

ヒスタミンとアレルギーの
シグナルネットワークにおける
トシル酸スプラタストの
作用機序解明

2016

折本 直樹

目次

1. 第一章 緒言.....	1
2. 第二章 トシル酸スプラタストのヒスタミンシグナル抑制作用の検証.....	5
2.1 序論.....	7
2.2 実験方法.....	9
2.2.1 使用試薬など.....	9
2.2.2 動物.....	9
2.2.3 TDI 感作, 鼻アレルギーの誘発及びスプラタストの投与.....	9
2.2.4 鼻アレルギー様症状の評価.....	10
2.2.5 mRNA の定量.....	11
2.2.6 [³ H] mepyramine binding assay.....	12
2.2.7 HeLa 細胞の培養及び薬剤処置.....	13
2.2.8 鼻腔内洗浄液中のヒスタミン含量の測定.....	13
2.2.9 鼻粘膜中の HDC 活性とヒスタミン含量の測定.....	13
2.2.10 タンパク定量.....	14
2.2.11 統計処理.....	14
2.3 実験結果.....	15
2.3.1 TDI 誘発鼻アレルギー様症状に対するスプラタストの効果.....	15
2.3.2 鼻粘膜中の TDI 誘発 H1R mRNA 及びタンパク発現亢進に対するスプラタストの効果.....	16
2.3.3 TDI 誘発 HDC mRNA 発現と HDC 活性亢進に対するスプラタストの効果.....	17
2.3.4 鼻腔内洗浄液及び鼻粘膜中における TDI 誘発ヒスタミン増加作用に対するスプラタストの効果.....	17
2.3.5 TDI 誘発 IL-4 mRNA 発現亢進に対するスプラタストの効果.....	19
2.3.6 TDI 未処置の正常ラット鼻粘膜における IL-4 またはヒスタミン処置による H1R 及び IL-4 mRNA 発現に対する作用.....	20
2.3.7 HeLa 細胞におけるヒスタミンまたは IL-4 誘発の H1R mRNA 発現亢進作用に対するスプラタストの効果.....	22
2.4 考察.....	24

3. 第三章 鼻アレルギーに対する H1 受容体拮抗薬と スプラタ	
 ストの併用効果.....	29
3.1 序論.....	31
3.2 実験方法.....	32
3.2.1 使用試薬など	32
3.2.2 動物	32
3.2.3 TDI 感作, 鼻アレルギーの誘発及びスプラタストの 投与	32
3.2.4 鼻アレルギー様症状の評価	33
3.2.5 細胞培養	34
3.2.6 リアルタイム定量 RT-PCR.....	34
3.2.7 ラットにおける mRNA の検出.....	34
3.2.8 統計処理	35
3.3 実験結果.....	36
3.3.1 TDI 誘発鼻アレルギー様症状鼻アレルギー様症状に 対するエピナスチン, スプラタスト単独, または併 用による効果	36
3.3.2 TDI 誘発 H1R, HDC 及び Th2 サイトカイン遺伝子 発現上昇に対するエピナスチン, スプラタスト単独, またはそれらの併用による効果.....	37
3.3.3 Jurkat 細胞におけるイオノマイシン/PMA 誘発 IL-2 遺伝子発現亢進に対するスプラタストの効果.....	39
3.3.4 RBL-2H3 細胞における IgE 及びイオノマイシン誘 発 IL-9 遺伝子発現亢進に対するスプラタストの効 果.....	41
3.4 考察.....	43
4. 第四章 総括.....	46
5. 参考文献.....	50
5.1 第二章	52
5.2 第三章	58

略号一覧

略号 (用語)	内容 (定義)
TDI	Toluene-2,4-diisocyanate
H1R	ヒスタミン H1 受容体 (histamine H1 receptor)
HDC	ヒスチジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase)
スプラタスト	トシル酸スプラタスト (suplatast tosilate)
PKC δ	Protein kinase C- δ
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
PARP-1	Poly (ADP-ribose) polymerase-1
CN	Calcineurin
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
rrIL-4	リコンビナントラット IL-4 (recombinant rat IL-4)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
FCS	ウシ胎児血清 (Fetal calf serum)
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
INCA-6	Inhibitor of NFAT-calcineurin association-6

1. 第一章 緒言

花粉症を含むアレルギー性鼻炎は世界で最も罹患率の高い疾患の一つである。アレルギー性鼻炎の発症には様々な因子が関与するとされ、その解明のため数多くの研究がなされているが、未だ不明な点も多い。治療法としては、アレルギーの原因物質、アレルゲンの除去と回避が第一とされ、また、薬物治療としては抗ヒスタミン薬等を用いた対症療法が主である。しかし、完治に繋がるような薬剤は未だ無く、その開発が望まれている。

これまで我々の研究室では、工業国における喘息の主要な原因の一つとして知られている toluene-2,4-diisocyanate (TDI) を感作させたラットを用いて作製した鼻アレルギーモデルにおいて、神経因性炎症を介した肥満細胞からのヒスタミン産生増加に伴う鼻過敏症が誘発されること、鼻粘膜中のヒスタミン H1 受容体 (H1R)、ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の発現量が亢進することなどを明らかにした。これらの知見により、H1R と HDC 遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子であることが示唆され、それらを抑制する薬剤開発は、新しい抗アレルギー薬の開発に繋がることが考えられた。また Th2 サイトカインもアレルギー性炎症の病因において重要な役割を持つことが知られており、我々は TDI 感作ラット鼻粘膜において IL-4 と IL-5 mRNA の発現が亢進し、TDI 感作ラットの鼻過敏症にも関与していることを報告している。

近年、ヒスタミンがいくつかのサイトカインの産生と活性に影響を及ぼし、また、いくつかのサイトカインがヒスタミンの産生と放出に関与するといった、ヒスタミン-サイトカインネットワークが存在し、アレルギー性炎症に深く関わるといった知見も増え、その重要性が高まっている。

本研究において我々は、好酸球浸潤、IgE 産生とアレルギー性炎症を抑制する免疫調節薬であり、すでに臨床においてアレルギー疾患治療薬として用いられているトシル酸スプラタスト (スプラタスト) に着目した。以前の検討において、スプラタストは TDI 感作ラットにおける TDI 誘発の H1R mRNA 発現亢進をほぼ完璧に抑制することを見いだしている。しかしながら、ヒスタミンシグナルにおけるスプラタストの効果はまだ十分に説明出来ておらず、またサイトカインシグナルの抑制がヒスタミンシグナルへどのような影響を及ぼすかも不明である。

第二章「トシル酸スプラタストのヒスタミンシグナル抑制作用の検証」では TDI 感作鼻アレルギーモデルを用いて、TDI 誘発の鼻症状、H1R、HDC 及び IL-4 mRNA 発現亢進に対するスプラタストの作用を評価し、加えて、同モデルの鼻粘膜における IL-4 発現増加と H1R 発現増加の相関も検討した。

その後我々の研究室において、protein kinase C- δ (PKC δ) / extracellular signal-regulated kinase (ERK) / poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) シグナルが上記現象に関わること、PKC δ はアレルギー性鼻炎における重要な治療ターゲットの一つであることを明らかにした。また、スプラタストの抗アレルギー作用は

PKC δ シグナル経路抑制を介してではなく、他の経路の抑制を介していることも示唆された。更なる研究により、calcineurin (CN) / Nuclear factor of activated T cells (NFAT) シグナルを介することを明らかにしている。

第三章「鼻アレルギーに対する H1 受容体拮抗薬とスプラタストの併用効果」において、PKC δ シグナル経路を抑制する H1 受容体拮抗薬と CN/NFAT シグナルを抑制するスプラタストを TDI 感作鼻アレルギーモデルに併用することによる、TDI 誘発の鼻症状、H1R、HDC 及び TH2 サイトカイン mRNA 発現亢進に対する作用を評価した。さらに関与するシグナルを検証するため、Jurkat 細胞における IL-2、RBL-2H3 細胞における IL-9 発現亢進に対するスプラタストの作用も検証した。

以上の検討により、アレルギー性鼻炎に対するスプラタストの作用メカニズムならびにスプラタストと抗ヒスタミン薬との併用効果について考察した。

2. 第二章

トシル酸スプラタストの ヒスタミンシグナル抑制作用 の検証

2.1 序論

アレルギー性鼻炎は世界で最も罹患率の高い疾患の一つであり、人口の約 5-22%において、性・年齢・社会および民族などを超越し、健康と QOL に影響を及ぼしている[1]。また、アレルギー性鼻炎は他の慢性気道疾患をしばしば伴うことも知られており、アレルギー性鼻炎患者の約 60-80%は、喘息または気管支過敏症を併発するとの報告もある[2]。

アレルギー性鼻炎に対する様々な治療薬は既にあるが、いずれの治療薬も完治に繋がることは到底言えず、アレルギー性鼻炎の高い発生率、QOL の著しい低下、喘息、副鼻腔炎や中耳炎などの疾患が併発することからも、アレルギー性鼻炎に対するより有用な治療薬開発が望まれている。

アレルギー性鼻炎はくしゃみ、そう痒、うっ血、鼻漏と嗅覚の喪失を伴う上気道の炎症性疾患に分類される。これらの症状は鼻腔上皮粘膜に存在する肥満細胞の IgE を介した活性化が原因であることが報告されている[3]。肥満細胞の活性化はヒスタミンや他の多くの伝達物質の放出を引き起こす。ヒスタミンはアレルギーの初期反応において、ヒスタミン H1 受容体 (H1R) への結合を介することが報告され[4, 5]、アレルギー性鼻炎患者鼻腔内擦過物中の H1R mRNA の増加が認められること[6]や、通年性アレルギー性鼻炎患者において H1R mRNA の増加が認められること[7]も報告されている。

Toluene-2,4-diisocyanate (TDI) は高活性化学物質の一つであり、工業国における喘息の主要な原因の一つとして知られている[8]。これまでに我々は、TDI をラットまたはモルモットの鼻腔内に頻回投与することで、神経因性の炎症を介して肥満細胞からのヒスタミン誘発が起こり、それにより鼻過敏症が引き起こされる動物モデルの報告を行った[9-11]。また、TDI 感作ラットを用いた鼻アレルギーモデルにおいて、鼻粘膜中の H1R mRNA とタンパク発現量が亢進することも報告している[12, 13]。

ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) は、ほ乳類においてヒスチジンからヒスタミンを合成する唯一の酵素であり、HDC 活性を調節することはヒスタミンシグナルをコントロールする上で重要な因子である。我々は HDC mRNA 量、HDC 活性及びヒスタミン量は TDI 感作ラット鼻粘膜において有意な増加が認められることを報告している[13]。

これらの知見により、H1R と HDC 遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子であることが示唆され、H1R と HDC の発現レベルはアレルギー症状の重症度に影響を及ぼすと考えられる。またヒスタミンシグナルを抑制する薬剤は、新規抗アレルギー薬の開発に繋がることも考えられる。

IL-4、IL-5、IL-9 と IL-13 を含む Th2 サイトカインもアレルギー性炎症の病因において重要な役割を持つことが知られている[14]。特に IL-4 はアレルギー性炎

症において中心的な役割を果たしており，Th2 細胞の成長因子として T リンパ球の成熟や IgE の合成と肥満細胞の活性化にも関わる[15]．また，我々は TDI 感作ラット鼻粘膜において IL-4 と IL-5 mRNA の発現が亢進しており，TDI 感作ラットの鼻過敏症に関与していることを報告した[16, 17]．

近年，ヒスタミンがいくつかのサイトカインの産生と活性に影響を及ぼし，また，いくつかのサイトカインがヒスタミンの産生と放出に関与するといったヒスタミン-サイトカインネットワークがアレルギー性炎症へ深く関わる現象とその重要性に関する知見やエビデンスが増えてきている[18-20]．ヒスタミン，プロスタグランジン，ロイコトリエンやサイトカインの放出と FcεRI へのサイトカインの反応は，IL-4 の前処置により活性化することが報告されており[21, 22]，一方ヒスタミンは T 細胞からの IL-4 と IFN-γ 産生を調節し[23]，IL-5 の放出を引き起こすことも報告されている[24]．

トシル酸スプラタスト（スプラタスト）は IL-4 と IL-5 の産生を抑制することにより好酸球浸潤，IgE 産生とアレルギー性炎症を抑制する免疫調節薬であり[25]，鼻アレルギーに対する有用性などが報告されている[26]．従って，スプラタストはアレルギー性鼻炎の治療または予防にも有用であることが考えられる．以前我々は，ヒスタミンシグナルを抑制する化合物を探索し，TDI 感作ラットにおける TDI 誘発の H1R mRNA 発現亢進を，d-クロルフェニラミンは部分的にしか抑制しないが，スプラタストはほぼ完璧に抑制することを見いだした[27]．この知見により，TDI 感作ラットにおける H1R 発現亢進に関わる二つのシグナル，一つは，H1 受容体拮抗薬感受性かつスプラタスト感受性の経路，他の一つは，H1 受容体拮抗薬非感受性の経路の存在が示唆された．しかしながら，ヒスタミンシグナルにおけるスプラタストの効果はまだ十分に明らかにされていない．

本検討において我々は，TDI 感作鼻アレルギーモデルを用いて，TDI 誘発の鼻アレルギー様症状，H1R，HDC 及び IL-4 mRNA 発現亢進に対するスプラタストの作用を評価した，加えて，同モデルの鼻粘膜における IL-4 発現増加と H1R 発現増加の相関も併せて検討した．

2.2 実験方法

2.2.1 使用試薬など

トシル酸スプラタストは、大鵬薬品工業株式会社から贈与されたものを使用した。[Pyridinyl 5-³H] mepyramine (比活性 20 Ci/mmol) は PerkinElmer 社から、ラットとヒト glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の TaqMan assay 試薬はアプライドバイオシステムから、MEM- α medium, TRIzol reagent はインビトロジェン社から、BCA protein assay kit はシグマアルドリッチ社から、TDI, 酢酸エチル, リコンビナントラット IL-4 (rrIL-4) は和光純薬工業株式会社よりそれぞれ入手した。その他全ての実験試薬は分析化学用を使用した。

2.2.2 動物

6 週齢雄性 Brown Norway ラット (日本エスエルシー株式会社) を使用した (使用時体重: 200-250 g)。ラットは自由摂餌, 自由飲水下にて, 室温 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, 湿度 55 \pm 10%, 12 時間毎の明暗サイクル環境下で飼育した。ラットは 4 匹ごと三群 (コントロール群, TDI 感作群, 被験薬投与群) に分けた。なお, 全ての実験動物に対する処置は「徳島大学動物実験指針」に基づき徳島大学動物実験委員会において動物実験計画書の承認を受け, 適正に使用した。

2.2.3 TDI 感作, 鼻アレルギーの誘発及びスプラタストの投与

Kitamura らの方法[12]の変法を用いた。ラットに対し 10% TDI-酢酸エチル溶液を 10 μ L, 両方の鼻前庭に 5 日間連日塗布することで 1 度目の感作作業を行った。2 日, 間を開けた後に, 2 度目の感作作業を 5 日間繰り返した。2 度目の感作作業から 9 日後に, 10% TDI-酢酸エチル溶液を 10 μ L 両方の鼻前庭に塗布することで鼻アレルギー様症状を惹起した。コントロールラットには酢酸エチルのみを同手順で塗布した。スプラタスト (100 mg/kg) は滅菌水に溶解させ, 初回感作の 7 日後から 14 日間連日経口投与した。スプラタストの投与量が多いように一見思われるが, 大鵬薬品工業株式会社における前臨床試験においても 30-300 mg/kg の用量で検討されており, 100 または 300 mg/kg の用量で気道過敏の発現を抑制することが報告されている。また, 同様の用量を用いた検討の報告が多数なされている [28-32]。本試験においてスプラタストの低用量での効果は不明であるため, 十分な効果が期待出来る 100 mg/kg の用量を用いた。また, 我々の予備的な検討において, TDI 感作ラットに対する TDI 誘発鼻アレルギー症状, HIR, HDC 及び IL-4 mRNA 発現に対するスプラタストの抑制効果は, 3 または 7 日間のスプラタスト前投与により抑制され, その効果はスプラタスト単回投与にくらべより効果的で

