

平成21年4月1日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590246
 研究課題名（和文） アレルギーにおけるプロスタノイドの役割

研究課題名（英文） The Roles of Prostanoid in Allergy

研究代表者

松岡 俊行 (MATSUOKA TOSHIYUKI)
 京都大学・医学研究科・特定准教授
 研究者番号：30397541

研究成果の概要：アレルギー病態におけるプロスタノイドの作用について、平成19年度は、気道上皮細胞を用いた解析を行い、サイトカイン刺激によるCCL17産生が、EP3作用薬により抑制されることを明らかとした。平成20年度は、アレルギー性結膜炎モデルを用いた解析を行い、EP3作用薬が結膜上皮に発現しているEP3受容体に作用しケモカイン産生等を抑制することでアレルギー炎症を抑制することを明らかとした。これらの結果は、EP3作用薬のアレルギー治療薬としての可能性を示唆するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：アレルギー・炎症・免疫

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息、アトピー性皮膚炎あるいはアレルギー性鼻炎、結膜炎等のアレルギー性疾患は、難治性で、その罹患率が近年増加の一途を辿っており、現代社会において重大な問題となっている。アレルギー性疾患の発症機序は、I型アレルギー反応が主体と考えられている。一連の反応は、まず局所における抗原感作により、抗原提示細胞からTh2型リンパ球、B細胞へと反応が伝わり、アレルゲン特異的IgEが産生される。いったん感作が成立すると、アレルゲン特異的IgEは、肥満

細胞上にFcレセプターを介して結合し、アレルゲンへの再暴露により架橋され、肥満細胞活性化の引き金となる。その際に、肥満細胞より放出されるヒスタミン等のケミカルメディエーターは、局所の炎症性浮腫、充血、かゆみ等を引き起こし、即時相のアレルギー炎症を特徴づけるものである。更に、抗原暴露8-24時間後の遅発相においては、局所への好酸球を中心とした炎症細胞の浸潤を伴う反応が生じる。このように免疫学の進歩と共にアレルギーの病態に関する理解は大いに進んできたが、いまだアレルギー制御に至

る十分な治療薬はなく、さらに詳細な病態の解析が必要とされている。

申請者らは、炎症と関わりの深いプロスタノイドについて、主として受容体欠損マウスの解析を中心に、各種病態モデルを用いて研究を行ってきた(Narumiya S and FitzGerald GA, Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 108:25-30, 2001)。プロスタノイドは、プロスタグランジン(PG)およびトロンボキサン(TX)からなる生理活性物質であり、PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}、PGI₂、TXA₂がある。それぞれに対する特異的な受容体として、DP、EP (EP1, EP2, EP3, EP4)、FP、IP、TPが知られている。いずれも7回膜貫通型のG蛋白質共役型受容体であり、創薬のターゲットとして有望なものである。

申請者らは、アレルギー疾患が炎症性疾患であることから、プロスタノイドがその病態において何らかの影響を及ぼす可能性について検討を行った。PGD₂は、I型アレルギー反応において肥満細胞が脱顆粒を生じるときに大量に放出されることがよく知られていた。そこで、まず、DP受容体欠損マウスを作製し、これらを用いてマウスアレルギー喘息モデルにて検討を行った。野生型マウスを卵白アルブミンの腹腔内投与により感作した後、気道への抗原暴露を行うと、好酸球を中心とした肺への炎症細胞浸潤、気道粘液産生増加、気道過敏性亢進などの気管支喘息特有の病態が誘発される。しかし、DP欠損マウスでは、これらの気管支喘息に特徴的な所見が著明に低下していた。これらの知見をもとに、PGD₂がその受容体であるDP受容体を介してアレルギー反応の増悪因子として作用することを発表した(Matsuoka T et al., Prostaglandin D₂ as a mediator of allergic asthma, *Science* 287: 2013-2017, 2000)。

一方、プロスタノイドの合成阻害薬である非ステロイド性抗炎症薬は、アレルギー喘息に対して無効であり、場合によっては悪化させることがあることが知られている。我々は、この現象に注目し、抗アレルギー作用をもつプロスタノイドおよびその受容体の存在について検索を行った。マウスアレルギー喘息モデルを用いた解析の結果、EP3欠損マウスにおいて喘息病態が悪化することが判明し、PGE₂がEP3受容体に作用して、内因性的アレルギー反応抑制物質として働くことが明らかとなった。さらに、EP3受容体作用薬を外来性に投与することにより、アレルギー反応を抑制することが可能であることを明らかにした(Kunikata T et al., Suppression of

allergic inflammation by the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature Immunology* 6: 524-531, 2005)。このように、マウスアレルギー喘息モデルを用いた解析から、DPおよびEP3受容体は、創薬のターゲットとして期待できることが明らかになった。

これらの事実から、申請者らは、プロスタノイドが気道上皮に存在する受容体を介して、そのサイトカインやケモカインの放出能を制御している可能性を考えた。この発想は、きわめて独創的なものであり、もし証明されれば、上皮細胞のアレルギー病態における、新たな主役としての位置を確立するものとなると考えられる。本研究では、上皮細胞を用いた解析を中心として、プロスタノイドのアレルギー病態における役割について検討を行う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「アレルギーの病態におけるプロスタノイドの役割の解明と、その受容体の新しいアレルギー治療薬の標的としての妥当性の評価」である。プロスタノイド受容体欠損マウス、およびプロスタノイド受容体選択的作用薬を用いて、アレルギー病態におけるプロスタノイドの作用機序について、詳細に解析することにより、その受容体の新しいアレルギー治療薬の標的としての妥当性の評価を行いたい。

