

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 C
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591330
 研究課題名（和文） アスピリンによるマスト細胞活性化の修飾に関する機序解明とアスピリン不耐症との関連
 研究課題名（英文） Aspirin enhances antigen-induced leukotriene synthesis in mast cells via dihydropyridine-sensitive calcium entry: implication for aspirin intolerance.
 研究代表者
 落合豊子 (OCHIAI TOYOKO)
 日本大学・医学部・教授
 研究者番号：40133425

研究成果の概要：

アスピリンは抗炎症作用を示す薬剤として広く用いられる一方、喘息、蕁麻疹などのアスピリン不耐症を引き起こし、临床上重大な問題となっている。不耐症患者ではアスピリン摂取後にロイコトリエン (LT) が過剰産生されることが報告されている。今回この LT 産生増強に着目し、アスピリンが直接にマスト細胞の LT 産生に影響を及ぼすとの仮説を立て検証した。その結果、アスピリンは IgE を介する LT 産生を低濃度で増強し、高濃度で抑制するという二相性の作用を示した。さらに、アスピリンはジヒドロピリジン感受性カルシウムチャンネルを選択的に活性化することで LT 産生を増強することを初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚病理学

1. 研究開始当初の背景

(1) アスピリンの作用機序は、1971 年 Vane の報告以来、アラキドン酸代謝経路に関与する COX の活性阻害によると考えられている。しかし、これらの説では説明できない様々な病態があることがわかってきた。その一つがアスピリン不耐症である。本症では、アスピリン摂取後に、喘息やショック、蕁麻疹などの過敏症状が誘発されシスチニル化型ロイコトリエン (cys-LTs) が生体内に過剰産生

される。この cys-LTs 過剰産生にはマスト細胞が中心的な役割を果たしていることが示唆されており、アスピリンが COX 活性を阻害することによって、アラキドン酸代謝反応のうち PG 産生経路が選択的に抑制され、リポキシゲナーゼを介する cys-LTs 産生に傾くためと説明されている。しかし、アスピリン不耐症患者ではアスピリンを服用しない時でも尿中の LTE₄ 値が高いことが示されており、アスピリン不耐症の病態は COX 活性阻害だけで

は説明のつかない研究課題になっている。臨床的にアスピリン不耐症はI型アレルギーに類似するが、内服誘発テスト以外のI型アレルギー検査は陰性であり、抗原特異的IgEは検出されないことから、COX 活性阻害による非アレルギー性機序が推測されているが、いまだ原因は不明である。

また近年注目されている特殊なアレルギーとして、食物依存性運動誘発アナフィラキシーが挙げられる。この疾患では、抗原となる食物摂取のみでは発症しないが、食物摂取とともに運動負荷などの2次的要因が加わるとアナフィラキシー反応が惹起される。この2次的要因として、最近、アスピリン摂取が注目されており、食物摂取と同時にしくはその前後にアスピリンを摂取した場合に発症するアナフィラキシーを、特に食物依存性アスピリン誘発アナフィラキシー (Food dependent aspirin induced anaphylaxis: FAIA) と呼んでいる。FAIAにおいてもアスピリン不耐症と同様に、COX 活性阻害によるリポキシゲナーゼ経路の増強の関与が推測されているが、アスピリンがI型アレルギー反応を増強させる機序は未だ不明である。

(2) マスト細胞は、アレルギーや炎症反応において中心的な役割を果たす。マスト細胞はcys-LTsの主な産生細胞であり、細胞上の高親和性IgE受容体 ($Fc\epsilon RI$) の抗原による架橋が、LT産生を含む活性化カスケードを惹起する。また、LT産生の重要な制御因子として細胞内カルシウム濃度の上昇が関与する。マスト細胞におけるカルシウム流入の主要な経路は、小胞体カルシウムストアの潤渇に依存して活性化される Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+} (CRAC) チャネルを介する経路 (store-operated Ca^{2+} entry: SOCE) である。共同研究者の鈴木らは、一貫してマスト細胞の活性化の分子機構を研究して多くの成果を挙げてきた。鈴木らは、マスト細胞においてCRACチャネル以外に、ストア非依存性カルシウム流入経路である dihydropyridine (DHP) 感受性チャネルがマスト細胞に発現していることを初めて明らかにした。さらに、このストア非依存性チャネルのひとつが神経細胞などの興奮性細胞に発現している $Ca_v1.2$ L型カルシウムチャネルであり、このチャネルが抗原刺激で活性化され、サイトカイン産生を制御することを示した。

