

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390041

研究課題名（和文） 侵害刺激受容チャネルを経由した化学物質の接触感作促進（アジュバント）作用の解明

研究課題名（英文） Adjuvant effect mechanism on contact sensitization through nociceptive receptors

研究代表者

今井 康之 (IMAI YASUYUKI)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：80160034

研究成果の概要（和文）：化学物質アレルギーにおいて、抗原の働きを強める作用（アジュバント作用）の重要性が注目されつつある。しかし、アジュバントの機構については不明な点が多い。マウスの接触性皮膚炎をモデルとして、様々なフタル酸エステルのアジュバント作用を比較し、知覚神経に発現する侵害刺激受容チャネルの刺激活性との相関を発見した。さらに、食品成分など抗原性の弱いハプテンの抗原性をフタル酸エステルが引き出すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Importance of the adjuvant activity of chemicals has become widely recognized in the development of allergies. However, mechanisms underlying the adjuvant activity are largely unknown. Using mouse contact hypersensitivity models, we discovered that the adjuvant activity of phthalate esters is correlated with the ability to activate nociceptive receptors, which are expressed on sensory neurons. We also found that phthalate esters uncovered the skin-sensitizing activity of a food constituent that has low immunogenicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	8,800,000	2,640,000	11,440,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：アレルギー、TRP チャネル、フタル酸エステル、樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生活環境中に存在する化学物質に対する過敏症では、しばしば原因となる化学物質の特定が困難であったり、複数の化学物質が複合的に働いていたりする可能性がある。抗原性の本体をなす化学物質の場合には、パッチテストなどの直接的な方法でアレルゲンを同定できる場合も多い。しかし、それ自体には抗原性がないが、他の化学物質アレルゲンによる感作を促進する作用（アジュバント作用）がある場合には、直接の証明が困難である。

未知の化学物質によるアジュバント作用は、近年大きな問題となっている。例えば、貧血の治療薬である組換え型エリスロポエチン製剤の Eprex の場合、薬剤を投与された患者にエリスロポエチンに対する中和抗体が誘導され、注射に用いられるシリンジのゴムからアジュバント物質の溶出が疑われている(*Nature* **449**, 274–276, 2007)。化学物質のアジュバント作用機構の本質を解明することは、医薬品の安全性の面からも、重要な意義があると考えた。

(2) 研究代表者は、接触性皮膚炎のマウスモデルの研究を行い、抗原性を証明できないフタル酸ジブチル(DBP)が抗原性のある低分子ハプテンであるフルオレッセインイソチオシアネート(FITC)に対する皮膚接触感作を促進することを見出してきた。皮膚に塗布されたハプテン FITC は、宿主のタンパク質と結合したのち皮膚の樹状細胞にとりこまれる。樹状細胞はリンパ管を通過して所属リンパ節に移動し、血管を介してリンパ節にホーミングしてきた T リンパ球に FITC を抗原提示し、特異的な免疫応答が開始される。フタル酸エステルは、プラスチックの可塑剤、塗料、壁紙、化粧品、ゴム製品、防虫スプレーなど、生活環境中で幅広く用

いられているが、構造の異なる6種類のフタル酸エステルについて、アジュバント活性を比較した。その結果、DBP やフタル酸ジブチル(DBP)についてアジュバント作用および樹状細胞の移動促進作用が強いことが判明した(Imai Y., et al., *Clin. Exp. Allergy* **36**, 1462–1468, 2006)。また、TRPV1 作動性のカプサイシン(CAP)や TRPA1 作動性のアリルイソチオシアネート(AITC)で皮膚局所を前処置して知覚神経を脱感作すると、DBP によるアジュバント作用および樹状細胞の移動促進が抑制され、FITC を用いた感作過程に TRP チャネルの関与が示唆された(Maruyama, T., Imai, Y., et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* **143**, 144–154, 2007)。さらに、フタル酸エステルの FITC 誘導接触過敏症に対するアジュバント作用には、所属リンパ節における IL-4 産生促進を伴っていることを明らかにした(Maruyama, T., Imai, Y., et al., *Microbiol. Immunol.* **51**, 321–326 (2007)。

