

—平成17年度 岐阜薬科大学特別研究費（一般）—

PGD₂による肥満細胞活性化亢進機構の解析

田中宏幸

1. 緒言

プロスタグランジン(PGs)は、生体の恒常性維持に重要なオートコイドであり、局所で産生・代謝されるローカルホルモンとして機能しているが、産生量が微量で、かつ、速やかに代謝されるため、これまでその役割を解明することは困難であった。また、各PGsの受容体に対する選択的な拮抗薬が創製されていなかったことも、各々のPGsあるいは受容体の病態生理学的意義の解明が進まなかった理由であると思われる。

近年、これらPGsの受容体欠損マウスが作製され、生体の恒常性ならびに病態形成における意義が明らかになりつつある。申請者らも、これらPGs受容体欠損マウスを用いて、特にアレルギーおよび喘息におけるPGsの役割を検討してきた¹⁻⁴⁾。すなわち、PGD₂の受容体であるDP1受容体欠損マウスを用いて、アレルギー性気道炎症ならびに気道過敏性におけるPGD₂の役割を検討した¹⁾。その結果、PGD₂は主として気道上皮細胞上のDP1受容体を介し、アレルギー性気道炎症ならびに気道過敏性に関与していることが明らかとなった。一方、PGI₂がIP受容体を介し^{2,3)}、PGE₂がEP3受容体を介し⁴⁾、それぞれアレルギー性炎症の制御に重要な役割を有することも明らかにした。また、獲得免疫反応の開始に重要な樹状細胞とT細胞との相互作用に関しては、TXA₂の意義をその受容体であるTP受容体欠損マウスを用いて明らかにした⁵⁾。このように、これまで個々の役割については不明であったPGsについても、受容体欠損マウスなどの実験ツールを用いることにより明らかにすることができるようになりつつある。

しかし、アレルギー疾患は周知のように多因子疾患であり、炎症局所では種々のアミン・脂質メディエーター・サイトカインが産生され、これらの機能分子間の相互作用も病態形成に重要である。特に、IgE依存性の肥満細胞の活性化は、種々の機能分子の遊離・産生はもとより、アレルギー疾患の病態を考える上で中心的な反応であり、患者のQOLの低下とも密接に関連していることが知られている。

そこで本研究では、上述のPGD₂のアレルギー性炎症における役割をさらに詳細に検討する目的で、IgE依存性に

肥満細胞から産生されたPGD₂のオートクライン作用による影響を検討した。すなわち、マウス骨髄由来培養肥満細胞からのIgE依存性ヒスタミン遊離に及ぼすPGD₂の意義を検討した。

2. 実験方法

雌性DP1(プロスタグランジンD₂受容体サブタイプ1)KOマウスならびにFP(プロスタグランジンF₂受容体サブタイプ)KOマウスは京都大学の成宮周教授より、DP2(プロスタグランジンD₂受容体サブタイプ2:CRTH2)KOマウスは東京医科歯科大学の中村正孝先生よりそれぞれ譲渡していただき、6-9週令のマウスを実験に用いた。

マウス骨髄由来培養肥満細胞(BMMC)の培養はKobayashi et alの方法⁶⁾に従って行った。得られたBMMCに体積の1/10量のMMCEを添加し、一晚受動感作した。感作後、数回Tyrode液で洗浄し、2 x 10⁶ cells/mlの濃度で培地に浮遊させ、5分間のプレインキュベーションの後、種々の濃度の薬物を添加し、さらに10分後に抗原として30ng/mlのDNP37.5-BSAを添加し、反応を惹起した。反応惹起30分後、氷冷にて反応を停止させ、上清を回収した。

BMMC中の総ヒスタミン含量は、12%過塩素酸を添加し、ヒスタミンを抽出した。ヒスタミン量は、high performance liquid chromatographyにて定量した。それぞれの検体で遊離されるヒスタミンは、総ヒスタミン含量に対する遊離率として計算した。

3. 実験成績

DP1 KOマウス由来BMMCにおけるヒスタミン遊離:

Wild-typeならびにDP1 KO両マウス由来BMMCにおいて、抗原刺激によるヒスタミン遊離が観察されたが、両マウス間に差は認められなかった(Fig. 1)。一方、PGD₂添加群では、wild-typeならびにDP1 KO両マウス由来BMMCにおいて、抗原単独刺激群に比しヒスタミン遊離の用量依存かつ有意な亢進が認められたが、両マウス間で差は認められなかった(Fig. 1)。

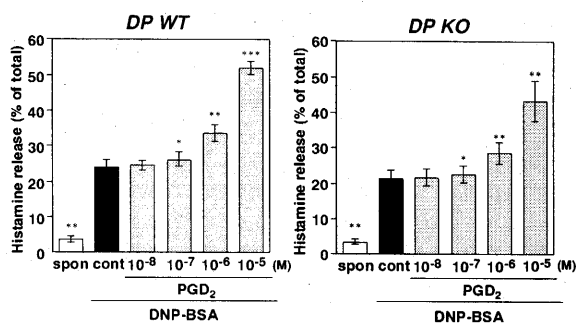


Fig. 1 Effect of PGD₂ on antigen-induced histamine release from bone marrow-derived mast cells in DP1 (DP) deficient mice. Results were represented as the means \pm SEM of 4 mice. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 (vs cont)