2. 研究の目的

著者は、アスピリンによるアレルギー炎症の増悪化機構を研究する上で、アスピリン不耐症患者における cys-LTs の産生増強に着目し、アスピリンが直接にマスト細胞の LT 産生に影響するとの仮説を立て、これを検証し

た。

3. 研究の方法

(1) RBL-2H3 細胞

Rat basophilic leukemia (RBL-2H3) 細胞は国立医薬品衛生研究所 (Japanese Collection of Research Biosources, [JCRB]; Cell No. JCRB0023) から入手し、培養した。IgE 感作は、DMEM 中に懸濁させた細胞を 100mm culture dishes または 24well plates で蒔種し、抗 TNP IgE 抗体で 37°C、一晚培養した。IgE 感作細胞を 37°C で TNP-BSA で刺激した。

(2) Bone marrow-derived mast cells (BMMCs)

すべての動物実験は日本大学ガイドラインに則って施行した。BMMCs は、生後 4~8 週の C3HeBFeJ マウスの大腿骨から採取した骨髄前駆細胞を培養、分化させて調製した。骨髄前駆細胞を培養し 4~6 週間培養後、細胞表面の $Fc\epsilon RI$ 発現をフローサイトメトリーで測定してマスト細胞への分化を確認した。調製した BMMCs を 4~8 週間後に実験に使用した。

(3) LTC₄産生量

マスト細胞を刺激後、培養上清中の LTC₄ を ELISA法で測定した。

(4) Western blotting

細胞を 37°C で 5 分間刺激後、細胞を SDS sample buffer で溶解し、タンパク質を SDS-PAGE (10%分離ゲル) により分離後、PVDF 膜に転写した。転写膜上の分離されたタンパク質を特異的抗体を用いて検出した。

(5) 細胞内カルシウム濃度測定

細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定には、カルシウム感受性蛍光プローブである Fluo-3 のアセトキシメチルエステル (AM) 誘導体である Fluo-3/AM を用いた。細胞刺激後、Fluo-3 の蛍光を microplate fluorometer (励起波長 485nm、測定波長 527nm) で 5 秒間隔、3 分間測定することで細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。

(6) ミトコンドリア膜電位測定

脂溶性カチオンである JC-1 を用いた。細胞刺激後、緑色蛍光と赤色蛍光を FACSCalibur instrument で測定し、膜電位を測定した。

(7) 統計処理

データは Tukey test による one-way ANOVA で有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

(1) マスト細胞における LTC₄ 産生に対するアスピリン (ASA) とサリチル酸の効果

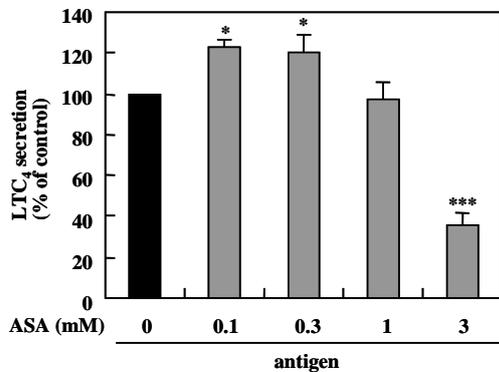
①結果

RBL-2H3 細胞 (図 1) およびBMMCsにおいて、アスピリン単独ではLTC₄産生を誘導しなかったが、抗原刺激によるLTC₄産生 (無刺激 48 ± 11 pg/ml; 抗原刺激 3601 ± 218 pg/ml) に対しては、低濃度のアスピリン (≤0.3mM) は有意に増強し、高濃度のアスピリン (>1mM) は抑制した。アスピリンの最適濃度は 0.1mMまたは 0.3mMであった。また、サリチル酸も同様の効果を示した。

②小括

アスピリンはIgEを介するLTC₄産生を、低濃度で有意に増強し、高濃度で抑制するという二相性の効果を示した。アセチル基を持たないアスピリンの代謝物質であるサリチル酸も同様の効果を示したことから、この効果はCOX活性阻害によるものではないと考えられた。

図 1



(2) LTC₄産生におけるcPLA₂, ERK1/2, p38MAPKの関与とアスピリンによる調節効果

アスピリンによるLTC₄産生の調節機構を知るために、LTC₄産生シグナル伝達経路に対するアスピリンの作用を検討した。このシグナル伝達経路には細胞質型ホスホリパーゼA₂ (cPLA₂) の活性化が関与している。cPLA₂の活性化はリン酸化に依存しており、cPLA₂のリン酸化には extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2²⁹⁾³⁰⁾ および p38-mitogen-activated protein kinaseの活性化が必要と考えられている。

