

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590268

研究課題名（和文）炎症性発癌におけるヒスタミンの役割および予防・治療への応用

研究課題名（英文）Suppressive role of histamine in inflammation-associated tumorigenesis

研究代表者

倉増 敦朗 (KURAMASU ATSUO)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90302091

研究成果の概要（和文）：炎症によって大腸癌を引き起こすモデルマウスにおいて、生理活性物質ヒスタミンの役割を調べた。ヒスタミンを作ることができないマウスでは、正常のマウスに比べて腫瘍の増殖が促進されたことから、ヒスタミンは炎症性発癌において抑制的に働いていることがわかった。そのメカニズムとして、骨髄由来抑制細胞という腫瘍に対する免疫反応を抑制する細胞が関与している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Role of histamine in inflammation-associated tumorigenesis was investigated using mice deficient of endogenous histamine. In colitis-associated colon cancer model, mice lacking histamine had significantly larger tumors, suggesting that histamine has suppressive role in tumor growth. In spleen from histamine-deficient mice with colon tumor, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) were increased, showing a possible mechanism of MDSC-mediated suppression of anti-tumor immune response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：ヒスタミン・炎症性発癌・H2受容体・シメチジン・骨髄由来抑制細胞・アゾキシメタン・デキストラン硫酸ナトリウム

1. 研究開始当初の背景

ヒスタミンは様々な機能を有する生理活性アミンであり、生体内ではL-ヒスチジン脱炭酸酵素 (Histidine Decarboxylase, HDC)

により合成される。ヒスタミンはGタンパク質共役受容体である4種類の受容体 (H1R, H2R, H3R, H4R) を介して作用する。これら4種類の受容体に対する特異的的刺激薬および

拮抗薬は既に多く開発されており、中でもH1R拮抗薬とH2R拮抗薬は、それぞれ抗アレルギー薬と消化性潰瘍治療薬として臨床的に広く使用されている。

多くの癌は炎症を基盤にして発生することが知られている。例えばヘリコバクターピロリによる慢性胃炎からの胃癌、ウイルス性肝炎による肝細胞癌、炎症性腸疾患（Inflammatory Bowel Disease; IBD）からの大腸癌などである。ヒスタミンと癌に関する研究はいくつか報告されているが、炎症性の発癌におけるヒスタミンの役割を調べた研究はない。

マウスでは、デキストラン硫酸ナトリウム（Dextran Sulfate Sodium; DSS）の飲水による慢性大腸炎モデルと化学発ガン物質のAzoxymethane（AOM）投与を組み合わせることにより、高頻度で大腸癌が発生することが報告されている（Okayasu et al. Gut 1996）。DSS単独あるいはAOM単独では、全く癌の発生が見られないことから、このマウスはIBD様慢性炎症に伴う大腸癌のモデルとして知られている。

炎症性発癌におけるヒスタミンの役割が明らかになれば、既に多く開発されているヒスタミン受容体刺激薬や拮抗薬が炎症性発癌の予防薬や治療薬になる可能性がある。

2. 研究の目的

マウスの大腸炎誘発大腸癌モデルを用いて、炎症性発癌におけるヒスタミンの役割を調べる。さらに関与する細胞やヒスタミン受容体など、そのメカニズムを明らかにし、受容体特異的的刺激薬あるいは拮抗薬による炎症性大腸癌発生の予防あるいは治療を試みる。

3. 研究の方法

(1) アゾキシメタンとデキストラン硫酸ナトリウムによる大腸癌発症モデル作製と

その評価

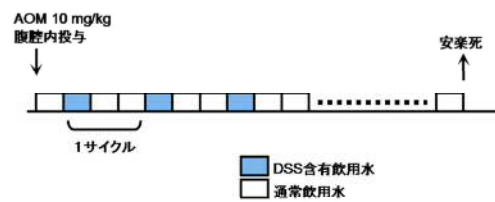


図1. AOM/DSSモデル作製スケジュール

図1に示すように、大腸炎誘発大腸癌モデルを作製した。6から8週齢のマウス（ICRメス、Balb/cオス、hdc^{-/-}オス）に、最初のDSS投与の1週間前に、10 mg/kg AOM（Sigma）を腹腔内投与する。DSS（平均分子量36,000 - 50,000; MP biomedical）は飲用水に3%（w/v）の濃度で混ぜ、自由に7日間飲水させた。その後2週間はDSSを含まない飲用水を自由に与え、これをDSS投与1サイクルとした。これを3サイクル繰り返した後、マウスを安楽死させ解析した。

