

プロスタノイド DP 受容体拮抗薬  
に関する免疫薬理学的研究

2013 年

平野 洋介

## 目次

緒言	1
第1章 プロスタノイド DP 受容体拮抗薬 S-5751 および pinagladin の 受容体選択性に関する検討	4
1. 緒言	4
2. 実験材料および方法	5
2.1 薬物および試薬	5
2.2 各種ヒトプロスタノイド受容体安定発現株の樹立	5
2.3 ボランティア採血	6
2.4 血小板の単離	6
2.5 細胞膜画分の調整	6
2.6 ヒト血小板および各種ヒトプロスタノイド受容体安定発現株を用いた cAMP 上昇阻害実験	6
2.7 各種ヒトプロスタノイド受容体安定発現株を用いた Ca <sup>2+</sup> 流入阻害実験	7
2.8 ヒト血小板および各種ヒトプロスタノイド受容体安定発現株の細胞膜画分 を用いた受容体結合阻害実験	7
3. 実験成績	9
3.1 S-5751 の各種プロスタノイド受容体に対する選択性	9
3.2 Pinagladin の各種プロスタノイド受容体に対する選択性	10
4. 考察	11

第2章 モルモットのケミカルメディエーター誘発鼻閉に及ぼす プロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響	12
1. 緒言	12
2. 実験材料および方法	14
2.1 薬物および試薬	14
2.2 実験動物	14
2.3 実験方法	14
2.3.1 動物の感作および反応惹起	14
2.3.2 鼻腔抵抗の測定	15
2.3.3 統計解析	15
3. 実験成績	16
3.1 PGD <sub>2</sub> による鼻腔抵抗の上昇とプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用	16
3.2 Histamine およびプロスタノイド TP 受容体刺激薬による鼻腔抵抗の上昇と プロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用	17
3.3 PGD <sub>2</sub> による histamine およびプロスタノイド TP 受容体刺激薬誘発鼻腔抵抗の 増強作用とプロスタノイド DP 受容体の関与	20
4. 考察	22
第3章 ヒツジ実験的喘息モデルにおけるプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響	25
1. 緒言	25
2. 実験材料および方法	27
2.1 薬物および試薬	27
2.2 実験動物	27

2.3	実験方法	27
2.3.1	肺抵抗 (mean pulmonary flow resistance : $R_L$ ) の測定	27
2.3.2	抗原および気道刺激因子の吸入方法	28
2.3.3	Carbachol に対する気道反応性の測定	28
2.3.4	気管支肺胞洗浄液 (BALF) の回収と細胞分類法	28
2.3.5	実験プロトコール	29
2.3.6	LTD <sub>4</sub> 誘発気道反応モデル	31
2.3.7	統計解析	31
3.	実験成績	32
3.1	気道反応における S-5751 の作用	32
3.2	抗原誘発炎症性細胞浸潤に及ぼす S-5751 の作用	34
3.3	LTD <sub>4</sub> 誘発気道収縮反応に対する S-5751 の作用	36
4.	考察	37
第 4 章	ラット抗原誘発気道過敏性ならびに気道炎症モデルにおける プロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響	40
1.	緒言	40
2.	実験材料および方法	41
2.1	薬物および試薬	41
2.2	実験動物	41
2.3	実験方法	41
2.3.1	動物の感作および反応惹起	41
2.3.2	薬物の投与	42
2.3.3	Acetylcholine に対する気道反応性の測定	42

2.3.4	気管支肺胞洗浄液 (BALF) の回収と細胞分類法	43
2.3.5	BALF 中の mucin 量の測定	43
2.3.6	Real-time 定量 PCR による肺組織中サイトカインおよびケモカイン mRNA の測定	44
2.3.7	組織標本の作製	44
2.3.8	In situ hybridization (ISH)	45
2.3.9	ヒト肺組織の免疫組織染色	45
2.3.10	統計解析	46
3.	実験成績	47
3.1	Acetylcholine に対する気道過敏性に対するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用	47
3.2	抗原誘発炎症性細胞浸潤に対するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用	48
3.3	気道における粘液分泌に対するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用	50
3.4	抗原暴露による肺のサイトカインおよびケモカイン mRNA 発現亢進に対する DP 受容体拮抗薬の作用	51
3.5	ラットの肺におけるプロスタノイド DP 受容体の発現解析	53
3.6	喘息患者の肺におけるプロスタノイド DP 受容体の発現解析	55
4.	考察	56
第 5 章 PGD <sub>2</sub> によるヒト単球系細胞株 THP-1 細胞からのメディエーター		
	産生増強作用に対するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響	59
1.	緒言	59
2.	実験材料および方法	60
2.1	薬物および試薬	60

2.2	細胞培養	60
2.3	実験方法	60
2.3.1	細胞の調整と刺激	60
2.3.2	THP-1 細胞のプロスタノイド DP 受容体を介した cAMP シグナル解析	61
2.3.3	RT-PCR による THP-1 におけるプロスタノイド DP 受容体の発現検討	61
2.3.4	プロテインアレイによる THP-1 細胞からのサイトカインおよびケモカイン 産生の網羅的解析	62
2.3.5	ELISA による MCP-1 および IL-8 測定	62
2.3.6	統計解析	62
3.	実験成績	63
3.1	THP-1 細胞におけるプロスタノイド DP 受容体の発現および機能解析	63
3.2	THP-1 細胞からのサイトカインおよびケモカイン産生における プロスタノイド DP 受容体の関与	65
3.3	PGD <sub>2</sub> による TNF- $\alpha$ 誘導 MCP-1 産生増強におけるプロスタノイド DP 受容体の 関与	67
3.4	プロスタノイド DP 受容体を介した MCP-1 産生増強作用における cAMP および protein kinase A (PKA) シグナル経路の関与	69
3.5	PGD <sub>2</sub> による TNF- $\alpha$ 誘導 IL-8 産生の増強作用におけるプロスタノイド DP 受容体活性化シグナルの関与	71
4.	考察	73
	総括および結論	77
	謝辞	81

参考文献 82

略語一覽 94

## 緒言

炎症や免疫に関与する細胞に刺激が加わると、細胞膜や核膜の構成脂質に活性化ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) が作用して種々の不飽和脂肪酸が産生される。その 1 つであるアラキドン酸は、さらに酵素的に代謝を受け、プロスタグランジン (PG) とロイコトリエン (LT) に代表される様々な生理活性脂質 (エイコサノイド) に変換される。これらのエイコサノイドは、細胞の分化・増殖、血圧調節、炎症、免疫、神経機能の調節など、生体内で様々な生理活性を示すことが知られている<sup>1-3)</sup>。エイコサノイドのうち、プロスタノイドの 1 種であるプロスタグランジン D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) は、アラキドン酸がシクロオキシゲナーゼによって PGH<sub>2</sub> に変換され、さらに PGD 合成酵素の作用によって産生される<sup>4)</sup>。PGD 合成酵素には、主に脳に存在するリポカリン型 (L-PGDS) と末梢の炎症細胞に存在する造血器型 (H-PGDS) の 2 種類が報告されている<sup>5)</sup>。肥満細胞に存在する PGD 合成酵素は造血器型であり、マスト細胞以外に一部の Th2 細胞<sup>6)</sup> や樹状細胞<sup>7)</sup> などのアレルギーに関与する細胞に発現がみられる。

PGD<sub>2</sub> は主に活性化された肥満細胞から主要なメディエーターの 1 つとして大量に分泌されるが<sup>8)</sup>、その他、樹状細胞、マクロファージ、好酸球、Th2 細胞および内皮細胞からも産生される<sup>9-15)</sup>。また、アレルギー性鼻炎、気管支喘息、アレルギー性結膜炎およびアトピー性皮膚炎の患者にアレルゲンを負荷すると、負荷後早期に、それぞれ、鼻腔洗浄液、気管支肺胞洗浄液、涙液およびスキッチャンバー液中に PGD<sub>2</sub> 量の増加が観察される<sup>16-19)</sup>。さらに、古くから PGD<sub>2</sub> は、結膜や皮膚における血管透過性亢進、結膜や気道への好酸球浸潤、気道狭窄など、様々な炎症反応を誘導することが知られており、アレルギー疾患の病態形成に関与することが示唆されている<sup>20-25)</sup>。

PGD<sub>2</sub> は 2 種類の異なった機能的受容体であるプロスタノイド DP 受容体と chemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2) に結合することが報告されている<sup>26)</sup>。プロスタノイド DP 受容体は 7 回膜貫通型、ロドプシンタイプの Gs タンパク共役型受容体であり、受容体刺激によってアデニル酸シクラーゼが活性化され、cAMP レベル増加に伴っ



てプロテインキナーゼ A(PKA)が活性化、続いて様々な細胞内シグナル経路が活性化される<sup>27,28)</sup>。一方、CRTH2は7回膜貫通型のGiタンパク共役型受容体であり、アデニル酸シクラーゼの活性化を抑制することによってcAMPの増加を抑制すると共に、細胞内Ca<sup>2+</sup>の増加を誘導することが知られている<sup>29)</sup>。

これらの受容体に関連し、PGD<sub>2</sub>はCRTH2を介し、アレルギー反応に対して促進的に作用することが報告されている<sup>30)</sup>のに対し、プロスタノイドDP受容体を介した作用には、抗炎症と炎症誘発の両者の報告がある。すなわち、抗炎症作用として、PGD<sub>2</sub>はプロスタノイドDP受容体を介して好中球、好塩基球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、Th1細胞およびナチュラルキラー細胞の機能を阻害することが報告されている<sup>31-37)</sup>。喘息モデルマウスに選択的プロスタノイドDP受容体作動薬を吸入させると肺の樹状細胞に対して負の制御が働き、regulatory T cellが誘導されて喘息様の症状が抑制される<sup>38)</sup>。さらに、選択的プロスタノイドDP受容体作動薬はアトピー性皮膚炎モデルマウスの引っ掻き行動を阻害する<sup>39)</sup>。一方、プロスタノイドDP受容体欠損マウスでは、抗原誘発気道過敏性、リンパ球および好酸球浸潤、および気道におけるTh2サイトカイン産生が減弱することから、本受容体は喘息に対して促進的に作用することが報告されている<sup>40)</sup>。さらに、細胞レベルにおいては、PGD<sub>2</sub>がプロスタノイドDP受容体を介して好酸球の生存延長を誘導すること<sup>41)</sup>、樹状細胞を活性化して間接的にTh2細胞への分化を誘導すること<sup>42)</sup>が知られている。以上のように、プロスタノイドDP受容体のアレルギー炎症における役割は明確ではない。

S-5751 (Fig. 1A) および pinagladin (Fig. 1B) は塩野義製薬(株)で創製された経口投与可能なプロスタノイドDP受容体拮抗薬であり<sup>43)</sup>、アレルギー疾患におけるプロスタノイドDP受容体の役割を検討するために有用なツールである。これまでに、S-5751がモルモットの抗原誘発即時型および遅発型鼻炎反応、結膜における抗原誘発血管透過性亢進、抗原誘発気道炎症を有意に抑制し<sup>44)</sup>、pinagladinもまた、モルモットの抗原誘発即時型鼻炎反応を有意に抑制することが明らかとなっている<sup>43)</sup>。これらの結果は、プロスタノイドDP受容体がアレルギー疾患において炎症促進的に作用することを示している。

本研究では、種々の呼吸器アレルギーモデルにおける S-5751 および pinagladin の免疫薬理学的作用についてさらなる検討を行うと共に、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬のアレルギー疾患における炎症抑制メカニズムについて検討した。