①結果

抗原刺激はcPLA₂の活性化を誘導し、さらに低濃度のアスピリン (≤0.3mM)はこの効果を有意に増強した (約 1.5 倍)。また、抗原刺激はERK1/2 と p38MAPKの活性化を誘導した。しかし、アスピリンはERK1/2 の活性化を濃度依存的に抑制し、一方p38MAPKの活性化に対してはほとんど影響を与えなかった。また、ERK1/2 の特異的阻害剤であるU0126 と、p38MAPKの特異的阻害剤であるSB203580 は両方とも、抗原刺激によるIgEを介するLTC₄産生

を有意に抑制した。

②小括

アスピリンによるLTC₄産生の増強効果は、cPLA₂の活性化を介すると考えられた。しかし、高濃度のアスピリンによるLTC₄産生の抑制にはERK1/2 の活性化の抑制が関与しているが、低濃度のアスピリンによるLTC₄産生の増強作用にはERK1/2 やp38MAPKの活性化とは別の経路が関与することが示唆された。

(3) IgEを介するLTC₄産生におけるカルシウム流入の関与とアスピリンの調節効果

細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、LTC₄産生の重要な制御因子の一つである。マスト細胞を含む非興奮性細胞におけるカルシウム流入の主要な経路は、小胞体カルシウムストアの涸渇に依存して活性化されるCRACチャネルであると考えられている。そこで、カルシウム流入に及ぼすアスピリンの影響を検討した。

①結果

EGTAによる細胞外カルシウムの涸渇は完全にLTC₄産生を抑制した。アスピリンは単独ではカルシウム流入に影響を及ぼさなかったが、抗原刺激によるカルシウム流入に対して、LTC₄産生と同様に低濃度のアスピリン (≤0.3mM) はこれを増強し、高濃度のアスピリン (>1mM) は抑制するという二相性の効果を示した (図 2 A)。しかし、細胞外カルシウムをキレートすることで小胞体ストアからのカルシウム放出に対するアスピリンの影響を調べたところ、アスピリンは、小胞体ストアからのカルシウム放出を低濃度から濃度依存的に抑制した。さらにアスピリンはCRACチャネルの活性化も低濃度から濃度依存的に抑制した。2-APBはCRACチャネルの活性化を完全に抑制した (図 2 B)。

図 2 A

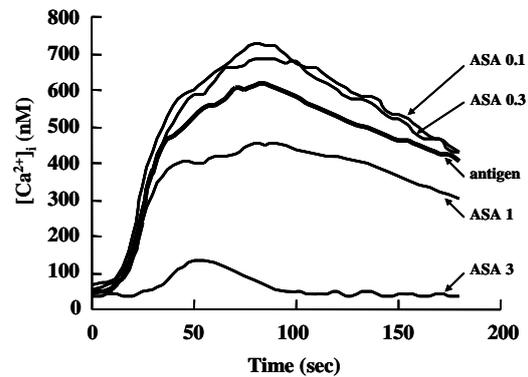
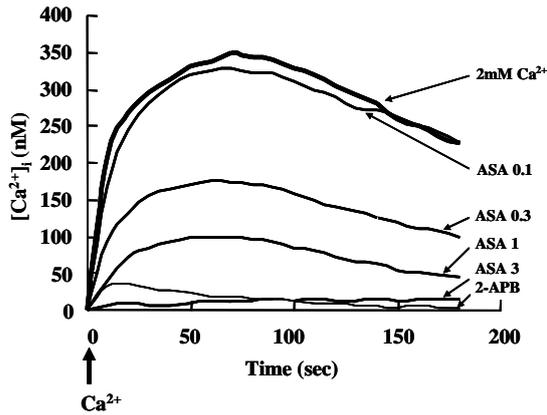


図 2 B



②小括

高濃度のアスピリンはCRACチャネルの活性化を抑制することでLTC₄産生を抑制することが考えられるが、低濃度のアスピリンはCRACチャネルとは別のカルシウム流入経路を増強していることが推察された。