DSSによって誘発される大腸炎は①体重減少、②潜血便、③下痢の3項目について、Cooperらの方法（Cooper et al. Lab Invest. 1993）に従ってスコア化し、評価した。発生した腫瘍は、個数およびサイズを測定した後、ホルマリン固定し切片を作製し組織学的検討を行った。

(2) フローサイトメトリー

安楽死させたマウスから脾臓細胞を採取し定法に従って表面抗原および細胞内抗原を染色し、Tリンパ球（CD4陽性、CD8陽性、Treg）NK細胞、NKT細胞、樹状細胞、マクロファージ、骨髄由来抑制細胞をフローサイトメーター（FACSCalibur）で解析した。

4. 研究成果

(1) 炎症と腫瘍の評価

①ヒスタミンH2受容体拮抗薬シメチジンの効果

ヒスタミンH2受容体拮抗薬である、シメ

チジンの炎症性発癌に対する効果を調べた。5週齢のメスICRマウスに、まず発癌性化学物質アゾキシメタンを10 mg/kg 腹腔内投与した。1週間後、大腸炎誘発物質であるデキストラン硫酸ナトリウムを2%の濃度で5日間自由飲水させた。その後は実験期間を通して、水道水を飲水させた。実験開始10週間後から、H2拮抗薬シメチジンを5週間、一日一回0.12mg/kgを皮下投与した。対照群には生理食塩水を投与した。生理食塩水投与群では腫瘍が個体あたり7.3個（標準誤差2.9）であったのに対し、シメチジン投与群では5.3個（標準誤差0.7）であった。シメチジン投与群の方が個体あたりの腫瘍発生数がやや少なかったが、統計学的に有意な差は認められなかった。また、腫瘍の病理組織像はどちらの群も腺癌であり、差は認められなかった。

以上の結果から、H2受容体拮抗薬シメチジンは、炎症性大腸がんの発生に対して単独では効果がないといえる。

②内因性ヒスタミンの役割

AOM/DSS モデルを用いて、内因性ヒスタミンの役割を調べた。ヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子欠損マウス (Hdc^{-/-}) は、ヒスタミン合成酵素の補酵素結合部位を欠損しているため、ヒスタミンを合成できない。6週齢の雄Hdc^{-/-}マウス及び対照群として6週齢の雄Balb/c マウスを用いて、AOM/DSS モデルを作

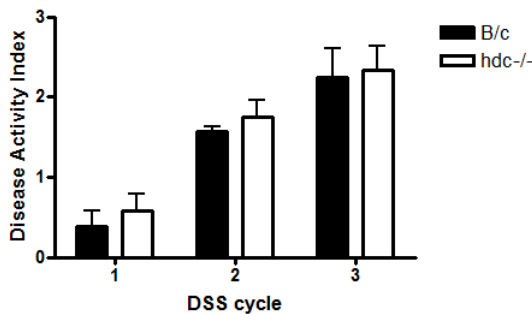


図2. DSSによる炎症の経時変化

製した。この過程において、各DSSサイクル後の急性大腸炎の程度をスコア化した結果を図2に示す。野生型もHdc^{-/-}型もサイクルが進むにしたがって、同程度にスコアが大きくなっていることから、炎症の程度に内因性ヒスタミンの有無は影響しないといえる。次に、生じた腫瘍の解析をした。20週間後に

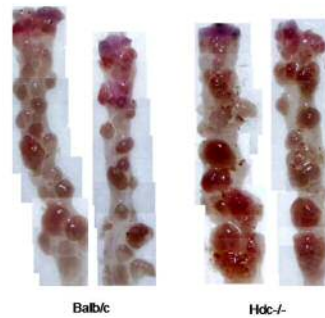


図3. 大腸腫瘍の肉眼像

は図3に示すように大腸に腫瘍が生じていた。個体あたりの腫瘍数は、Hdc^{-/-}でやや多いものの、有意な差は認められなかった(図4)。一方、腫瘍の大きさは、野生型マウスに生じた腫瘍に比べて、Hdc^{-/-}マウスに生じた腫瘍の方が、有意に大きいことがわかった(図4)。以上の結果から、内因性ヒスタミンは、炎症性大腸癌モデルにおいて、腫瘍の増殖に抑制的に働いていることが考えられる。

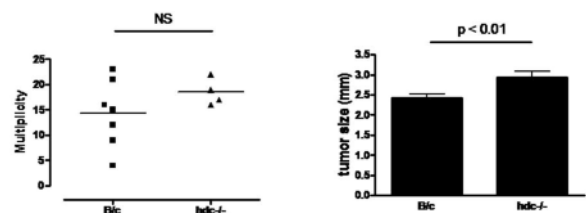


図4. 腫瘍数(左)と腫瘍径(右)の比較

(2) 免疫細胞の評価

内因性ヒスタミンの腫瘍増殖抑制作用について、抗腫瘍免疫が関与している可能性を検討した。AOM/DSSモデルの野生型及びHdc^{-/-}型マウスから、脾臓を取り出して、各