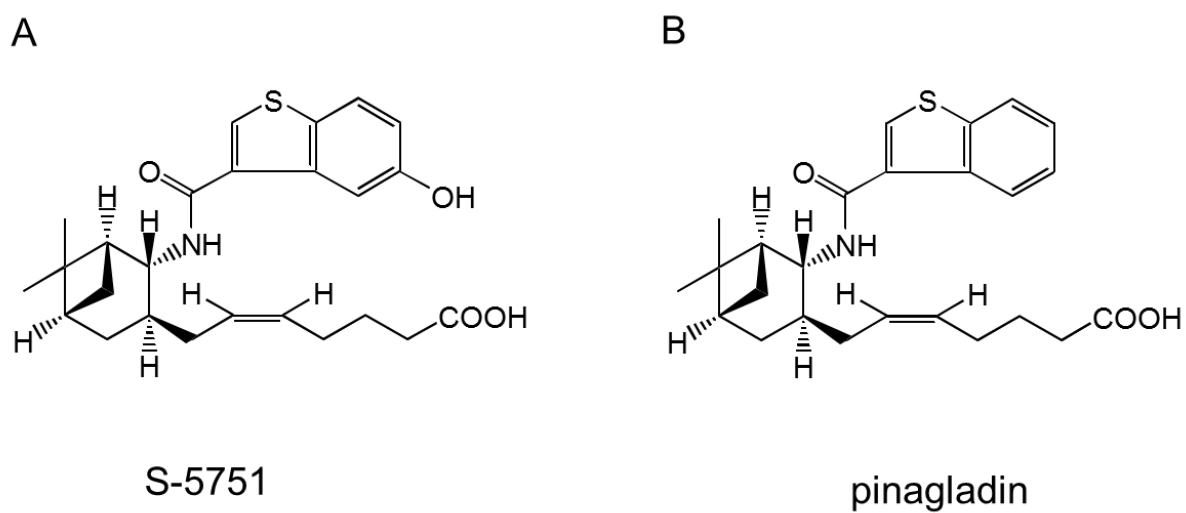


Fig. 1 Chemical structures of S-5751 and pinagladin

## 第1章 プロスタノイド DP 受容体拮抗薬 S-5751 および pinagladin の受容体選択性に関する検討

### 1. 緒言

S-5751 および pinagladin は、塩野義製薬（株）で創製された強力なプロスタノイド DP 受容体拮抗薬である。これまでにプロスタノイド TP 受容体 (thromboxane(TX)A<sub>2</sub> 受容体)、プロスタノイド IP 受容体 (プロスタグランジン I<sub>2</sub> 受容体) およびプロスタノイド EP2 受容体 (プロスタグランジン E<sub>2</sub> 受容体 EP2 サブタイプ) に対する作用を検討し、両化合物がプロスタノイド DP 受容体に対して高い選択性を有することを報告している<sup>43,44)</sup>。しかしながら、S-5751 および pinagladin のプロスタノイド FP 受容体(プロスタグランジン F<sub>2</sub>α 受容体)、プロスタノイド EP1、EP3 および EP4 受容体 (プロスタグランジン E<sub>2</sub> 受容体 EP1、EP3 および EP4 サブタイプ)、CRTH2 に対する結合活性は検討されていない。プロスタノイドは、それぞれの対応するプロスタノイド受容体に最も高い選択性を示すものの、その受容体ファミリーに属する他のプロスタノイド受容体に対しても交差反応性を示すことが報告されている<sup>45)</sup>。そのため、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬である S-5751 および pinagladin も、他のプロスタノイド受容体に対する結合活性を示す可能性がある。本章では、種々のヒトプロスタノイド受容体安定発現株を用いて、S-5751 および pinagladin のプロスタノイド受容体に対する選択性について検討を行った。同時に、もう一つの PGD<sub>2</sub> 受容体である CRTH2 に対する結合活性についても検討を行った。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 薬物および試薬

(Z)-7-[(1R,2R,3S,5S)-2-(5-hydroxybenzothiophen-3-ylcarbonylamide)-10-norpinan-3-yl]hept-5-enoic acid ( S-5751 、 Fig. 1A ) 、 (Z)-7-[(1R,2R,3S,5S)-2-(benzothiophen-3-ylcarbonylamide)-10-norpinan-3-yl]hept-5-enoic acid (pinagladin, Fig. 1B) および<sup>[3H]</sup>(+)-S-145 (プロスタノイド TP 受容体作動薬) は、塩野義製薬 (株) において合成したものを使用した。PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>α、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) および triton X は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。<sup>[3H]</sup>-PGD<sub>2</sub>、<sup>[3H]</sup>-PGF<sub>2</sub>α および <sup>[3H]</sup>-PGE<sub>2</sub> は、Perkin Elmer Life and Analytical Science Inc. (Waltham, MA, USA) より購入した。さらに、<sup>[3H]</sup>-iloprost (プロスタノイド IP 受容体作動薬、GE Healthcare UK Limited, UK)、carbacyclin (プロスタノイド IP 受容体作動薬、Biomol International LP, Plymouth, PA, USA)、G418 硫酸塩 (ネオマイシン耐性細胞選択試薬、Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、Fluo-3/AM (蛍光イオンインディケーター、Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) および Pluronic F-127 (蛍光イオンインディケーターの細胞取り込み補助試薬、AnaSpec Inc., San Jose, CA, USA) をそれぞれ購入して使用した。

### 2.2 各種ヒトプロスタノイド受容体安定発現株の樹立

ヒトプロスタノイド EP1、EP2、EP3、EP4 および FP 受容体 cDNA を挿入した遺伝子発現ベクター (pcDNA3.1+, the UMR cDNA Resource Center, Rolla, MO, USA) は、HEK293 細胞に、ヒトプロスタノイド DP 受容体 cDNA を挿入した遺伝子発現ベクター (pcDNA3.1+) は Jurkat 細胞にそれぞれトランスフェクトした。また、ヒト CRTH2 の遺伝子発現ベクターは K562 細胞にトランスフェクトした。各種安定発現株の選択は、G418 硫酸塩 (0.5 mg/ml) の存在下、限界希釈法にて行った。

### 2.3 ボランティア採血

予め採血量の 1/10 の 3.8%クエン酸ナトリウムを添加したシリンジで、計 5 名のボランティアから採血を行った。すべての実験は、塩野義製薬研究倫理委員会の規定に準拠して実施した。

### 2.4 血小板の単離

予め採血量の 1/10 の 3.8% クエン酸ナトリウムを添加したシリンジで健常人から採血し、180 xg、10 分間室温で遠心し、上層の platelet rich plasma 層を採取した。得られた platelet rich plasma を wash buffer (100 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM trisodium citrate dehydrate, 9.9% glucose, 5.5% bovine serum albumin) で 3 回洗浄した後、血小板数をマイクロセルカウンターで計数し、終濃度が 5x10<sup>8</sup> 個/ml になるよう調整し、washed platelet として使用した。

### 2.5 細胞膜画分の調整

PRP を 2,300 rpm で 22 分間遠心して回収した血小板および PBS で洗浄された各種プロスタノイド受容体安定発現株を、氷冷したメンブレンバッファー (2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、0.25 M sucrose、0.5 mM p-amidinophenyl methansulfonyl fluoride (p-APMSF) および 1/200 aprotinin を含有する 20 mM Tris-HCl 溶液、pH7.4) に分散させ、氷冷下、超音波で処理して細胞を破碎した。3,000 rpm、10 分間、4 °C で遠心した後、上清を回収し、さらに、40,000 rpm、60 分間、4 °C で超遠心を行った。沈殿物をメンブレンバッファーで再懸濁した後、Downs ホモジナイザーで膜分画を均一化し、タンパク定量後、濃度に調整して使用した。

### 2.6 ヒト血小板および各種ヒトプロスタノイド受容体安定発現株を用いた cAMP 上昇阻害実験

Pinagladin のプロスタノイド DP、IP、EP2、EP3 および EP4 受容体に対する拮抗活性を調べるために、cAMP 上昇阻害実験を行った。すなわち、washed platelet を用いてプロスタノイド DP および IP 受容体に対する拮抗活性を確認し、受容体安定発現株を用いてプロスタノイド EP2、

EP3 および EP4 受容体に対する拮抗活性を確認した。細胞は加温後、0.5 mM の IBMX を加え、5 分後に種々の濃度の pinagladin を添加して 10 分間インキュベーションした。その後、100 nM の PGD<sub>2</sub> (washed platelet)、carbacyclin (washed platelet) あるいは PGE<sub>2</sub> (各種プロスタノイド受容体安定発現株) で 2 分間刺激した。インキュベーション終了後、直ちに 1 N HCl で反応を停止し、1.2% の Triton X で細胞を破碎した。上清を回収し、上清中の cAMP 濃度を cAMP femto 2 (Cisbio International, Codolet, France) を用いて測定した。各種プロスタノイドに対する拮抗活性は、pinagladin による cAMP の阻害曲線より算出した 50% cAMP の上昇阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) として示した。

## 2.7 各種ヒトプロスタノイド受容体安定発現株を用いた Ca<sup>2+</sup>流入阻害実験

S-5751 および pinagladin の CRTH2 に対する拮抗活性と pinagladin のプロスタノイド EP1、FP 受容体に対する拮抗活性を調べるために、Ca<sup>2+</sup>流入阻害試験を行った。すなわち、各種ヒトプロスタノイド受容体安定発現株を、4 μM Fluo-3 / AM (Dojindo Laboratories)、4% Pluronic F-127 (AnaSpec Inc.) および 1% bovine serum albumin (BSA) と 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES) および 1 mM probenecid を含有した Hanks' 溶液を混合して作製した Ca<sup>2+</sup> loading buffer で懸濁し、室温で 30 分間インキュベートした。続いて、室温で様々な濃度の S-5751 あるいは pinagladin を細胞に添加し、5 分間インキュベートした後、100 nM の PGD<sub>2</sub>、3 nM の PGE<sub>2</sub> あるいは 100 nM の PGF<sub>2α</sub> で刺激した際に放出される 480 nm の蛍光波長をハイスループットセルイメージャー (FDSS3000、Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) を用いて測定した。各種プロスタノイドに対する拮抗活性は、pinagladin による Ca<sup>2+</sup>流入の阻害曲線より算出した IC<sub>50</sub> 値として示した。

## 2.8 ヒト血小板および各種ヒトプロスタノイド受容体安定発現株の細胞膜画分を用いた受容体結合阻害実験

本章 2.4 項で示した方法で調製した細胞膜画分を 50 mM Tris-HCl buffer (pH7.4、10 mM MgCl<sub>2</sub> 含有) 中で、種々の濃度の S-5751 あるいは pinagladin の存在下あるいは非存在下に、トリチウム標識した各種プロスタノイド受容体結合リガンド (Table 1 および Table 2 に示す) を添加し、室温で 60 分間インキュベートした。インキュベート終了後、反応液をガラス繊維濾紙 (GF/C、Whatman、Maidstone、UK) を用いて濾過し、数回洗浄後、濾紙に残った放射活性を液体シンチレーションカウンター (PerkinElmer Life Science、Norwalk、CT、USA) を用いて測定した。非特異的結合を調べる目的で、過剰量 (10 $\mu$ M) の非標識体の存在下で同様にインキュベートを行った。特異的結合量は、全結合量から非特異的結合量を差し引くことよって求めた。S-5751 および pinagladin の阻害定数 (K<sub>i</sub> 値) は Cheng-Prusoff の式より算出した。