(4) DHP 感受性カルシウムチャネルの活性化に及ぼすアスピリンの効果

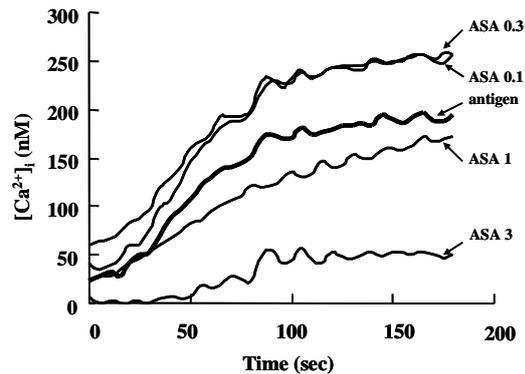
興奮性細胞では、ストア非依存性カルシウム流入機構の一つとして、種々の膜電位依存性カルシウムチャネルが存在する。そのなかで、開口時間の長い (long-lasting) L型カルシウムチャネル (L-type Ca²⁺ channels ; LTCCs) は様々な細胞に存在しており、このチャネルのαサブユニットは、DHP受容体として知られている。近年、非興奮性細胞においてもLTCCsに類似したカルシウム流入機構の存在が報告されつつある。最近、共同研究者の鈴木らは、マスト細胞にDHP感受性を示すLTCCs類似チャネルが発現しており、IgEを介する刺激により活性化され、サイトカイン産生を制御することを明らかにした。そこで、DHP感受性チャネルの活性化に及ぼすアスピリンの影響を検討した。

①結果

DHP感受性チャネルを介するカルシウム流入に対し、抗原刺激はカルシウム流入を誘導したがThapsigargin (Tg : 小胞体Ca²⁺-ATPase 阻害剤) 刺激では誘導しなかった。細胞外カルシウムをEGTAでキレートするとこの効果は認められないことから、この反応は細胞外カルシウムの流入によることがわかった。また、このカルシウム流入はDHP受容体阻害剤であるnifedipineで抑制するも、CRACチャネル阻害剤である 2-APBでは抑制しなかった。反対にCRACチャネルを介したカルシウム流入では、2-APBは完全に抑制するも、nifedipineは抑制しなかった。アスピリンはこのDHP感受性チャネルを介するカルシウム流入に対し、低濃度(≤0.3mM) ではカルシウム流入を増強し、高濃度 (>1mM) では抑制す

るという二相性の効果を示した。(図3)

図 3



②小括

アスピリンは SOCE (CRAC チャネル) とは異なるカルシウム流入経路である DHP 感受性チャネルを活性化することが示された。

(5) SOCE または DHP 感受性カルシウムチャネルの活性化に及ぼすミトコンドリア脱分極の効果

ミトコンドリアが CRAC チャネルの開口に関与していることはすでに報告されている。ミトコンドリアの脱分極は FCCP プロトノホアまたは呼吸鎖の阻害剤である rotenone (complex I 阻害剤) や antimycin A (complex III 阻害剤) により誘導される。これらの薬剤により誘導された脱分極は CRAC チャネルを介するカルシウム流入を抑制する。そこで DHP 感受性カルシウムチャネルにもミトコンドリア脱分極が影響を及ぼすかどうかを検討した。

①結果

FCCP と antimycin A はミトコンドリアの脱分極を誘導した。しかし rotenone は誘導しなかった。また、FCCP と antimycin A は CRAC チャネルを介するカルシウム流入を抑制した。この結果と対比して、FCCP と antimycin A は DHP 感受性カルシウムチャネルからのカルシウム流入を増強させた。

②小括

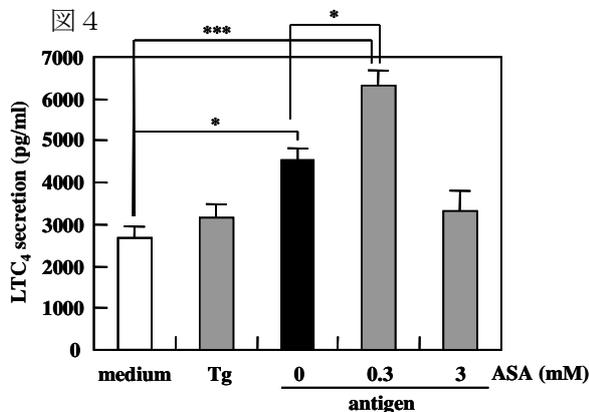
ミトコンドリアの脱分極は SOCE (CRAC チャネル) と DHP 感受性カルシウムチャネルの活性化に対し、相対的な効果を持つことが示された。

