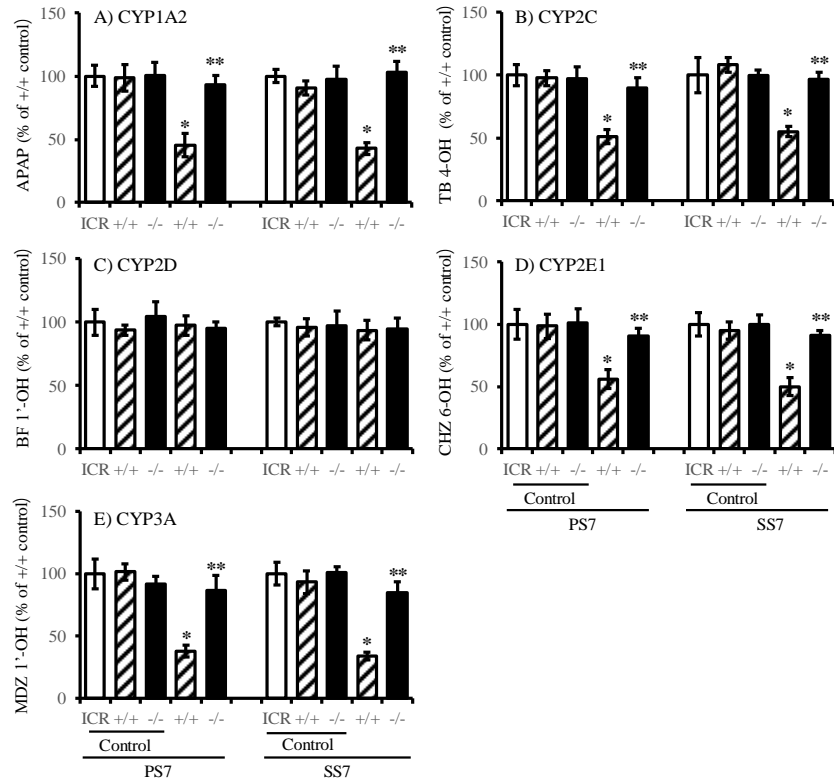
e) 感作による肥満細胞欠損マウス肝組織内サイトカイン、NOS と F4/80 陽性細胞の発現変化

肥満細胞欠損マウスを再感作すると、iNOS、TNF-alpha と IFN-gamma の mRNA 発現量が有意に上昇した(右図 A, B と D)。しかし、TNF-alpha と IFN-gamma の発現量上昇は、野生型(+/+)のそれぞれの値と比べ、かなり低値であった(右図 B と D)。IL-1beta と F4/80 陽性細胞の発現は感作した欠損マウス(PS7 と SS7)で約2倍上昇した程度であった(右図 C と E)。



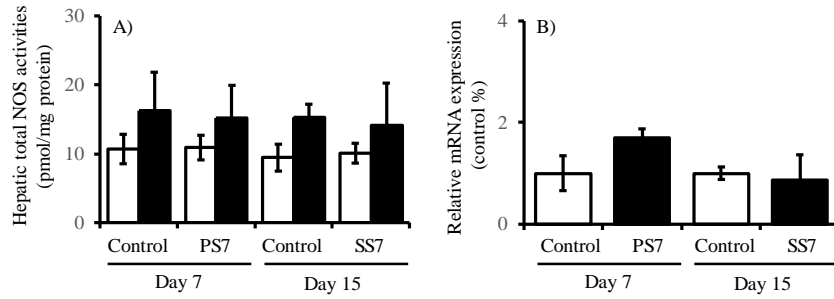
f) 感作による肥満細胞欠損マウス肝 CYP 活性変化

初感作および再感作 ICR と欠損マウスの野生型(+/+)マウスでは、肝 CYP1A2、2C、2E1 と 3A 活性を強く抑制した。これまでの研究では、CYP 活性の低下はタンパク質発現量の抑制でないことが示された。一方、肥満細胞欠損(-/-)マウスでは型アレルギー感作後、4つの CYP 分子種の活性は抑制されなかった。これらの結果より、疾患を司る肥満細胞が肝の薬物代謝酵素機能に影響を与えることが示された。



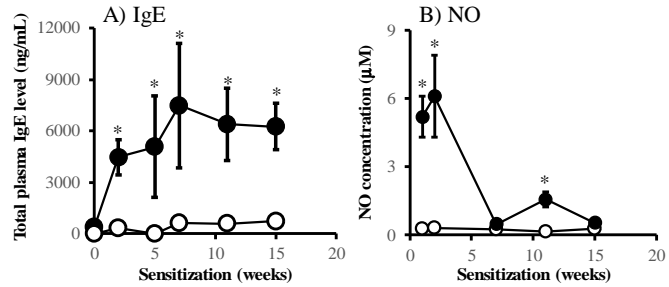
g) 感作 ICR マウスの肝組織内総 NOS 活性と肥満細胞 (c-kit) 発現:

肝臓 9000 × g 上澄中と単離した肝細胞内の NOS 活性を測定した。先の mRNA 発現量変動の結果と異なり、初感作と再感作は、肝組織内の NOS (iNOS と eNOS) 活性に影響を与えなかった(下図 A)。またニワトリ卵白アルブミンによる感作(PS7 と SS7)は、肝組織内に局在する肥満細胞 mRNA 発現量を変動させなかった(下図 B)。

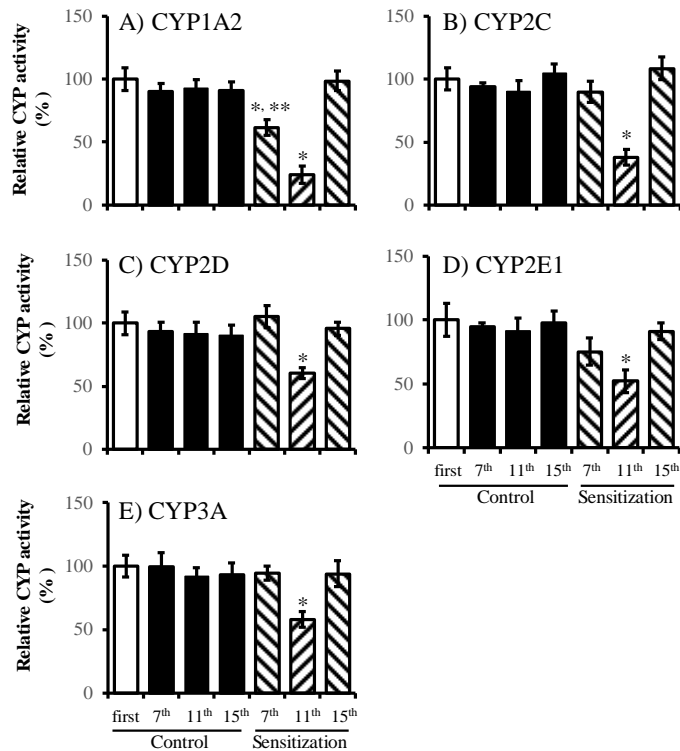


h) 慢性感作による肝 CYP 活性変動と生体内マーカー

15 週間感作すると、血中 IgE レベルはほぼ一定値を維持した(右図 A) が、血中 NO 濃度が大きく変動(低下)することが示された(右図 B)。



慢性アレルギー発症時の主な肝 CYP 分子種の活性を評価した。その結果、11 週目に有意な抑制が見られた(右図)。そこで血中 NO レベルを調べると、11 週に上昇していることが分かった。ここには示していないが、CYP1A2、2C、2D6、2C と 3A のタンパク質発現量は、すべての感作期間で抑制されなかった。



以上のことから、ニワトリ卵白アルブミンで雌性 ICR マウス肝臓の薬物代謝酵素 CYP 分子種 (1A2, 2C, 2E1 と 3A) 活性を抑制するメカニズムを調べた結果、活性化された肥満細胞(司令塔)から連続放出される NO が循環血から速やかに肝臓に移行し、4 種の CYP 分子種や FMO3 がニトロソ化修飾される経路が明らかになった (Tanino et al., *Biochem. Pharm.*, 158:318-326(2018))。しかし 15 週間連続感作させても、CYP2D6 や FMO1 分子種のニトロソ化修飾は観察されなかった。慢性アレルギー疾患も含めた I 型アレルギーで肝代謝律速型薬物の体内動態変動予測には、疾患司令塔が産生する生体内マーカーの NO が利用できることを見出すことができた (Tanino et al., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 44:379-387(2019))。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanino T., Bando T., Okada Y., Nojiri Y., Hashimoto K., Ueda Y., Sakurai E	4. 巻 44
2. 論文標題 Hepatic cytochrome P450 activity and nitric oxide production during multiple ovalbumin challenges	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.	6. 最初と最後の頁 379-387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13318-018-0527-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tanino T., Bando T., Nojiri Y., Okada Y., Nagai N., Ueda Y., Sakurai E	4. 巻 158
2. 論文標題 Hepatic cytochrome P450 metabolism suppressed by mast cells in type 1 allergic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 318-326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2018.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本可那子、谷野公俊、板東 徹、岡田祐奈、野尻幸江、上田ゆかり、櫻井栄一
2. 発表標題 アレルギー疾患の慢性化によるシトクロムP450代謝能への影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野尻幸江、谷野公俊、板東 徹、岡田祐奈、上田ゆかり、櫻井栄一
2. 発表標題 I型アレルギー産生一酸化窒素によるシトクロムP450代謝抑制への肥満細胞の関与
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------