あった（未掲載データ）。これらの知見と臨床においてもスプラタストは長期投与されていることから、我々はスプラタストを2週間投与することとした。

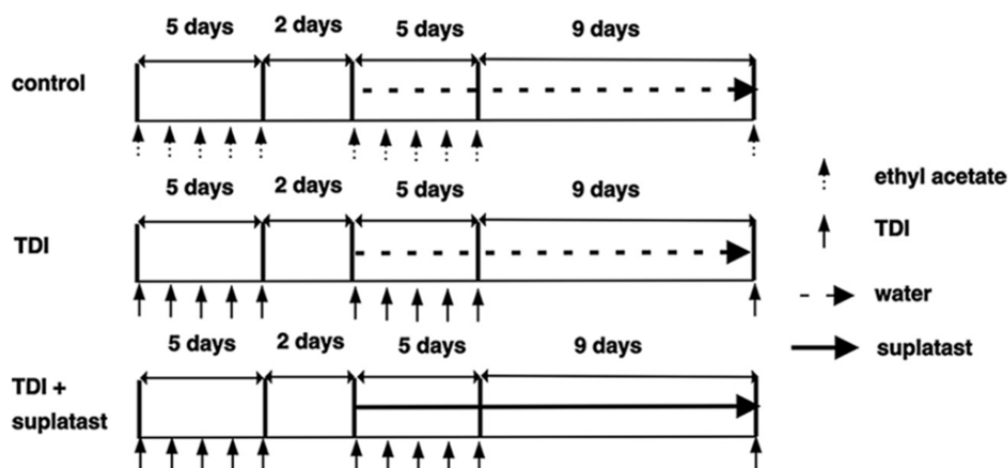


図1 TDI誘発鼻アレルギーモデルの作製と薬剤投与スケジュール

10 μ L の 10% TDI - ethyl acetate（酢酸エチル）溶液をラット鼻腔内に2週間投与（5日間連投，2日間休みのサイクル）することで感作を行った。最終投与から9日後に10 μ L の 10% TDI - 酢酸エチル溶液を投与することで病態を惹起させた。コントロール群は酢酸エチル溶液のみを用いて同様の操作を行った。suplatast（スプラタスト）投与群は100 mg/kg/dayの用量を，TDI初回投与1週間後より2週間連日経口投与した。なお，スプラタストの投与はTDI感作1時間前に行った。

2.2.4 鼻アレルギー様症状の評価

鼻アレルギー様症状の評価には，Abeらの方法[9]を用いて，くしゃみ回数と鼻漏の程度によって評価した。TDI暴露後，動物はプラスチックケージに入れ，10分間におけるくしゃみ回数と鼻漏の程度を評価した。鼻漏の程度は表1に示した指標に基づき評価した。

表1 鼻アレルギー様症状の評価基準

鼻症状	スコア			
	0	1	2	3
水様性鼻漏	(-)	鼻腔中	1と3の間	鼻から落ちる
鼻の腫れ及び発赤	(-)	少し膨らむ	1と3の間	強く腫れ上がる

2.2.5 mRNA の定量

2.2.5.1 ラット鼻粘膜組織の調製

TDIによるアレルギー様症状の惹起後、ラットを安楽死させ鼻粘膜組織を採取し、ただちにRNAlater (Applied Biosystems) 中に浸漬し、使用まで保存した (-80°C)。

2.2.5.2 組織からの total RNA 抽出, cDNA の作製

保存していた組織を取り出し、Polytron (Model PT-K; Kinematica) を用いてホモジナイズした。Total RNA の抽出には TRIzol reagent (Invitrogen) を用い、手順は添付マニュアルに従った。得られた RNA を SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて cDNA へと逆転写させた。

2.2.5.3 リアルタイム定量 RT-PCR

TaqMan プライマーとプローブは Primer Express software (Applied Biosystems) を用いて設計した。用いたプライマーとプローブの塩基配列は表 2 に示した。リアルタイム定量 RT-PCR は GeneAmp 7300 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて行った。PCR 産物と PCR 反応の特異性はアガロースゲル電気泳動を用いて確認を行った。PCR 産物の塩基配列の確認は遺伝子解析システム (Beckman CEQ 8000; Beckman Coulter) を用いて行った。またリアルタイム定量 RT-PCR の主な変動の要因である RNA の純度や逆転写効率の差を補正する内部標準として、細胞の活性化あるいは増殖といった環境条件に伴う発現の変動が理論上無く、常に一定レベルで発現していると考えられているハウスキーピング遺伝子 GAPDH を用いた。

表 2 本試験で使用したリアルタイム定量 RT-PCR 用
プライマーとプローブの塩基配列

Primer/probe name	Sequence
Rat H1R mRNA	
Sense primer	5'-TATGTGTCCGGGCTGCACT-3'
Anti-sense primer	5'-CGCCATGATAAAACCCCACTG-3'
Probe	FAM-CCGAGAGCGGAAGGCAGCCA-TAMRA
Human H1R mRNA	
Sense primer	5'-CAGAGGATCAGATGTTAGGTGATAGC-3'
Anti-sense primer	5'-AGCGGAGCCTCTTCCAAGTAA-3'
Probe	FAM-CTTCTCTCGAACGACTCAGATACCACC-TAMRA
Rat HDC mRNA	
Sense primer	5'-GCAGCAAGGAAGAACAAAATCC-3'
Anti-sense primer	5'-CAACAAGACGAGCGTTCAGAGA-3'
Probe	FAM-AAAGCGCATGAGCCCAATGCTGCTGAT-TAMRA
Rat IL-4 mRNA	
Sense primer	5'-CAGGGTGCTTCGCAAATTTTAC-3'
Anti-sense primer	5'-CACCGAGAACCCAGACTTG-3'
Probe	FAM-CCCACGTGATGTACCTCCGTGCTTG-TAMRA

2.2.5.4 正常ラット (TDI 未処置ラット) 鼻粘膜に対する IL-4 処置による H1R 発現に対する作用評価

PBS に溶解させた rrIL-4 10 μ L (0-1.0 μ g/rat) を両側鼻腔内に投与した。投与 4 時間後にラットを安楽死させ鼻粘膜組織を採取し、H1R mRNA の定量を行った。

2.2.5.5 正常ラット鼻粘膜に対するヒスタミン処置による IL-4 発現に対する作用評価

ヒスタミン 10 μ L (0-3 mg/rat) を両側鼻腔内に 1 日 1 回投与した (1, 3, 7 日間)。最終投与 4 時間後にラットを安楽死させ鼻粘膜組織を採取し、H1R mRNA の定量を行った。

2.2.6 [³H] mepyramine binding assay

鼻粘膜を採取し、10 倍量 (w/v) の 50 mM Na₂/K phosphate buffer 中でポリトロンを用いてホモジナイズした。上清を遠心操作 (18,000 rpm, 30 分, 4°C) にて除去し、沈殿を 10 倍量 (w/v) の 50 mM Na₂/K phosphate buffer で再懸濁させ、[³H] mepyramine binding assay における細胞膜サンプルとして使用した。タンパク量として 100 μ g の細胞膜サンプルを、1 nM の [³H] mepyramine と 10 μ M のトリプロロリ

ジン存在下, 非存在下にて 25°C, 60 分インキュベートした (最終容量: 500 μ L). 事前に 1% polyethyleneimine に浸した Whatman GF/B フィルターにて濾過を行うことで反応を停止し, フィルターにトラップされた放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した. 10 μ M トリプロリジンを処置した群での結合活性を非特異的な結合として減じ, 得られた放射活性を特異的な結合として算出した.

2.2.7 HeLa 細胞の培養及び薬剤処置

HeLa 細胞は 8%ウシ胎児血清 (FCS, Sigma-Aldrich) およびペニシリン (100 IU/mL, Sigma-Aldrich) ストレプトマイシン (50 μ g/mL, Sigma-Aldrich) を添加した MEM- α 培地を用い, 37°C, 5%CO₂ インキュベーターにて培養を行った. 35mm dish で約 70%コンフルエントの細胞に 10 μ M ヒスタミンまたは 5 ng/ml rrIL-4 を処置した. 10 μ M の d-クロルフェニラミン (1 時間前) または 100 μ M のスプラタスト (24 時間前) の処置後, ヒスタミンまたは IL-4 処置 3 時間後における H1R mRNA の発現を評価した.

2.2.8 鼻腔内洗浄液中のヒスタミン含量の測定

鼻腔内洗浄液の採取は Durland らの方法[33]の変法を用いた. ラットをジエチルエーテル麻酔下で吸引器に接続したポリエチレンチューブを左鼻腔内に入れ弱い陰圧を掛けた. 37°Cに温めた PBS を右鼻腔内に 1.5 mL 注入することで鼻腔内を洗浄し洗浄液を得た. 同じ操作を左右逆にして繰り返した. 得られた鼻腔内洗浄液を新しいチューブに移した後に, 10 μ L の 60%過塩素酸を加えた. 混合後, 上清を遠心操作 (10,000 x g, 4°C, 15 分) により得た後に 200 μ L を新しいチューブに移し, 測定まで-20°Cで保存した. 鼻腔内洗浄液中のヒスタミン含量の測定は HPLC システムを用いて行った (後述).

2.2.9 鼻粘膜中の HDC 活性とヒスタミン含量の測定

鼻粘膜を採取し, 10 倍量 (w/v) の氷冷 HDC buffer 中でポリトロンを用いてホモジナイズした後に, 遠心操作 (10,000 x g, 4°C, 15 分) により上清を得た (上清 A). 上清 A の半量を十分量の HDC buffer 中で透析操作を 3 回行い (4°C, 6 時間), 上清 B を得た. 残りの上清 A を用いてヒスタミン含量を HPLC システム

(cation exchanger (Tosoh), automated o-phthalaldehyde fluorometric detection system (Hitachi)) を用いて, 過去に検討した方法[13]で測定した. HDC 活性は, 上清 B を 0.25 mM ヒスタミンと 4 時間 37°Cで反応させることにより測定した. ヒスタミン合成量はブランク値を引いて算出した.

HDC buffer の組成

0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8)

0.2 mM DTT

0.01 mM pyridoxal-5'-phosphate

1% polyethylene glycol (average M.W. 300 kDa)

100 µg/ml PMSF

2.2.10 タンパク定量

タンパク定量は BCA protein assay kit (Sigma-Aldrich) を用いて、BSA 標品を指標に測定した。

2.2.11 統計処理

実験データは、平均±標準誤差で示した。また、GraphPad Prism software (GraphPad Software INC.) を用いて、One-way ANOVA および Dunnett's multiple comparison test により統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意な変化とした。

2.3 実験結果

2.3.1 TDI 誘発鼻アレルギー様症状に対するスプラタストの効果

TDI 感作ラットにおいて、TDI 処置により鼻アレルギー様症状（くしゃみ，鼻水）が引き起こされた。スプラタストを 2 週間、本モデルに前投与することにより、TDI 誘発のくしゃみと鼻かき行動を有意に減少させたが（図 2a, 2b），鼻アレルギー様症状スコアには影響しなかった（図 2c）。なお，コントロールラットにおいて TDI 処置による鼻アレルギー様症状は認められなかった。

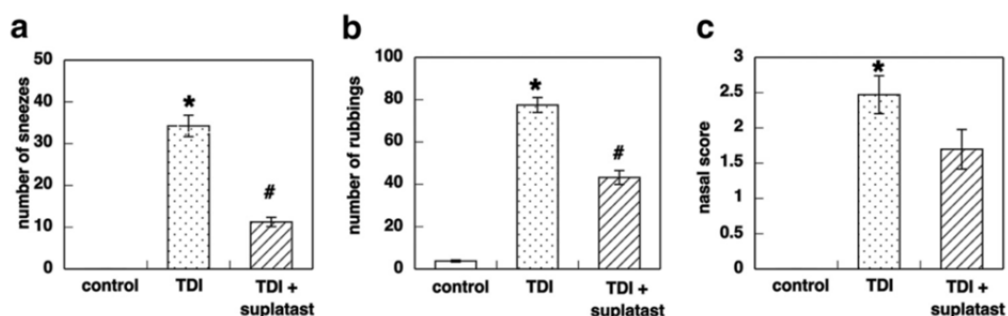


図 2 TDI 誘発鼻アレルギー症状に対するスプラタストの効果

実験方法の項目に記載の手法でラットの感作，病態惹起を行った。

惹起後 10 分間における，

- number of sneezes（くしゃみ回数）
- number of rubbings（鼻かき行動の回数）
- nasal score（鼻膨張，発赤及び鼻漏の程度を表 1 の基準に従いスコア化）

を示した。

データは平均±標準誤差（N=4）で示した。

* : $p < 0.01$ vs コントロール群，# : $p < 0.01$ vs TDI 群

2.3.2 鼻粘膜中の TDI 誘発 H1R mRNA 及びタンパク発現亢進に対するスプラタストの効果

TDI 感作ラットに TDI を繰り返し処置することにより H1R mRNA 発現亢進作用が認められ、その発現は TDI 誘発後 4 時間で最大となる[12]。スプラタストの前投与は、TDI 感作ラット鼻粘膜における H1R mRNA の発現を有意に減少させた (図 3a)。

次に、H1R タンパク発現についても検討した。TDI 感作ラット鼻粘膜において TDI 処置による³H] mepyramine 結合活性は有意に増加し (図 3b)、スプラタストの前投与により結合活性は有意に低下し (図 3b)、TDI 感作ラット鼻粘膜において H1R の発現が減少したことが示された。

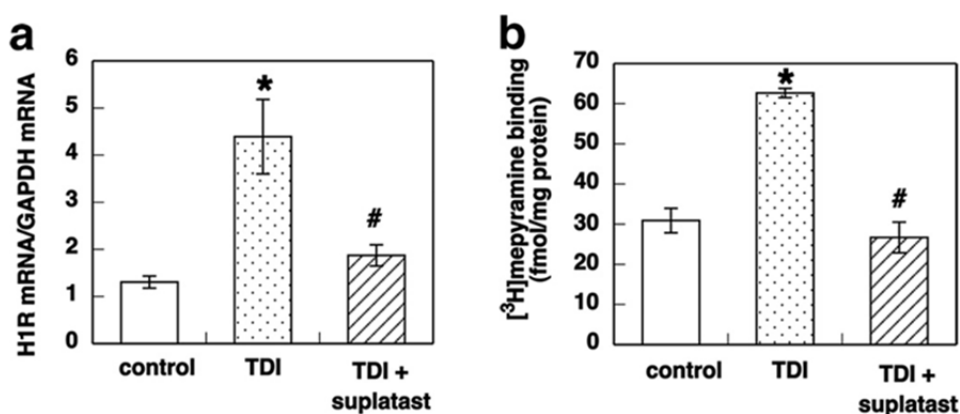


図 3 TDI 感作ラットの TDI 誘発 H1R mRNA (a) 及び H1R タンパク発現亢進 (b) に対するスプラタストの効果

実験方法の項目に記載の手法でラットの感作、病態惹起を行った。

- TDI による病態惹起 4 時間後にラットを安楽死させ、H1R mRNA 量を測定した。
- TDI による病態惹起 24 時間後にラットを安楽死させ、実験方法の項目に記載の方法で³H] mepyramine 結合活性を測定した。

データは平均±標準誤差 (N=4) で示した。

* : p<0.01 vs コントロール群, # : p<0.01 vs TDI 群

2.3.3 TDI 誘発 HDC mRNA 発現と HDC 活性亢進に対するスプラタストの効果

TDI 感作ラット鼻粘膜におけるヒスタミンの増加は HDC 活性の増加に伴うと考えられ, TDI 感作ラットにおいて HDC mRNA 発現と HDC 活性が有意に亢進し, TDI 投与後 4 または 9 時間後に最大となることが報告されている[13]. よって我々は TDI 投与後 9 時間の鼻粘膜を採取し, HDC 活性に対するスプラタストの効果を検討した. 図 4a に示したように, スプラタストの前投与により TDI 感作ラット鼻粘膜における HDC 活性の顕著な抑制効果が認められた. TDI 感作ラット鼻粘膜における HDC 活性の亢進は HDC mRNA 発現亢進によって引き起こされ, また, スプラタストによる HDC 活性の抑制作用は, HDC mRNA 発現を抑制することによるものと考えられた.