(6) IgEを介するLTC₄産生におけるDHP感受性カルシウム流入の効果

低濃度のアスピリンがDHP感受性カルシウム流入を増強することが示されたことから、このDHP感受性カルシウム流入がLTC₄産生に関与しているかを検討した。

①結果

RBL-2H3 細胞においてTg刺激は抗原刺激よりもLTC₄産生を誘導した。DHP感受性カルシウムチャンネルを活性化させた細胞では、Tg刺激はLTC₄産生を誘導しなかった（基準レベル 2689 ± 261pg/ml; Tg刺激 3142 ± 318pg/ml）。これに対比して、抗原刺激は有意にLTC₄産生を誘導した（4520 ± 289pg/ml）。さらにこのDHP感受性カルシウムチャンネルを活性化させた細胞において、アスピリンは低濃度（0.3mM）でLTC₄産生を増強し（6311 ± 350 pg/ml）、高濃度（3mM）で抑制する（3303 ± 484 pg/ml）という二相性を示した（図4）。また、RBL-2H3 細胞において、DHP受容体阻害剤であるnifedipineは、抗原刺激によるIgEを介するLTC₄産生を抑制し、DHP受容体刺激剤である(S)-Bay8644 は増強した。これに対してTg刺激によるIgEを介さないLTC₄産生には影響を及ぼさなかった。



②小括

DHP感受性カルシウムチャンネルを介するカルシウム流入はLTC₄産生を誘導し、さらに、低濃度のアスピリンはDHP感受性チャンネルを選択的に活性化することでLTC₄産生を増強することが示された。

以上の結果から、治療時における血中濃度と同等の低濃度のアスピリンが、新たなカルシウム流入経路であるDHP感受性カルシウムチャンネルを選択的に活性化することによって、IgEを介するマスト細胞のLTC₄産生を増強することを見出した。このようなCOX活性阻害とは全く異なった、新しいアスピリンの作用機序についての報告は、著者が知る限りこれまでない。

今後、これらの研究をさらに発展させ、アスピリン不耐症や食物依存性アスピリン誘発アナフィラキシーなど、アスピリンがマスト細胞を介して即時型アレルギーを増悪化させる分子機序を解明していく予定である。これらの新しい知見が、今後のマスト細胞におけるアレルギーの分子機序の理解、新しい治療法の開発に寄与することが期待される。

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)

- ①K Togo, Y Suzuki, T Yoshimaru, T Inoue, T Terui, T Ochiai, C Ra. Aspirin and salicylates modulate IgE-mediated leukotriene secretion in mast cells through a dihydropyridine receptor-mediated Ca²⁺ influx. *Clinical Immunology* 2009;131:145-156 査読有
- ②東郷香奈、鈴木良弘、落合豊子、羅智靖：アスピリンによるマスト細胞ロイコトリエン生成亢進の機序. 臨床免疫・アレルギー科：2008;49:633-637 査読無

[学会発表] (計5件)

- ①Kana Togo, Yoshihiro Suzuki, Tetsuro Yoshimaru, Toshio Inoue, Tadashi Terui, Chisei Ra, Toyoko Ochiai: Aspirin regulates leukotriene synthesis in mast cells via dihydropyridine-sensitive calcium entry International Investigative Dermatology 2008 2008.5.14-17 京都
- ②Kana Togo-Kitamura, Yoshihiro Suzuki, Tetsuro Yoshimaru, Toshio Inoue, Chisei Ra, Tadashi Terui, Toyoko Ochiai: Aspirin regulates leukotriene C₄ synthesis in mast cells through modulating a non-capacitative calcium entry 第37回日本免疫学会総会・学術集会 2007.11.20-22 東京
- ③東郷香奈、鈴木良弘、吉丸哲郎、井上寿男、照井正、落合豊子、羅智靖：アスピリンによるミトコンドリアを介したマスト細胞活性化調節 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007.11.1-3 横浜
- ④東郷香奈、鈴木良弘、吉丸哲郎、井上寿男、照井正、落合豊子、羅智靖：アスピリンの免疫調節作用に対する新たな視点：ミトコンドリア機能制御 日本研究皮膚科学会第32回年次学術大会・総会 2007.4.18-20 横浜
- ⑤北村香奈、鈴木良弘、吉丸哲郎、井上寿男、照井正、落合豊子、羅智靖：アスピリンのマスト細胞機能への影響 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会 2006.11.2-4 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 豊子 (OCHIAI TOYOKO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40133425

(2)研究分担者

羅 智靖 (RA CHISEI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60230851

鈴木 良弘 (SUZUKI YOSHIHIRO)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：80206549

(3)連携研究者

なし