### 3. 実験成績

#### 3.1 S-5751 の各種プロスタノイド受容体に対する選択性

S-5751 による種々のプロスタノイド受容体への特異的リガンドの結合阻害活性を、ヒトプロスタノイド受容体安定発現株を用いて検討した。Table 1 に示すように、S-5751 は、 $[^3\text{H}]$ -PGD<sub>2</sub> のプロスタノイド DP 受容体への結合に対して強力な阻害作用を示し、その Ki 値は 2.4 nM であった。また、S-5751 は、プロスタノイド TP、FP、EP1、EP2、EP3 および EP4 受容体に対し、結合活性を有し、そのうち最も強い結合活性を示したのは、プロスタノイド EP4 受容体であった。その Ki 値は 90 nM であり、プロスタノイド DP 受容体に対する結合と比較すると約 1/40 と弱いものであった。CRTH2 についてはさらに細胞内カルシウムによる機能的な作用を検討したが、S-5751 は 10  $\mu\text{M}$  の高濃度においても、PGD<sub>2</sub> 刺激による CRTH2 を介した細胞質内 Ca<sup>2+</sup>流入反応を抑制しなかった（抑制率 50%未満）。

**Table 1 Receptor selectivity of S-5751 in prostanoid receptors**

Prostanoid receptor	Ligand	Species	Preparation	Assay	Ki (nM)
DP	$[^3\text{H}]$ PGD <sub>2</sub>	human	transfectant	binding	2.4
CRTH2	$[^3\text{H}]$ PGD <sub>2</sub>	human	transfectant	binding	>5,000
TP	$[^3\text{H}]$ (+)-S-145	human	transfectant	binding	320
IP	$[^3\text{H}]$ -iloprost	human	transfectant	binding	>6,800
FP	$[^3\text{H}]$ - PGE <sub>2<math>\alpha</math></sub>	human	transfectant	binding	4,700
EP1	$[^3\text{H}]$ - PGE <sub>2</sub>	human	transfectant	binding	9,300
EP2	$[^3\text{H}]$ - PGE <sub>2</sub>	human	transfectant	binding	170
EP3	$[^3\text{H}]$ - PGE <sub>2</sub>	human	transfectant	binding	2,600
EP4	$[^3\text{H}]$ - PGE <sub>2</sub>	human	transfectant	binding	90
<b>Functional antagonism</b>					<b>IC<sub>50</sub>(nM)</b>
CRTH2	PGD <sub>2</sub>	human	transfectant	Ca <sup>2+</sup>	>10,000



### 3.2 Pinagladin の各種プロスタノイド受容体に対する選択性

Pinagladin による種々のプロスタノイド受容体への特異的リガンドの結合阻害活性を、ヒト血小板およびヒトプロスタノイド受容体安定発現株を用いて検討した。Table 2 に示すように、pinagladin は  $[^3\text{H}]\text{-PGD}_2$  のプロスタノイド DP 受容体への結合に対して強力な阻害作用を示し、その  $K_i$  値は 3.7 nM であった。プロスタノイド TP 受容体への結合に対しても  $K_i$  値 380 nM と結合活性を示したが、プロスタノイド DP 受容体への結合と比較し、約 1/100 であった。さらに、pinagladin は、機能的なプロスタノイド DP 受容体に対する作用である WP での cAMP 上昇に対しても強力な阻害活性を示し、 $\text{IC}_{50}$  値は 5.6 nM であった。また、 $\text{PGE}_2$  のプロスタノイド EP3 受容体を介した cAMP 上昇作用に対して  $\text{IC}_{50}$  値 2 $\mu\text{M}$  と軽度のシグナル阻害作用を示した。一方、 $\text{PGD}_2$  の CRTH2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入反応、carbacyclin のプロスタノイド IP 受容体を介した cAMP 上昇作用、 $\text{PGF}_{2\alpha}$  のプロスタノイド FP 受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入反応、 $\text{PGE}_2$  のプロスタノイド EP1 受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入反応、 $\text{PGE}_2$  のプロスタノイド EP2 受容体を介した cAMP 上昇作用および  $\text{PGE}_2$  のプロスタノイド EP4 受容体を介した cAMP 上昇作用に対しては 10  $\mu\text{M}$  の高濃度においても十分な阻害作用を示さなかった（抑制率 50%未満）。

**Table 2 Receptor selectivity of pinagladin in prostanoid receptors**

Prostanoid receptor	Ligand	Species	Preparation	Assay	$K_i$ (nM)
DP	$[^3\text{H}]\text{PGD}_2$	human	platelet membrane	binding	3.7
TP	$[^3\text{H}](+)\text{-S-145}$	human	platelet membrane	binding	380
Functional antagonism					$\text{IC}_{50}$ (nM)
DP	$\text{PGD}_2$	human	washed platelet	cAMP	5.62
CRTH2	$\text{PGD}_2$	human	transfectant	$\text{Ca}^{2+}$	>10000
IP	carbacyclin	human	washed platelet	cAMP	>10000
FP	$\text{PGF}_{2\alpha}$	human	transfectant	$\text{Ca}^{2+}$	>10000
EP1	$\text{PGE}_2$	human	transfectant	$\text{Ca}^{2+}$	>10000
EP2	$\text{PGE}_2$	human	transfectant	cAMP	>10000
EP3	$\text{PGE}_2$	human	transfectant	cAMP	2000
EP4	$\text{PGE}_2$	human	transfectant	cAMP	>10000

#### 4. 考察

本章において、S-5751 のヒトプロスタノイド DP 受容体に対する親和性は、他のヒトプロスタノイド受容体に対する親和性と比べて約 40~3,000 倍以上強力であることが明らかとなった。また、pinagladin のヒトプロスタノイド DP 受容体に対する親和性は、他のヒトプロスタノイド受容体に対する親和性と比べて約 100~2,700 倍以上強力であることが明らかとなった。さらに、S-5751 および pinagladin は、ヒト washed platelet を PGD<sub>2</sub> 刺激した際の cAMP 上昇に対しても強い抑制作用を示した<sup>44)</sup>。これらの結果から、S-5751 および pinagladin はプロスタノイド DP 受容体に対して高い選択性を有するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬であることが明らかとなった。したがって、S-5751 および pinagladin はアレルギー疾患におけるプロスタノイド DP 受容体の役割を検討するために有用なツールと考えられる。詳細なデータは示さないが、両化合物がモルモット、ラットおよびヒツジのプロスタノイド DP 受容体に対しても同様に阻害活性を有することを確認している。

次章以降では、モルモット、ラットおよびヒツジを用いた呼吸器アレルギーモデルにおける S-5751 および pinagladin の免疫薬理学的作用について検討を行うと共に、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬のアレルギー反応抑制メカニズムについても検討した。

## 第2章 モルモットのケミカルメディエーター誘発鼻閉に及ぼすプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響

### 1. 緒言

アレルギー性鼻炎はくしゃみ、鼻漏および鼻閉を三大主徴とするアレルギー疾患であり、その罹患者数は日本をはじめ世界中で増加の一途を辿っている。その発症機構として、抗原刺激を受けた肥満細胞が遊離する様々な chemical mediator が鼻炎症状を惹起すると考えられている<sup>16,46,47)</sup>。様々な chemical mediator の中で、histamine は三大主徴をすべて再現できる<sup>48)</sup>ことから、重要な chemical mediator と考えられ、実際、histamine H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬はアレルギー性鼻炎の第一選択薬として汎用されている。しかしながら、histamine H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬はくしゃみおよび鼻漏に対しては著効を示すが、鼻閉に対してはほとんど効果を示さない<sup>49)</sup>。このことから、鼻閉の発現には histamine 以外の chemical mediator が重要な役割を演じていると考えられる。特に、PGD<sub>2</sub>、thromboxane (TXA<sub>2</sub>)、cysteinyl leukotirienes (CysLTs)、platelet activating factor (PAF)、kinin などが容積血管の拡張および鼻粘膜毛細血管の透過性亢進を引き起こし、鼻閉を惹起すると考えられる<sup>50-52)</sup>。PGD<sub>2</sub> は抗原刺激を受けたアレルギー性鼻炎患者の鼻腔洗浄液中に多量に検出される<sup>53)</sup>。また、健常人に PGD<sub>2</sub> を点鼻投与すると強い鼻閉が誘発される<sup>22)</sup>。さらに、アレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜においてプロスタノイド DP 受容体、およびもう一つの PGD<sub>2</sub> 受容体である CRTH2 の強い mRNA 発現が認められている<sup>54)</sup>。これまでに有村らは、モルモットのアレルギー性鼻炎モデルを作製し、プロスタノイド DP 受容体選択的拮抗薬である S-5751 が抗原暴露によって誘導される鼻腔抵抗の上昇をほぼ完全に抑制することを示している<sup>44)</sup>。S-5751 以外に臨床で使われたことのあるプロスタノイド DP 受容体選択的拮抗薬である MK-0524 もヒトの PGD<sub>2</sub> 誘発鼻閉症状を強く阻害することが報告されている<sup>55)</sup>。一方、CRTH2 およびプロスタノイド TP 受容体の dual antagonist である ramatroban はヒトの PGD<sub>2</sub> 誘発鼻閉症状を全く抑

制しないことが報告されている<sup>56)</sup>。これらの知見から、PGD<sub>2</sub>によって誘発される鼻閉反応にはプロスタノイド DP 受容体が強く関与することが示唆される。

しかしながら、アレルギー性鼻炎の鼻閉を PGD<sub>2</sub>とプロスタノイド DP 受容体のみで説明することは難しい。これまでの報告では、抗原誘発鼻閉モデルに対し、プロスタノイド TP 受容体拮抗薬<sup>57,58)</sup>、CysLT 受容体拮抗薬<sup>59)</sup> および histamine H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬<sup>58)</sup> は部分的ではあるが有意に鼻腔抵抗の上昇を抑制することが示されており、鼻閉反応には種々の chemical mediator が関与していると考えられる。

本章では、抗原感作モルモットを用い、PGD<sub>2</sub>あるいは他の chemical mediator 誘発の鼻腔抵抗の上昇に対するプロスタノイド DP 受容体の関与について検討した。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 薬物および試薬

プロスタノイド DP 受容体拮抗薬として S-5751 を使用した。プロスタノイド TP 受容体作動薬 U-46619 (11a,9a-epoxymethano-PGH<sub>2</sub>) も塩野義製薬 (株) において合成した。PGD<sub>2</sub> (Funakoshi, Tokyo, Japan)、histamine dihydrochloride (histamine, Nacalai Tesque)、ovalbumin (OVA, Sigma Aldrich)、pentobarbital sodium (Abbott, Abbott Park, IL, USA) および gallamine triethiodide (Sigma Aldrich) は購入して使用した。histamine は直接、PGD<sub>2</sub> および U-46619 は ethanol にて溶解した後、saline で適当な濃度に希釈して使用した。

### 2.2 実験動物

実験には体重 390~670 g の雄性 Hartley 系モルモット (日本チャールス・リバー、Yokohama, Japan) を使用した。動物は室温 23±3 °C、湿度 30~70%、12 時間ごとの明暗サイクルによる人工照明の環境下、固形飼料および水道水を自由摂取させ、1 週間以上予備飼育した後、実験に使用した。すべての動物実験は塩野義製薬動物実験適正運用委員会の規定に準拠して実施した。

### 2.3 実験方法

#### 2.3.1 動物の感作および反応惹起

感作抗原として OVA を用いた。すなわち、1% OVA 溶液を超音波ネブライザー (NE-U12、オムロン、Kyoto, Japan) でエアロゾル化し、暴露用チャンバーに固定したモルモットに 1 週間間隔で 2 回、それぞれ 10 分間、無麻酔下で吸入させることによって能動的に感作した。反応惹起は、種々の濃度のケミカルメディエーター (PGD<sub>2</sub>、histamine および U-46619) を単独の溶液あるいは混合溶液とし、超音波ネブライザー (TUR-3200、日本光電、Tokyo, Japan) でエアロゾル化し、非感作あるいは 2 回目の抗原感作 7 日後のモルモットの鼻腔内に 2 分間暴露して行った。S-5751 は 0.5% のメチルセルロース溶液に懸濁し、反応惹起の 1 時間前に経口投与した。