この仮説を検証するため, 我々は TDI 感作ラット鼻粘膜における HDC mRNA 発現とそれに対するスプラタストの効果を検討した. その結果, TDI を繰り返し TDI 感作ラットに処置することにより, 鼻粘膜中の HDC mRNA 発現亢進作用が認められ, スプラタストは有意にその発現亢進を抑制した (図 4b).

2.3.4 鼻腔内洗浄液及び鼻粘膜中における TDI 誘発ヒスタミン増加作用に対するスプラタストの効果

TDI 投与後の鼻アレルギー様症状は鼻腔内におけるヒスタミン産生と強く相関する. よって我々は鼻腔内洗浄液中のヒスタミン含量に対するスプラタストの効果を検討した. その結果, スプラタストは鼻腔内中のヒスタミン含量を顕著に低下させた (図 4c).

また, 鼻粘膜中のヒスタミン含量は TDI 投与後 9 時間において最大になるという報告があり[13], 次に我々は TDI 投与後 9 時間における鼻粘膜中のヒスタミン含量に対するスプラタストの効果を検討した. その結果, スプラタストの前投与は鼻粘膜中ヒスタミン含量を減少させる傾向にあったが有意な作用ではなかった (図 4d).

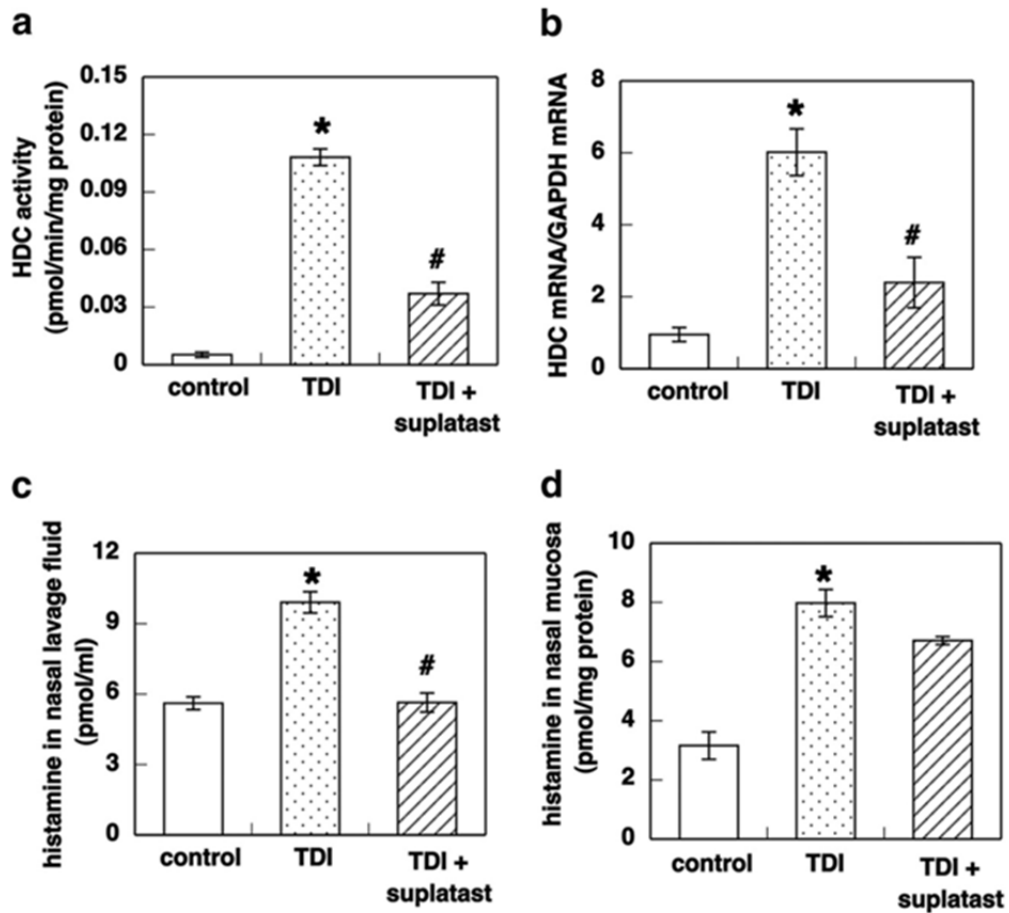


図4 TDI感作ラットのTDI誘発HDC活性(a), HDC mRNA(b), 鼻洗浄液中のヒスタミン含量(c)及び鼻粘膜中のヒスタミン含量(d)に対するスプラタストの効果

実験方法の項目に記載の手法でラットの感作, 病態惹起を行った.

- TDIによる病態惹起9時間後にラットを安楽死させ, 鼻粘膜中のHDC活性をHPLCで測定した.
- TDIによる病態惹起4時間後にラットを安楽死させ, HDC mRNA量を測定した.
- TDIによる病態惹起10分後のラットからエーテル麻酔下で両側鼻腔より nasal lavage fluid (鼻洗浄液) を回収した. そのヒスタミン含量をHPLCで測定した.
- TDIによる病態惹起9時間後にラットを安楽死させ, nasal mucosa (鼻粘膜) 中のヒスタミン含量をHPLCで測定した.

データは平均±標準誤差(N=4)で示した.

* : p < 0.01 vs コントロール群, # : p < 0.01 vs TDI 群

2.3.5 TDI 誘発 IL-4 mRNA 発現亢進に対するスプラタストの効果

IL-4 はアレルギー疾患の病因において重要な役割を担っており、TDI 感作ラット鼻粘膜において IL-4 mRNA の発現が TDI 処置後 4 時間において最大となる。スプラタストは Th2 サイトカイン阻害薬であることから、我々は TDI 誘発 IL-4 mRNA の発現亢進に対するスプラタストの作用を検討した。その結果、スプラタストはほぼ完全に TDI 誘発 IL-4 mRNA の発現亢進を抑制した (図 5)。

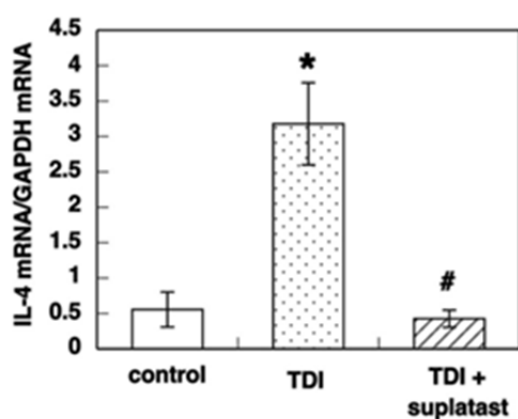


図 5 鼻粘膜における TDI 誘発 IL-4 mRNA 発現亢進に対するスプラタストの効果

実験方法の項目に記載の手法でラットの感作、病態惹起を行った。

TDI による病態惹起 4 時間後にラットを安楽死させ、IL-4 mRNA 量を測定した。

データは平均±標準誤差 (N=4) で示した。

* : $p < 0.01$ vs コントロール群, # : $p < 0.01$ vs TDI 群

2.3.6 TDI 未処置の正常ラット鼻粘膜における IL-4 またはヒスタミン処置による H1R 及び IL-4 mRNA 発現に対する作用

TDI 感作ラット鼻粘膜においてヒスタミン及び IL-4 mRNA 発現が亢進することから、ヒスタミンと IL-4 シグナルとの間に何らかの関係があることを仮説として考えた。我々は以前、TDI 感作ラットに対する H1 受容体拮抗薬の予防的投与が TDI 誘発の H1R と IL-4 mRNA 発現亢進作用を抑制すると報告しており[34]、上記仮説を支持するものである。この仮説を検証するため、我々は rrIL-4 またはヒスタミンを正常ラット鼻腔内に直接投与した際の H1R または IL-4 mRNA 発現に対する作用を検討した。

予備検討において、rrIL-4 またはヒスタミンを正常ラット鼻腔内に直接投与することで、H1R 及び IL-4 mRNA の発現が投与 4 時間後に最大となるデータが得られている（未掲載データ）。図 6 に示したように、IL-4 をラット鼻腔内に投与した結果、IL-4 濃度依存的な H1R mRNA 発現上昇作用が認められた。一方ヒスタミンは鼻腔内へ 1 週間投与することで、濃度依存的な IL-4 mRNA 発現上昇作用が認められた（図 7a）。しかしながら、ヒスタミンの単回投与では IL-4 mRNA レベルの有意な上昇作用は認められなかった（図 7b）。

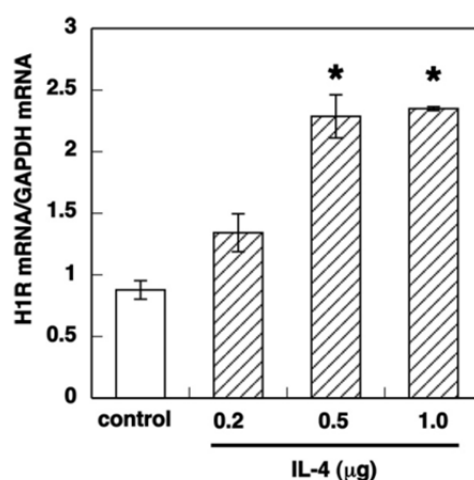


図 6 正常ラット鼻粘膜への IL-4 処置による H1R mRNA 発現に対する作用

rrIL-4 を正常ラット鼻腔内に処置し(0-1.0 µg/rat), 4 時間後に安楽死させ, H1R mRNA 量を測定した。

データは平均±標準誤差 (N=4) で示した。

* : p<0.01 vs コントロール群

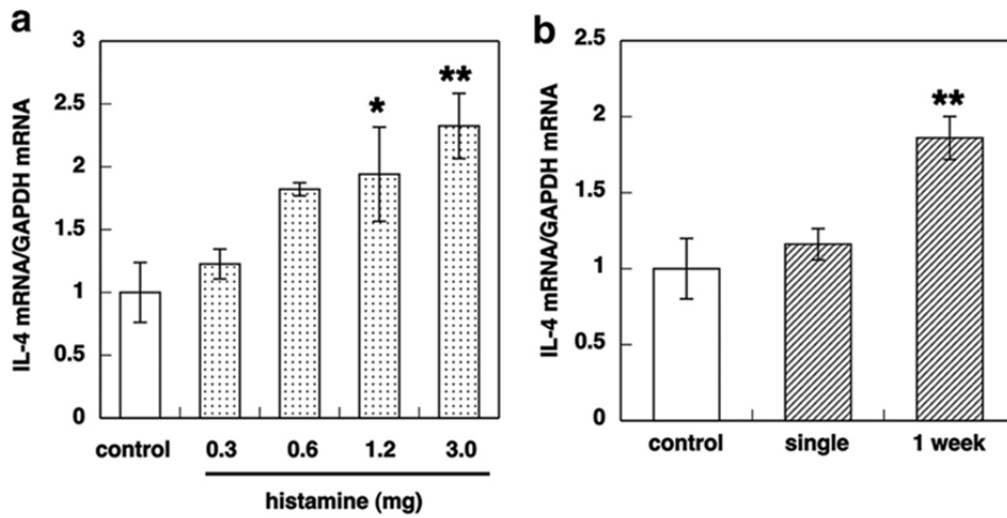


図7 正常ラット鼻粘膜へのヒスタミン処置による
IL-4 mRNA 発現に対する作用

a. 濃度依存反応

10 μ L のヒスタミンを正常ラット両側鼻腔内に 1 週間処置した (0-3 mg/rat).

b. 時間依存反応

3 mg のヒスタミンを正常ラット両側鼻腔内に single (1 日) または 1 week (1 週間連日) 処置した.

鼻粘膜をヒスタミンの最終投与 4 時間後に回収し, IL-4 mRNA 量を測定した.

データは平均 \pm 標準誤差 (N=4) で示した.

* : $p < 0.05$ vs コントロール群, ** : $p < 0.01$ vs コントロール群

2.3.7 HeLa 細胞におけるヒスタミンまたは IL-4 誘発の H1R mRNA 発現亢進作用に対するスプラタストの効果

HeLa 細胞をヒスタミンで刺激することにより，有意かつ一過性の H1R mRNA 発現亢進が刺激後 9 時間をピークとして引き起こされ，さらに H1R を介することが示されている[35]．図 8a に示したように，10 μ M の d-クロルフェニラミンを 1 時間前処置することにより，ヒスタミン誘発 H1R mRNA 発現亢進作用は完全に阻害された．スプラタストは TDI 感作ラット鼻粘膜における H1R mRNA 発現亢進の抑制作用を持つことから，我々は次に HeLa 細胞におけるヒスタミン誘発 H1R mRNA 発現亢進に対するスプラタストの作用を検討した．その結果スプラタストの前処置は HeLa 細胞におけるヒスタミン誘発 H1R mRNA 発現亢進には作用を及ぼさなかった（図 8a）．

また，我々は HeLa 細胞において IL-4 誘発 H1R mRNA 発現亢進作用を見いだしており[36]，IL-4 誘発 H1R mRNA 発現亢進作用に対するスプラタストの作用も検討した．図 8b に示したとおり，IL-4 誘発 H1R mRNA 発現亢進作用に対するスプラタストの濃度依存的な抑制作用が認められた．

なお，スプラタスト自身には H1R mRNA 発現亢進作用は無いことは確認している．

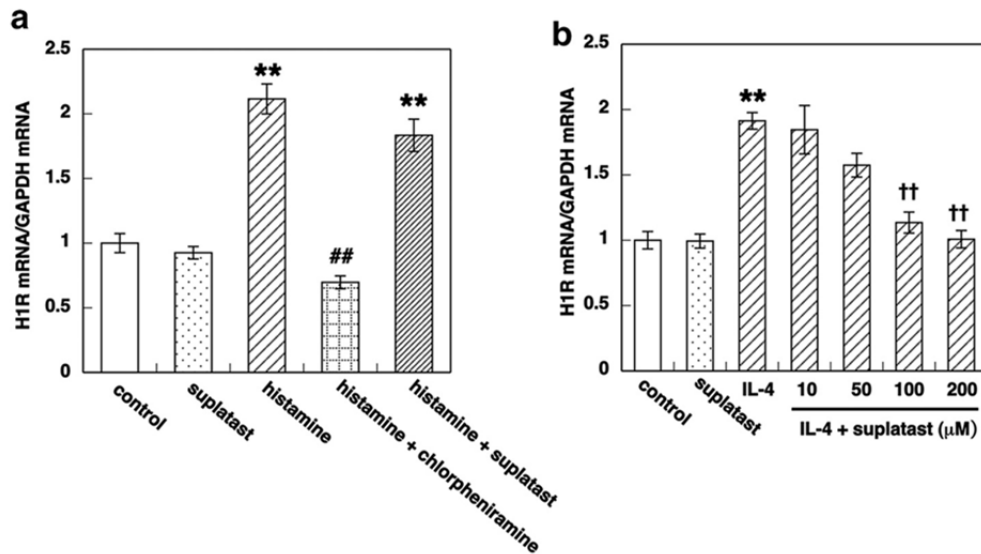


図8 HeLa細胞におけるヒスタミン誘発 (a) 及び IL-4 誘発 (b) H1R mRNA 発現亢進に対するスプラタストの効果

HeLa 細胞は無血清培地で 37°C, 24 時間血清飢餓培養を行った後に, 10 μM ヒスタミン (a) または 5 ng/mL IL-4 (b) を処置した.

- 10 μM の chlorpheniramine (d-クロルフェニラミン, 陽性対照) または 100 μM のスプラタストをヒスタミン処置 1 時間前に前処置した.
- 0-200 μM のスプラタストを IL-4 処置 24 時間前に前処置した.

ヒスタミン処置 3 時間後または IL-4 処置 4 時間後に細胞を回収し, H1R mRNA 量を測定した.

データは平均±標準誤差 (測定は triplicate で行い, 独立した 4 回の検討を行った) で示した.