(3) TRP チャネルは、侵害受容神経、特に無髄の C 繊維や有髄の A $\delta$ 繊維に見られる。知覚神経受容体の一つとして、カプサイシン受容体の遺伝子(TRPV1) がクローニングされ広く注目を集めるようになった。トウガラシ(TRPV1)、ワサビや西洋カラシ(TRPA1)の味覚を感知するなど、味覚のセンサーとしても注目されている。また、TRP チャネルファミリーは、巨大な分子ファミリーを形成しており、生体の調節機構に広くかかわっていることが想定されている(Clapham, D.E., *Nature* **426**, 517–524, 2003)。

## 2. 研究の目的

(1) 種々の構造のフタル酸エステルについて、TRPV1 および TRPA1 チャネル作動活性を比較する。FITC を用いた接触性皮膚炎マウスモデルにおけるアジュバント作用および FITC を提示した樹状細胞の移動促進作用

との相関性を明らかにする。

(2) FITC 以外のハプテンについて、フタル酸エステルの影響を精査し、どのような生物学および化学的性質をもったハプテンが影響を受けやすいのかを明らかにする。

(3) 生活環境中に存在する感作性の弱いハプテンについて、フタル酸エステルのアジュバント作用を調べることで、複合的な化学物質による感作に知覚神経系が関与している可能性を探索する。

### 3. 研究の方法

(1) マウス神経細胞を用いた TRPV1 および TRPA1 チャンネル作動活性の測定：マウスの後根神経節(dorsal root ganglia; DRG)から神経細胞体を採取し、細胞質カルシウム指示薬である Fluo-4 で標識した。スライドグラス上で細胞に試料を含む緩衝液を灌流させ、共焦点顕微鏡にて個々の細胞ごとに細胞内のカルシウム濃度変化を観測した。緩衝液のみを灌流させて試料を除去後、陽性対象として AITC や CAP を順次灌流し、個々の細胞がどの刺激に反応するのかを特定した。カルシウムイオノフォア処理で、個々の細胞ごとに最大反応レベルを規定した。

(2) TRPV1 あるいは TRPA1 チャンネルを強制発現させた細胞株を用いた TRPV1 および TRPA1 チャンネル作動活性の測定：HEK293 細胞もしくは CHO 細胞を Fluo-4 で標識し、フタル酸エステルを添加して多検体蛍光検出装置を用いて細胞内カルシウム応答を観察した。細胞株は、連携研究者の渡辺達夫教授より提供を受けた。この方法により、多種類のフタル酸エステルの TRP チャンネルに対する刺激作用を系統的に調べた。

(3) TRP チャンネル作動性と接触感作促進作用の相関：TRP チャンネル作動性が明らかになったフタル酸エステルについて、接触感作

促進作用を調べた。BALB/c マウス皮膚にフタル酸エステルの存在下あるいは非存在下で FITC を塗布し接触感作を行い、マウス耳介腫脹反応により感作促進活性を評価した。一方、FITC の蛍光性を利用し、FITC 感作後 24 時間において、所属リンパ節における FITC 陽性細胞数をフローサイトメトリーにて計数し、樹状細胞トラフィッキング促進作用との関連性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) DBP による TRPV1 および TRPA1 チャンネル作動活性：マウス神経細胞を用いた研究

マウスの後根神経節 (dorsal root ganglia; DRG) から神経細胞体を採取し、細胞内カルシウム蛍光指示薬で標識後、スライドグラス上に培養し、試料を含む緩衝液で灌流しながら共焦点蛍光顕微鏡で観察した (図 1)。DBP を含む緩衝液で灌流すると、約 14% の細胞で細胞内カルシウム濃度上昇が認められた。DBP を含まない灌流液を流して細胞を洗浄後、再び AITC を含む灌流液を流すと、AITC 依存的に細胞内カルシウム濃度上昇が再び認められた。さらに、AITC を洗浄除去後、CAP を含む灌流液を流すと、再び CAP 依存的な細胞内カルシウム濃度上昇が観察された。CAP を洗浄除去後、カルシウムイオノフォア (IONO) 処理して最大反応レベルを規定した。