### 2.3.2 鼻腔抵抗の測定

Sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.p.) 麻酔下でモルモットの気管を切開し、鼻腔側と肺側にそれぞれカニューレを装着した。肺側のカニューレに人工呼吸器 (SN-480-7、シナノ、Tokyo、Japan) を接続して呼吸を維持した後、gallamine triethiodide (2 mg/kg, i.v.) で自発呼吸を停止させた。鼻腔側のカニューレに別の人工呼吸器を接続して一定の空気 (1 回換気量 4ml、換気回数 70 回/分) を鼻腔内に送り、この送気に必要な空気圧 (鼻腔内圧) の変化を側枝に装着したトランスデューサー (TP-400T、日本光電) で反応惹起後 30 分間測定し、鼻腔抵抗の指標とした。なお、S-5751 投与による鼻腔抵抗への影響は鼻腔内圧の変動曲線の曲線下面積 (AUC) を総鼻腔抵抗とし、vehicle 投与群の総鼻腔抵抗に対する抑制率を算出した。

$$\text{S-5751 による鼻腔抵抗の抑制率} = \frac{\text{vehicle 投与群の総鼻腔抵抗} - \text{S-5751 投与群の総鼻腔抵抗}}{\text{vehicle 投与群の総鼻腔抵抗} - \text{saline challenge 群の総鼻腔抵抗}}$$

### 2.3.3 統計解析

成績は平均値±標準誤差で表した。有意差検定は、各測定時間に行った。2 群間比較には Student's *t*-test あるいは Welch's *t*-test を用い、多群間比較には Dunnett's test を用いた。

### 3. 実験成績

#### 3.1 PGD<sub>2</sub>による鼻腔抵抗の上昇とプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用

PGD<sub>2</sub>がプロスタノイド DP 受容体を介して直接鼻腔抵抗の上昇を誘発するかどうかを検討した。Fig. 2A に示すように、非感作モルモットにおいて 0.3%の PGD<sub>2</sub> 暴露は鼻腔抵抗をほとんど上昇しなかった。一方、感作モルモットにおいては 0.3%の PGD<sub>2</sub> 暴露によって鼻腔抵抗は有意に上昇した。PGD<sub>2</sub> による感作モルモットの鼻腔抵抗は PGD<sub>2</sub> の濃度に依存して上昇した (Fig. 2B)。さらに、0.3% PGD<sub>2</sub> 暴露による鼻腔抵抗の上昇は、S-5751 の経口投与によって用量依存的に、かつ 1 mg/kg の投与ではほぼ完全に抑制された (Fig. 2C)。

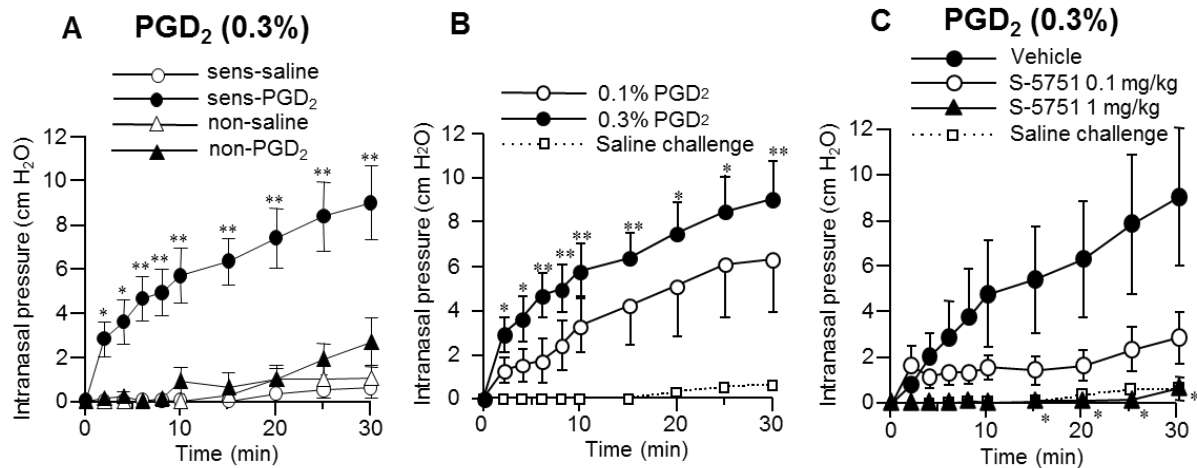


Fig. 2 Involvement of PGD<sub>2</sub> and prostanoid DP receptor in the induction of increases in intranasal pressure of guinea pigs actively sensitized by repeated antigen inhalation

Actively sensitized or non-sensitized guinea pigs were exposed to saline, 0.1% or 0.3% PGD<sub>2</sub> for 2 min (A, B and C). S-5751 or vehicle was orally administered 1 h before mediator exposure (C). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-8 guinea pigs. \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  vs. time-matched non-sensitized group (A), saline-challenged group (B) or vehicle-treated group (C).

### 3.2 Histamine およびプロスタノイドTP 受容体刺激薬による鼻腔抵抗の上昇とプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用

非感作モルモットに種々のケミカルメディエーターを暴露した際の鼻腔抵抗の変化について検討を行った。Fig. 3A および B に示すように、非感作モルモットに対する 0.1%の histamine あるいは U-46619 の暴露は有意に鼻腔抵抗を上昇した。この 0.1%の histamine および U-46619 による鼻腔抵抗の上昇は 10 mg/kg の S-5751 によって全く抑制されなかった (Fig. 3C および D)。つぎに、感作モルモットに種々のケミカルメディエーターを暴露した際の鼻腔抵抗の変化について検討を行った。非感作モルモットに 0.01%の histamine あるいは U-46619 を暴露してもほとんど鼻腔抵抗の上昇を示さなかった (Fig. 3A および B) が、感作モルモットにこれらの濃度のメディエーターを暴露すると有意な鼻腔抵抗の上昇が認められ、その程度は非感作モルモットに 0.1%の histamine あるいは U-46619 を暴露した際の鼻腔抵抗とほぼ同程度であった (Fig. 4A および B)。また、Fig. 4C および D に示すように、感作モルモットに 0.01%の histamine あるいは U-46619 を暴露した際の鼻腔抵抗の上昇は、S-5751 の前処置によって用量依存的かつ有意に抑制された。S-5751 10 mg/kg の投与による抑制率は histamine 誘発鼻腔抵抗の上昇に対しては 87%、U-46619 誘発鼻腔抵抗に対しては 71%であった。



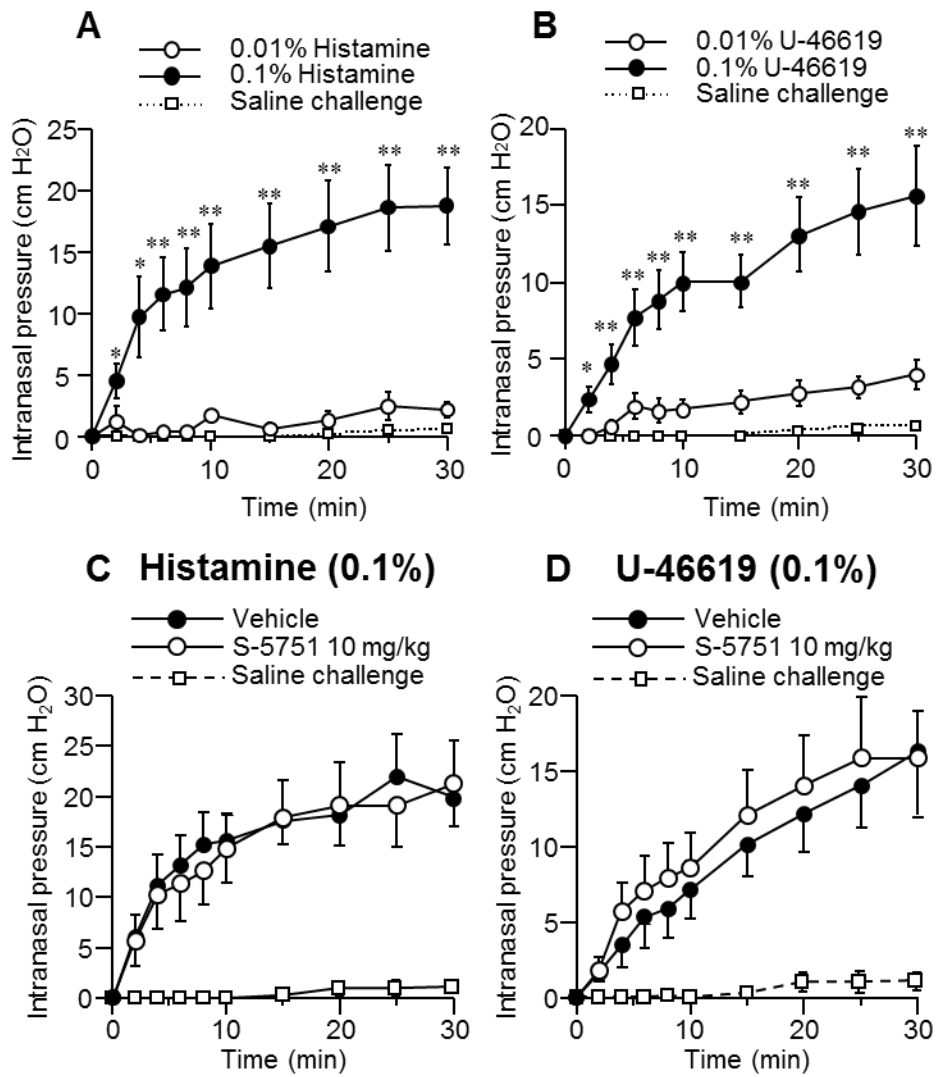


Fig. 3 Involvement of prostanoid DP receptor in increases in intranasal pressure by histamine (A and C) or U-466619 (B and D) in non-sensitized guinea pigs

Non-sensitized guinea pigs were exposed to saline, histamine or U-46619 for 2 min, and intranasal pressure was measured. S-5751 or vehicle was orally administered 1 h before mediator exposure. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-8 guinea pigs. \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  vs. time-matched saline-challenged group (A and B).

