

201229005B

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

アレルギー疾患感受性遺伝子である
ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子の発現抑制作用を
持つ天然物を用いる治療戦略

平成22年度～平成24年度

総合研究報告書

研究代表者 福井 裕行

平成25(2013)年5月

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
アレルギー疾患感受性遺伝子であるヒスタミン H₁ 受容体遺伝子の
発現抑制作用を持つ天然物を用いる治療戦略

研究代表者：福井 裕行 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授
研究分担者：武田 憲昭 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授
研究分担者：水口 博之 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授
研究分担者：柏田 良樹 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授
研究分担者：根本 尚夫 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授
研究分担者：荻野 敏 大阪大学大学院医学系研究科 教授
研究分担者：斎藤 博久 国立成育医療研究センター研究所 副研究所長
研究分担者：中山 勝文 東北大学・加齢医学研究所 生体防御学 助教
研究分担者：有信 洋二郎 九州大学病院 遺伝子・細胞療法部 助教
研究協力者：大保木啓介 国立成育医療研究センター研究所 免疫アレルギー研究部
研究員
研究協力者：梶原 直樹 順天堂大学 アトピー疾患研究センター 研究員
研究協力者：小笠原 康悦 東北大学・加齢医学研究所 生体防御学 教授
研究協力者：川野 光子 東北大学・加齢医学研究所 生体防御学 博士研究員
研究協力者：出原 賢治 佐賀大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野 教授
研究協力者：白石 裕士 佐賀大学医学部分子生命科学講座分子医化学分野 助教

研究要旨： 多くの G タンパク共役型受容体 (GPCR) がその刺激により脱感作機構が働き、発現レベルは低下する。それに反して、ヒスタミン H₁ 受容体 (H₁R) 刺激は H₁R 遺伝子発現亢進を介して、発現レベルが増加する。ヒト花粉症において、H₁R 遺伝子発現亢進機構は活性化され、鼻粘膜 H₁R mRNA レベルと症状の相関性が証明された。また、抗ヒスタミン薬の初期療法により H₁R mRNA レベル低下と症状改善が証明された。

H₁R 刺激による H₁R 遺伝子発現亢進は、PKC δ のゴルジ体移行と活性化に引き続く ERK、poly (ADP ribose) polymerase-1 (PARP) シグナルを介して引き起こされる。PARP は 2 か所の転写調節部位を介して H₁R 遺伝子プロモーターの活性化を引き起こす。上流側には 2 か所の AP-1 と 1 か所の Ets-1 の転写調節部位を介して、下流側は予め抑制的に結合している Ku70/Ku86 複合体が解離することにより、プロモーターの活性化が引き起こされる。

H1R 遺伝子発現亢進は、抗ヒスタミン薬により抑制されるが、苦参などの抗アレルギー一和漢薬によっても抑制される。苦参に含有される H1R 遺伝子発現抑制薬は、(-)maackiain であることが同定された。(-)maackiain の作用点は、PKC δ のゴルジ体移行と活性化であり、この抑制により H1R 遺伝子発現亢進を抑制する。(-)maackiain の標的分子として、HSP90 を同定した。PKC δ は、PKC δ ・HSP90 複合体を形成し、H1R 刺激により複合体のゴルジ体移行と活性化が引き起こされる。(-)maackiain の投与により、(-)maackiain が HSP90 に結合し、PKC δ ・HSP90 複合体の解離が引き起こされ、シグナル伝達が阻害される。

HSP90 抑制薬である 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) は H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進を抑制した。また、フラボノイドの apigenin、及び、quercetin は、PKC δ 活性を抑制し、H1R 遺伝子発現亢進を抑制した。そして、(-)maackiain、apigenin、quercetin、及び、HSP90 抑制薬の celastrol をトルエン 2,4-イソシアン酸 (TDI) 感作鼻過敏症モデルラットに投与することにより、鼻粘膜 H1R mRNA レベル低下と関連した症状改善が証明された。そして、HSP90 はアレルギー疾患に対する創薬ターゲットであることが強く示唆された。

以上の研究結果より、花粉症症状は H1R 遺伝子発現に依存し、H1R 遺伝子はアレルギー疾患感受性遺伝子であると考えられる。そして、抗ヒスタミン薬の花粉症症状改善に対する薬効発現機構は、H1R 遺伝子発現亢進の抑制による H1R シグナルの絶対的低下によると考えられる。

ヒト花粉症において、H1R mRNA レベルは、ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) mRNA レベル、及び、IL-5 mRNA レベルと非常に高い相関性を示した。また、TDI 感作鼻過敏症モデルラットにおいて、H1R、HDC、IL-4、及び、IL-5 の各 mRNA レベルは高い相関性を示した。以上の結果により、アレルギー疾患感受性遺伝子は、いくつかの遺伝子が集まって感受性遺伝子群を形成していると考えられる。

TDI 感作鼻過敏症モデルラットに対して、抗ヒスタミン薬、及び、(-)maackiain などの H1R 遺伝子発現抑制薬を投与した時、H1R 遺伝子発現は完全に抑制されたが、鼻過敏症症状の改善は 60%に留まった。残存する 40%の症状の改善に有効な抗アレルギー性天然物 A、その有効成分 B、作用点となる疾患感受性遺伝子 C と上流の細胞内シグナル D、及び、天然物 A の有効成分 E の同定に成功した。TDI 鼻過敏症モデルラットに抗ヒスタミン薬とを抗アレルギー性天然物 A、天然物 B、又は、有効成分 E を併用投与することにより、約 90%の症状改善を証明した。

苦参熱水抽出物から新規 H1R/IL-4 遺伝子発現抑制物質として単離・同定された (-)maackiain の菌体成分誘発性炎症の抑制効果について in vitro 解析した。LPS、或いは、細菌由来成分である PAM₃CSK₄ で刺激したマクロファージにおいて、IL-6、及び、TNF- α 産生亢進は、(-)maackiain により抑制された。このサイトカイン産生は、抗ヒスタミン薬のクロルプロマジン、及び、ロラタジンにより部分的抑制が観察され、ヒスタミン/H1R

経路を介することが示唆された。

喘息の代表的アレルゲンの一つであるカビの菌体成分として、 β -glucan (β -1,3-glucan の curdlan) が同定されている。マウス骨髄マクロファージを curdlan で刺激することにより、dectin-1 を介した IL-6 および TNF- α 産生亢進に対して、(-)maackiain、apigenin、quercetin は、いずれもそれら炎症性サイトカイン産生を抑制し、PKC δ の活性化を抑制することも判明した。更に、(-)maackiain、apigenin は ERK リン酸化を、quercetin は NF- κ B の活性化をそれぞれ抑制した。以上の研究結果により、(-)maackiain、apigenin、及び、quercetin は、 β -glucan 刺激によるマクロファージの炎症応答を抑制するが、食食機能（病原体排除機能）を抑制しないことを示唆し、これら新規 HSP90 抑制フラボノイドはカビアレルギーに対する治療薬として期待できる。

喘息モデルマウスに対する苦参の投与により、症状改善、及び、好酸球の遊走能阻止が引き起こされた。また、celastrol の投与により、喘息モデルマウスにおける好酸球性炎症は著明に抑制された。

A. 研究目的

アレルギー疾患において、マスト細胞から種々のアレルギーメディエーターが遊離される。ヒスタミンは主要メディエーターであり、抗ヒスタミン薬（ヒスタミン H₁ 受容体 (H₁R) 拮抗薬）はアレルギー疾患の主要治療薬である。ヒスタミン以外のアレルギーメディエーターとして、ロイコトリエンが同定され、抗ロイコトリエン薬が開発された。マスト細胞からメディエーターを遊離させる上流のシグナルは、IgE・抗原複合体であるが、IgE に対する抗体医薬が抗アレルギー薬として開発されている。また、アレルギーサイトカイン抑制薬として、トシル酸スプラタストが開発され、主に、皮膚科領域でカルシニューリン抑制薬のタクロリムスが使われている。しかし、アレルギー疾患の症状の満足の行く治療薬がないことから、最善の症状改善が期待されるステロイドが用いられる。既存のアレ