以上の実験結果を蛍光強度によって定量的に表示した (図 2)。

191 個の生きた神経細胞 (イオノマイシン処理で細胞質カルシウム濃度上昇が観察される) について、同様な実験を行い、神経細胞の反応をまとめた (図 3)。その結果、27 個の細胞 (生細胞の 14%) が DBP に反応してカルシウム濃度上昇を示した。

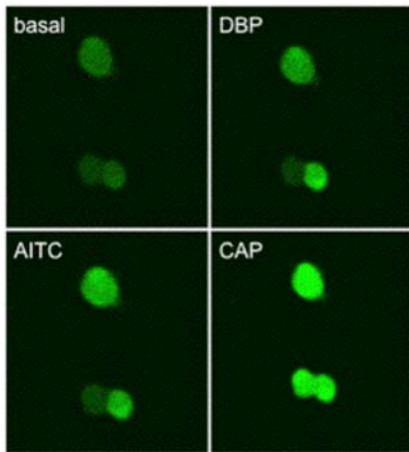


図 1 マウス後根神経節より分離した神経細胞を細胞質カルシウム指示薬 Fluo-4 で標識した。スライドガラス上で細胞に試料を含む緩衝液を順次灌流させ、共焦点顕微鏡にて個々の細胞ごとに細胞内カルシウム濃度変化を観測した。各試料の灌流後、次の試料を灌流する前には、緩衝液で洗浄した。左上から順次：灌流前、DBP、AITC、CAP を灌流。この視野では、DBP に反応した細胞（上および右下）は AITC および CAP の両者に反応している。一方、左下の細胞は DBP や AITC に反応しないが、CAP にのみに反応している。

蛍光強度（カルシウム）

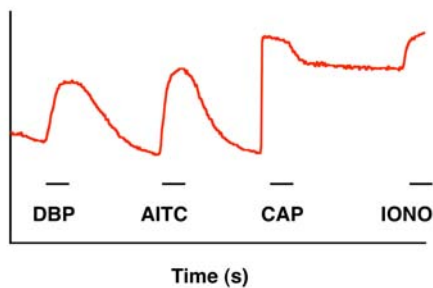


図 2 マウス後根神経節より分離した神経細胞のカルシウム応答の一例。横棒で示した時間帯に試料を灌流した。DBP (1000  $\mu$ M), AITC (30  $\mu$ M), CAP (1  $\mu$ M), IONO (5  $\mu$ M)。横軸が時間経過、縦軸が相対的蛍光強度。

DBP 反応性細胞の 93%が AITC に応答を示した。また、DBP 反応性細胞の 41%が CAP に応答を示した。図 3 にまとめたように、DBP 反応性細胞は後根神経節細胞の一定部分を

占めており、さらにそのほとんどが AITC 応答性であることが判明した。また、DBP 反応性の細胞の約 4 割が AITC と CAP の両者に反応性を示すことが明らかになった。

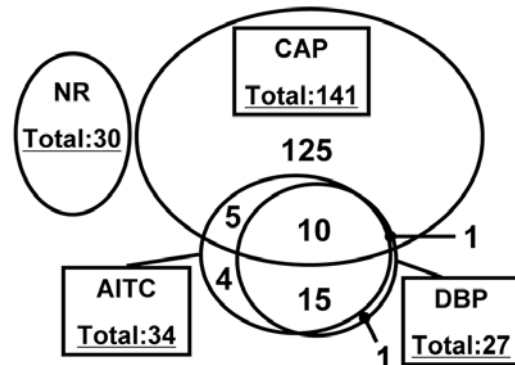


図 3 DBP がカルシウム応答を誘導するマウス後根神経節細胞の大部分は AITC 反応性である

(2) DBP による TRPA1 チャンネル作動活性：TRPA1 を強制発現させた CHO 細胞を用いた研究

TRPA1 を強制発現させた CHO 細胞をカルシウム蛍光指示薬で標識し、特異的なアニオニストである AITC を加えて細胞内カルシウム濃度上昇を経時的に観測できた。