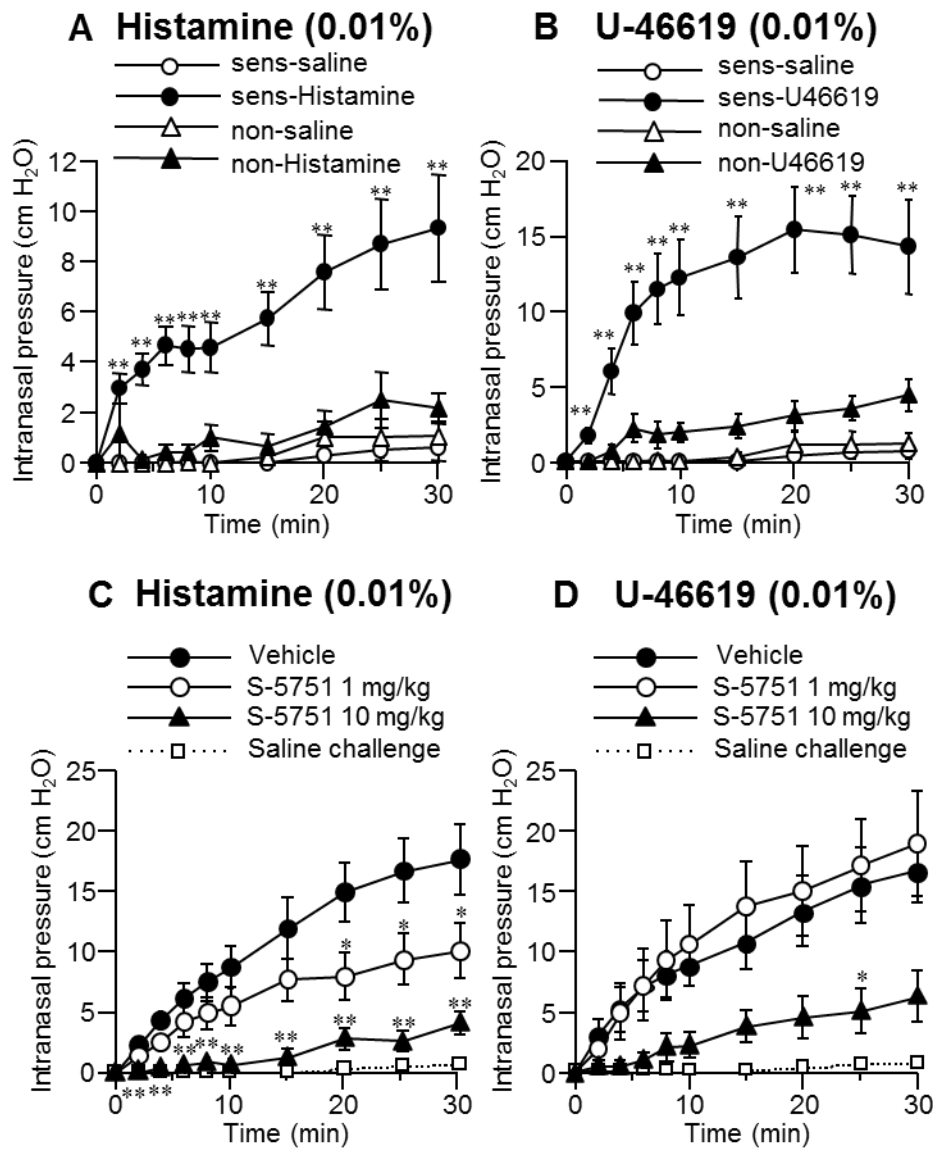


Fig. 4 Involvement of prostanoid DP receptor in increases in intranasal pressure by histamine (A and C) or U-466619 (B and D) in actively sensitized guinea pigs. Actively sensitized guinea pigs were exposed to saline, histamine or U-46619 for 2 min, and intranasal pressure was measured. S-5751 or vehicle was orally administered 1 h before mediator exposure. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-8 guinea pigs. \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  vs. time-matched saline-challenged group (A and B) or vehicle-treated group (C and D).

### 3.3 PGD<sub>2</sub>による histamine およびプロスタノイド TP 受容体刺激薬誘発鼻腔抵抗の増強作用とプロスタノイド DP 受容体の関与

PGD<sub>2</sub>が他のケミカルメディエーターによって誘発される鼻腔抵抗の上昇に影響を与えるかどうかを検討する目的で、PGD<sub>2</sub>と histamine あるいは U-46619 の共刺激を行った。非感作モルモットに単独では鼻腔抵抗の上昇を誘発しない濃度である 0.01%の histamine あるいは 0.01%の U-46619 とともに 0.3%の PGD<sub>2</sub>の共刺激を行ったところ、明らかに相乗的な鼻腔抵抗の上昇が誘発された (Fig. 5A および B)。これらの histamine あるいは U-46619 と PGD<sub>2</sub>の同時暴露による鼻腔抵抗の上昇は、10 mg/kg の S-5751 投与によって有意に抑制された。S-5751 による抑制率は PGD<sub>2</sub>と histamine 誘発鼻腔抵抗の上昇に対しては 83%、PGD<sub>2</sub>と U-46619 誘発鼻腔抵抗に対しては 88%であった (Fig. 5C および D)。

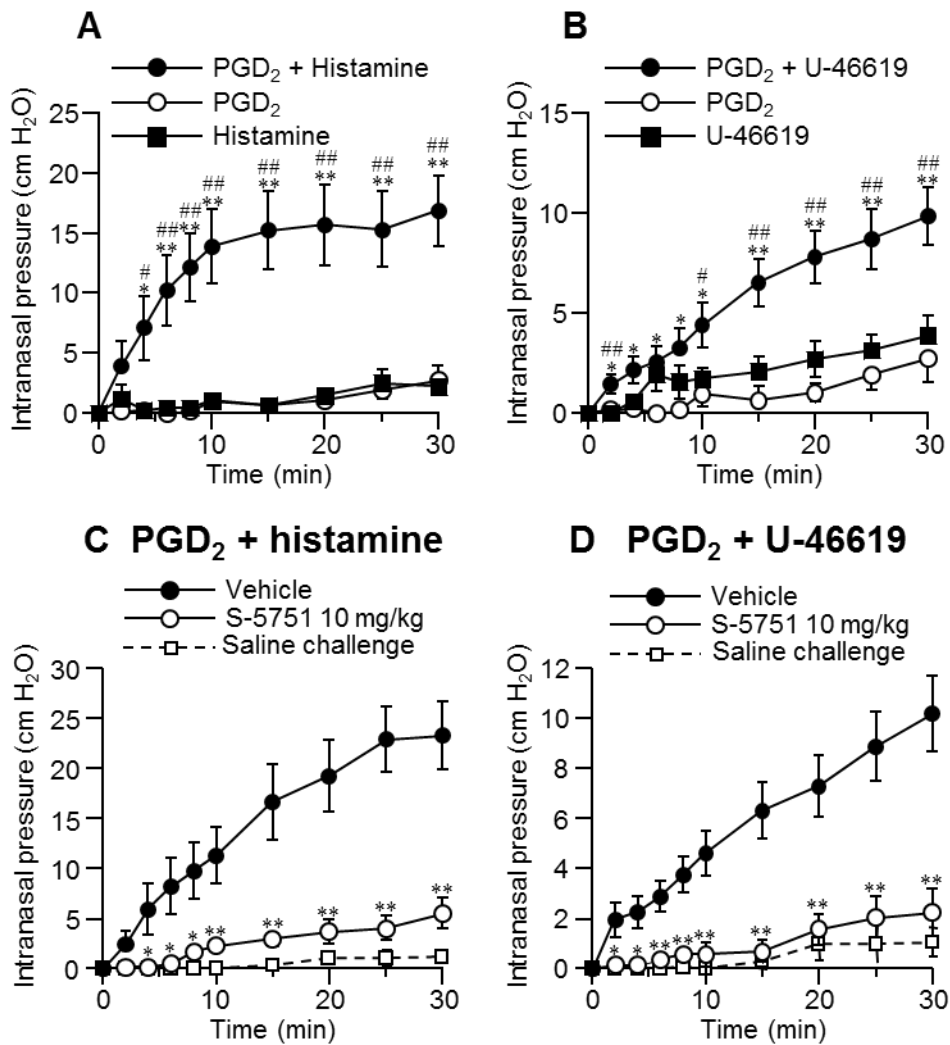


Fig. 5 Synergistic enhancement of histamine (A)- or U-46619 (B)-induced increases in intranasal pressure by PGD<sub>2</sub> in non-sensitized guinea pigs and the effect of S-5751 on the resulting increases in intranasal pressure (C and D)

Animals were exposed to saline, 0.3% PGD<sub>2</sub> and/or 0.01% histamine or 0.01% U-46619 for 2 min, and intranasal pressure was measured. S-5751 or vehicle was orally administered 1 h before mediator exposure (C and D). Each value represents the means ± S.E.M. of 6-8 guinea pigs. \*, p<0.05 and \*\*, p<0.01 vs. time-matched PGD<sub>2</sub> alone (A and B). #, p<0.05 and ##, p<0.01 vs. time-matched histamine (A) or U-46619 alone (B). \*, p<0.05 and \*\*, p<0.01 vs. time-matched vehicle-treated group (C and D).

#### 4. 考察

本章では、アレルギー性鼻炎における鼻閉症状発現のメカニズムを解析する目的で、PGD<sub>2</sub>あるいは他の chemical mediator によって誘発される鼻腔抵抗の上昇に対するプロスタノイド DP 受容体の関与について検討した。

ヒトにおいて PGD<sub>2</sub> の鼻腔内暴露は、強力な鼻閉症状を誘発することが知られている。その作用は同濃度において histamine より約 10 倍、bradykinin より約 100 倍強力である<sup>22)</sup>ことから、鼻閉の発現に大きく寄与していると考えられる。PGD<sub>2</sub> によって誘発されるヒト鼻閉は、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬である MK-0524 で強力に阻害されることから、本受容体の関与が明らかである<sup>55)</sup>。また、抗原の繰り返し暴露で能動感作したモルモットを抗原で刺激した際に認められる鼻腔内圧の上昇に対して、プロスタノイド TP 受容体拮抗薬、histamine H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬<sup>57)</sup>、CysLT 受容体拮抗薬 (pranlukast 30 mg/kg p.o.、未公表の成績) および platelet activating factor (PAF) 受容体拮抗薬 (CV-3988 10 mg/kg i.v.、未公表の成績) は部分的な抑制を示すに過ぎないが、S-5751 は 10 mg/kg の経口投与によってほぼ完全に鼻腔内圧の上昇を抑制する<sup>44)</sup>。以上の知見より、PGD<sub>2</sub> はプロスタノイド DP 受容体を介して、それ自身が直接鼻閉を惹起し、その鼻閉惹起への寄与は、他の chemical mediator に比して大きいことが推察される。

本章では、鼻腔内への繰り返し抗原暴露によって感作したモルモットにおいて、PGD<sub>2</sub> の鼻腔内暴露が鼻腔内圧の有意な上昇を示し、その鼻腔内圧の上昇がプロスタノイド DP 受容体拮抗薬である S-5751 によって完全に阻害されることを示した。これらの結果から、ヒトのみならずモルモットにおいても、PGD<sub>2</sub> がプロスタノイド DP 受容体を介して直接的に鼻閉を誘発することが明らかとなった。つぎに、他の chemical mediator による鼻閉発現に対するプロスタノイド DP 受容体の関与を、histamine とプロスタノイド TP 受容体作動薬である U-46619 を用いて検討した。抗原の鼻腔内への繰り返し暴露によって能動感作したモルモットに histamine および U-46619 を鼻腔内暴露したところ、非感作のモルモットに比べて histamine および U-46619 に対する反応性が明らかに亢進しており、より低濃度で鼻腔内圧の上昇が惹起された。S-5751 は非