** : $p < 0.01$ vs コントロール群, ## : $p < 0.01$ vs ヒスタミン投与群,

†† : $p < 0.01$ vs IL-4 投与群

2.4 考察

本検討において、我々はアレルギー性鼻炎のモデルとして TDI 感作ラットを使用した。

TDI 感作モルモットとラットは、TDI を鼻腔内投与することにより、鼻粘膜におけるニューロペプチドを介して肥満細胞からヒスタミン放出が生じ、くしゃみと鼻漏などの鼻アレルギー様症状を引き起こす[9-12, 37, 38]。一般的にはアレルギー性鼻炎とは IgE を介した疾患であり、IgE を介さない鼻炎である TDI 誘発鼻炎とは異なると考えられるが、TDI によって引き起こされる鼻アレルギー様症状はアレルギー性鼻炎患者で観察される症状と似ている[39, 40]。加えて、好酸球や肥満細胞の浸潤といったヒトにおけるアレルギー性鼻炎で特徴的な多数の所見と同様な所見が、TDI 感作ラットにおいても示されている[41]。

また、TDI 感作動物からのヒスタミン産生が IgE ではなくニューロペプチドによって引き起こされるにも関わらず、サイトカインレベルの上昇[8, 42-44]、H1R mRNA 及びタンパク量の増加[12]、HDC mRNA 発現量、HDC 活性及びヒスタミン含量の増加[13]、さらに TDI 処置による IL-4, IL-5 mRNA の発現亢進が認められる知見もあり[16,17]、我々は TDI 感作ラットをアレルギー性鼻炎のモデルであると考えている。

くしゃみと鼻かき行動などのアレルギー様症状は TDI 処置 10 分後に観察されており、TDI 感作時期に形成されたケミカルメディエーターによって主に引き起こされる初期のアレルギー反応であると考えられ、本検討においてスプラタストは初期のアレルギー反応に対する作用を評価していると考えられる。

スプラタストの前処置はくしゃみと鼻かき行動を有意に減少させたが（図 2a, 2b）、鼻の膨張と鼻漏は減少させなかった（図 2c）。ヒスタミンは知覚神経終末にある H1R に結合し、くしゃみと鼻かき行動を引き起こすことが報告されている[45]。これに対し、鼻の膨張、鼻漏とうっ血に関してはロイコトリエンやプロスタグランジンといった他のメディエーターが主に関与すると報告されている[46]。このことが鼻スコアに対してスプラタストが有意な作用を及ぼさなかった理由であると考えている。

H1R mRNA の発現は、通年性アレルギー患者の鼻粘膜における上皮、内皮および神経細胞において増加することが報告されている[47, 48]。また、鼻アレルギーの進行に伴い鼻粘膜における H1R の結合活性が増加することも報告されている[49]。我々も TDI 感作ラットにおける鼻粘膜中 H1R mRNA とタンパク両方の発現亢進を報告している[12,13]。したがって、TDI 感作ラットの鼻アレルギー様症状の発現は、鼻粘膜における H1R の発現増加によるものと考えられる。

スプラタストは H1R mRNA 発現を有意に抑制し（図 3a）、TDI 感作ラットで TDI 処置により増加した鼻粘膜中の H1R タンパク発現も有意に抑制した（図 3b）。

これらのデータより、スプラタストは TDI 誘発の H1R 発現亢進を抑制することで鼻過敏状態を改善していることが示唆された。

HDC によるヒスタミンの合成はヒスタミンシグナルの重要な調節機構を担っている。また、HDC mRNA 発現はアレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜において増加するといった報告[50]や、TDI によって誘発される HDC mRNA 発現、HDC 活性及びヒスタミン含量が有意に増加するといった報告[13]は、アレルギー反応における HDC の重要性を示している。

スプラタストの前処置は、鼻粘膜における HDC 活性と HDC mRNA 発現亢進を有意に抑制し（図 4a,4b）、鼻粘膜におけるヒスタミン含量も顕著ではないものの減少させた（図 4d）。しかし、ヒスタミン処置ラットにおいて HDC 活性は 30% ほど残っており（図 4a）、図 4d での鼻粘膜に残存したヒスタミンは、この残った HDC 活性によるものと考えられる。ヒスタミンはアレルギー性鼻炎の重要なケミカルメディエーターであることから、HDC 活性と HDC 発現抑制によるヒスタミン発現抑制は、アレルギー性鼻炎に対するスプラタストの有用な効果となり得ることが考えられる。

アレルギー性鼻炎症状の進展は、鼻腔内粘膜における肥満細胞の活性化及びヒスタミン放出に付随して起こる。本検討においてスプラタストは鼻腔内洗浄液へのヒスタミン放出を有意に抑制した（図 4c）。スプラタストは腸間膜肥満細胞における抗原誘発脱顆粒を抑制し、ラット腹膜滲出細胞からのヒスタミン放出を抑制することが報告されている[51]。従って、スプラタストの前処置により鼻腔内洗浄液中のヒスタミン含量が低下したことは、肥満細胞からのヒスタミン放出を抑制したことによると示唆された。

アレルギー性鼻炎は IL-4, IL-5 などの Th2 サイトカインの増加を引き起こす特徴も持っている。IL-4 は Th2 細胞の成熟, IgE 産生亢進, 肥満細胞の活性化など、アレルギー反応の様々な段階における制御に関わっている[52]。

スプラタストは Th2 サイトカイン阻害薬として知られているが、IL-4 遺伝子発現に対するスプラタストの作用はまだ検討されていなかった。我々のデータにより、IL-4（図 5）と IL-5（未掲載データ）発現を翻訳レベルで抑制することが明確になった。しかし、本試験において我々は、IL-4 と IL-5 発現亢進に伴う好酸球浸潤に対するスプラタストの効果を検討出来ていない。ただ、TDI 感作モルモットにおいて TDI 誘発の好酸球と肥満細胞の浸潤が起こることが報告されており[41]、TDI 感作ラットにおいて TDI 誘発の好酸球浸潤の知見を我々も得ている（未発表データ）。

以上より、スプラタストは IL-4 と IL-5 の発現を抑制することから、スプラタスト処置により好酸球の浸潤が抑制されることが強く期待できる。

アレルギー性炎症に関わるサイトカインネットワークについて色々と解明されつつあり、いくつかのサイトカインの発現と活性にヒスタミンが影響し、同様にヒスタミンの産生と放出にサイトカインが関わっている、ヒスタミン-サイトカインネットワークの重要性についてのエビデンスが世の中で蓄積してきている[18, 19, 53]. 我々は TDI 感作ラットにおいて H1R 遺伝子発現亢進が H1 受容体拮抗薬 (d-クロルフェニラミンやオロパタジン) により部分的に抑制されることを報告した[27]. この TDI 誘発 H1R 遺伝子発現亢進はスプラタストによって完全に抑制された (図 3a). これらの知見は H1R mRNA 発現亢進に関わる経路に H1R を介在する経路の他、非介在の経路の存在を示唆する.

以前の検討において我々は、H1 受容体拮抗薬の予防的投与が TDI 感作ラットにおける H1R だけでなく IL-4 mRNA の発現亢進も抑制することを報告した[34]. また、IL-4 を非 TDI 処置ラットの鼻腔内へ直接投与することで H1R mRNA の発現亢進を引き起こされることを見いだした (図 6). IL-4 処置による H1R mRNA 発現亢進は HUVEC やリウマトイド滑液線維芽細胞でも起こることも報告されている[54, 55].

一方、ヒスタミンを 1 週間正常ラットの鼻腔内に投与することで IL-4 mRNA 発現が亢進した (図 7a). しかしながら、ヒスタミンの単回投与ではそれは観察されなかった (図 7b). この理由として、ヒスタミン刺激による IL-4 産生には IL-4 産生細胞の鼻粘膜への集積が必要であり、それによるタイムラグの可能性が示唆されるが、その細胞の同定には至っていない. 以上の知見により、ヒスタミンと IL-4 のクロストークの存在 (ヒスタミンが H1R を介して IL-4 遺伝子発現亢進を引き起こし、IL-4 も H1R の発現亢進を引き起こす) が示唆される.

以前の我々の検討において、HeLa 細胞をヒスタミン処置することにより H1R の発現亢進が起こることを示した[35]. この反応は、d-クロルフェニラミンにより抑制されることから、HeLa 細胞におけるヒスタミン誘発の H1R 発現亢進は H1R を介することが分かっている[35]. 加えて、IL-4 も H1R 遺伝子発現を HeLa 細胞で引き起こす (図 8b). 以上のことより、TDI 感作ラットにおける H1R 遺伝子の発現亢進に関し IL-4 は重要な因子の一つであると考えられる.

以上ヒスタミンが H1R を介して IL-4 遺伝子発現亢進を、IL-4 も H1R の発現亢進を引き起こすという知見から、ヒスタミンと IL-4 の関係において「アレルギー悪循環サイクル」が存在し、つまり、H1R 発現亢進はヒスタミン感受性の亢進とアレルギー症状の悪化に繋がるということが考えられる.

図 3a と図 5 に示したように、スプラタストは H1R と IL-4 両方の TDI 誘発遺伝子発現亢進を抑制する. 従って、H1R だけでなく IL-4 を介した H1R の発現亢進をスプラタストは抑制し、「アレルギー悪循環サイクル」を遮断することで TDI 感作ラットにおけるアレルギー症状の回復に繋がるということが考えられる.

また、HeLa 細胞におけるヒスタミン誘発 H1R 発現亢進は、ヒスタミンと H1R との間に上記のサイクルとは他の「アレルギー悪循環サイクル」が存在することを示唆し、ヒスタミンによる H1R 発現亢進はヒスタミンへの感受性向上とアレルギー症状の悪化に繋がることが考えられる。鼻腔内洗浄液中におけるヒスタミン含量のスプラタストによる低下は、この二つめの「アレルギー悪循環サイクル」も遮断すると考えられたが、スプラタストは HeLa 細胞において、H1R を介した H1R 発現亢進は抑制せず (図 8a)、濃度依存的な IL-4 誘発 H1R 発現亢進抑制作用のみを示した (図 8b)。このことより、HeLa 細胞においてスプラタストは、H1R を介する H1R 発現亢進のシグナル経路に直接は作用せず、IL-4 を介する経路を抑制することが示唆された。また、TDI 感作ラットにおける TDI 誘発の H1R 介在 H1R の発現亢進に対するこのスプラタストの抑制効果は、HDC 発現抑制によるヒスタミンの低下によるものと考えられた。

近年、マウスを用いた TDI 誘発鼻炎モデルの作製と特徴付けが行われ[56]、TDI によって引き起こされる Th1/Th2 混合型の炎症反応の存在と、それが下気道でなく上気道において炎症と遺伝子発現変化を引き起こすことが報告された。このことから、TDI 誘発の鼻炎はアレルゲン誘発の鼻炎とは異なることが示唆された。よって我々の知見は、スプラタストの臨床における効果をすべて説明できる訳ではないが、いくつかの臨床データを説明しうるデータであると考えた。

他にも、スプラタストを抗原抗体反応の作動相 (OVA 感作マウスへの OVA 暴露 3 日前) に投与することで抗原誘発粘液分泌過多と好酸球浸潤を阻害したが、誘導相にスプラタストを投与しても効果はなかったとの報告もある[32]。我々の予備的な検討において、鼻粘膜における TDI 誘発 H1R、HDC 及び IL-4 mRNA 発現亢進と鼻アレルギー様症状に対してスプラタストは、単回投与では有意な作用がないが、3 日以上連投することでより効果があることを見いだしている (未掲載データ)。これらの二つの知見により、TDI 及び抗原誘発鼻炎両方に対しスプラタストの長期投与が効果的であると考えた。

H1 受容体拮抗薬は H1R へ結合することによりヒスタミンシグナル抑制を引き起こすことが知られている。小児アトピー性喘息の予防のために早期にスプラタストを投与することで、H1 受容体拮抗薬の一つであるケトチフェンと比較して喘鳴と喘息をより予防することが報告されている[57]。この知見は我々のデータで説明できると考える。つまり、スプラタストは H1R を介した H1R の発現亢進だけでなく IL-4 誘発 H1R 発現亢進も抑制するが、H1 受容体拮抗薬は H1R を介した H1R 発現亢進だけしか抑制しない。したがって、スプラタストはケトチフェンより効果的であると考えられる。

結論として、TDI 感作ラットのアレルギー性鼻炎に対するスプラタストの投与は鼻アレルギー様症状を寛解した。そのメカニズムとして、TDI 誘発 H1R 及び IL-4

を介した H1R 発現亢進の抑制作用が示唆された。また、IL-4 誘発 H1R 遺伝子発現亢進を、IL-4 mRNA の発現を低下することで抑制した。加えて、HDC 遺伝子発現の抑制とヒスタミン放出の抑制によって H1R を介する H1R 発現亢進を抑制した。よって我々の検討はヒスタミンがアレルギー症状の悪化の過程において、単なるケミカルメディエーターとしてだけではなく「アレルギー悪循環サイクル」の重要な調節因子として重要な役割を担うことを示したと考える。

3. 第三章

鼻アレルギーに対する H1 受容体拮抗薬と スプラタストの併用効果

3.1 序論

花粉症は草木の花粉に対する過敏症に起因する季節性アレルギー性鼻炎で、米国では 3600 万人以上、日本においても人口の約 30%にのぼる患者がいるとされている[1, 2]. 代表的な症状として、発作性かつ反復性のくしゃみ、鼻漏と鼻閉が挙げられる.

ヒスタミンは、特に初期相のアレルギー反応における主要なケミカルメディエーターであり、主にヒスタミン H1 受容体 (H1R) の活性化を介する. ゆえに、H1 受容体拮抗薬はアレルギー性鼻炎における各種鼻症状に対する第一選択薬として広く使用されている.

以前我々の研究室において、H1R 遺伝子の発現がスギ花粉症患者のアレルギー症状の重症度と強く相関していることを証明した[3]. また、TDI 感作ラットにおいて H1R 発現亢進抑制とアレルギー症状を軽減することも報告している[4-7]. さらに、我々は H1R が恒常的に発現している HeLa 細胞を用いた検討により、ヒスタミンと phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 刺激による H1R mRNA 及びタンパク発現増加が H1R の活性化を介して起こることを示しており[8], さらに同細胞において、PKC δ / ERK / PARP-1 シグナル経路が PMA 誘発 H1R 遺伝子発現に関与することを示している[9].

これらの知見は PKC δ シグナル経路が花粉症の症状の進行にとって重要であり、PKC δ シグナル経路を抑制する薬剤設計はアレルギー疾患に対して効果的な薬剤開発に繋がることが期待出来る. しかし、我々がこれまでに行ってきた TDI 感作ラットを用いた H1 受容体拮抗薬の長期投与の検討において、TDI 誘発 H1R 発現亢進を基礎レベルまで抑制しても、鼻アレルギー様症状を完全には抑制しない知見を得ている [10]. よってこれらのことから、アレルギー性疾患に上記とは異なるシグナル経路の関与が示唆される.

スプラタストは、IL-4 及び IL-5 産生を抑制することによって、好酸球浸潤、IgE 産生とアレルギー性炎症を抑制する免疫調節物質である[11, 12]. 第二章において、スプラタストは TDI 感作ラットにおける鼻アレルギー様症状と H1R と IL-4 mRNA 上昇を軽減すると報告した[5]. しかし、スプラタストは、HeLa 細胞におけるヒスタミン誘発の H1R 発現亢進を抑制しなかった[5]. このことよりスプラタストの抗アレルギー作用は PKC δ シグナル経路抑制を介してではなく、他の経路の抑制を介していることが示唆される. これら未知のシグナル経路を解明することは、アレルギー疾患の新しい治療戦略に繋がることが考えられる.

本検討において我々は、PKC δ シグナル経路を抑制する H1 受容体拮抗薬とスプラタストを併用することによるアレルギー症状に対する作用を検討した. さらに、Jurkat 細胞と RBL-2H3 細胞における IL-2, IL-9 発現亢進に対するスプラタストの作用を確認することにより、関与するシグナルについて考察した.