ルギー疾患治療薬は、ヒスタミンを中心として、細胞間アレルギーシグナルの抑制が治療戦略であると考えられる。

G タンパク共役型受容体 (GPCR) の多くが、その刺激により受容体脱感作機構が作動し、受容体発現レベルを低下させる。それに反し、H₁R 刺激が遺伝子発現亢進を介した H₁R 発現レベルの増加を引き起こすことを見いだした。H₁R シグナルは H₁R 発現量に依存することから、H₁R 遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子として働き、疾患症状の悪化に関与しているのではないかと考えた。

先ず、H₁R 遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子であることを明らかにするために、花粉症患者における臨床研究を行い、鼻炎症状レベルと H₁R 遺伝子発現亢進が相関することを明らかにする。また、toluene-2,4-diisocyanate (TDI) 感作による鼻過敏症モデルラットにおいて、鼻炎症状レベルと H₁R 遺伝子発現亢進が相関す

ることを明らかにする。そして、H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構を H1R を自然発現する HeLa 細胞を用いて、分子レベルの解明を行う。

科学的に未検証であるが、抗アレルギー作用の伝承を持つ苦参（マメ科クララの根（*Sophorae Radix*）を材料とする和漢薬）などの和漢薬、及び、桑葉、土筆、玉葱、柿の葉などの抗アレルギー食品、及び、天然物医薬が存在する。そこで、これらの医薬の HeLa 細胞における H1R 遺伝子発現亢進に対する抑制作用、及び、TDI 感作鼻過敏症モデルラットにおける症状改善と H1R 遺伝子発現亢進の抑制作用を明らかにする。

本研究課題において、アレルギー疾患感受性遺伝子である H1R 遺伝子の発現亢進機構を作用点とする抗アレルギー天然物を同定し、それに含有される有効成分の精製・単離、化学構造の同定、標的分子の同定、及び、抗アレルギー作用の分子薬理機構解明を行い、アレルギー疾患に対する創薬ターゲットの同定を行うことを目的とする。

また、抗ヒスタミン薬の初期療法を行ったヒト花粉症患者において、現在まで報告されている IL-4 遺伝子、IL-5 遺伝子などのアレルギー疾患感受性遺伝子、及び、ヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）遺伝子の発現レベルと H1R 遺伝子発現レベルを比較し、相互の関係を明らかにする。TDI 感作鼻過敏症モデルラットにおいても同様の検討を行う。

更に、TDI 感作鼻過敏症モデルラットに抗ヒスタミン薬の投与を行い、H1R 遺伝子発現亢進を完全に抑制した場合、鼻症状の

改善度が不完全（約 60%）であることを見いだしている。そこで、残りの 40%の症状に関与する機構を種々の抗アレルギー天然物のスクリーニングにより同定し、有効成分の同定、有効成分の標的分子、及び、その分子薬理機構の解明により、新規アレルギー疾患治療薬シーズの開発、及び、同疾患の創薬ターゲットの同定を行う。そして、H1R 遺伝子発現を抑制する治療薬との併用投与により、TDI 感作鼻過敏症モデルラットの高度な症状改善を証明する。

一方、マウス喘息モデルを用いて、苦参抽出物、及び、苦参有効成分の急性喘息の病態に及ぼす影響について検討を行う。更に、自然免疫によって駆動されるアレルギー炎症に対する効果を調べるためのモデル作成を行う。

苦参抽出物成分が、アレルギー疾患に加えて、喘息病態を抑制するのか、或いは感作成立過程に作用するのかを明らかにする必要がある、更に、ナチュラルヘルパー細胞に代表される新しいアレルギー性炎症関連細胞の発見により、獲得免疫に依存しない、即ち自然免疫を介するアレルギー炎症を評価できるモデルの必要性が高まっている。そこで、苦参熱水抽出物の、アレルギー性鼻炎モデルラットの鼻粘膜 H1R、HDC、IL-4、及び、IL-5 の mRNA 発現亢進に対する抑制作用、くしゃみなどの鼻アレルギー症状に対する軽減作用に加えて、新しい炎症抑制作用を見出すことを目的とし、細菌感染性炎症への抑制効果について検討を行う。更に、苦参の有効成分として同定された(+)maackiain の LPS 刺激によるマクロファージ炎症性サイトカイン産生に対する抑制作用、及び、炎症抑制作用について検

討し、更に、その抑制メカニズムについて解析を行う。

更に、苦参有効成分である(-)maackain、フラボノイドである apigenin、quercetin などの抗アレルギー天然物の有効成分の標的分子として、HSP90 が同定された (Int Immunopharmacol 15:232-239, 2013、H23 福井班厚労科研報告書)。一方、カビアレルギーの発症メカニズムとして、菌体細胞壁成分の β -glucan がマクロファージに発現する C 型レクチン受容体の dectin-1 を刺激して炎症性サイトカインを産生させること (J Immunol 189:3653-3660, 2012)、及び、dectin-1 の炎症シグナルには PKC δ が関与すること (Immunity 36:32-42, 2012) から、新規 HSP90 阻害薬である (-)maackiain, apigenin、及び、quercetin の β -glucan 刺激マクロファージ炎症応答に対する抑制効果について解析する。

苦参抽出物は鼻過敏症モデルラットの鼻アレルギー症状を改善、及び、鼻粘膜の H1R, HDC, IL-4, IL-5 の遺伝子発現を抑制することが明らかにされているが、依然として不明な点も多い。そこで、苦参の作用メカニズムを明らかにし、より幅広い薬効を探索することを目的に、喘息モデルマウス、及び皮膚炎モデルマウスに対する苦参の効果について解析を行う。そこで、苦参抽出物の喘息モデルマウスの症状改善作用、細菌感染性炎症に対する苦参の抑制作用、喘息モデルマウスのアレルギー性炎症に対する効果、骨髄球系細胞の分化に与える苦参の影響、肺胞洗浄液中への好酸球浸潤を抑制作用、好酸球分化過程での CCR3 発現抑制、及び、肺胞洗浄液中への好酸球の浸潤抑制について明らかにする。マウス喘息

モデルにおける苦参の関して検討した。また、作成に成功しているダニ抽出物誘導性皮膚炎モデルマウスの解析を行い、(1) 喘息モデルマウスにおける苦参による好酸球性炎症抑制のメカニズムを明らかにし、(2) 皮膚炎モデルマウスに与える苦参の効果を検証する。更に、(3) 苦参の有効成分である (-)maackiain の標的分子である HSP90 の抑制薬である cetastrol の効果を、喘息モデルマウスにて検証し、(4) 皮膚炎の改善効果を期待する薬剤の評価を正確に行うための in vitro 皮膚炎モデルを構築する。

B. 研究方法

1. 臨床研究

花粉症患者ボランティアの抗ヒスタミン薬による初期療法群 8 名、非初期療法群 17 名について、くしゃみと鼻漏を鼻アレルギーガイドライン 2009 の重症度分類に従ってスコア化した。また、ボランティア鼻粘膜を採取し、ヒスタミン H₁ 受容体 mRNA を測定した。同様に、HDC、IL-4、及び、IL-5 の各 mRNA を測定した (Mizuguchi H et al. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 32 (10), 745-748, 2010)。

2. 鼻過敏症モデルラット

6 週齢 Brown-Norway 系雄性ラットの鼻前庭に toluene 2,4-diisocyanate (TDI) により感作した。感作ラットを TDI により過敏症発作を誘発し、症状スコアの測定と mRNA 測定用鼻粘膜サンプルを採取した (Mizuguchi H et al. *J Pharmacol Sci* 108 (4), 480-486, 2008.)。抗アレルギー作用の