種免疫担当細胞の数をフローサイトメトリーで解析した。その結果、図5に示すように、CD11b陽性 Gr-1陽性の骨髄由来抑制細胞(Myeloid-derived suppressor cell, MDSC)が野生型に比べ *hdc*^{-/-}で有意に多く存在していた。MDSCは各種サイトカイン産生および、アルギナーゼや一酸化窒素合成酵素の発現により、獲得免疫反応を抑制することが知られている。因みに、ナイーブなマウスでは、この細胞は骨髄に多く存在するが、その数は野生型と *hdc*^{-/-}で同程度存在している。これらの結果から、AOM/DSSモデルにおいて、内因性ヒスタミンの欠如により、より多くのMDSCが誘導されることで腫瘍免疫が抑制され、腫瘍増殖が促進された可能性が考えられた。

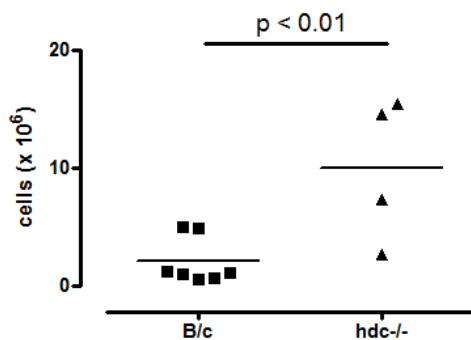


図5. 脾臓の骨髄由来抑制細胞数の比較

今後、このメカニズムに関与するヒスタミン受容体を同定し、薬物によりMDSCの誘導を抑制することができれば、負の制御を抑制することによる新たな腫瘍免疫療法開発の可能性がある。

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 4 件)

① Kuramasu A, Sukegawa J, Sato T, Sakurai E, Watanabe T, Yanagisawa T, Yanai K. The hydrophobic amino acids in putative helix

8 in carboxy-terminus of histamine H(3) receptor are involved in receptor-G-protein coupling. *Cell Signal*. 2011 Nov;23(11):1843-9. 査読有

② Xu A, Sakurai E, Kuramasu A, Zhang J, Li J, Okamura N, Zhang D, Yoshikawa T, Watanabe T, Yanai K. Roles of hypothalamic subgroup histamine and orexin neurons on behavioral responses to sleep deprivation induced by the treadmill method in adolescent rats. *J Pharmacol Sci*. 2010;114(4):444-53. 査読有

③ Takino N, Sakurai E, Kuramasu A, Okamura N, Yanai K. Roles of the histaminergic neurotransmission on methamphetamine-induced locomotor sensitization and reward: a study of receptors gene knockout mice. *Int Rev Neurobiol*. 2009;85:109-16. 査読有

④ Sakurai E, Kuramasu A, Watanabe T, Yanai K. Multiple histamine receptor gene knockout mice and their phenotypes. *Inflamm Res*. 2009 Apr;58 Suppl 1:41-2. 査読無

[学会発表] (計 3 件)

① 倉増敦朗, 助川淳, 櫻井映子, 渡邊建彦, 柳澤輝行, 谷内一彦 ヒスタミン H3 受容体のヘリックス 8 は G タンパク質との共役に重要である 第 62 回日本薬理学会西南部会 2009 年 11 月 27 日 愛媛 リジェール松山

② 倉増敦朗, 若林深恵, 谷内一彦 ヒスタミン H4 受容体を介するケモタキシスにおける低分子量 G タンパク質 Rac の関与 第 64 回日本薬理学会西南部会 2009 年 11 月 20 日 福岡 KKR ホテル博多

③ 倉増敦朗, 若林深恵, 乾誠, 谷内一彦 ヒスタミン H4 受容体を介するケモタキシスに

おける低分子量Gタンパク質 Rac の関与 第
85 回日本薬理学会年会 2011 年 3 月 14 日
京都 国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉増 敦朗 (KURAMASU ATSUO)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90302091

(2) 研究分担者

助川 淳 (SUKEGAWA JUN)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30187687

谷内 一彦 (YANAI KAZUHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50192787
(H21)

渡邊 建彦 (WATANABE TAKEHIKO)
東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授
研究者番号：70028356
(H21)

櫻井 映子 (SAKURAI EIKO)
いわき明星大学・薬学部・教授
研究者番号：90153949
(H21)