3.2 実験方法

3.2.1 使用試薬など

トシル酸スプラタスト及び主代謝物 M-1 は、大鵬薬品工業株式会社及び沢井製薬株式会社から贈与された。モノクローナル抗ジニトロフェニル (DNP) IgE 抗体 (抗 DNP-IgE 抗体, clone SPE-7) と MEM (MEM; with Earle's salts, L-glutamine, and nonessential amino acids without NaHCO₃) は Sigma-Aldrich より, RPMI-1640 培地は Gibco BRL Life Technology, RNAiso Plus, PrimeScript RT Reagent Kit, and Premix ExTaq は Takara Bio Inc からそれぞれ入手した。その他全ての実験試薬は分析化学用を使用した。

3.2.2 動物

6 週齢雄性 Brown Norway ラット (日本エスエルシー) を使用した (使用時体重: 200-250 g)。ラットは自由摂餌, 自由飲水下にて, 室温 25±2°C, 湿度 55±10%, 12 時間毎の明暗サイクル環境下で飼育した。ラットは 4 匹毎三群 (コントロール群, TDI 感作群, 被験薬投与群) に分けた。なお, 全ての実験動物に対する処置は「徳島大学動物実験指針」に基づき徳島大学動物実験委員会において動物実験計画書の承認を受け, 適正に使用した。

3.2.3 TDI 感作, 鼻アレルギーの誘発及びスプラタストの投与

第二章と同じ方法を用いた[5]。ラットに対し 10% TDI-酢酸エチル溶液を 10 µL, 両方の鼻前庭に 5 日間連日塗布することで 1 度目の感作作業を行った。2 日間を開けた後に, 2 度目の感作作業を 5 日間繰り返した。2 度目の感作作業から 9 日後に, 10% TDI-酢酸エチル溶液を 10 µL 両方の鼻前庭に塗布することで鼻アレルギー様症状を惹起した。コントロールラットには酢酸エチルのみを同手順で塗布した。

エピナスチン (24 mg/kg/day) とスプラタスト (80 mg/kg/day) は, 初回感作の 7 日後から 14 日間連日経口投与した。我々のこれまでの検討に従い, 上記の投与量を決定した。なお, 二つの薬剤の併用効果をより明確にするため, これまで用いていた投与量の 8 割に減少させた。

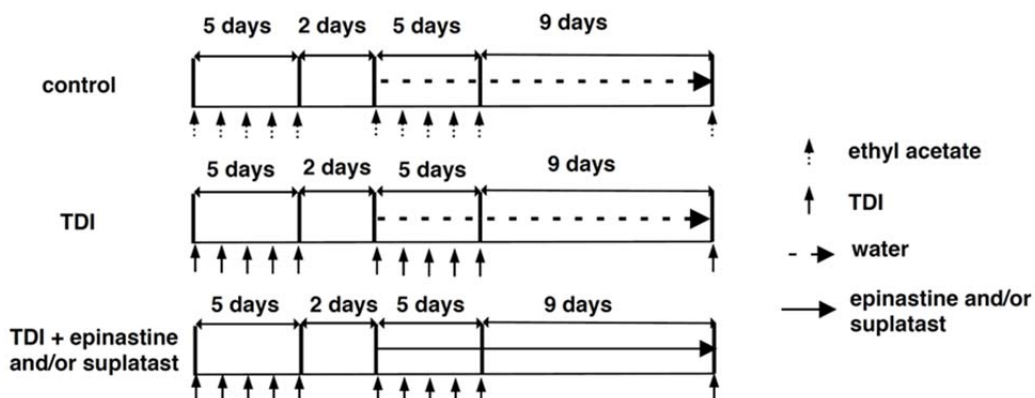


図1 TDI誘発鼻アレルギーモデルの作製と薬剤投与スケジュール

10 μ L の 10% TDI - ethyl acetate (酢酸エチル) 溶液をラット鼻腔内に 2 週間投与 (5 日間連投, 2 日間休みのサイクル) することで感作を行った. 最終投与から 9 日後に 10 μ L の 10% TDI - 酢酸エチル溶液を投与することで病態を惹起させた.

コントロール群は酢酸エチル溶液のみを用いて同様の操作を行った.

epinastine (エピナスチン, 24 mg/kg/day) と suptatst (スプラタスト, 80 mg/kg/day) を TDI 初回投与 1 週間後より 2 週間連日経口投与した. なお, エピナスチンとスプラタストの投与は TDI 感作 1 時間前に行った.

3.2.4 鼻アレルギー様症状の評価

鼻アレルギー様症状の評価も第二章と同じ方法で[5], くしゃみ回数と鼻漏の程度によって評価した. TDI 暴露後, 動物はプラスチックケージに入れ, 10 分間におけるくしゃみ回数と鼻漏の程度を評価した. 鼻漏の程度は表 1 に示した指標に基づき評価した.

表 1 鼻アレルギー様症状の評価基準

鼻症状	スコア			
	0	1	2	3
水様性鼻漏	(-)	鼻腔中	1と3の間	鼻から落ちる
鼻の腫れ及び発赤	(-)	少し膨らむ	1と3の間	強く腫れ上がる

3.2.5 細胞培養

Jurkat 細胞は 10% FCS (Sigma-Aldrich) およびペニシリン (100 IU/mL, Sigma-Aldrich), ストレプトマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich) を添加した RPMI-1640 培地を用い, RBL-2H3 細胞は同じ添加物を混合した MEM 培地を用い, 37°C, 5%CO₂ インキュベーターにて培養を行った.

3.2.6 リアルタイム定量 RT-PCR

6well plate で約 70%コンフルエントの細胞にスプラタスト (24 時間前) または M-1 (36 時間前) の処置後, イオノマイシン (1 μM) と PMA (50 nM) 処置 (Jurkat 細胞) またはイオノマイシン (1 μM) のみ処置 (RBL-2H3 細胞) を行った. Jurkat 細胞では 6 時間後, RBL-2H3 細胞では 2 時間後に 700 μL の RNAiso Plus (210 μL chloroform 混合) を用いて細胞の回収を行った後に, 遠心操作 (15,000 rpm, 4°C, 15 分) により上清を得た. IgE 処置実験においては, RBL-2H3 細胞に対し抗 DNP IgE 抗体を 100 ng/mL の濃度で 4 時間処置し, RNAiso Plus を用いて細胞を回収し, 同様の遠心操作を行った. それぞれの上清を回収した後に, イソプロピルアルコールを加えることで RNA を沈殿させた. 遠心操作 (15,000 rpm, 4°C, 15 分) により得た RNA 沈殿を氷冷 70%エタノールで洗浄した. Total RNA は 10 μL の DEPC 処理水に再溶解させ, 1 μg 相当量の RNA サンプルを逆転写反応に供した.

3.2.7 ラットにおける mRNA の検出

第二章と同様の方法で実施した[5].

TDI によるアレルギー様症状の惹起後, ラットを安楽死させ鼻粘膜組織を採取し, 直ちに RNAlater (Applied Biosystems) 中に浸漬し, 使用まで保存した (-80°C).

鼻粘膜は 10 倍量の RNAiso Plus 中で Polytron (Model PT-K; Kinematica) を用いてホモジナイズした. 上記と同様の方法で Total RNA を抽出した後に, 20 μL の DEPC 処理水に溶解させた.

RNA サンプルは PrimeScript RT Reagent Kit を用いた逆転写反応により cDNA を得た.

TaqMan プライマーとプローブは Primer Express software (Applied Biosystems) を用いて設計した. 用いたプライマーとプローブの塩基配列は表 2 に示した. IL-2 mRNA に関しては TaqMan gene amplification primers and probes (Hs00174114_m1; Applied Biosystems) を用いて検出した. 第二章の時と同様に内部標準として endogenous control human GAPD と rodent GAPDH control reagents (Applied Biosystems) を用いて, 各 mRNA の発現量は GAPDH mRNA の発現量で除した ratio で示した.

表 2 本試験で使用したリアルタイム定量 RT-PCR 用
プライマーとプローブの塩基配列

Primer/probe name	Sequence
Rat H1R mRNA	
Sense primer	5'-TATGTGTCCGGGCTGCACT-3'
Anti-sense primer	5'-CGCCATGATAAAAACCCAACTG-3'
Probe	FAM-CCGAGAGCGGAAGGCAGCCA-TAMRA
Rat HDC mRNA	
Sense primer	5'-GCAGCAAGGAAGAACAAAATCC-3'
Anti-sense primer	5'-CAACAAGACGAGCGTTCAGAGA-3'
Probe	FAM-AAAGCGCATGAGCCCAATGCTGCTGAT-TAMRA
Rat IL-4 mRNA	
Sense primer	5'-CAGGGTGCTTCGCAAATTTTAC-3'
Anti-sense primer	5'-CACCGAGAACCCCACTTG-3'
Probe	FAM-CCCACGTGATGTACCTCCGTGCTTG-TAMRA
Rat IL-5 mRNA	
Sense primer	5'-CAGTGGTGAAAGAGACCTTGATACAG-3'
Anti-sense primer	5'-GAAGCCTCATCGTCTCATTGC-3'
Probe	FAM-TGTCACTCACCGAGCTCTGTTGACG-TAMRA
Rat IL-9 mRNA	
Sense primer	5'-GACGACCCATCAAAATGC-3'
Anti-sense primer	5'-CTGTGACATTCCCTCCTGYAA-3'
Probe	FAM-TTGTGCCTCCCCATCCCATCTGAT-TAMRA

Rat IL-13 mRNAとhuman IL-2 mRNAの測定は、TaqMan gene amplification primers and probes (Rn00587615_m1 for IL-13 and Hs00174114_m1 for IL-2; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を使用した。

3.2.8 統計処理

実験データは、平均±標準誤差で示した。また、GraphPad Prism software (GraphPad Software INC.) を用いて、One-way ANOVA および Dunnett's multiple comparison test により統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意な変化とした。

3.3 実験結果

3.3.1 TDI 誘発鼻アレルギー様症状鼻アレルギー様症状に対するエピナスチン、スプラタスト単独、または併用による効果

3週間のTDI処置は、TDI感作ラットにおいてくしゃみ、鼻水を含む鼻アレルギー様症状を引き起こした(図2)。我々の報告[10]において、エピナスチン単剤を前処置することにより、TDIによって誘発されたくしゃみと鼻アレルギー様症状スコアを有意に低下させ、スプラタスト単剤の前処置は、エピナスチンよりは弱い有意に鼻アレルギー様症状を減弱させることが示されている。図2に示したように、それぞれ単剤の処置に比べ、エピナスチンとスプラタストの併用はくしゃみと鼻アレルギー様症状スコアを著しく低下させた。

なお、コントロールラットはTDI誘発の鼻アレルギー様症状を示さなかった。

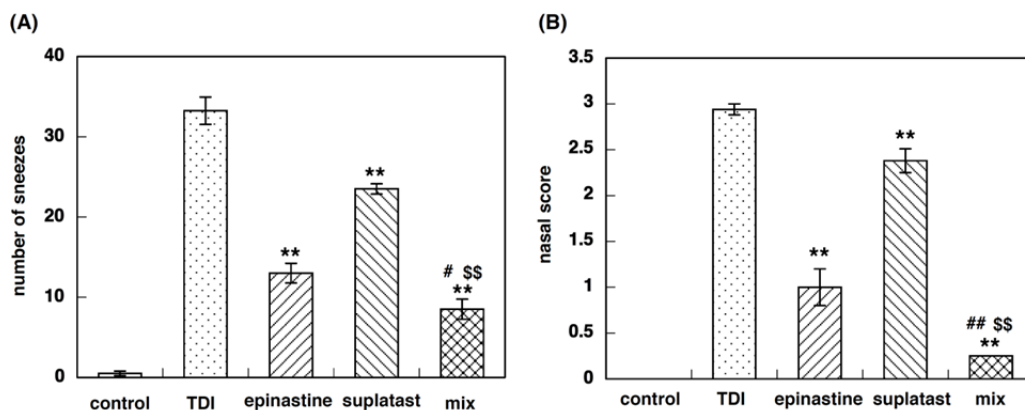


図2 TDI誘発鼻アレルギー症状に対するエピナスチンとスプラタストの効果

実験方法の項目に記載の手法でラットの感作、病態惹起を行った。惹起後10分間における、

A. くしゃみ回数

B. 鼻膨張、発赤及び鼻漏の程度を表1の基準に従いスコア化を示した。

データは平均±標準誤差(N=4)で示した。

** : p<0.01 vs TDI 群, # : p<0.05, ## : p<0.01 vs エピナスチン投与群,

\$: p<0.05, \$\$: p<0.01 vs スプラタスト投与群

3.3.2 TDI 誘発 H1R, HDC 及び Th2 サイトカイン遺伝子発現上昇に対するエピナスチン, スプラタスト単独, またはそれらの併用による効果

これまでに比べてエピナスチンの投与量が少なく, 投与期間も短かったことから, TDI 誘発 H1R 及び HDC 遺伝子発現上昇に対するエピナスチンの作用は弱かったが, スプラタストはエピナスチンに比べ抑制効果が強かった (図 3A). 両薬剤を併用して前処置することにより, 各薬剤単独投与に比べ TDI 誘発 H1R 及び HDC 遺伝子発現上昇を有意に抑制した (図 3A, B).

次に我々は TDI 誘発 Th2 サイトカイン遺伝子発現上昇に対するエピナスチンとスプラタスト単独, またはそれらを併用した際の作用を検討した. その結果, スプラタストは単独で TDI 誘発 IL-4, IL-5, IL-9 及び IL-13 遺伝子発現上昇に対する有意な抑制作用を示した (図 4).

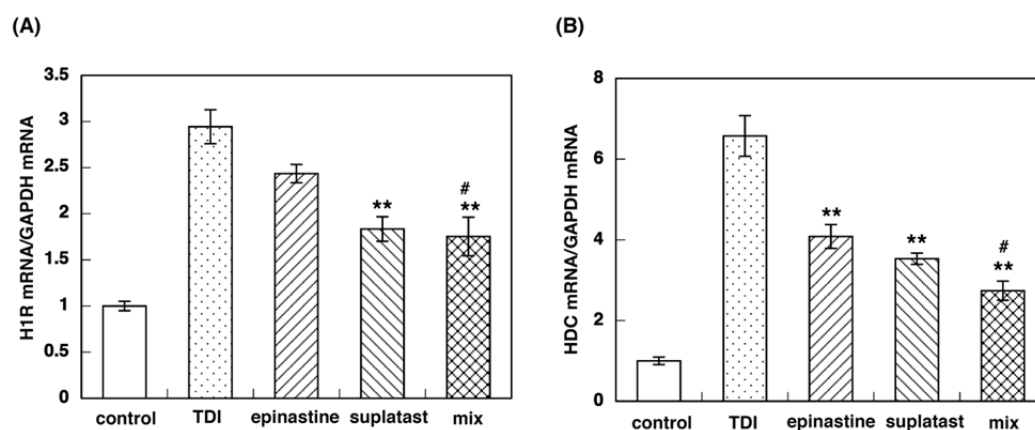


図 3 TDI 感作ラットの TDI 誘発 H1R mRNA (A) 及び HDC mRNA (B) 発現亢進に対するエピナスチンとスプラタストの効果

実験方法の項目に記載の手法でラットの感作, 病態惹起を行った.

TDI による病態惹起 4 時間後にラットを安楽死させ,

A. H1R mRNA

B. HDC mRNA

の量をそれぞれ測定した.

データは平均±標準誤差 (N=4) で示した.