アレルギー病態における上皮の役割を解明することは、新しいアレルギー治療薬の開発につながる可能性が高いと考える。

3. 研究の方法

プロスタノイドが気道上皮に存在する受容体を介して、そのサイトカインやケモカインの放出能を制御している可能性について、気道上皮細胞 cell line(A549 cell)を用いて検討を行った。

アレルギー喘息以外のアレルギー病態におけるプロスタノイドの関与を検討するため、マウスにおける結膜炎モデル・鼻炎モデルを立ち上げ検討した。

4. 研究成果

EP3作用薬が気道上皮細胞に作用し、上皮細胞からのケモカイン産生を抑制することにより、アレルギー喘息抑制効果を発揮する可能性について、Th2サイトカイン刺激によって引き起こされるケモカイン産生能を指標として、EP3作用薬のケモカイン産生抑制

効果について検討を行った。サイトカイン刺激は文献的に使用されている TNF-alpha (50ng/ml)およびIL-4(10ng/ml)の組み合わせを用い、刺激の15分前にEP3作用薬もしくはvehicleを処置した条件下で、刺激48時間後におけるCCL17産生について検討を行った。EP3作用薬は、濃度依存的にCCL17産生を抑制した。

我々はこれまで、EP3作用薬がマウス喘息モデルにおいて、CCL11やCCL17等のケモカインの産生、およびそれに付随した炎症性細胞の浸潤に対し、抑制効果を有することを明らかにしてきた。このことはEP3作用薬のアレルギー喘息における治療薬としての可能性を示唆するとともに、同様のメカニズムで発症すると考えられている他のアレルギー疾患に関しても、EP3作用薬は治療効果を発揮しうることも示唆するものである。そこで、他のアレルギー性疾患として、アレルギー性鼻炎、および、アレルギー性結膜炎に注目し、マウスを用いたこれらの疾患モデルの確立を行い、EP3作用薬の有効性について検討した。

アレルギー性鼻炎は、マウスに卵白アルブミンを抗原として腹腔内投与する事により免疫感作を行い、抗原溶液を点鼻することによりチャレンジを行い、顔掻き回数や、くしゃみ回数、および鼻組織の炎症像を用いて評価を行なった。野生型マウスとEP3受容体遺伝子欠損マウスとの間で比較検討では、いずれの指標においてもEP3受容体遺伝子欠損マウスにおいて、野生型マウスと比較し、増加傾向が認められた。

アレルギー性結膜炎モデルは、ブタクサを抗原として足底皮下注により免疫感作を行い、抗原溶液を点眼することによりチャレンジを行い、結膜組織中の好酸球数を用いて評価を行なった。EP3欠損により病態が増悪すること、および、EP3アゴニスト局所投与による有効性を確認した。また、EP3受容体が結膜上皮および表皮に発現することを明らかとし、病態形成における上皮の重要性を示した。更に、DNFBを用いた接触性皮膚炎モデルにおいても、EP3作用薬局所投与が病態の抑制に有効であることを確認した。

これまで、EP3作用薬が気道上皮に作用し、アレルギー喘息反応に関与する様々な遺伝子変化を引き起こすことで抗アレルギー作用を示していることが示されていたが、その作用機序や他のアレルギー疾患における有効性は不明であった。本研究では、サイトカイン刺激後の培養気道上皮細胞を用いた解析を行い、EP3作用薬がCCL17産生を抑制することが示された。また、EP3作用薬のアレルギー疾患に対する適応拡大の可能性について、マウスアレルギー性結膜炎モデル、および、接触性皮膚炎モデルを用いて検討した。

いずれのモデルにおいても、EP3作用薬の局所投与による有効性が示されたことから、これら疾患に対するEP3作用薬の臨床応用の可能性が示唆された。今後、臨床応用の可能性を追求していく上で、安定性の高いEP3作用薬の探索、および安全性等の検討が必要と考える。また、EP3受容体が、結膜上皮および表皮に発現することが明らかとなり、病態形成における上皮の重要性が示された。喘息モデルと同様に、両疾患においても、上皮細胞がアレルギー治療薬の標的となる可能性があると考えられた。

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 2件)

① Ueta Mayumi, Matsuoka Toshiyuki, Narumiya Shuh, Kinoshita Sigeru
Prostaglandin E receptor subtype EP3 in conjunctival epithelium regulates late-phase reaction of experimental allergic conjunctivitis.
J Allergy Clin Immunol.
123(2):466-71. 2009 Feb
査読有

② Matsuoka Toshiyuki, Narumiya Shuh
The roles of prostanoids in infection and sickness behaviors.
J Infect Chemother.
14(4):270-8. 2008 Aug
査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 俊行 (MATSUOKA TOSHIYUKI)
京都大学・医学研究科・特定准教授
研究者番号：30397541

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

上田 真由美 (UETA MYUMI)
同志社大学・生命医科学部・講師
研究者番号：60398386
本田 哲也 (HONDA TETSUYA)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：40452338