検討を行う天然物エキス、及び、天然物由来抗アレルギー化合物については、TDI 感作と同時に連日、1日1回、発作誘発直前まで投与した。

3. mRNA 測定

培養細胞、鼻過敏症モデルラット鼻粘膜、及び、花粉症患者鼻粘膜サンプルに含まれる mRNA 測定は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems)を用いて cDNA 合成を行い、Fast Start Universal Probe Master (ROX) (Roche)を含む試薬により、Sequence Detector (GeneAmp 7300 Sequence Detection System、Applied Biosystems)を用いて real-time PCR 反応による mRNA 測定を行った (Mizuguchi H et al. *J Pharmacol Sci* **108** (4), 480-486, 2008)。

4. 苦参含有有効成分 ((-)maackiain) の同定

培養細胞 (RBL 2H3 細胞) の IgE 受容体刺激による IL-4 mRNA 上昇に対する抑制活性を指標に有効成分の精製・単離、及び、化学構造の同定を行った。苦参 (*Sophorae Radix*) 100°C抽出液を異なる pH で酢酸エチルによる抽出を行い、IL-4 mRNA の増加に対する抑制活性画分を Silica gel 60N (関東化学) のオープンカラムを用いて精製を行い、更に、Mightysil RP18 GP (関東化学) による HPLC により活性成分を単離した。そして、1次元 ¹H-NMR、¹³C-NMR 及び 2次元 HH-COSY、DEPT、HMBC、HSQC (日本ブルカー; ARX-400) と旋光度測定により構造決定を行い、(-)maackiain を同定した。

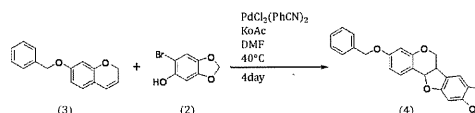
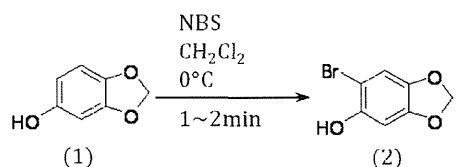


図 1. (±)maackiain の有機合成

5. (±)maackiain の有機合成

(±)-maackiain の有機合成は Jaco C. Breytenbach らの方法 (Jaco CB et al. *J Chem Soc Perkin trans I* 04-1809, 1980) を一部改良して行った。

¹H NMR と ¹³C NMR は CDCl₃ を溶媒、TMS を基準物質として、Bruker AV400N を用いて測定した。MS は LCTPREMIER (Waters /Micromass) を用いて測定した。IR は FT/IR-6000 (JASCO) によって測定した。

silica gel 60N(関東化学)をカラムクロマトグラフィに用いた。

bis(benzonitrile)palladium(II)dichloride は既知法に従って合成した¹⁶⁾ (図 1)。

セサモール (1) を氷冷塩化メチレン中で、N-Bromosuccinimide 反応させ、塩化メチレン層を濃縮し、silica gel 60N (関東化学) カラムクロマトグラフィ (hexane-chloroform, 1:2) により 2-Bromo-4,5-methylenedioxyphenol (2) を得た。次いで、7-Benzyloxy-2H-1-benzopyran (3) 、

2-Bromo-4,5-methylenedioxyphenol (2) に、DMF(N,N-dimethylformamide)を加え、bis(benzonitrile)palladium (II) dichloride を加えシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、(±)maackiain (4) を得た。

更に、(±)maackiain の分割を Chiral Pack IC カラム(ダイセル化学工業)を用いて行い、(-)maackiain を得た。

6. 苦参含有有効成分 ((-)maackiain) の薬理機構

H1Rを自然発現するHeLa細胞を用いて、H1R刺激によるH1R遺伝子発現機構解明を行った。PKC- δ シグナル活性化の検出を、サンプルのSDS-PAGEによる展開後、リン酸化PKC δ (Tyr³¹¹) 抗体 (Cell Signaling)、及び、リン酸化ERK抗体 (Santa Cruz) によるWestern-blot法によるPKC δ 、及び、ERKのリン酸化の測定により行った。

PKC δ の細胞内移行は、抗PKC δ 抗体 (Santa Cruz)、及び、抗Golgi抗体 (Santa Cruz) を用いる免疫組織学的方法により、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。遺伝子転写調節因子の同定は、H1R遺伝子の上流 2.1-kb DNA fragmentを用いて、AP-1, Ets-1, 及び、poly (ADP-ribose) polymerase-1(PARP-1)/Ku86/Ku70などの転写調節機構について、ゲルシフトアッセイ、スーパーシフトアッセイなどにより行った。(-)maackiainの標的分子同定のために、HeLa細胞から抽出した蛋白質を陰イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーで分画後、(-)maackiainの存在により蛍光をクエンチングさせる分画を見いだし、同分画のSDS-PAGEによる展開後、主要蛋白質の

1次構造を決定し、候補タンパク質と(-)maackiainの結合を(-)maackiain固定化ビーズにより証明した。

7. 急性喘息モデルマウスを用いる実験

C57BL/6J 雄マウスに対して卵白アルブミン (OVA 50 μ g : 水酸化アルミニウムゲル (1:1)) 溶液を 0, 8 日目に腹腔内投与により感作し、16, 18, 20 日目に 200 μ g の OVA の経鼻吸入により急性喘息モデルを作成した。苦参抽出物は 0 から 20 日目まで 1 日おきに 300 mg/kg を腹腔内投与した。21 日目に気道過敏性試験 (Buxco 社侵襲的気道抵抗測定装置) を行い、血清、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織をサンプリングした。喘息モデルの指標として、血清中の IgG1 及び IgE レベル、BALF 中の炎症細胞数 (Sysmex, XT1800iv) とサイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10) 濃度 (ELISA)、肺の病理組織学的変化 (HE 染色)、肺組織中のサイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10) 及びヒスタミン H1R の mRNA 発現量 (Real-time PCR) を評価した。(-)maackiain は感作開始後 15 から 20 日目まで毎日 0.5 μ g/100 μ l を腹腔内投与した。21 日目に安楽死させ、血清、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織をサンプリングした。喘息モデルの指標として、血清中の IgG1 及び IgE レベル、BALF 中の炎症細胞数 (Sysmex, XT1800iv) とサイトカイン濃度 (Luminex, ELISA) を評価した。

8. 自然免疫型のアレルギー気道炎症モデルを用いる実験

自然免疫型のアレルギー気道炎症モデルを作成する外来因子として、ヒョウヒダニ

主要抗原 Der f 1 と相同性の高い植物由来のシステインプロテアーゼ型アレルゲンである papain を用いた。実験には C57BL/6N 雌、BALB/cA 雌を使用した。感作を行わず、1, 2, 3 日目にそれぞれ 100 µg/20 µl の papain を経鼻吸入させることで気道炎症モデルを作成した。最終吸入日から経時的に (day 1, 7, 14) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、BALF 中の炎症細胞数とサイトカイン濃度を評価した (各時点 N=4-5)。また、吸入後の短時間の炎症動態を調べる目的で、C57BL/6N 雌マウスに 100 µg/20 µl の papain を上記と同様 3 回経鼻吸入したのち、6H、24H、48H、72H 後 (各時点 N=4-5) に気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、BALF 中の炎症細胞数とサイトカイン濃度を評価した。

9. LPS 刺激マウス骨髄由来マクロファージの炎症性サイトカイン産生抑制活性、及び、黄色ブドウ球菌感染性皮膚炎モデルマウスの抗炎症作用

in vitro および in vivo 実験により苦参熱水抽出物の抗炎症作用を評価した。まず、マウス骨髄由来マクロファージを LPS (10 ng/ml) で刺激し、12 時間後の炎症性サイトカインを ELISA 法により測定した。このとき、マウス骨髄由来マクロファージを苦参熱水抽出物 (0.3 mg/ml, 1 mg/ml あるいは 3 mg/ml) で 1 時間前処理することによりこの天然物の効果を評価した。

マウス骨髄由来マクロファージを LPS (10 ng/ml) で刺激し、10~60 分後の NF-κB および MAPK 活性化をウエスタンブロット法により、12 時間後の炎症性サイトカインを ELISA 法により各々測定した。