** : p<0.01 vs TDI 群, # : p<0.05 vs エピナスチン投与群

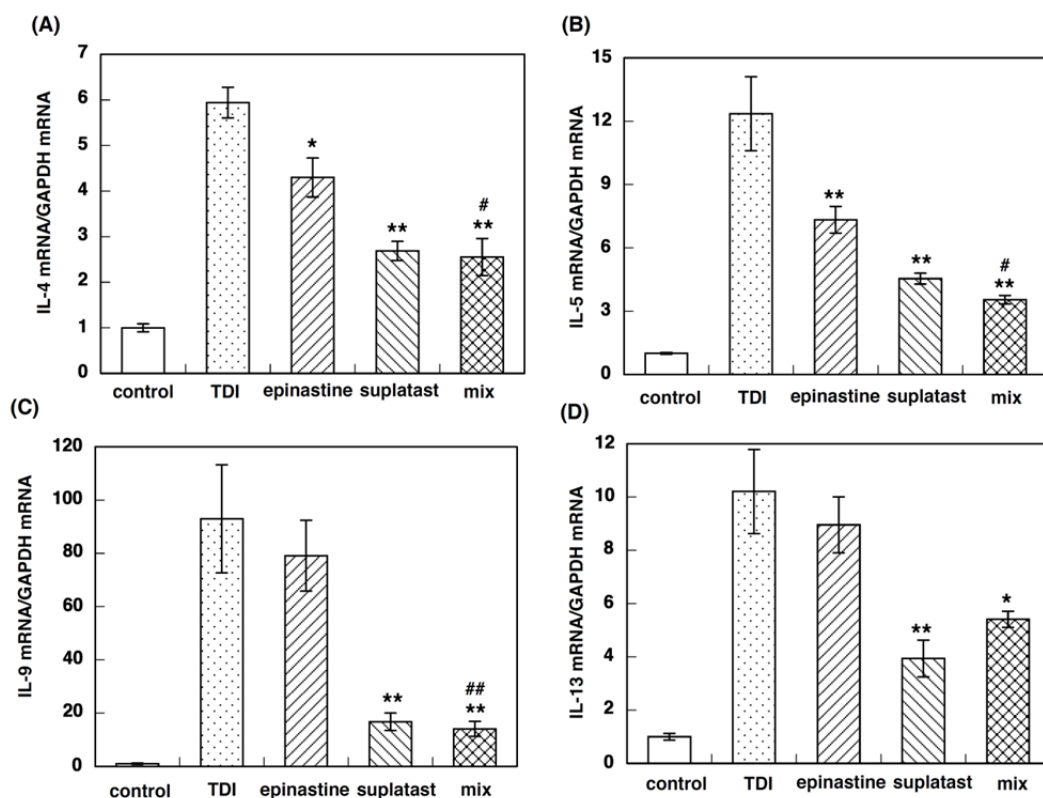


図4 TDI感作ラットのTDI誘発Th2サイトカインmRNA発現亢進に対するエピナスチンとスプラタストの効果

実験方法の項目に記載の手法でラットの感作、病態惹起を行った。TDIによる病態惹起4時間後にラットを安楽死させ、

- A. IL-4 mRNA
- B. IL-5 mRNA
- C. IL-9 mRNA
- D. IL-13 mRNA

の量をそれぞれ測定した。

データは平均±標準誤差 (N=4) で示した。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs TDI 群, # : $p < 0.01$ vs TDI 群

3.3.3 Jurkat 細胞におけるイオノマイシン/PMA 誘発 IL-2 遺伝子発現亢進に対するスプラタストの効果

CN/NFAT シグナル経路は Th2 サイトカイン遺伝子発現の調節に関わると報告されていることから[13-15], 我々は CN/NFAT シグナル経路に対するスプラタストの作用を検討した. 以前の検討において, CN/NFAT シグナルが T 細胞における IL-2 遺伝子発現に関係していることを確認しており, また NFAT は AP-1 と共に IL-2 の転写を活性化することが示されている[14,15]. 従って, スプラタストで抑制されるシグナル経路を確認するために, 我々は Jurkat 細胞におけるイオノマイシン/PMA 誘発 IL-2 遺伝子発現亢進に対するスプラタストの作用を検討した.

図 5 に示したように, Jurkat 細胞においてイオノマイシン / PMA の刺激により IL-2 mRNA 発現上昇が認められた. この IL-2 mRNA 発現上昇は Inhibitor of NFAT-calcineurin association-6 (INCA-6) 及び cyclosporin A の処置 (両薬剤とも CN/NFAT シグナル経路を阻害することが既知[13, 16, 17]) により有意な抑制作用が認められた. これにより, Jurkat 細胞におけるイオノマイシン/PMA 誘発 IL-2 遺伝子発現亢進への CN/NFAT シグナル経路の関与が示された.

スプラタストまたはその主要代謝物である M-1[18]の前処置はイオノマイシン /PMA 誘発 IL-2 遺伝子発現亢進を, 濃度及び処置時間依存的に抑制した (図 5). 時間経過に伴う結果から代謝物 M1 が主要な活性物質であり, スプラタストは「プロドラッグ」であることも考えられた (図 5A, C).

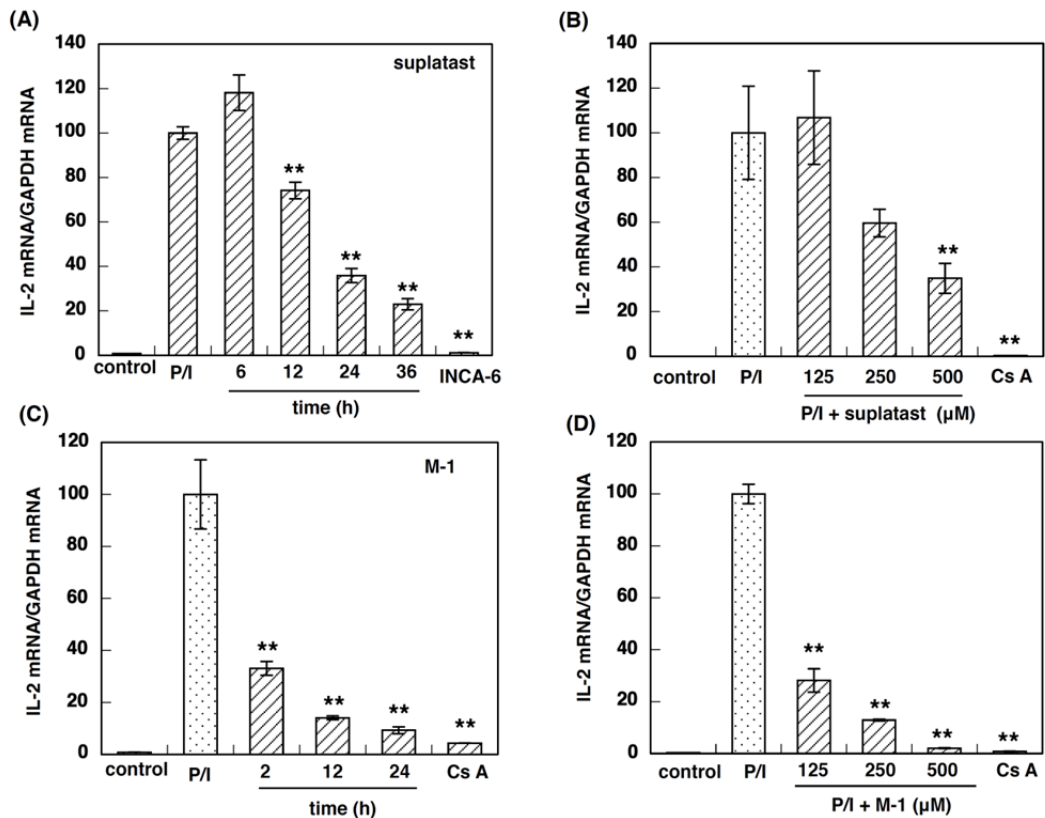


図5 Jurkat細胞におけるイオノマイシン / PMA 誘発 IL-2 遺伝子発現亢進に対するスプラタスト (A, B) 及び代謝物 M-1 (C, D) の効果

A, C イオノマイシン / PMA 処置前に, 500 μ M のスプラタスト (A) 及び 500 μ M の M-1 (C) を図に示された時間で処置した.

B, D イオノマイシン / PMA 処置前に, 36 時間のスプラタスト (B) 及び 24 時間の M-1 (D) を図に示された濃度で処置した.

イオノマイシン / PMA 処置 6 時間後に細胞を回収し, IL-2 mRNA 量を測定した. 陽性対照として 50 μ M の INCA-6 (A), 0.5 μ M の cyclosporin A (B-D) をそれぞれイオノマイシン / PMA の 1 時間前に処置した.

CsA : cyclosporin A, P/I : PMA / イオノマイシン

データは平均 \pm 標準誤差 (N=3-4) で示した.

** : $p < 0.01$ vs イオノマイシン / PMA 処置群

3.3.4 RBL-2H3 細胞における IgE 及びイオノマイシン誘発 IL-9 遺伝子発現亢進に対するスプラタストの効果

IL-4, IL-13 を含むサイトカイン産生に繋がるいくつかのシグナル経路を, IgE は単独で活性化させることが報告されている[19]. 我々の検討においても RBL-2H3 細胞対して IgE の処置により IL-9 遺伝子発現の亢進が認められた (図 6A).

IgE の処置により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが報告されているため[20, 21], 我々は RBL-2H3 細胞における IL-9 遺伝子発現に対するイオノマイシン処置による作用を検討した. 1 μ M, 2 時間のイオノマイシン処置により, RBL-2H3 細胞における IL-9 遺伝子発現亢進作用が認められた. このイオノマイシン誘発 IL-9 遺伝子発現の亢進は cyclosporin A 及び INCA-6 の処置により有意に抑制された (図 6B, 6C). これにより, RBL-2H3 細胞におけるイオノマイシン誘発 IL-9 遺伝子発現における CN/NFAT シグナル経路の関与が示唆された.

スプラタストまたは M-1 の前処置は IL-9 遺伝子発現亢進を, 濃度及び処置時間依存的に抑制した (図 6D-G). これらのデータよりスプラタストまたは M-1 は RBL-2H3 細胞において, CN/NFAT シグナル経路を阻害することにより IL-9 遺伝子発現を抑制することが示された.

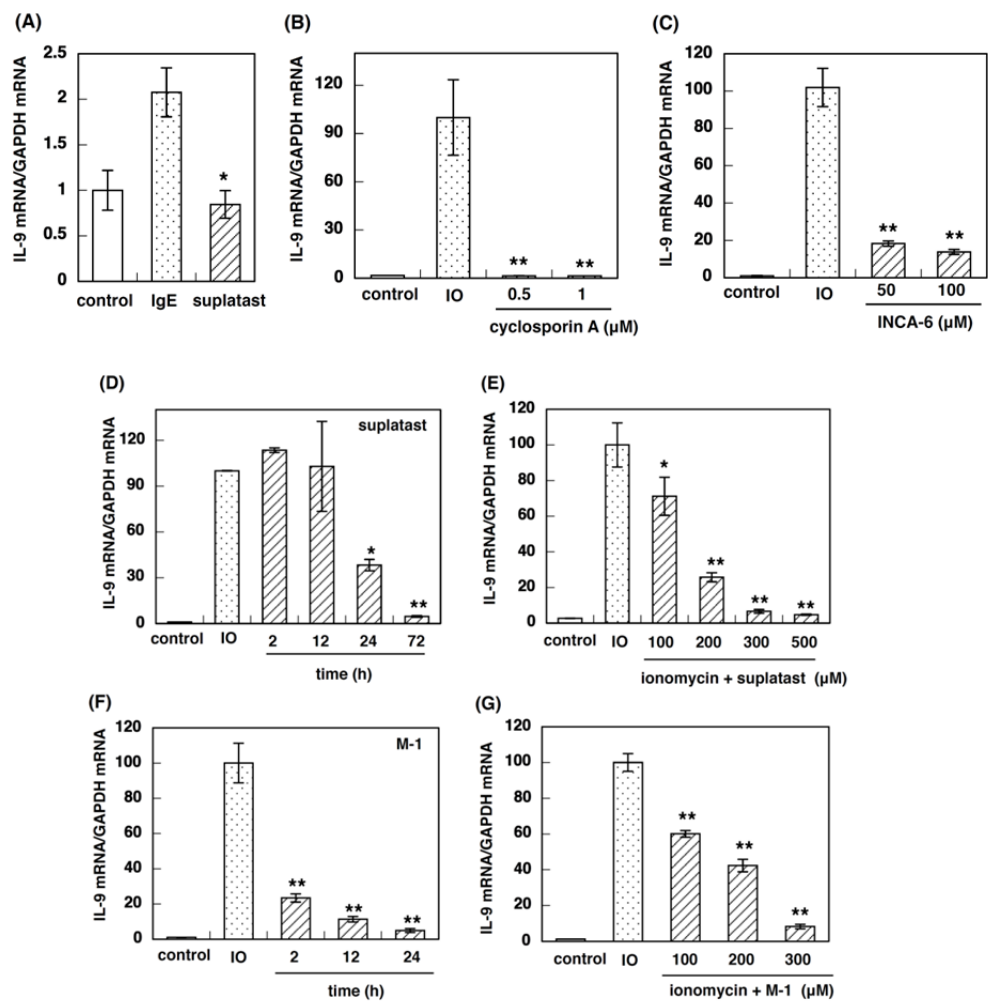


図6 RBL-2H3細胞における単量体IgE (A) 及びイオノマイシン (B-G) 誘発IL-9遺伝子発現亢進に対するスプラタスト及び代謝物M-1の効果

- A 100 ng/mLの抗DNP-IgE抗体処置4時間後に細胞を回収し、IL-9 mRNA量を測定した。スプラタスト(500 μM)はIgE処置72時間前に処置した。
- B, C 0.5, 1 μMのcyclosporin Aまたは50, 100 μMのINCA-6をイオノマイシン処置の1時間前に処置した。
- D, F イオノマイシン処置前に、500 μMのスプラタスト(D)及び300 μMのM-1(F)を図に示された時間で処置した。
- E, G イオノマイシン処置前に、72時間のスプラタスト(E)及びM-1(G)を図に示された濃度でそれぞれ処置した。

(B-G)はそれぞれイオノマイシン処置2時間後に細胞を回収し、IL-9 mRNA量を測定した。

IO: イオノマイシン

データは平均±標準誤差(N=3)で示した。

* : p<0.05, ** : p<0.01 vs イオノマイシン群

3.4 考察

本検討において我々は、H1 受容体拮抗薬とスプラタストの併用により TDI 感作ラットにおける鼻アレルギー様症状を顕著に改善することを示した。

H1 受容体拮抗薬は、アレルギー性鼻炎の鼻症状治療の第一選択薬として使われている。以前我々は、H1R 遺伝子の発現がスギ花粉症患者でアレルギー性症状の重症度と非常に相関していることを証明している[3]。また、HeLa 細胞においてヒスタミンは H1R 遺伝子の発現亢進を引き起こすことも示しており[8]、それには PKC δ シグナル経路が関与することを示している。加えて、H1 受容体拮抗薬はインバースアゴニストとして H1R の阻害及び PKC δ シグナル経路の抑制をすることも示している[9]。しかしながら、PKC δ シグナル経路の抑制が TDI 感作ラットにおける鼻アレルギー様症状を完全には抑制しないことも示しており、鼻アレルギー様症状における他のシグナル経路の存在を示唆している。

ヒスタミンに加え、IL-4、IL-5、IL-9 及び IL-13 などの Th2 サイトカインはアレルギー性炎症の病因において重要な役割を示すことが知られている[22]。さらに、ヒスタミンは Th2 サイトカインの発現及び活性に影響を及ぼし、また Th2 サイトカインはヒスタミンの産生と放出に関与しているといった、ヒスタミンと Th2 サイトカインのクロストークの存在だけでなく、その重要性も報告されている[23, 24]。

我々も H1 受容体拮抗薬の予防的投与により TDI 感作ラットにおける TDI 誘発 H1R 及び IL-4 mRNA 発現亢進を抑制し、非 TDI 感作ラット鼻腔への IL-4 直接投与により H1R mRNA 発現が亢進することを示している[10]。さらに、正常ラットにおいて鼻腔内へのヒスタミン処置は IL-4 の mRNA 発現亢進を引き起こすことが示されている[5]。加えて、H1R 発現レベルが花粉症患者で IL-5 の発現と強く相関していることも示している[25]。これらの知見により、TDI 感作ラットの鼻アレルギー様症状に対する Th2 サイトカインの関与が示されたと考える。

トシル酸スプラタストは、IL-4、IL-5 など Th2 サイトカインの産生を抑制する[11, 12]。第二章で示した検討において、TDI 感作ラットにおける TDI 誘発の HDC 遺伝子発現亢進をスプラタストが抑制し、ヒスタミン合成を減少させ、H1R mRNA 発現亢進の抑制につながることを示している[5]。従って、スプラタストの鼻アレルギー様症状改善作用には PKC δ シグナル経路の抑制が一部関与しているが、大部分は Th2 サイトカイン遺伝子発現のシグナル経路の抑制によって引き起こされていることが考えられる (図 4)。

CN/NFAT シグナル経路は、免疫反応によって誘導される遺伝子発現において中心的な役割を示している[26,27]。NFAT はヒト IL-2 遺伝子プロモーターの antigen-receptor response element 末端に結合する因子として初めて同定された[28-30]。加えて、NFAT は IL-4、IL-5 や IL-13 などを含む沢山のサイトカインの

プロモーター領域に結合することが示されている[13-15]. 我々の検討においても, スプラタストは TDI 誘発の Th2 サイトカイン遺伝子発現亢進を抑制することが示されていることから, 我々はそのスプラタストの抑制効果は CN/NFAT シグナル経路の抑制を介するのではと推測した. スプラタストとタクロリムス (CN 阻害剤) の併用治療がアトピー性皮膚炎の患者においてタクロリムスの有効濃度を低下させる知見[31]は, 上記仮説と整合性があり, また我々のデータは, Jurkat 細胞におけるイオノマイシン/PMA 誘発の IL-2 遺伝子発現亢進に対し, スプラタストが抑制効果を持つことを示している.