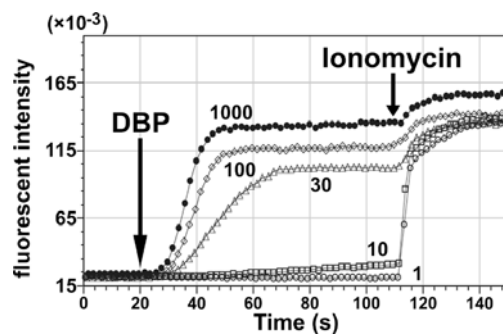


図 4 TRPA1 を強制発現させた CHO 細胞に DBP を作用させ細胞内カルシウム濃度上昇を経時的に観測した。図中の数字は DBP の濃度 ( $\mu$ M)。

同じ細胞を用いて DBP が TRPA1 を活性化するかどうかを調べたところ、濃度依存的なカルシウム応答を観測した (図 4)。この結果は、DBP に TRPA1 刺激活性があることを

示唆している。なお、TRPA1 の cDNA を導入していない CHO 細胞に対しては、AITC や DBP がカルシウム応答を誘導しなかった。

### (3) 種々のフタル酸エステルによる TRPA1 および TRPV1 刺激活性

DBP 以外のフタル酸エステルに、FITC による接触感作を促進するものがあることが判明している。そこで、どのフタル酸エステルに TRP チャンネル刺激活性があるかどうかを、TRP チャンネルを強制発現させた CHO 細胞を用いて系統的に調べた (表 1)。その結果、TRPA1 については、側鎖のアルキル基の炭素数 2 から 6 まで、TRPV1 については、炭素数 3 から 6 までのフタル酸エステルに刺激活性を認めた。なお、炭素数 1 のフタル酸ジメチル (DMP) については、高濃度において TRP チャンネルを強制発現していない CHO 細胞に対しても同程度にカルシウム応答を誘導したことから、TRP 受容体刺激活性の有無を判定できなかった。

### (4) 各種フタル酸エステルによる TRP チャンネル作動活性と接触感作促進作用、樹状細胞トラフィッキング促進作用の相関性

各種フタル酸エステルによる TRPA1 および TRPV1 の作動活性と、FITC 誘導接触感作促進作用、FITC 提示樹状細胞トラフィッキング促進作用の関係を表 1 にまとめた。

その結果、側鎖炭素数 n=2 から n=6 のフタル酸エステルには TRPA1 作動活性が、n=3 から n=6 のフタル酸エステルに TRPV1 作動活性を認めたが、FITC に対する接触感作促進作用 (n=2 から n=7) および FITC 提示樹状細胞トラフィッキング促進作用 (n=3 から n=7) と良好な相関性を示した。一方、FITC に対する接触感作の促進効果および FITC 提示樹状細胞

表 1 種々のフタル酸エステルの TRP チャンネル作動活性と、FITC 接触感作、FITC 提示樹状細胞のトラフィッキングに与える影響の相関性

Phthalate ester	Side chain carbon	TRPA1 activation	TRPV1 activation	Enhanced DC trafficking	Enhanced skin sensitization
DMP	1	ND	ND	×	×
DEP	2	○	×	×	○
DPP	3	○	○	○	○
DBP	4	○	○	○	○
DPNP	5	○	○	○	○
DHXP	6	○	○	○	○
DHPP	7	×	×	○	○
DEHP	8	×	×	×	×
DINP	9	×	×	×	×

ND:判定できない。

トラフィッキング促進作用がなかったフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP) (n=8)やフタル酸ジイソノニル(DINP) (n=9)には、TRPA1 や TRPV1 作動活性を認めなかった。

### (5) FITC 以外のハプテン感作に及ぼすフタル酸エステルの接触感作促進作用の検討

FITC による接触感作モデルは、IL-4 産生を伴う Th2 型の免疫応答の関与が指摘されてきた。フタル酸エステル接触感作促進作用が、免疫応答の分極化に基づいているのかを、Th2 型および Th1 型のハプテンとして知られている代表的なハプテンについてマウス耳介腫脹反応を用いて比較した。