このとき、マーキアイン、クロルプロマジン、ロラタジンを 1 時間前処理することによりこれらの阻害効果を検討した。なお、これら薬剤について、マクロファージ細胞毒性を示さない濃度 [マーキアイン (100 mM)、クロルプロマジン (2 mM)、ロラタジン (2 mM)] を使用した。

C57BL/6 マウスに黄色ブドウ球菌 RN4220 株 (1×10^8 cfu/mouse) を皮下感染させ、感染後 10 日間の皮膚炎症領域を経時的に測定した。この皮膚炎モデルマウスに予め苦参熱水抽出物 (6 mg/mouse) あるいは PBS を隔日に 1 週間腹腔内投与することにより、抗炎症作用を評価した。

C57BL/6 マウス骨髄細胞より M-CSF により分化誘導したマクロファージを β-1,3-glucan (curdlan : 50 mg/ml) で刺激し、12 時間後の培養上清中の IL-6 および TNF-α を ELISA 法により測定した。このとき、このマクロファージを次の阻害剤で 30 分間前処理することにより抑制効果を評価した : (-)maackiain (1~300 mM)、apigenin (0.3~100 mM)、quercetin (0.3~100 mM)、celastrol (CLS : 3 nM~1 mM)。また、マクロファージの PKCδ、NF-κB および MAPK 経路の活性化については、抗リン酸化 PKCδ 抗体、IκB-α 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体を用いた Western blotting 法により解析した。

10. 苦参の喘息モデルマウスの症状改善と血球に対する影響

C57BL/6 mouse を用い、OVA 50µg+ Alum 1mg 腹腔内投与による感作 (Day0, 8)、1% OVA aerosol 吸入による曝露 (Day16, 18, 20) により喘息誘導を行った。

Day0 から Day20 までの間の隔日に、苦参熱抽出物 (300mg/kg, 6mg/mouse) を腹腔内投与した。Day21 に、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数を評価した。また、骨髓球系細胞の血液分化に与える影響として、骨髓中の骨髓球系共通前駆細胞 (CMP)、顆粒球・単球系前駆細胞 (GMP)、好酸球前駆細胞 (EoP) の数、腹腔内の肥満細胞の数、及び末梢血の白血球分画を評価した。

マウス骨髓から、multi-color FACS を用いて顆粒球・単球系前駆細胞 (granulocyte/monocyte progenitor; GMP)、好酸球前駆細胞 (eosinophil progenitor; EoP) を、脾臓から成熟好酸球をそれぞれ単離し、20%FCS+IMDM 培養液に以下のサイトカインを添加し培養を行った (骨髓球系細胞培養条件 ; SCF, IL-3, IL-11, GM-CSF, Epo, Tpo, 好酸球培養条件 ; SCF, IL-5)。細胞の評価は、May-Gimsae 染色、flowcytometer にて行った。苦参抽出物が、細胞分化や細胞表面マーカーに与える影響を検討した。

C57BL/6 mouse を用い、OVA 50µg+ Alum 1mg 腹腔内投与による感作 (Day0, 8)、1% OVA aerosol 吸入による曝露 (Day16, 18, 20) により喘息誘導を行った。Day0 から Day20 までの間の隔日に、celastrol (50ug/mouse) を腹腔内投与した。Day21 に、アレルギー性炎症に与える影響として、気管支肺胞洗浄液中の好酸球数を評価した。また、骨髓球系細胞の血液分化に与える影響として、骨髓中の骨髓球系共通前駆細胞 (CMP)、顆粒球・単球系前駆細胞 (GMP)、好酸球前駆細胞 (EoP) の数、及び末梢血の白血球分画を評価した。

1.1. 皮膚炎モデルマウス

Balb/c mouse または C57BL/6 mouse の耳介をテープストリッピング後、ダニ抽出物 (10µg/ml, 25µL) を Day0, 7, 14, 21, 28 に、各耳表裏に塗布し、作成した。Day0 から Day28 までの間の隔日に、苦参熱抽出物 (300mg/kg, 6mg/mouse) を腹腔内投与し、耳の腫れを計測して評価した。

in vitro での評価系として、3次元 air-liquid interface 共培養系を構築した。コラーゲンゲル内に線維芽細胞を混合し、その上でケラチノサイトを培養した。この系では線維芽細胞やケラチノサイトから分泌される液性因子がコラーゲンゲルを介して作用し合えるとともに、ケラチノサイトの上側が空気に接して生理的環境に近い状態での培養が可能となった。ケラチノサイトや線維芽細胞の細部数などを検討して、細胞の増殖・分化やサイトカイン産生について検討を行った。

C. 研究結果

1. アレルギー疾患感受性遺伝子としての H1R 遺伝子、及び、アレルギーシグナル関連遺伝子の臨床研究

花粉症患者ボランティアの鼻過敏症症状スコアと鼻粘膜 H1R mRNA の測定を行った。症状スコアと鼻粘膜 H1R mRNA レベルには相関性が証明された (相関係数 = 0.51)。抗ヒスタミン薬による初期療法を行った患者において、くしゃみと鼻水スコア、及び、鼻粘膜 H1R mRNA レベル共に、非初期療法患者群に比べて有意に低かった (図2)。

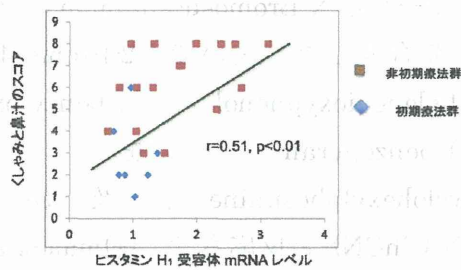


図2. 花粉症患者の症状と H1R mRNA レベルの相関性

また、花粉症患者鼻粘膜の H1R mRNA、HDC mRNA、IL-4 mRNA、IL-5 mRNA、及び、IL-33 mRNA を測定した。HDC mRNA、及び、IL-5 mRNA レベルは H1R mRNA と非常に高い相関性を示し(図3)、鼻過敏症症状スコアとも相関した。IL-4 mRNA は測定できなかった。IL-33 mRNA は H1R mRNA、HDC mRNA、IL-5 mRNA、及び、鼻過敏症症状スコアと相関性を示さなかった。

2. H1R 刺激による PKC δ シグナルを介した H1R 遺伝子発現亢進の分子機構

HeLa 細胞の H1R 刺激による H1R mRNA 上昇、及び、H1R プロモーター活性化は、rottlerin (PKC δ 特異的阻害薬)で抑制された。H1R 刺激は、PKC δ リン酸化レベル (Tyr³¹¹, Thr⁵⁰⁵) を上昇させ、H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇は、siRNA による PKC δ 発現量の減少により低下し、PKC δ の過剰発現により上昇した。H1R 刺激、及び、PKC δ 活性化は、PKC δ の Golgi への移行を引き起こし、rottlerin の処置により移行は抑制された。H1R 刺激による ERK のリン酸化は、rottlerin により抑制さ

れた。H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇、及び、H1R プロモーター活性化は、R0126 (MEK 阻害薬)、及び、DPQ (PARP-1 阻害薬) により抑制された。

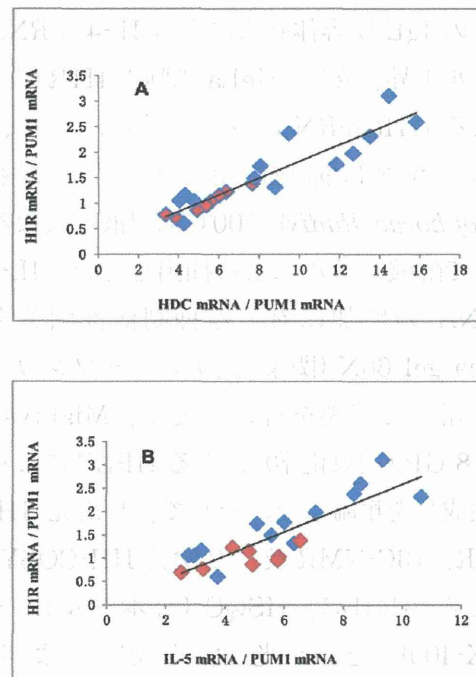


図3. 花粉症患者鼻粘膜の H1R mRNA、HDC mRNA、及び、IL-5 mRNA レベルの相関性. A: $r = 0.923$, $p < 0.01$, B: $r = 0.788$, $p < 0.01$.