感作モルモットに histamine および U-46619 を鼻腔内暴露して誘発される鼻腔内圧の上昇を全く抑制しなかったが、能動感作したモルモットに両メディエーターを鼻腔内暴露して誘発される鼻腔内圧の上昇を用量依存的かつ有意に抑制した。したがって、抗原の繰り返し暴露で chemical mediator による鼻閉症状誘発の反応性が亢進した状態（鼻過敏症）では、何らかの刺激によって産生された PGD<sub>2</sub> がプロスタノイド DP 受容体を介して鼻閉反応を増強している可能性が示唆される。実際、PGD<sub>2</sub> のプロスタノイド DP 受容体を介したシグナルと histamine との相乗作用は、モルモットの結膜<sup>44)</sup> やラットの皮膚<sup>60)</sup> における血管透過性亢進反応やラットのくしゃみ誘発反応<sup>61)</sup> において報告されている。そこで、非感作モルモットの鼻腔内に、単独では鼻腔内圧の上昇を惹起しない閾値以下の低濃度の PGD<sub>2</sub> と histamine あるいは U-46619 を同時に暴露したところ、明らかな鼻腔内圧の上昇が認められ、これらの反応は S-5751 の前処置によって有意に抑制された。抗原の繰り返し暴露によって鼻腔内で持続的な PGD<sub>2</sub> の産生亢進が誘発され、鼻過敏症の形成に関与している可能性がある。事実、アレルギー性鼻炎の患者では健常人と比較して鼻粘膜中の PGD<sub>2</sub> 量が恒常的に増加していることが報告されている<sup>62)</sup>。ヒトのアレルギー性鼻炎の病態において今回の研究結果のような PGD<sub>2</sub> と他の chemical mediator の鼻閉誘発反応の相乗作用がどの程度関与しているかは不明である。しかし、ヒトや動物モデルにおいて鼻腔内負荷試験で用いられる chemical mediator の濃度が、アレルギー性鼻炎患者に抗原負荷した際に認められる鼻腔洗浄液中の内因性 chemical mediator 量と比べて明らかに高いことから、アレルギー性鼻炎における鼻閉の発現には単独のメディエーターのみが関与しているのではなく、PGD<sub>2</sub> および種々の chemical mediator の相乗作用が中心的な役割を担っていると推察される。また、本研究において、PGD<sub>2</sub> 単独で誘発される鼻腔内圧の上昇は S-5751 1 mg/kg の投与で完全に抑制されたが、histamine や U-46619 との相乗作用による鼻腔内圧の上昇は S-5751 10 mg/kg の投与において 70～90%の抑制であった。一方、モルモットの抗原誘発鼻炎モデルにおいては、S-5751 は 10 mg/kg の投与で 95%の抑制を示した<sup>44)</sup>。抗原誘発による鼻閉の抑制には、PGD<sub>2</sub> 単独刺激の場合より高用量の S-5751 を必要とすること、また、最大効果も減弱することが明らかである。したが

って、様々な抗原によって誘発されるアレルギー性鼻炎の病態においては、単独のメディエーターではなく、複数のメディエーターが病態の発症や維持に関与していると考えられる。

以上の成績より、PGD<sub>2</sub> はプロスタノイド DP 受容体を介して、単独あるいは histamine や TXA<sub>2</sub> のような他の **chemical mediator** の反応を増強することによって鼻閉症状を誘発する可能性が示唆された。同時に、アレルギー性鼻炎における鼻閉症状の誘発において、PGD<sub>2</sub> と **chemical mediator** の相乗的な鼻閉反応増強作用が中心的な役割を担っている可能性が示唆された。

### 第3章 ヒツジ実験的喘息モデルにおけるプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響

#### 1. 緒言

慢性気管支喘息は、リンパ球、肥満細胞、好中球および好酸球などの様々な炎症性細胞の浸潤や、気道粘膜上皮の損傷による気道の反応性亢進（気道過敏性）を伴う慢性の炎症性疾患であると定義されており<sup>63)</sup>、抗原刺激によって産生される様々な mediator が発症原因として考えられている。気管支喘息の患者に抗原を負荷すると、気管支肺胞洗浄液（BALF）中の PGD<sub>2</sub> 含量が上昇すること<sup>17,64)</sup>、PGD<sub>2</sub> の吸入暴露によって気道狭窄が誘発されること<sup>23)</sup> から、PGD<sub>2</sub> も気管支喘息において重要な役割を演じると考えられる。PGD<sub>2</sub> はプロスタノイド DP 受容体と CRTH2 の2つの受容体に結合することが知られている<sup>26)</sup> が、これまでに喘息モデルにおけるプロスタノイド DP 受容体の役割に関して異なった報告がある。Matsuoka らはプロスタノイド DP 受容体欠損マウスに抗原感作した後、抗原暴露して惹起される acetylcholine に対する気道反応性の亢進、気道へのリンパ球および好酸球浸潤、Th2 サイトカイン産生が、野生型マウスと比べて有意に減弱していることを報告している<sup>40)</sup>。この結果とは対照的に、Hammad らは抗原暴露時にプロスタノイド DP 受容体刺激薬である BW245C を経気道投与したマウスでは、気道反応性亢進および気道炎症が抑制され、その抑制作用がプロスタノイド DP 受容体欠損マウスでは消失することを報告している<sup>38)</sup>。以上のように、プロスタノイド DP 受容体を介した気道反応については相反する結果が示されており、異なる実験系を用いた研究が望まれる。

そこで本章では、ヒツジの実験的喘息モデルを用いて抗原誘発気道反応におけるプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響を検討し、本受容体の役割について考察した。ヒツジの実験的喘息モデルには、ブタ回虫抗原 *Ascaris suum* antigen に自然感作されたヒツジを用いており、人為的な感作処置を必要とせず、抗原暴露によって再現良く即時型および遅発型気道反応、carbachol に対する気道反応性亢進、BALF 中の炎症性細胞の増加が観察される<sup>65)</sup> ことから、開発初期段階にある抗喘息薬の効果を検証するために繁用されている。また、以前の研究において、本モデルはヒ



トの喘息患者と同様に、抗原暴露直後に回収した BALF 中に PGD<sub>2</sub> 量が有意に増加することが報告されている<sup>66)</sup>。さらに、S-5751 はヒツジの血小板を PGD<sub>2</sub> で刺激した際の cAMP の産生増強を濃度依存的に抑制する（成績には示さない）ことから、本モデルはプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の喘息症状に対する作用の検討に有用であると考えられる。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 薬物および試薬

プロスタノイド DP 受容体拮抗薬として S-5751 を使用した。CysLT 受容体拮抗薬 montelukast sodium は、Singulair (アルフレッサファーマ、大阪) を購入し、塩野義製薬 (株) で抽出 (純度 97.7%) して使用した。

### 2.2 実験動物

実験には体重 32–46 kg (平均 40 kg) の豚回虫抗原 (*Ascaris suum* antigen) に自然感作された雌性ヒツジを使用した。動物はすべて感作抗原の吸入暴露によって即時性および遅発性の気道収縮反応を発現し、抗原吸入後、carbachol エアロゾルの吸入によって気道過敏性 (AHR) を発症することを確認した。すべての動物実験は Mount Sinai Medical Center Animal Research Committee のヒューマンケアおよび実験動物使用規定に準拠して実施した。

### 2.3 実験方法

#### 2.3.1 肺抵抗 (mean pulmonary flow resistance : $R_L$ ) の測定

胸腔内圧の測定のために食道内に留置したバルーンカテーテルと気道内圧測定のために気管チューブに留置した側圧測定カテーテルを差圧トランジューサー (MP45、Validyne、Northridge、CA、USA) に接続し、transpulmonary pressure (肺内外圧差) を測定した。一方、気流速度は、ニューモタコグラフ (Fleisch No. 1、Dyna Sciences Inc.、Blue Bell、PA、USA) を気道カテーテルに接続して測定した。Transpulmonary pressure と気流速度を記録し、気流から積分して求められる換気量と transpulmonary pressure との変化から  $R_L$  を算出し、気道収縮の指標とした。嚥下によるアーティファクトを除いた 5~10 呼吸の平均値を  $R_L$  の算出に用い、測定単位は  $\text{cm H}_2\text{O/L/Second}$  ( $\text{cm H}_2\text{O/L/S}$ ) とした。

### 2.3.2 抗原および気道刺激因子の吸入方法

抗原および気道刺激因子の吸入は、以前の論文に従って行った<sup>65,66</sup>。すなわち、ブタ回虫抗原 (PBS で 20 倍希釈、82,000 PNU/ml)、carbachol および LTD<sub>4</sub> の吸入は、医療用ネブライザー (Raindrop、Puritan Bennett Co., Carlsbad, CA, USA) に電磁弁と圧縮空気発生装置 (20 psi) から成る線量計制御システムを連結した装置を用いて行った (1 回換気量 500 ml、換気回数 20 回/分)。

### 2.3.3 Carbachol に対する気道反応性の測定

気道反応性は carbachol の累積用量-反応曲線を用いて決定した。すなわち、0.25、0.5、1.0、2.0 および 4.0 w/v% の carbachol/PBS 溶液を 2.3.2 項に示す方法で各濃度 10 呼吸ずつ漸増的に吸入させた際の R<sub>L</sub> を測定した。気道反応性は carbachol の累積用量-反応曲線より、R<sub>L</sub> を basal level (PBS 吸入) の 400% まで上昇させる carbachol の累積用量 (provocative concentration of 400%、PC<sub>400</sub>) を算出して求めた。carbachol の累積用量は、1 w/v% の carbachol 溶液エアロゾルの 1 呼吸単位を 1 breath unit (BU) として算出した。

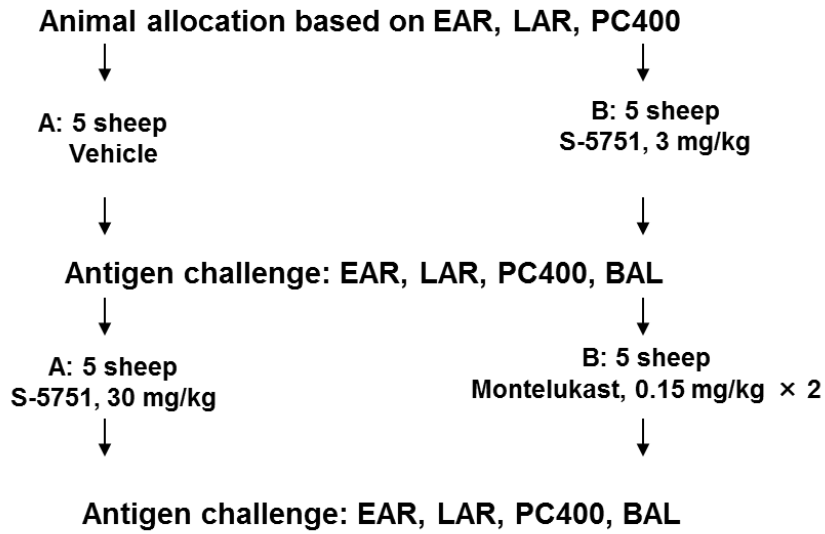
### 2.3.4 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の回収と細胞分類法

80 cm の光ファイバー気管支鏡を無作為に抽出した細気管支に挿入した。肺洗浄は気管支鏡の working channel に結合した 30 ml のシリンジを用い、39 °C、pH7.4 に調整した Ca<sup>2+</sup> および Mg<sup>2+</sup> を含有しない PBS 溶液 30 ml の注入と吸引によって行った。各測定時間に、3 箇所 of 細気管支から BALF を回収してプールした (total 90 ml)。回収した BALF は 2 枚のメッシュを通して粘液を除去した後、hemocytometer に適量を滴下し、位相差顕微鏡によって総細胞数を計測した。さらに、BALF を遠心後、PBS で 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml に再懸濁し、cytospin を用いて塗抹標本を作成した。塗抹標本は Diff-Quik (Baxter, McGraw Park, IL, USA) で染色した後、顕微鏡下、細胞 500 個中の気道上皮細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球、単球数から各炎症細胞の存在比率を計測し、総細胞数との乗算により各炎症性細胞数を算出した。