NFAT と AP-1 は, 協調して IL-2 遺伝子の転写を調整することが報告されている[14, 15]. 我々は HeLa 細胞においてヒスタミン誘発 H1R 遺伝子発現亢進にはスプラタストは作用を示さないことを示しており, その遺伝子発現には AP-1 の活性化が不可欠であることを示している[5, 9]. また, Jurkat 細胞を用いた検討において, AP-1 のサブユニットの一つである c-Fos の活性化にはスプラタストは関与しないことも併せると, 我々のデータから, スプラタストと M-1 は CN/NFAT シグナル経路の抑制に関わっていることが強く示唆された.

臨床においてスプラタストの併用が, CN/NFAT シグナル経路を抑制するタクロリムス軟膏の使用量減少, さらには使用中止を可能にすることが報告されている[31, 32]. ケラチノサイトにおける胸腺間質性リンパ球新生因子の産生と NFAT シグナル経路の関与も報告されている[33]. これらの知見はスプラタストが CN/NFAT シグナル経路の抑制を示すという我々のデータと矛盾せず, さらにスプラタストのアトピー性皮膚炎に対する治療効果の説明に繋がる可能性があるとも考えられる.

また, 我々のデータは TDI 感作ラットにおける TDI 誘発 IL-9 遺伝子発現亢進作用に対するスプラタストの強い抑制作用を示した (図 4C). IL-9 はヘルパー T 細胞から産生される多面的なサイトカインであるが, 肥満細胞を活性化させることや[34-36], さらにアレルギー性炎症や喘息症状といった Th2 特異的なアレルギー反応を引き起こすことも知られている[37, 38]. また, IL-9 は IL-4, IL-5 または IL-13 の発現亢進に関わるとの報告もある[39]. このことから, スプラタストによる IL-9 発現の抑制は, これら Th2 サイトカイン産生の抑制に関与することが示唆される.

我々のデータは, スプラタストによる Th2 サイトカイン転写活性抑制作用の作用機序が CN/NFAT シグナル経路の抑制を介することを示唆した. IL-9 遺伝子発現における CN/NFAT シグナル経路の関与について, すべてが証明された訳ではないが, RBL-2H3 細胞におけるイオノマイシン誘発 IL-9 遺伝子発現の亢進において, CN/NFAT シグナル経路が関与することを我々のデータは示している. 最近の報告において, NFAT と NFκB が相乗的に IL-9 の転写を亢進していることが CD4

陽性 T 細胞において示されており, それには IL-9 プロモーター領域へ NF κ B のアクセスが容易になるようなクロマチンプラットフォームを NFAT が生成することが示されている[40]. よって, RBL-2H3 細胞におけるイオノマイシン誘発 IL-9 遺伝子発現の亢進において NF κ B が関与する可能性は除外できないが, スプラタストの抑制効果は CN/NFAT シグナル経路の抑制を介していることが考えられる.

結論として, H1 受容体拮抗薬とスプラタストの併用治療はアレルギー性鼻炎における鼻症状を軽減するために有用であり, そのメカニズムとして H1R シグナル抑制及び CN/NFAT シグナル経路が関与する可能性が考えられた.

4. 第四章

総括

本研究では、ヒスタミンとアレルギーのシグナルネットワークにおけるスプラタストの作用機序解明を目的として検討を行った。

まず我々は第二章において、TDI感作ラットにおける鼻アレルギー様症状、H1R, HDC, IL-4 遺伝子発現亢進及び H1R を発現している HeLa 細胞に対するスプラタストの作用を検討した。

TDI の暴露により鼻アレルギー様症状、HDC 活性、鼻洗浄液中のヒスタミン含量、H1R, HDC, IL-4 mRNA 発現がそれぞれ亢進した。スプラタストの 2 週間前投与は、TDI 誘発の鼻アレルギー様症状、H1R, HDC, IL-4 mRNA 発現亢進をそれぞれ有意に抑制した。スプラタストは、さらに鼻粘膜中の HDC 活性、鼻洗浄液中のヒスタミン含量を減少させた。また、正常ラットの両側鼻腔内に、IL-4 を投与すると H1R mRNA の発現が亢進し、ヒスタミンを投与すると IL-4 mRNA の発現が亢進した。さらに、スプラタストは HeLa 細胞において、IL-4 誘発の H1R mRNA 発現亢進は抑制したが、ヒスタミン誘発の H1R mRNA 発現亢進は抑制しなかった。

これらの結果から、スプラタストはヒスタミンシグナルを抑制することで TDI 感作ラットの鼻アレルギー様症状を減弱し、それは、HDC 及び IL-4 遺伝子発現抑制を介してヒスタミン及び IL-4 誘発の H1R 遺伝子発現を阻害することによることが示唆された。

次に第三章において、スプラタストと H1 受容体拮抗薬の併用は TDI 感作ラットの鼻アレルギー様症状を顕著に減弱させることを示した。また、CN/NFAT シグナルが関与する、Jurkat 細胞におけるイオノマイシン / PMA 誘発 IL-2 遺伝子発現亢進をスプラタストは抑制した。同じく CN/NFAT シグナルが関与する、RBL-2H3 細胞におけるイオノマイシン処置による IL-9 mRNA 発現亢進に対しても、スプラタストは抑制効果を示した。これらの結果より、アレルギー性鼻炎に対してスプラタストと H1 受容体拮抗薬の併用は有用であることが示唆され、それは H1R と CN/NFAT シグナル両方を抑えることによるものと考えられた。

以上より、スプラタストは CN/NFAT シグナル経路を介してヒスタミンシグナルを抑制することでアレルギー性鼻炎の治療効果を示し、さらに PKC δ シグナル経路を抑制する薬剤との併用により、より効果の高い治療効果が得られることが示唆された。

鼻アレルギー診断ガイドラインによると、アレルギー性鼻炎は I 型アレルギー疾患の中でも治療が難しいとされ、重症化し QOL の低下を生じさせる。通年性アレルギー性鼻炎の治療においてスプラタストは、「軽症」及び鼻閉型または鼻閉を主とする完全型の「中等症」で、花粉症の治療においては「初期療法」での使用が推奨されている。また、中等症の通年性アレルギー性鼻炎の治療において鼻噴霧用ステロイド薬との併用も推奨されている。

今回の検討結果により，実臨床においてもスプラタストと抗ヒスタミン薬との併用効果が期待出来ると考えられ，実際に，スギ花粉症初期治療における抗ヒスタミン薬へのスプラタストの上乗せ効果（鼻閉症状及び患者満足度）が確認されており（伊藤聡久 他．アイピーディ®のスギ花粉症に対する初期治療効果，耳鼻咽喉科臨床 2003 96 (11) 1017-1021），本検討結果をさらに支持すると考える．

さらに，本研究において H1R と CN/NFAT シグナル両方を抑えることがより高い治療効果を得られるという知見は，「アレルギー悪循環サイクル」を抑えうる薬剤のターゲットとして有益であり，創薬ターゲットとしても興味深いと考えられる．

5. 参考文献

5.1 第二章

- [1] Bousquet, J., P. Van Cauwenberge, and N. Khaltaev. 2001. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108: S147–S334.
- [2] Togias, A. 2003. H1-receptors: localization and role in airway physiology and in immune functions. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 60–68.
- [3] Kawabori, S., M. Okuda, T. Unno, and A. Nakamura. 1985. Dynamics of mast cell degranulation in human allergic nasal epithelium after provocation with allergen. *Clin. Allergy* 15: 509–515.
- [4] White, M. V. 1990. The role of histamine in allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86: 599–605.
- [5] Gelfand, E. W. 2004. Inflammatory mediators in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114: S135–S138.
- [6] Iriyoshi, N., K. Takeuchi, A. Yuta, K. Ukai, and Y. Sakakura. 1996. Increased expression of H1R mRNA in allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 26: 379–385.
- [7] Dinh, Q. T., A. Cryer, S. Dinh, C. Peiser, S. Wu, J. Springer, E. Hamelmann, B. F. Klapp, W. Heppt, and A. Fischer. 2005. Transcriptional up-regulation of histamine receptor-1 in epithelial, mucus and inflammatory cells in perennial allergic rhinitis. *Clin. Exp. Allergy* 35: 1443–1448.
- [8] Ban, M., G. Morel, I. Langonne, N. Huguet, E. Pepin, and S. Binet. 2006. TDI can induce respiratory allergy with Th2-dominated response in mice. *Toxicology* 218: 39–47.
- [9] Abe, Y., N. Takeda, M. Irifune, S. Ogino, B. Kalubi, I. Imamura, H. Fukui, H. Wada, and T. Matsunaga. 1992. Effects of capsaicin desensitization on nasal allergy-like symptoms and histamine release in the nose induced by toluene diisocyanate in guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 112: 703–709.
- [10] Abe, Y., S. Ogino, M. Irifune, I. Imamura, Y. Q. Liu, H. Fukui, and T. Matsunaga. 1993. Histamine content, synthesis and degradation in nasal mucosa and lung of guinea-pigs treated with toluene diisocyanate (TDI). *Clin. Exp. Allergy* 23: 512–517.
- [11] Murata, Y., A. Miyoshi, Y. Kitamura, N. Takeda, and H. Fukui. 2004. Up-regulation of H1Rs in an allergic rat nasal mucosa model. *Inflamm. Res.* 53: 11–12.

- [12] Kitamura, Y., A. Miyoshi, Y. Murata, B. Kalubi, H. Fukui, and N. Takeda. 2004. Effect of glucocorticoid on upregulation of histamine H1 receptor mRNA in nasal mucosa of rats sensitized by exposure to toluene diisocyanate. *Acta Otolaryngol.* 124: 1053–1058.
- [13] Kitamura, Y., A. K. Das, Y. Murata, K. Maeyama, S. Dev, Y. Wakayama, B. Kalubi, N. Takeda, and H. Fukui. 2006. Dexamethasone suppresses histamine synthesis by repressing both transcription and activity of HDC in allergic rats. *Allergol. Int.* 55: 279–286.
- [14] Holgate, S. T. 1993. Asthma: past, present and future. *Eur. Respir. J.* 6: 1507–1520.
- [15] Ricci, M. 1994. IL-4: a key cytokine in atopy. *Clin. Exp. Allergy* 24: 801–812.
- [16] Dev, S., H. Mizuguchi, A. K. Das, C. Matsushita, K. Maeyama, H. Umehara, T. Ohtoshi, J. Kojima, K. Nishida, K. Takahashi, and H. Fukui. 2008. Suppression of histamine signaling by probiotic Lac-B: a possible mechanism of its anti-allergic effect. *J. Pharmacol. Sci.* 107: 159–166.
- [17] Das, A. K., H. Mizuguchi, M. Kodama, S. Dev, H. Umehara, Y. Kitamura, C. Matsushita, N. Takeda, and H. Fukui. 2009. Sho-seiryu-to suppresses histamine signaling at transcriptional level in TDI-sensitized nasal allergy model rats. *Allergol. Int.* 58: 81–88.
- [18] Marone, G., F. Granata, G. Spadaro, A. Genovese, and M. Triggiani. 2003. The histamine-cytokine network in allergic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: S83–S88.
- [19] Igaz, P., I. Novak, E. Lazar, B. Horvath, E. Heninger, and A. Faauls. 2001. Bidirectional communication between histamine and cytokines. *Inflamm. Res.* 50: 123–128.
- [20] Abdelaziz, M., J. Devalia, O. Khair, H. Bayram, A. Prior, and R. Davies. 1998. Effect of fexofenadine on eosinophil-induced changes in epithelial permeability and cytokine release from nasal epithelial cells of patients with seasonal allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101: 410–420.
- [21] Bischoff, S. C., G. Sellge, A. Lorentz, W. Sebald, R. Raab, and M. P. Manns. 1999. IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8080–8085.
- [22] Yamaguchi, M., K. Sayama, K. Yano, C. S. Lantz, N. Noben-Trauth, C. Ra, J. J. Costa, and S. J. Galli. 1999. IgE enhances Fcε receptor I ex-

- pression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fcε receptor I expression and mediator release. *J. Immunol.* 162: 5455–5465.
- [23] Lagier, B., B. Lebel, J. Bousquest, and J. Pene. 1997. Different modulation by histamine of IL-4 and interferon- γ (IFN- γ) release according to the phenotype of human Th0, Th1 and Th2 clones. *Clin. Exp. Immunol.* 108: 545–551.
- [24] Krouwels, F. H., B. E. Hol, R. Lutter, B. Bruinier, A. Bast, H. M. Jansen, and T. A. Out. 1998. Histamine affects interleukin-4, interleukin-5, and interferon- γ production by human T cell clones from airways and blood. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18: 721–730.
- [25] Murakami, T., K. Yamanaka, K. Tokime, I. Kurokawa, H. Tsutsui, K. Nakanishi, and H. Mizutani. 2006. Topical suplatast tosilate (IPD) ameliorates Th2 cytokine-mediated dermatitis in caspase-1 transgenic mice by downregulating interleukin-4 and interleukin-5. *Br. J. Dermatol.* 155: 27–32.
- [26] Furukido, K., S. Takeno, T. Ueda, K. Hirakawa, and K. Yajin. 2002. Suppression of the Th2 pathway by suplatast tosilate in patients with perennial nasal allergies. *Am. J. Rhinol.* 16: 329–336.
- [27] Fukui, H. 2008. Progress in allergy signal research on mast cells: up-regulation of histamine signal-related gene expression in allergy model rats. *J. Pharmacol. Sci.* 106: 325–331.
- [28] Yanagihara, Y., M. Kiniwa, K. Ikizawa, H. Yamaya, T. Shida, N. Matsuura, and A. Koda. 1993. Suppression of IgE production by IPD-1151T (suplatast tosilate), a new dimethylsulfonium agent, 1: Regulation of murine IgE response. *Jpn. J. Pharmacol.* 61: 23–30.
- [29] Konno, S., K. Asano, Y. Gonokami, M. Kurokawa, K. Kawazu, and M. Adachi. 1995. Effect of IPD-1151T (suplatast tosilate) on airway hyperresponsiveness in mice (in Japanese). *Arerugi* 44: 556–561.
- [30] Taniguchi, H., M. Togawa, K. Ohwada, M. Kiniwa, N. Matsuura, H. Nagai, and A. Koda. 1996. Suplatast tosilate, a new type of antiallergic agent, prevents the expression of airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 318: 447–454.
- [31] Iijima, H., G. Tamura, T. R. Hsiue, Y. Liu, H. Taniguchi, and K. Shirato. 1999. Suplatast tosilate inhibits late response and airway inflammation in sensitized guinea pigs. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160: 331–335.