H1R 遺伝子プロモーターに対する転写調節部位は、領域 A、及び、領域 B に分布した。領域 A には、2ヶ所の AP-1、及び、1ヶ所の Ets-1 結合部位が存在した。領域 A の活性化には、3ヶ所の転写調節部位の全ての結合部位への結合が必要であった。領域 B には Ku86/Ku70 複合体が抑制的に結合し、PARP-1 の活性化により、Ku86/Ku70 複合体が領域 B から解離し、

抑制が解かれ、プロモーター活性化が引き起こされることが明らかとなった。

3. 苦参に含まれる H1R 遺伝子発現抑制物質の精製・単離、及び、化学構造決定

RBL-2H3 細胞(マウス好塩基性白血球細胞)の IgE 受容体刺激による IL-4 mRNA レベル上昇、及び、HeLa 細胞の H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇に対して、苦参エキスは抑制作用を示した。苦参 (*Sophorae Radix*) 100°C抽出液を異なる pH で酢酸エチルによる抽出を行い、IL-4 mRNA の増加に対する抑制活性画分を Silica gel 60N (関東化学) のオープンカラムを用いて精製を行い、更に、Mightysil RP18 GP (関東化学) による HPLC により活性成分を単離した。そして、1 次元 ¹H-NMR、¹³C-NMR 及び 2 次元 HH-COSY、DEPT、HMBC、HSQC (日本ブルカー; ARX-400) と旋光度測定により (-)maackiain を同定した (図 4)。(-)maackiain は H1R mRNA の増加に対して抑制活性を示した。

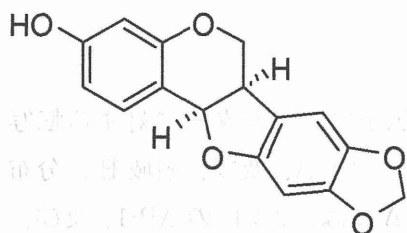


図 4. (-)maackiain の化学構造

4. (±)maackiain の有機合成

2-Bromo-4,5-methylenedioxyphenol を

セサモールと N-Bromosuccinimide の反応により合成した。次いで、2-Bromo-4,5-methylenedioxyphenol と 7-benzyloxy-2H-1-benzopyran を、tricyclohexylphosphine、及び、PdCl₂(PhCN)₂と反応させ、(±)maackiain を得た。反応生成物は Silica gel 60N により精製し、FT-NMR AL-400 (日本電子) により構造を同定した。更に、Chiral Pack IC カラムにより、(±)maackiain の分割を行い、(-)maackiain を得た。

5. H1R 遺伝子発現亢進機構と (-)maackiain の薬理学

抗アレルギー和漢薬、苦参の有効成分、(-)maackiain は、HeLa 細胞の H1R 刺激、及び、PKC 活性化ホルボールエステル (PMA) 刺激による H1R mRNA レベル上昇、PKCδ の Tyr³¹¹ のリン酸化、PKCδ の Golgi への移行、及び、ERK のリン酸化を抑制した。(-)maackiain は(±)maackiain の半分の濃度で同等の作用を示した。

HeLa 細胞から抽出した蛋白質溶液を陰イオン交換カラム (HiTrap Q FF, GE Healthcare) を用いる HPLC により分画し、(-)maackiain の添加により蛋白質の蛍光が強くクエンチされる分画の SDS 電気泳動を行い、泳動ゲルから蛋白質を回収し、一次構造決定により蛋白質の同定を行い、(-)maackiain の標的となる蛋白質の検索を行った。その結果、HSP90 が候補と考えられた。そして、(-)maackiain を固定化した樹脂を作成し、(-)maackiain と HSP90 の結合を証明した。

H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇、及び、PKCδ の Golgi 体移行は、17-

H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇、及び、PKC δ の Golgi 体移行は、17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG、HSP90 抑制薬) により抑制された。

抗アレルギー天然物に含有されるフラボノイド、apigenin、及び、quercetin は、H1R 刺激による H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用を示した。そして、apigenin、及び、quercetin の標的分子が HSP90 であることが示唆された。TDI 感作鼻過敏症モデルラットに対する cetastrol (HSP90 抑制薬) の投与により、鼻症状の改善、及び、H1R mRNA レベル上昇に対する抑制作用が見いだされた。

6. 鼻過敏症症状に関与する細胞内シグナルと疾患感受性遺伝子の検索

鼻過敏症モデルラットの症状は抗ヒスタミン薬投与により約 60% が改善された。そこで、鼻過敏症モデルラットに抗ヒスタミン薬と抗アレルギー性天然物抽出液の併用投与を行い、症状の高度な改善を引き起こす抗アレルギー性天然物の検索を行った。その結果、抗ヒスタミン薬と天然物 A 抽出液、及び、抗ヒスタミン薬と天然物 B 抽出液の併用投与により、症状の 90% が改善されることを見いだした。そこで、H1R 遺伝子、HDC 遺伝子、IL-4 遺伝子、及び、IL-5 遺伝子などの PKC δ シグナル下流の疾患感受性遺伝子以外で、天然物 A 抽出液の投与により発現亢進が抑制される遺伝子の検索を行い、遺伝子 C を同定した。次いで、培養細胞を用いて、遺伝子 C の発現亢進機構を調べ、細胞内シグナル D により調節されることを明らかにした。そして、遺伝子 C

の発現亢進に対する抑制活性を指標に、天然物 A に含有される活性物質 E の同定に成功した。

7. 急性喘息モデルマウスに対する苦参の症状改善作用

感作したマウスに OVA を吸入させることによって気道抵抗値の上昇、BALF 中への好酸球を中心とする炎症細胞の増加が認められた。血清中の総 IgE 及び OVA 特異的 IgE レベルは OVA 吸入によって増加し IgG1 レベルは変化しなかった。さらに、肺組織の IL-4 及び H1R の発現が OVA 吸入によって増加し、BALF 中の IL-4 濃度も増加した。一方、肺組織の IFN- γ 、IL-17、IL-10 の mRNA、および BALF 中のそれらサイトカインレベルの増加は観察されなかった。

苦参抽出物の腹腔内投与によって、気道抵抗値、BALF 中への好酸球浸潤共に有意に減少した。また、肺組織、BALF における IL-4 量は苦参抽出物の腹腔内投与によって有意に抑制された。一方、肺組織、BALF 中の IFN- γ 、IL-17、IL-10 レベルに変化は認められなかった。総 IgE 及び OVA 特異的 IgE の産生は苦参抽出物の投与によって僅かに抑制傾向が見られたものの、PBS 投与 (対照) との間に統計的有意差はなかった。苦参抽出物は肺組織における H1R mRNA 量には影響を及ぼさなかった。

8. 喘息モデルマウスに対する (-)-maackiain の改善作用

感作したマウスに OVA を吸入させることによって、BALF 中への好酸球を中心とする炎症細胞の増加が認められた。血清中の総 IgE 及び OVA 特異的 IgE レベルは

OVA 吸入によって増加した。総 IgG1 レベルは変化せず、OVA 特異的 IgG1 レベルは増加した。OVA 特異的 IgE の産生は(-)MKN の投与によって僅かに抑制傾向が見られたものの、PBS 投与 (対照) との間に統計的有意差はなく、総 IgE、総 IgG1 および OVA 特異的 IgG1 の産生は不変であった。