### 2.3.5 実験プロトコール

実験は Fig. 6 に示すプロトコールに従って実施した。すなわち、実験に先立って 10 頭の豚回虫抗原に感作された羊の反応性を、豚回虫抗原暴露によって確認し、5 頭ずつ 2 群 (A および B) に分割した (Table 3)。群の分割に際し、S-5751 および montelukast の抗炎症作用に重点を置くため、遅発型気道反応 (late phase airway response、LAR) および気道過敏性 (airway hyperresponsiveness、AHR) が同等の値となるよう考慮した。Table 3 に示すようにスクリーニング試験において即時型気道反応 (early phase airway response、EAR)、LAR および AHR のいずれの測定値も Group A および Group B の 2 群間に有意差は認められなかった。Fig. 6 に示すように、Group A は vehicle (0.5%メチルセルロース) 経口投与の試験を行った後、S-5751 30 mg/kg (溶媒、0.5%メチルセルロース) 経口投与の試験を行った。Group B は S-5751 3 mg/kg (溶媒、0.5%メチルセルロース) 経口投与の試験を行った後に、montelukast 0.15 mg/kg 2 回/日、静脈内投与 (溶媒、生理食塩水) の試験を行った。なお、S-5751 の経口投与には経鼻胃投与方法を用いた<sup>67)</sup>スクリーニング試験および本試験における最初の試験 (vehicle および S-5751 3mg/kg 経口投与) と後続の試験 (S-5751 30 mg/kg 経口投与および montelukast 投与) の間隔は 3 週間以上空けて行った。Fig. 6 の timeline に示すように、薬物投与開始の 1~4 日前に予め carbachol に対する気道反応性と BALF 中の炎症性細胞数の baseline 値を測定した。薬物投与は抗原暴露 4 日前から刺激 6 日後まで連日行い、抗原暴露日においては、vehicle または S-5751 を 2 時間前に経口投与し、montelukast を暴露 30 分前および 4 時間後に静脈内投与した。抗原誘発肺抵抗 (RL) の測定については抗原暴露 2 時間および 30 分前、また、暴露 1、2、3、4、5、6、6.5、7 および 7.5 時間後に行った。抗原暴露 24 時間後および 7 日後には AHR (PC<sub>400</sub>) を測定し、AHR 測定後に BALF の回収を行った。

### Study Design



### Timeline

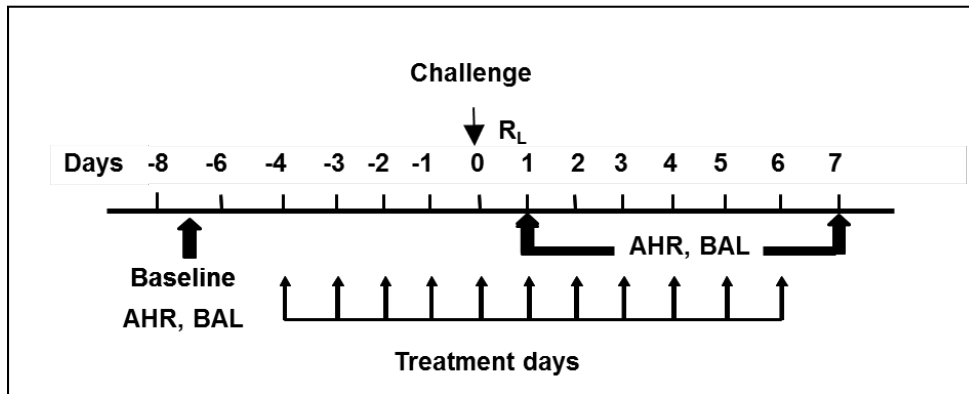


Fig. 6 Schematic of experimental design and protocol for an asthma model on sheep

Table 3 Antigen-induced early (0-4 h) and late (4-7.5 h) bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness in formulated groups for the pharmacological study

Screening antigen trial	AUC		Post/ pre-challenge PC <sub>400</sub> ratio	
	R <sub>L</sub> (%) 0-4 h (early asthmatic response)	R <sub>L</sub> (%) 4-7.5 h (late asthmatic response)	Day 1	Day 7
Group A mean ± SEM	610 ± 26%	478 ± 11%	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Group B mean ± SEM	494 ± 64%	484 ± 14%	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0
<i>P</i> -value (unpaired Student's <i>t</i> -test)	0.153	0.751	0.694	0.213

Early and late bronchoconstriction are expressed as AUC. Airway responsiveness is expressed as a ratio of the post/pre-challenge value of PC<sub>400</sub>. A ratio of 1 indicates that there was no change in the airway responsiveness, whereas a ratio < 1 indicates the development of airway hyperresponsiveness. Values are mean ± S.E.M. for five sheep. AUC, area under the curve.

### 2.3.6 LTD<sub>4</sub>誘発気道反応モデル

S-5751 が in vivo において CysLT<sub>1</sub> 受容体に作用していないことを確認するため、LTD<sub>4</sub> 誘発気道反応モデルにおける S-5751 の作用を検討した。すなわち、3 頭のヒツジに対し、吸入 4 日前より当日までの 5 日間 30 mg/kg の S-5751 を投与した。吸入当日の S-5751 投与は抗原吸入試験のプロトコールに従い、最初の LTD<sub>4</sub> 吸入開始 2 時間前に行った。薬物投与後、LTD<sub>4</sub> を 50、100 および 150 µg/ml の順に漸増的に 10 呼吸ずつ吸入させ、各濃度の LTD<sub>4</sub> 吸入後 5 分間の肺抵抗 (RL) を測定した。

### 2.3.7 統計解析

成績は平均値±標準誤差で表した。有意差検定は各試験のコントロール群と S-5751 処置群間で分散分析を行い、有意差が認められた場合には Dunnett's test でさらに解析した。

### 3. 実験成績

#### 3.1 気道反応における S-5751 の作用

抗原誘発気道収縮反応および AHR における S-5751 および montelukast の作用を検討した。Fig. 7A および Table 4 に示すように、S-5751 3 mg/kg 投与群は抗原誘発即時型気道収縮反応 ( $AUC_{0-4h}$ ) と遅発型気道収縮反応 ( $AUC_{4-7.5h}$ ) を抑制しなかった。一方、S-5751 30 mg/kg および montelukast 投与群においては即時型気道収縮反応を部分的に抑制し、遅発型気道収縮反応をほぼ完全に抑制した (Fig. 7A、C および Table 4)。両者の抑制の程度はほぼ同等であった。Fig. 7B および Table 4 に示すように、S-5751 3 mg/kg 投与群は抗原暴露 1 日後の気道過敏性を全く抑制しなかったが、抗原暴露 7 日後の気道過敏性を部分的かつ有意に抑制した。一方、S-5751 30 mg/kg と montelukast 投与群においては抗原暴露 1 日後および 7 日後の気道過敏性をほぼ完全に抑制した (Fig. 7A、C および Table 4)。

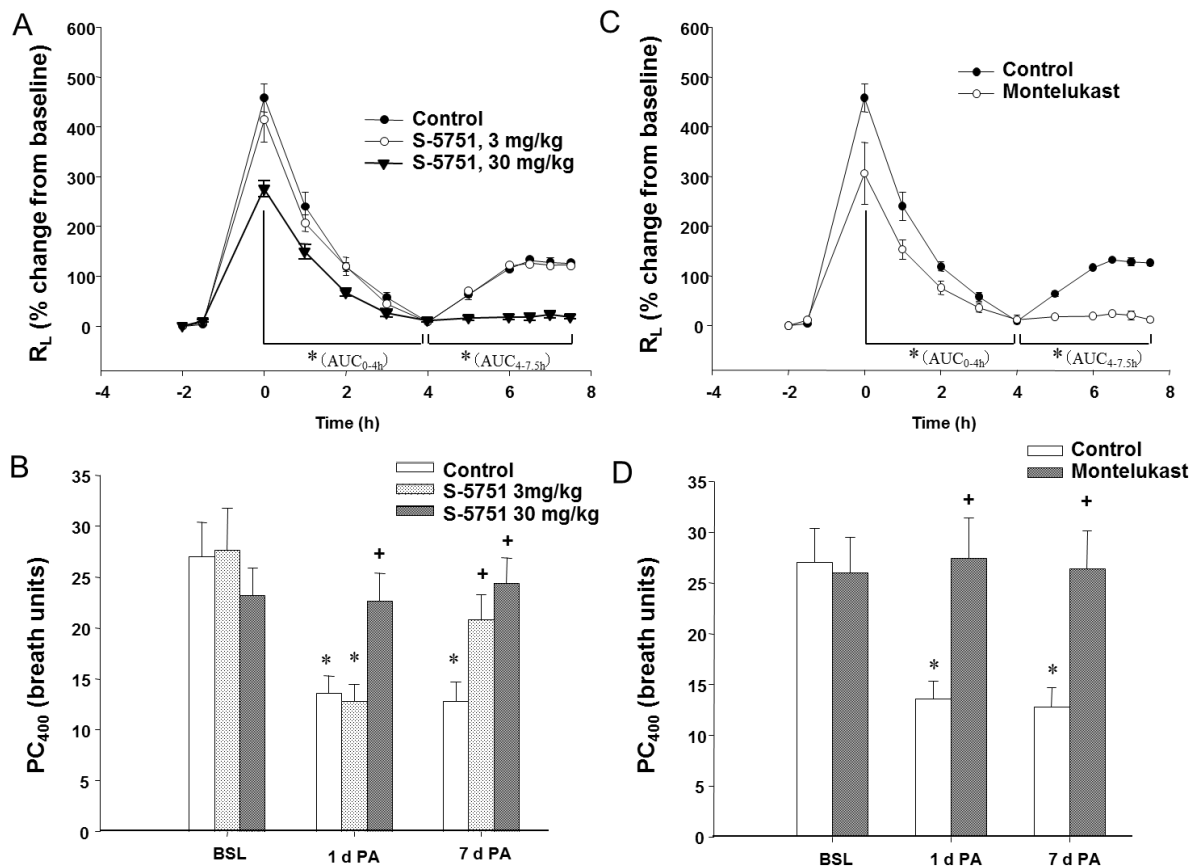


Fig. 7 Effects of S-5751 and montelukast on the time-course of antigen-induced changes in lung resistance ( $R_L$ ) (A and C), and airway responsiveness to inhaled carbachol expressed as  $PC_{400}$  (B and D)

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 sheep. Top: \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  vs. vehicle control (Time-matched statistical comparison). Bottom: \*,  $p < 0.05$  vs. baseline, +,  $p < 0.05$  vs. vehicle control. Statistical comparisons are presented in Table 4.

Table 4 Effect of S-5751 and montelukast on antigen-induced early (0-4 h) and late (4-7.5 h) bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness

Group	AUC <sub>0-4h</sub> (Early)			AUC <sub>4-7.5h</sub> (Late)			AHR (Day 1)		AHR (Day 7)	
	$R_L$ (%)	% inhibition	<i>P</i> -value	$R_L$ (%)	% inhibition	<i>P</i> -value	Post/pre-challenge	<i>P</i> -value	Post/pre-challenge	<i>P</i> -value
vehicle	652 $\pm$ 48	-	-	318 $\pm$ 9	-	-	0.50 $\pm$ 0.03	-	0.48 $\pm$ 0.04	-
S-5751 3mg/kg	584 $\pm$ 51	10	NS	314 $\pm$ 14	1	NS	0.48 $\pm$ 0.02	NS	0.78 $\pm$ 0.60	<0.05
S-5751 30mg/kg	385 $\pm$ 33	41	<0.05	61 $\pm$ 12	81	<0.05	0.96 $\pm$ 0.02	<0.05	1.04 $\pm$ 0.02	<0.05
Montelukast	423 $\pm$ 62	35	<0.05	65 $\pm$ 12	80	<0.05	1.00 $\pm$ 0.05	<0.05	1.00 $\pm$ 0.03	<0.05

Early and late bronchoconstriction are expressed as AUC. Airway responsiveness is expressed as a ratio of the post/pre-challenge value of  $PC_{400}$ . A ratio of 1 indicates that there was no change in the airway responsiveness, whereas a ratio below 1 indicates the development of airway hyperresponsiveness. Values are mean  $\pm$  S.E.M. for five sheep. AUC, area under the curve. *P*-value: vs vehicle.