Th1 型のハプテンとして 2,4-dinitro-fluorobenzene (DNFB)と oxazolone、Th2 型のハプテンとして trimellitic anhydride (TMA), methylenediphenyl 4,4'-diisocyanate (MDI), toluene 2,4-diisocyanate (TDI)を用いて検討した。いずれのハプテンに対しても、DBP や DPP は有意に感作を促進しなかった。

### (6) FITC と化学構造が共通なハプテンに対するフタル酸エステルによる感作促進作用

フタル酸エステルの接触感作促進作用が

FITC に対して限られているのかどうかを調べるため、FITC と化学構造が類似した eosin 5-isothiocyanate (EITC) および rhodamine B isothiocyanate (RITC) について調べた。その結果、DBP および DPP によって、EITC、RITC に対する接触感作が有意に促進された。特に、RITC は蛍光性のハプテンのため、FITC の代わりに実験に用いられているが、FITC と挙動が同じであることが示唆された。

#### (7) 食品成分の抗原性の検出

前項から明らかになったように、フタル酸エステルは FITC, EITC, RITC の感作を促進し、いずれもイソチオシアネート基を持つハプテンであった。アブラナ科の野菜には辛味成分としてフェネチルイソチオシアネート(PEITC) が含まれている。PEITC は、発ガン予防活性のある食品成分として近年注目を集めているが、アレルギー性については検討されていない。

PEITC は、フタル酸エステルの非存在下で極めて弱い抗原性をもつのみであった。DBP や DPP の共存下で感作すると、有意に感作が促進された。この結果は、環境中の化学物質の影響下で、食品成分のアレルギー性が明らかになる可能性を示している。

#### (8) 国内外における位置づけとインパクトおよび今後の展望

本研究は、アレルギー学と神経科学の接点を追求し、知覚神経刺激の側面から抗原感作の機構を明らかにする点にインパクトがある。フタル酸エステルのアジュバント活性については、イギリスの研究グループが長年研究を続けているが、近年我々の研究成果を良く引用している。また、アジュバント機構を解明し、候補物質の *in vitro* スクリーニング法の開発も展望している。

#### 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 3 件)

- (1) Tomoko Matsuda, Takashi Maruyama, Hiromi Iizuka, Ayumi Kondo, Takuma Tamai, Kohta Kurohane, Yasuyuki Imai: Phthalate esters reveal skin-sensitizing activity of phenethyl isothiocyanate in mice. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 1704–1708 (2010) 査読有
- (2) Tomoko Matsuda, Kohta Kurohane, and Yasuyuki Imai: Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances skin sensitization to isocyanate haptens in mice. *Toxicol. Lett.*, **192**, 97–100 (2010) 査読有
- (3) Takahiro Shiba, Takashi Maruyama, Kohta Kurohane, Yusaku Iwasaki, Tatsuo Watanabe, and Yasuyuki Imai: TRPA1 and TRPV1 activation is a novel adjuvant effect mechanism in contact hypersensitivity. *J. Neuroimmunol.*, **207**, 66–74 (2009) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 玉井琢磨、FITC 誘導接触性皮膚炎におけるフタル酸ジブチルの全身的アジュバント作用、第 39 回日本免疫学会、2009 年 12 月 3 日、大阪
- (2) 柴 隆大、TRPA1, TRPV1 活性化を介した接触性皮膚炎におけるアジュバント作用、第 38 回日本免疫学会、2008 年 12 月 1 日、京都
- (3) 松田朋子、Adjuvant effects of phthalate esters on various hapten-induced CHS, 第 38 回日本免疫学会、2008 年 12 月 1 日、京都

[その他]

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/bisei/>

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
今井 康之 (IMAI YASUYUKI)  
静岡県立大学・薬学部・教授  
研究者番号：80160034
- (2) 研究分担者  
黒羽子 孝太 (KUROHANE KOHTA)  
静岡県立大学・薬学部・助教  
研究者番号：90333525
- (3) 連携研究者  
渡辺 達夫 (WATANABE TATSUO)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授  
研究者番号：10210915