(-)maackiain の腹腔内投与によって、BALF 中への好酸球浸潤の減少を認めなかった。BALF 中のサイトカインのうち、統計的有意差はないものの、アレルギー疾患における炎症に関連するサイトカインである IL-4 ($p=0.34$)、IL-5 ($p=0.16$)、IL-6 ($p=0.14$)、IL-13 ($p=0.20$) についての減少傾向を認めた。さらに、他のサイトカイン、ケモカインについて検討したところ、統計的有意差はないものの、IL-18 ($p=0.08$)、IL-2 ($p=0.20$)、IL-17 ($p=0.13$)、RANTES/CCL5 ($p=0.12$) についての減少傾向を認め、KC/CXCL1 については統計的に有意な減少を認めた ($p=0.04$)。一方で、BALF 中の IP-10、TNF、TARC、IL-25 濃度レベルに変化は認められなかった。

9. papain 吸入 C57BL/6N マウスにおける各種サイトカインの変動

C57BL/6N マウスに papain を吸入させることによって、7日後を最大とする BALF 中への好酸球優位の炎症細胞の増加が認められた。一方で BALB/cA マウスでは papain の吸入を行っても好酸球性の気道炎症は認められず、マクロファージの微増のみが認められた。

ヒト大規模 GWAS で再現性の高い喘息関連遺伝子である IL-33 の BALF 中での上昇を認めなかったため、papain 吸入後のより

早い時間帯でのサンプリングを行った。その結果、IL-33 の産生は papain 吸入後 6H を最大とする一過性のピークを特徴とすることが判明した。IL-33 と同様に IL-5、IL-6、G-CSF、IL-25、CXCL1/KC も papain 吸入後 6H をピークとする類似のパターンを有していた (パターン 1)。IL-13 は 6H と 72H にピークがあり (パターン 2)、TNF、CXCL10/IP10、CCL20/MIP-3a は papain 吸入後 6H と 7 日目にピークがある二峰性のパターンを示した (パターン 3)。IL-4 は 72H 後に単一のピークがあり、他のどの因子とも類似性がなかった (パターン 4)。7 日目に単一のピークを示すものは CCL12/MCP-5、CCL19/MIP-3b、CCL21c/Exodus-2/SLC、CCL22/MDC であった (パターン 5)。CCL17/TARC と CX3CL1/Fractalkine はそれぞれ 7 日目、6H にピークとなるものの、早期から炎症収束まで高値を示した (パターン 6 および 7)。また、papain 吸入回数により気道炎症細胞の構成が変化し、それに並行して BALF サイトカインの濃度パターンも変動していた。

10. 苦参の LPS 刺激マウス骨髄由来マクロファージの炎症性サイトカイン産生抑制活性、及び、苦参の黄色ブドウ球菌感染性皮膚炎モデルマウスの抗炎症作用

C57BL/6 マウス骨髄細胞を M-CSF (50 ng/ml) で 7 日間培養することにより分化させたマクロファージを LPS (10 ng/ml) で 12 時間刺激すると、IL-6 および TNF- α といった炎症性サイトカインの産生が認められたが、このとき、0.3 あるいは 1 mg/ml の苦参熱抽出物を LPS 刺激 1 時間前にマクロファージに添加することにより、IL-6 お

よび TNF- α 共に濃度依存的な抑制効果が認められ、1 mg/ml 濃度では両サイトカイン産生がほぼ完全に抑制された。

C57BL/6 マウス背部皮下に黄色ブドウ球菌 (1×10^8 cfu/mouse) を感染させると、感染 2 日後から徐々に皮膚炎が認められ、感染 5~7 日後にその炎症領域が最大になった。この皮膚炎モデルマウスにおいて PBS 投与群と苦参熱水抽出物投与群を比較した結果、PBS 投与群では感染 2 日後に炎症が認められる個体が多いのに対して、苦参熱水抽出物投与群では 4 日以降に発症する個体が多かった。また苦参熱水抽出物投与により炎症が抑えられる傾向が認められたが、統計学的有意差は認められなかった。

1 1. Toll-like receptor シグナルに対する (-)maackiain の抑制作用

Toll-like receptor 4 (TLR4) リガンドとして知られるグラム陰性菌由来 LPS あるいは TLR1/2 リガンドとして知られるグラム陽性菌由来リポペプチド合成産物 PAM₃CSK₄ でマクロファージを刺激すると顕著な IL-6 産生が認められたが、この産生は (-)maackiain によって濃度依存的に抑制された。一方、TLR3 および MDA5 リガンドとして知られるウイルス由来二本鎖 RNA 合成産物 polyI:C 刺激による IL-6 産生は (-)maackiain によって抑制されなかった。これらの結果は、(-)maackiain が MyD88 経路を抑制する可能性を示唆する。しかしながら LPS 刺激 30 分後に認められるマクロファージの I κ B- α の分解および MAPK のリン酸化に対しては (-)maackiain の抑制効果が弱かったことから、別の経路にも作用することが示唆された。最近、マクロファージにおいて LPS 刺激により分泌誘導されたヒスタミンがオートクライン的に TLR4 シグナルを増強させるという報告がされて

いることから、(-)maackiain は H1R のシグナル阻害を介して、サイトカイン産生を抑制する可能性が考えられた。この仮説を検証するために、抗ヒスタミン薬のクロルプロマジンあるいはロラタジンと (-)maackiain との併用試験を行った。その結果、LPS 刺激によるマクロファージの IL-6 産生は (-)maackiain、クロルプロマジン、ロラタジン単独で各々 60%、25%、30% 抑制し、(-)maackiain にクロルプロマジンあるいはロラタジンを併用しても 60% 以上の抑制効果は認められなかった。これらの結果から、(-)maackiain は MyD88 経路を阻害するだけでなく、H1R 経路を阻害することによって、ヒスタミンによる TLR4 炎症応答の増強作用を抑制することが示唆された。

さらに我々はヒトにおける ν の炎症抑制効果について検討を行った。LPS 刺激した PBMC からの TNF- α 産生量には個人差が認められた。予試験結果ではあるが、TNF- α 産生量の高い検体には (-)maackiain の抑制作用が認められ、TNF- α 産生量の低い検体にはその作用が認められなかった。この結果に関してはさらに検体数を増やして解析する必要がある。

1 2. 活性化マクロファージにおけるサイトカインの変動に対する抗アレルギーフラボノイドの影響

カビ細胞壁成分 β -1,3-glucan の curdlan でマクロファージを刺激すると顕著な IL-6 および TNF- α のサイトカイン産生が認められたが、これらの産生は (-)maackiain、apigenin、あるいは quercetin によって濃度依存的に抑制された。curdlan による炎症性サイトカイン産生はその受容体である dectin-1 を介すること、さらに dectin-1 はその細胞内領域で Syk と会合してその下流

の PKC δ の活性化を介して炎症シグナルを伝えることが報告されていることから、次に我々は curdlan 刺激 10~30 分後のマクロファージの PKC δ 、NF- κ B、および ERK 活性化を測定し、各フラボノイドの抑制効果を検討した。その結果、apigenin および (-)maackiain は PKC δ および ERK のリン酸化を抑制し、quercetin は PKC δ のリン酸化および NF- κ B の活性化を抑制した。

HSP90 阻害剤として既に報告されている celastrol の curdlan によるマクロファージ炎症応答に対する抑制作用についても解析した結果、celastrol も濃度依存的に curdlan による IL-6 および TNF- α 産生を抑制し、さらに NF- κ B および ERK の活性化を抑制することが判明した。

dectin-1 は β -1,3-glucan を含む菌体粒子を貪食する機能があるため、(-)maackiain、apigenin、quercetin、及び、celastrol が、その貪食作用を阻害するか否かを検討した。マクロファージは AF488 蛍光標識した zymosan (crude β -1,3-glucan) を効率良く貪食したが、いずれのフラボノイドもその貪食作用を全く抑制しなかった。以上の結果は、これらフラボノイドは Dectin-1 の炎症性サイトカイン産生は抑制するが、貪食作用は抑制しないことを示唆する。