- [32] Shimizu, S., R. Hattori, Y. Maijima, and T. Shimizu. 2009. Th2 cytokine inhibitor suplatast tosilate inhibits antigen-induced mucus hypersecretion in the nasal epithelium of sensitized rats. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 118: 67–72.
- [33] Durland, W. F., A. P. Lane, K. W. Durland, T. L. Smith, K. L. Johnson, J. Prazma, and H. C. Pillsbury. 2000. Nitric oxide is a mediator of the late-phase response in an animal model of nasal allergy. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 22: 706–711.
- [34] Mizuguchi, H., M. Hatano, C. Matsushita, H. Umehara, W. Kuroda, Y. Kitamura, N. Takeda, and H. Fukui. 2008. Repeated pre-treatment with antihistamines suppresses transcriptional up-regulations of histamine H1 receptor and interleukin-4 genes in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. *J. Pharmacol. Sci.* 108: 480–486.
- [35] Das, A. K., S. Yoshimura, R. Mishima, K. Fujimoto, H. Mizuguchi, S. Dev, Y. Wakayama, Y. Kitamura, S. Horio, N. Takeda, and H. Fukui. 2007. Stimulation of histamine H1 receptor up-regulates histamine receptor itself through activation of receptor gene transcription. *J. Pharmacol. Sci.* 103: 374–382.
- [36] Horio S, Fujimoto K, Mizuguchi H, Fukui H. 2010 Interleukin-4 up-regulates histamine H1 receptors by activation of H1 receptor gene transcription. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 381: 305–313.
- [37] Kalubi, B., N. Takeda, M. Irifune, S. Ogino, Y. Abe, S. L. Hong, M. Yamano, T. Matsunaga, and M. Tohyama. 1992. Nasal mucosa sensitization with toluene diisocyanate (TDI) increases peptotachykinin A (PPTA) and preproCGRP mRNA in guinea pig trigeminal ganglion neurons. *Brain Res.* 576: 287–296.
- [38] Takeda, N., M. Morita, S. Hasegawa, A. Horii, T. Kubo, and T. Matsunaga. 1993. Neuropharmacology of motion sickness and emesis: a review. *Acta Otolaryngol.* 501(Suppl.): 10–15.
- [39] Tanaka, K., Y. Okamoto, Y. Nagata, F. Nishimura, A. Takeoka, S. Hanada, S. Kohno, and M. Kawai. 1988. A nasal allergy model developed in the guinea pig by intranasal application of 2,4-toluene diisocyanate. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 85: 392–397.
- [40] Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, Uchio E, Odajima H, Takenaka H; Japanese Society of Allergology. Japanese Guideline for Allergic Rhinitis 2014. *Allergol Int.* 2014 63: 357-75.

- [41] Irifune, M. 1989. Effect of sympathetic denervation in guinea pigs with nasal hypersensitivity (in Japanese). *Jibirinnsho* 82: 719–727.
- [42] Mapp, C., P. Boschetto, D. Miotto, E. De Rosa, and L. M. Fabbri. 1999. Mechanisms of occupational asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 83: 645–664.
- [43] Wisnewski, A. V., and C. A. Redlich. 2001. Recent developments in diisocyanate asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 1: 169–175.
- [44] Maestrelli, P., M. Saetta, C. Mapp, and L. M. Fabbri. 1997. Diagnostic basis of occupational asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 7: 316–317.
- [45] Bachert, C. 1998. Histamine: a major role in allergy? *Clin. Exp. Allergy* 28: 15–19.
- [46] Howarth, P. H. 1997. Mediators of nasal blockage in allergic rhinitis. *Allergy* 52: S12–S18.
- [47] Hamano, N., N. Terada, K. Maesako, T. Ikeda, S. Fukuda, J. Wakita, T. Yamashita, and A. Konno. 1998. Expression of histamine receptors in nasal epithelial cells and endothelial cells: the effects of sex hormones. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 15: 220–227.
- [48] Nakasaki, T., K. Masuyama, H. Fukui, S. Ogino, M. Eura, Y. Samejima, T. Ishikawa, and E. Yumoto. 1999. Effect of PAF on histamine H1 receptor mRNA expression in rat trigeminal ganglia. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 58: 29–41.
- [49] Shimada, H. 1990. The factor of hypersensitivity of the human nasal mucosa: receptor binding assay of histamine H1 receptors. *J. Jpn. Rhinol. Soc.* 29: 225–233.
- [50] Hirata, N., K. Takeuchi, K. Ukai, and Y. Sakakura. 1999. Expression of histidine decarboxylase messenger RNA and histamine N-methyltransferase messenger RNA in nasal allergy. *Clin. Exp. Allergy* 29: 9–11
- [51] Matsuura, N., H. Mori, H. Nagai, and A. Koda. 1992. Effect of suplatast tosilate (IPD-1151T) on types I–IV allergic reactions (in Japanese). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 100: 495–501.
- [52] Niggemann, B., T. Zuberbier, U. Herz, K. Enssle, U. Wahn, and H. Renz. 1997. Interleukin-4 (IL-4) enhances and soluble interleukin-4 receptor (sIL-4R) inhibits histamine release from peripheral blood basophils and mast cells in vitro and in vivo. *Mediators Inflamm.* 6: 111–118.

- [53] Hsieh, F. H., B. K. Lam, J. F. Penrose, K. F. Austen, and J. A. Boyce. 2001. T helper cell type 2 cytokines coordinately regulate immunoglobulin E-dependent cysteinyl leukotriene production by human cord blood-derived mast cells: profound induction of leukotriene C4 synthase expression by IL-4. *J. Exp. Med.* 193: 123–133.
- [54] Wierzbicki, T., S. M. Iqbal, S. L. Cuvelier, G. Awong, L. A. Tibbles, and K. D. Patel. 2003. IL-4 primes human endothelial cells for secondary responses to histamine. *J. Leukocyte Biol.* 74: 420–427.
- [55] Zenmyo, M., K. Hiraoka, T. Sasaguri, S. Komiya, A. Inoue, M. Morimatsu, and Y. Sasaguri. 1996. Interleukin-4 stimulates rheumatoid synovial fibroblast to express matrix metalloproteinase-1 (tissue collagenase) and histamine H1 receptor mRNA. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40: 1253–1260.
- [56] Johnson, V. J., B. Yucesoy, J. S. Reynolds, K. Fluharty, W. Wang, D. Richardson, and M. I. Luster. 2007. Inhalation of toluene diisocyanate vapor induces allergic rhinitis in mice. *J. Immunol.* 179: 1864–1871.
- [57] Yoshihara, S., M. Ono, Y. Yamada, H. Fukuda, T. Abe, and O. Arisaka. 2009. Early intervention with suplatast tosilate for prophylaxis of pediatric atopic asthma: a pilot study. *Pediatr Allergy Immunol.* 20: 486-92

5.2 第三章

- [1] Nathan RA, Meltzer EO, Derebery J, et al. The prevalence of nasal symptoms attributed to allergies in the United States: findings from the burden of rhinitis in an America survey. *Allergy Asthma Proc.* 2008;29:600–608.
- [2] Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, Uchino E, Odajima H, et al. Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergology Int.* 2014;63:357–375.
- [3] Mizuguchi H, Kitamura Y, Kondo Y, Kuroda W, Yoshida H, Miyamoto Y, et al. Preseasonal prophylactic treatment with antihistamines suppresses nasal symptoms and expression of histamine H1 receptor mRNA in the nasal mucosa of patients with pollinosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2010;32:745–748.
- [4] Matsushita C, Mizuguchi H, Niino H, Sagesaka Y, Masuyama K, Fukui H. Identification of epigallocatechin-3-O-gallate as an active constituent in tea extract that suppresses transcriptional up-regulations of the histamine H1 receptor and interleukin-4 genes. *J Trad Med.* 2008;25:133–142.
- [5] Shahriar M, Mizuguchi H, Maeyama K, Kitamura Y, Orimoto N, Horio S, et al. Suplatast tosilate inhibits histamine signaling by direct and indirect down-regulation of histamine H1 receptor gene expression through suppression of histidine decarboxylase and IL-4 gene transcriptions. *J Immunol.* 2009;183:2133–2141.
- [6] Hattori M, Mizuguchi H, Baba Y, Ono S, Nakano T, Zhang Q, et al. Quercetin inhibits transcriptional up-regulation of histamine H1 receptor via suppressing protein kinase C- δ /extracellular signal-regulated kinase/poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling pathway in HeLa cells. *Int Immunopharmacol.* 2013;15:232–239.
- [7] Mizuguchi H, Nariai Y, Kato S, Nakano T, Kanayama T, Kashiwada Y, et al. Maackiain is a novel anti-allergic compound that suppresses transcriptional up-regulation of the histamine H1 receptor and interleukin-4 genes. *Pharmacol Res Pers.* 2015;3:e00166, doi: 10.1002/prp2.166.
- [8] Das AK, Yoshimura S, Mishima R, Fujimoto K, Mizuguchi H, Dev S, et al. Stimulation of histamine H1 receptor up-regulates histamine re-

- ceptor itself through activation of receptor gene transcription. *J Pharmacol Sci.* 2007;103:374–382.
- [9] Mizuguchi H, Terao T, Kitai M, Ikeda M, Yoshimura Y, Das AK, et al. Involvement of PKC γ /Extracellular signal-regulated kinase/Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) signaling pathway in histamine-induced up-regulation of histamine H1 receptor gene expression in HeLa cells. *J Biol Chem.* 2011;286:30542–30551.
- [10] Mizuguchi H, Hatano M, Matsushita C, Umehara H, Kuroda W, Kitamura Y, et al. Repeated pre-treatment with antihistamines suppresses transcriptional up-regulations of histamine H1 receptor and interleukin-4 genes in toluene-2,4-diisocyanate-sensitized rats. *J Pharmacol Sci.* 2008;108:480–486.
- [11] Koda A, Yanagihara Y, Matsuura N. IPD-1151T: a prototype drug for IgE antibody synthesis modulation. *Agents Actions.* 1991;34:369–378.
- [12] Murakami T, Yamanaka K, Tokime K, Kurokawa I, Tsutsui H, Nakaniishi K, et al. Topical suplatast tosilate (IPD) ameliorates Th2 cytokine-mediated dermatitis in caspase-1 transgenic mice by downregulating interleukin-4 and interleukin-5. *Br J Dermatol.* 2006;155:27–32.
- [13] Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:707–747.
- [14] Rooney JW, Hoey T, Glimcher LH. Coordinate and cooperative roles for NFAT and AP-1 in the regulation of the murine IL-4 gene. *Immunity.* 1995;2:473–483.
- [15] Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. *Nature.* 1992;356:801–804.
- [16] Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today.* 1992;13:136–142.
- [17] Roehrl MH, Kang S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, Hogan PG. Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:7554–7559.
- [18] Kizawa M, Miyamoto E, Aono S, Kawakami J, Adachi I. Inhibition of theophylline metabolism by suplatast and its metabolites in rats. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:1061–1065.
- [19] Kalesnikoff J, Huber M, Lam V, Damen JE, Zhang J, Siraganian RP, et al. Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that

- lead to cytokine production and cell survival. *Immunity*. 2001;14:801–811.
- [20] Huber M, Helgason CD, Damen JE, Liu L, Humphries RK, Krystal G. The src homology 2-containing inositol phosphatase (SHIP) is the gatekeeper of mast cell degranulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:11330–11335.
- [21] Tanaka S, Mikura S, Hashimoto E, Sugino Y, Ichikawa A. Ca^{2+} influx-mediated histamine synthesis and IL-6 release in mast cells activated by monomeric IgE. *Eur J Pharmacol*. 2005;35:460–468.
- [22] Holgate ST. Asthma: past, present and future. *Eur Respir J*. 1993;6:1507–1520.
- [23] Marone G, Granata F, Spadaro G, Genovese A, Triggiani M. The histamine-cytokine network in allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112:S83–S88.
- [24] Igaz P, Novak I, Lazar E, Horvath B, Heninger E, Faauls A. Bidirectional communication between histamine and cytokines. *Inflamm Res*. 2001;50:123–128.
- [25] Kitamura Y, Mizuguchi H, Ogishi H, Kuroda W, Hattori M, Fukui H et al. Preseasonal prophylactic treatment with antihistamines suppresses IL-5 but not IL-33 mRNA expression in the nasal mucosa of patients with seasonal allergic rhinitis caused by Japanese cedar pollen. *Acta Oto-Laryngologica*. 2012;132:434–438.
- [26] Rao A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today*. 1994;15:274–281.
- [27] Crabtree GR, Clipstone NA. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T-lymphocytes. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:1045–1083.
- [28] Shaw J-P, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*. 1988;241:202–205.
- [29] Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the interleukin 2 gene. *Curr Opin Immunol*. 1995;7:333–342.
- [30] Serfling E, Avots A, Neumann M. The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochem Biophys Acta*. 1995;1263:181–200.
- [31] Miyauchi Y, Katayama I, Furue M. Suplatast/Tacrolimus Combination Therapy for Refractory Facial Erythema in Adult Patients with Atopic

- Dermatitis—A Meta-Analysis Study. *Allergology Int.* 2007;56:269–275.
- [32] Suto H, Mitsuishi K, Hira K, Uchida T, Unno T, Ogawa H, et al. The effect of suplatast tosilate on immunological parameters for the patients with atopic dermatitis. *Allergy.* 2000;49:1163–1172. Japanese.
- [33] Wilson SR, Thé L, Batia LM, Beattie K, Katibah GE, McClain SP, et al. The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell.* 2013;155:285–295.
- [34] Uyttenhove C, Simpson RJ, Van Snick J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 6934–6938.
- [35] Demoulin JB, Renauld JC. Interleukin 9 and its receptor: an overview of structure and function. *Int Rev Immunol.* 1998;16:345–364.
- [36] Hultner L, Kolsch S, Stassen M, Kaspers U, Kremer JP, Mailhammer R, et al. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J Immunol.* 2000;164:5556–5563.
- [37] Hauber HP, Bergeron C, Hamid Q. IL-9 in allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2004;134:79–87.
- [38] Temann UA, Laouar Y, Eynon EE, Homer R, Flavell RA. IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells. *Int. Immunol.* 2007;19:1–10.
- [39] Temann UA, Ray P, Flavell RA. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest.* 2002;109:29–39.
- [40] Jash A, Sahoo A, Kim G-C, Chae C-S, Hwang J-S, Kim J-E, et al. Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT-1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor- κ B (NF- κ B)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation. *J Biol Chem.* 2012;287:15445–15457

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、多大なる御支援のもと、懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院医歯薬学研究部 分子難治性疾患学分野 福井 裕行 特任教授、分子情報薬理学分野 水口 博之 准教授 に心より感謝の意を表します。

本研究の共同研究者としてご協力くださいました、Dr. Masum Shahriar, Associate professor of Pharmacy, Jahangirnagar University, 徳島大学大学院医歯薬学研究部 耳鼻咽喉科学分野 武田 憲昭 教授、北村 嘉章 講師、愛媛大学大学院医学系研究科 薬理学分野 前山 一隆 教授、徳島大学大学院医歯薬学研究部 分子情報薬理学分野 堀尾 修平 助教、新潟大学大学院医歯学総合研究科 分子細胞医学 薬理学分野 梅原 隼人 助教 に深く感謝致します。

本研究の遂行に際し多大なる御協力を頂きました徳島大学大学院医歯薬学研究部 分子情報薬理学分野の皆様へ深く感謝致しますとともに、今後益々のご活躍をお祈り申し上げます。

本研究の機会を与えて頂き、様々な御支援、御指導と御鞭撻を賜りました、九州大学大学院消化器・総合外科 木庭 守 客員教授、大鵬薬品工業株式会社 山崎 靖人 副部長、松尾 憲一 所長、三好 和久 副部長、佐々木 英治 所長、林 勸生 担当部長、箱井 加津男 副本部長、内田 淳二 所長、開発薬理研究所の皆様へ厚く御礼申し上げますとともに心から感謝致します。

最後に、博士後期課程の履修に関し理解を頂きました家族、両親に心より感謝致します。

2016年3月

折本 直樹