DP2 KO マウス由来 BMMC におけるヒスタミン遊離:

Wild-type ならびに DP2 KO 両マウス由来 BMMC において、抗原刺激によるヒスタミン遊離が観察されたが、両マウス間に差は認められなかった (Fig. 2)。一方、PGD₂ 添加群では、wild-type ならびに DP2 KO 両マウス由来 BMMC において、抗原単独刺激群に比しヒスタミン遊離の用量依存的かつ有意な亢進が認められたが、両マウス間で差は認められなかった (Fig. 2)。

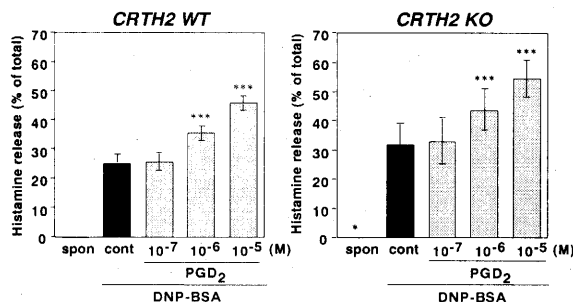


Fig. 2 Effect of PGD₂ on antigen-induced histamine release from bone marrow-derived mast cells in DP2 (CRTH2) deficient mice. Results were represented as the means \pm SEM of 4 or 5 mice. * p <0.05, *** p <0.001 (vs cont)

FP KO マウス由来 BMMC におけるヒスタミン遊離:

Wild-type ならびに FP KO 両マウス由来 BMMC において、抗原刺激によるヒスタミン遊離が観察されたが、両マウス間に差は認められなかった (Fig. 3)。一方、PGD₂ 添加群では、wild-type ならびに FP KO 両マウス由来 BMMC において、抗原単独刺激群に比しヒスタミン遊離の用量依存的かつ有意な亢進が認められたが、両マウス間で差は認められなかった (Fig. 3)。

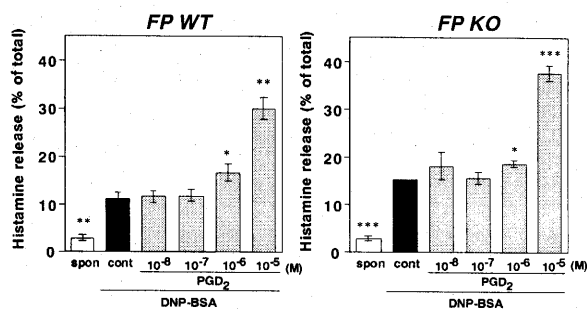


Fig. 3 Effect of PGD₂ on antigen-induced histamine release from bone marrow-derived mast cells in FP deficient mice. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 (vs cont)

4. 考察

アレルギー性炎症時には、抗原曝露により IgE 依存性に肥満細胞から大量のヒスタミンが放出され、また、刺激後、PGD₂ が産生されることが知られている。本研究では、アレルギー性炎症局所で産生された PGD₂ の肥満細胞に対するオートクライン作用を検討する目的で、PGD₂ 添加による IgE 依存性ヒスタミン遊離に及ぼす影響を検討した。その結果、PGD₂ の前処置により肥満細胞からの IgE 依存性ヒスタミン遊離が著明に亢進することを見出した。また、このヒスタミン遊離亢進作用は、DP1、DP2、あるいは交差反応性を示すことが知られている FP 受容体のそれぞれの欠損マウスから確立した培養肥満細胞においても認められることから、これらの受容体非依存的に生ずることを見出した。この成績は、抗原刺激により IgE 依存性にアレルギー性炎症局所で産生された PGD₂ が、肥満細胞上の DP1、DP2 あるいは FP 受容体以外の受容体を介しヒスタミン遊離を亢進し、アトピー型喘息・鼻炎ならびにアトピー性皮膚炎の症状増悪に関与している可能性を示すものであり、アレルギー患者の QOL の向上ならびに治療戦略・新規治療薬のターゲットを考える上で、非常に重要な知見であると思われる。今後、その機序はもとより、肥満細胞上のこれら受容体の発現変動ならびに IgE 依存性に産生されるロイコトリエンあるいはサイトカイン産生に及ぼす PGD₂ の影響も併せて検討する必要があると思われる。

5. 引用文献

- 1) T. Matsuoka, M. Hirata, H. Tanaka, et al. *Science*, **287**, 2013 (2000).
- 2) Y. Takahashi, S. Tokuoka, T. Masuda, et al. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 315 (2002).
- 3) K. Nagao, H. Tanaka, M. Komai, et al. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **29**, 314 (2003).
- 4) T. Kunikata, H. Yamane, E. Segi, et al., *Nat. Immunol.*, **6**, 524 (2005).
- 5) K. Kabashima, T. Murata, H. Tanaka, et al. *Nat. Immunol.*, **4**, 694 (2003).
- 6) T. Kobayashi, T. Miura, T. Haba, et al. *J. Immunol.*, **164**, 3855 (2000).