1 3. 苦参の喘息モデルマウスの症状改善と血球に対する影響

苦参の腹腔内投与により、喘息モデルマウスの気管支肺胞洗浄液中への好酸球浸潤は著明に抑制された。一方、骨髄中の CMP、GMP、EoP 数、腹腔内肥満細胞数、末梢血の白血球分画には影響を与えなかった。次いで、*in vitro* での骨髄球系細胞分化に対する苦参の効果を検討した。苦参は、骨髄球系細胞培養条件における GMP からの顆粒

球・単球への分化、好酸球培養条件における GMP からの好酸球への分化に影響を与えなかった。一方、GMP から好酸球への分化過程にておける CCR3 の発現を、苦参は抑制した。成熟し終えた好酸球に苦参を投与しても、CCR3 の発現は抑制されないことから、苦参は好酸球への分化過程での CCR3 の発現増強を特異的に阻害する可能性が示唆された。更に、喘息モデルマウスにおける HSP90 抑制薬の影響を調べた。celastrol の腹腔内投与により、気管支肺胞洗浄液中への好酸球浸潤は著明に抑制された。一方、骨髄中の CMP、GMP、EoP 数、腹腔内肥満細胞数、末梢血の白血球分画には影響を与えなかった。

1 4. 皮膚炎モデルマウスに対する苦参の効果

Balb/c mouse 耳介に対するダニ抽出物の繰り返し塗布により、局所への炎症細胞浸潤、表皮肥厚、線維化、及び血清 IgE 値の上昇などの皮膚炎症状を認めた。苦参投与により改善傾向を認めたが、有意差を見出すことはできなかった。また、*in vitro* 皮膚炎モデルにおけるサイトカイン産生を調べた。ケラチノサイトはマウスの新生仔から準備した。ケラチノサイトの細胞数をプレート当たり 2×10^6 個から 4×10^6 個で、線維芽細胞の細胞数をプレート当たり 6×10^4 個から 2×10^6 個で検討した結果、ケラチノサイトの細胞数は 2×10^6 個が、線維芽細胞の細胞数は 2×10^5 個が最も適切にケラチノサイトの増殖・分化を誘導させる条件であることがわかった。また、この際にケラチノサイトから TSLP、TNF、GM-CSF、IL-1 α などの炎症性サイトカインの産生を

D. 考察

疾患感受性遺伝子の発現亢進抑制薬は新規アレルギー疾患治療薬として期待される。H1R 刺激は遺伝子発現亢進を介して H1R 発現量を増加させること、及び、花粉症患者の鼻過敏症症状スコアと鼻粘膜 H1R mRNA レベルが相関することから H1R 遺伝子はアレルギー疾患感受性遺伝子であると考えられる (図 2)。

更に、鼻粘膜 H1R mRNA に加えて、HDC mRNA、及び、IL-5 mRNA と鼻過敏症症状スコアとの相関性を証明した。H1R mRNA、HDC mRNA、及び、IL-5 mRNA はそれぞれ間で、非常に高い相関性を示した (図 3)。以上の結果は、H1R 遺伝子、HDC 遺伝子、及び、IL-5 遺伝子が疾患感受性遺伝子群を形成することを示唆する。花粉症患者鼻粘膜の IL-4 mRNA は測定できなかった。採取した鼻粘膜サンプルの中には IL-4 産生細胞が含まれなかった可能性が考えられる。しかし、鼻過敏症モデルラットにおいて、H1R mRNA と IL-4 mRNA は非常に高い相関性を示すことから、IL-4 遺伝子も同じ疾患感受性遺伝子群に属することが考えられる。HDC 遺伝子、IL-4 遺伝子、及び、IL-5 遺伝子の発現機構は十分に解析されていないが、H1R シグナルによる調節機構は興味深い。一方、近年アレルギー疾患に関与することが示されている IL-33 の mRNA レベルは花粉症患者の症状スコアと相関が見られず、H1R mRNA レベルとも相関しなかった。IL-33 遺伝子発現と相関する症状は、H1R 遺伝子とはアレルギー疾患に対して異なる病理機構に属することが考えられる。

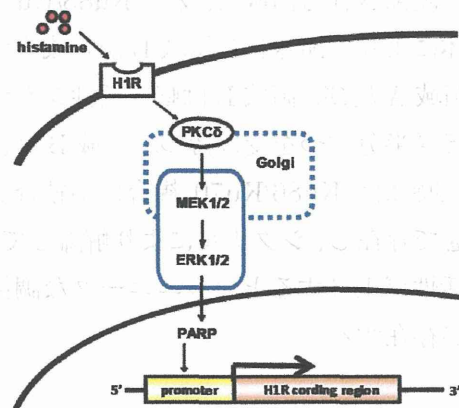


図 5. H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構 (1)

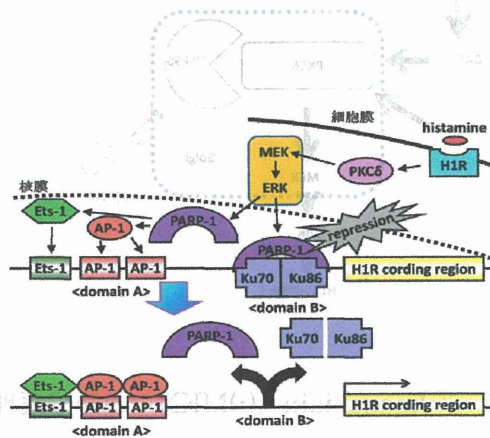


図 6. H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構 (2)

H1R 刺激による H1R 遺伝子発現亢進機構において、H1R 刺激によりリン酸化とゴルジ体への移行が引き起こされた PKCδ は、MEK、ERK、PARP にシグナルを伝達し、H1R 遺伝子発現を亢進させることが明らかとなった (図 5)。

更に、H1R 遺伝子プロモーターにおける転写調節機構を明らかにした (図 6)。そし

て、2ヶ所の AP-1、及び、1ヶ所の Ets-1 により調節される領域 A、及び、Ku86/Ku70 複合体により調節される領域 B から成立する。領域 A 及び、領域 B は転写活性シグナルのほぼ半分ずつを受け持つ。領域 B は、非刺激時には Ku86/Ku70 複合体が結合した状態で存在し、シグナルにより解離して、転写活性が上昇するというユニークな調節機構が存在する。

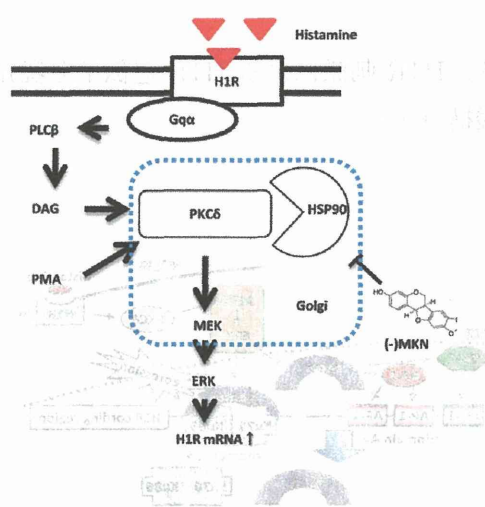


図 7. (-)maackiain ((-)MKN) の分子薬理機構

抗アレルギー作用の伝承を持つ天然物は多数存在するが、科学的検証がなされていない。抗アレルギー性漢薬の苦参の抽出液は H1R mRNA の増加に対する強力な抑制作用を持ち、有効成分が(-)maackiain (図 4) であることが明らかになった。(-)maackiain は、PKCδ の活性化を抑制することが明らかとなった。

更に、(-)maackiain の標的分子として、HSP90 の同定に成功した。HSP90 は PKCδ

と複合体を形成することが知られている。(-)maackiain は HSP90 と結合することにより PKCδ・HSP90 複合体を解離させ、複合体のゴルジ体移行を阻害すると考えられる (図 7)。(-)maackiain に加えて、フラボノイドの apigenin、及び、quercetin も鼻過敏症モデルラットの症状改善作用と H1R mRNA 上昇抑制作用を持ち、HSP90 を標的分子とすることが明らかとなった。更に、HSP90 の抑制薬、17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG) が、HeLa 細胞における H1R 遺伝子発現亢進を抑制すること、及び、もうひとつの HSP90 の抑制薬、celastrol、が鼻過敏症モデルラットの症状改善と鼻粘膜 H1R 遺伝子発現亢進を抑制することから、HSP90 はアレルギー疾患において重要な機構を持つことが示唆される。また、HSP90 は糖質コルチコイド受容体と複合体を形成することが知られており、アレルギー炎症の調節機能についても非常に興味深い。

HeLa 細胞における H1R 遺伝子発現亢進、鼻過敏症モデルラットの症状改善、及び、鼻粘膜 H1R mRNA 上昇に対する天然物由来 PKCδ 抑制薬、及び、HSP90 抑制薬による抑制プロフィールは、抗ヒスタミン薬による抑制プロフィールと類似した。以上の結果から、抗ヒスタミン薬の薬効発現機構は、H1R 遺伝子発現亢進の抑制により引き起こされることが考えられる。

花粉症患者において、鼻粘膜 H1R mRNA レベルが低いにも関わらず症状の改善が見られないケースがあり、また、鼻過敏症モデルラットの症状スコアが H1R mRNA レベルをコントロールラットのレベルにまで低

花粉症患者において、鼻粘膜 H1R mRNA レベルが低いにも関わらず症状の改善が見られないケースがあり、また、鼻過敏症モデルラットの症状スコアが H1R mRNA レベルをコントロールラットのレベルにまで低下させても症状スコアは 40%までしか低下しなかった。そこで、鼻過敏症モデルラットに抗ヒスタミン薬と併用投与することにより症状を高度に改善できる天然物の検索を行い、天然物 A、及び、天然物 B の発見に成功した。これらの天然物 A は、細胞内シグナル D の抑制を介して、疾患感受性遺伝子 C の発現亢進を抑制した。更に、天然物 A の有効成分 E の同定にも成功した（特許出願準備中）。有効成分 E は新規アレルギー疾患治療薬シーズとしての可能性を持ち、有効成分 E の標的分子は創薬ターゲットとして期待できる。そして、抗ヒスタミン薬、或いは、PKC δ シグナル抑制薬と細胞内シグナル D 抑制薬の併用投与による鼻過敏症治療戦略は、本疾患を高度に改善できる可能性が考えられる。

苦参抽出物が肺組織における IL-4 の産生を抑制し、気道過敏性、気道炎症を抑制するという本年度の研究成果は、福井らが報告したアレルギー性鼻炎ラットモデルの結果と一致する。IFN- γ 、IL-17、IL-10 の発現や産生が苦参抽出物の投与によって変化しなかったことから、苦参抽出物はヘルパー T 細胞のバランスの偏向に影響を及ぼすのではなく、2 型ヘルパー T 細胞の分化や機能を選択的に抑制すると考えられる。

(-)maackiain が肺組織における IL-4 などアレルギー疾患に関連するサイトカインおよびケモカインの産生を抑制する傾向にあ

るという本年度の研究成果は、福井らが報告したアレルギー性鼻炎ラットモデルの結果および昨年度の本分担研究結果と一致する。また、(-)maackiain の投与によって IL-4 のみならず、多くのアレルギー疾患の炎症に関連するサイトカイン、ケモカインが減少傾向にあることから、2 型ヘルパー T 細胞の分化や機能の抑制だけではなく、気道構成細胞やマクロファージなどにも (-)maackiain は作用しうると考えられる。

自然免疫型アレルギー気道炎症モデルの BALF におけるサイトカイン・ケモカイン動態が明らかになった。このモデルは著しい系統差があったことから、遺伝背景に原因があると考えられる。papain 吸入後の BALF におけるサイトカイン・ケモカイン発現パターンは、7 つに分類可能であった。中でも喘息関連遺伝子である IL-33 を初め、好酸球機能と関連の深い IL-5、杯細胞過形成を誘導する IL-13、喘息病態モデルや GWAS による喘息関連遺伝子 IL-6、上皮由来のサイトカイン IL-25 が papain 吸入後、類似パターンで短時間での誘導が起きることから、気道におけるこれらの早期の誘導が喘息病態に重要であると考えられた。IL-13 が papain 吸入後 6 時間と 72 時間の二峰性パターンを示したことや、papain 吸入後 72 時間で BALF 中の IL-4 が初めて上昇することが観察された。これらは papain 吸入後の肺への IL-4、IL-13 産生細胞の流入が示唆し、アレルギー性炎症の一次免疫応答に関連する現象と考えた場合、感染時の一次免疫応答との異同を検討する上で大変興味深い。Th2 細胞誘導ケモカインとされる CCL17/TARC、CCL22/MDC の連続的な高値、その他のケモカインが 7 日目をピ

ークとすることなどが判明し、機能的示唆に富むモデルである。

papain は本研究で明らかにした自然免疫系による炎症だけではなく、獲得免疫系も駆動する（特異的 IgE 産生に至る）ことが報告される（私信）。これら各種因子の動態を総合すると、本モデルは喘息成立の自然史をある程度反映すると考えられることに加え、天然物由来成分の機能評価や喘息メカニズムの研究に良いモデルとなることが示唆される。

苦参熱水抽出物、及び、苦参の有効成分、(-)**maackiain** が C57BL/6 マウス骨髄マクロファージの TLR 刺激による IL-6 および TNF- α 産生を抑制することが明らかとなった。この抑制機構の一部は、本研究班代表者（福井）らによって見出された H1R シグナル抑制作用に依存することが判明した。ヒトにおいては、LPS 刺激した PBMC からの TNF- α 産生量ならびに(-)**maackiain** の抑制効果について個人差が認められたが、これはヒスタミン産生量の個人差に起因するかも知れない。今後、菌体成分誘導性ヒスタミンの炎症増強作用および(-)**maackiain** の炎症抑制作用の関連についてより詳細に解析する必要がある。

本研究から、新規 HSP90 抑制フラボノイドの(-)**maackiainn**、**apigenin**、及び、**quercetin** が β -1,3-glucan 刺激マクロファージの炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。 β -1,3-glucan はカビの細胞壁成分であり、マクロファージ受容体の **dectin-1** のリガンドである。カビは喘息のアレルゲンの一つでもあり、カビアレルギーの発症メカニズムは長い間不明で

あった。最近になって β -1,3-glucan の **dectin-1** 刺激による炎症性サイトカイン産生が、カビアレルギーの引き金となることが報告されたため、そのシグナルを抑えることは、その治療を考える上で極めて重要である。しかしながら菌体の貪食を担う **dectin-1** の細胞内シグナルを全て抑えてしまうと、病原体の排除に異常をきたし、アレルギーを増悪させてしまう危険性も考えられる。特筆すべき本研究成果は、(-)**maackiainn**、**apigenin**、及び、**quercetin** のいずれのフラボノイドも **dectin-1**/Syk の下流に位置する PKC δ の活性化を抑制するが、貪食シグナルは全く抑制しないことである。これらのことから、(-)**maackiainn**、**apigenin**、及び、**quercetin** は病原体の排除機構には影響を与えることなく、炎症のみを選択的に抑え、カビアレルギーの新たな治療薬として期待できる。

苦参の投与にて、喘息モデルマウスでの肺の好酸球性炎症は抑制されることが示唆された。苦参投与は GMP, EoP, 末梢血好酸球への分化に影響を与えないことから、苦参は、炎症局所への EoP・成熟好酸球の遊走や、局所での EoP・成熟好酸球の分化・生存・増殖に影響を与えている可能背が考えられた。*in vitro* 骨髄球系細胞分化に対する苦参の効果について検討したところ、苦参の投与により、GMP から成熟好酸球への分化過程における CCR3 発現が特異的に抑制された。喘息モデルマウスにおける抗炎症作用は、末梢の炎症局所への好酸球の遊走阻止により発揮されている可能性が示唆された。喘息モデルマウスについて、**celastrol** の投与にて、喘息モデルマウスで