### 3.2 抗原誘発炎症性細胞浸潤に及ぼす S-5751 の作用

Fig. 8 に抗原暴露したヒツジの BALF 中炎症性細胞数に及ぼす S-5751 および montelukast の作用を示す。抗原暴露 1 日後では、baseline における細胞数と比べ、BALF 中の総細胞数、マクロファージ数および好中球数の明らかな増加が認められ、この増加は 7 日後においても維持された (Fig. 8A、B および C)。S-5751 3 mg/kg の投与は、抗原暴露 1 日後においてはこれらの細胞浸潤に対して抑制傾向のみで有意な効果を示さなかったが、7 日後においては総細胞数、マクロファージ数および好中球数のいずれに対しても有意な抑制作用を示した (Fig. 8A、B および C)。一方、S-5751 30 mg/kg の投与は、抗原暴露 1 日後より総細胞数を有意に抑制し、7 日後においては総細胞数、マクロファージ数および好中球数のいずれに対しても有意な抑制作用を示した (Fig. 8A、B および C)。また、montelukast の投与は、S-5751 30 mg/kg の投与と同様の抑制効果を示した。今回の試験においては BALF 中の好酸球数も測定した。baseline における好酸球数は  $2.6 \pm 1.9 \times 10^3$  cells/ml であるのに対し、抗原暴露 1 日後では  $8.2 \pm 3.5 \times 10^3$  cells/ml、7 日後では  $1.0 \pm 0.7 \times 10^3$  cells/ml であり、1 日後において好酸球数の増加傾向が認められたが、有意ではなかった。また、S-5751 および montelukast の投与による好酸球数の変化は認められなかった (成績には示さない)。

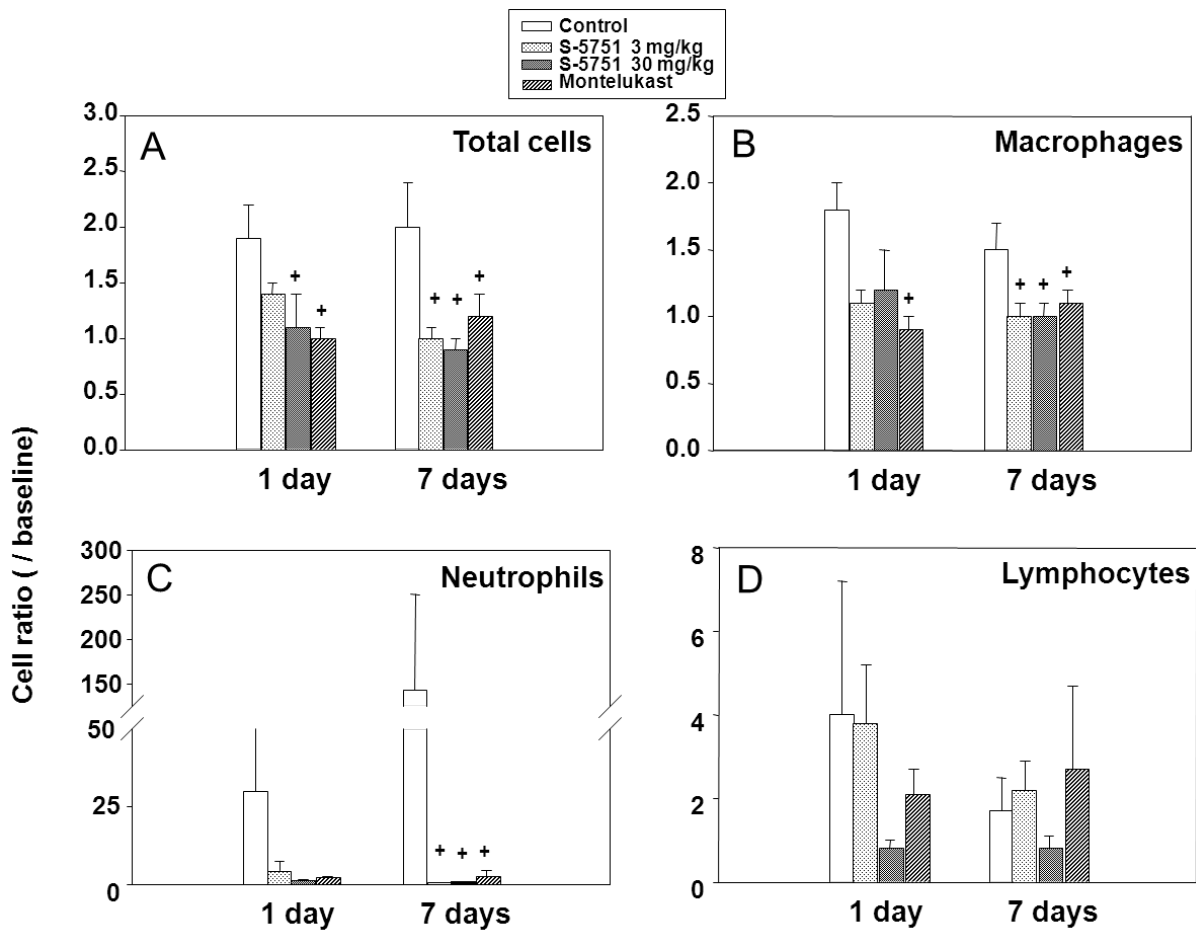


Fig. 8 Effects of S-5751 and montelukast on antigen-induced infiltration of inflammatory cells in sheep

Data are expressed as a ratio of post-challenge values on day 1 and days 7 (after antigen challenge)/baseline. Values for total cells, macrophages, neutrophils and lymphocytes are shown. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 sheep. +,  $p < 0.05$  vs. vehicle.

### 3.3 LTD<sub>4</sub>誘発気道収縮反応に対する S-5751 の作用

種々の抗原誘発気道反応に対する S-5751 と montelukast の作用が類似していたため、S-5751 が in vivo において CysLT1 受容体に対して拮抗作用を示す可能性が懸念された。そこで、LTD<sub>4</sub> 誘発気道収縮反応に対する S-5751 の作用を検討した。Fig. 9 に示すように、S-5751 30 mg/kg の投与によって LTD<sub>4</sub> 誘発気道収縮反応は抑制されなかった。

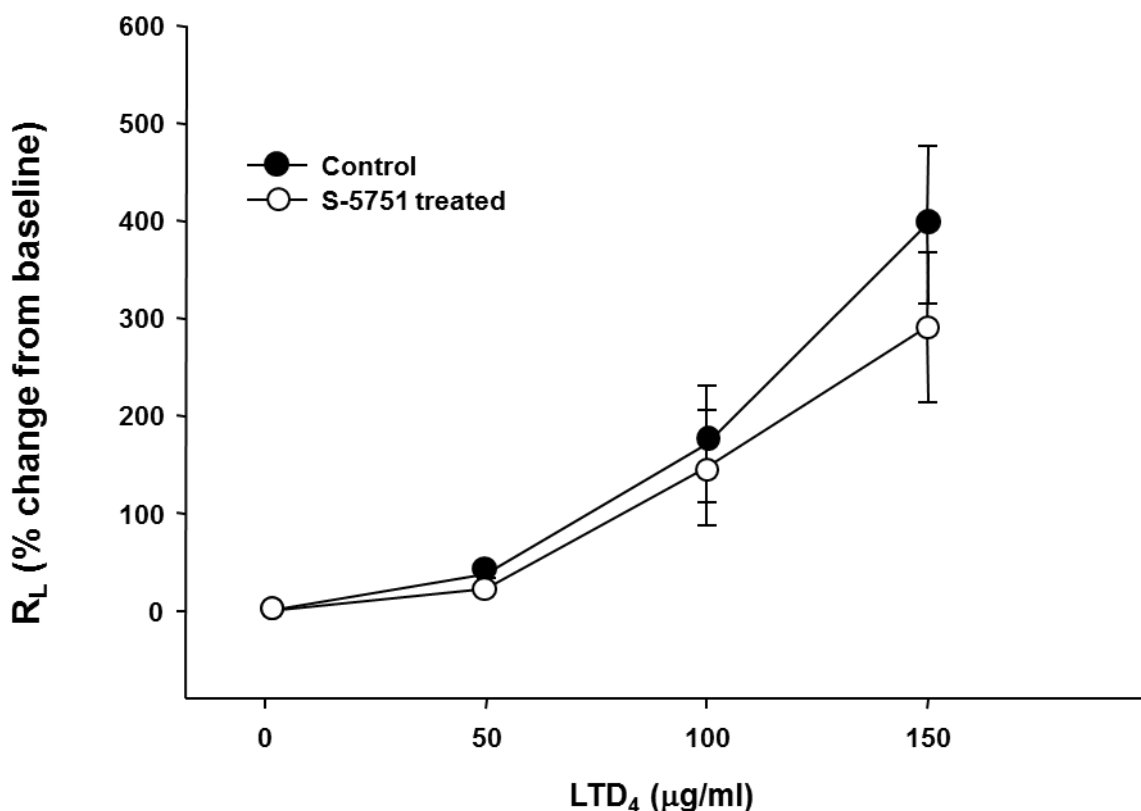


Fig. 9 Concentration-response curves to inhaled leukotriene (LT) D<sub>4</sub> with and without treatment with S-5751

Animals were treated with 30 mg/ml S-5751 for 4 days and then on the fifth days 2 h before LTD<sub>4</sub> challenge. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 3 sheep.

#### 4. 考察

本章では、ヒツジの実験的喘息モデルおよび S-5751 を用い、喘息におけるプロスタノイド DP 受容体の役割を検討した。その結果、プロスタノイド DP 受容体の喘息における役割は、Hommad ら<sup>38)</sup> や Spik ら<sup>68)</sup> が報告した抑制的なものではなく、Matsuoka らの報告<sup>40)</sup> と同様に、気道炎症を促進するものであった。

本検討において、30 mg/kg の S-5751 は抗原誘発後の EAR、LAR、抗原暴露 1 日後の carbachol に対する気道反応性の亢進、炎症性細胞の浸潤を有意に抑制したが、3 mg/kg ではこれらの反応を抑制しなかった。本検討における抗原暴露時の S-5751 の血漿中濃度を測定したところ、3 mg/kg 投与群では 0.02  $\mu$ M、30 mg/kg 投与群では 0.36  $\mu$ M であった。ヒツジ PRP を PGD<sub>2</sub> 刺激した際の cAMP 上昇に対する S-5751 の抑制作用は IC<sub>50</sub> 値で 0.12  $\mu$ M であった（成績には示さない）。3 mg/kg 投与では IC<sub>50</sub> 値の 1/6 の血中濃度であり、30 mg/kg 投与では IC<sub>50</sub> 値の 3 倍の血中濃度であった。したがって、S-5751 3 mg/kg 投与群において、抗原暴露 1 日後までの気道反応が抑制されなかった原因は、作用を発揮する薬物濃度に達していなかったためと考えられた。一方、抗原暴露 7 日後では、3 mg/kg の S-5751 においても気道過敏性および炎症性細胞浸潤は有意に抑制された。抗原暴露直後の PGD<sub>2</sub> の大量放出の後も持続的に低濃度の PGD<sub>2</sub> が放出され、プロスタノイド DP 受容体を介して気道過敏性および気道への炎症性細胞浸潤の維持に寄与している可能性が示唆される。事実、Liu ら<sup>69)</sup> は、喘息患者において抗原暴露 5 分後および 19 時間後の BALF 中の PGD<sub>2</sub> 量を測定し、19 時間後においても 5 分後の 2/5 程度ではあるが、健常人と比較して有意に高値な PGD<sub>2</sub> が検出されることを報告している。3 mg/kg の S-5751 は低濃度の PGD<sub>2</sub> 刺激を持続的に遮断することで、抗原暴露 7 日後の気道過敏性および気道への炎症性細胞浸潤を抑制したものである。

本検討において、S-5751 は EAR を有意ではあるが部分的な抑制を示すにすぎなかったが、LAR、気道過敏性および炎症性細胞浸潤を強く抑制した。S-5751 の EAR に対する効果は、Johnston ら<sup>23)</sup> のヒトにおける PGD<sub>2</sub> 吸入暴露が気道狭窄を誘発するという報告と一致するが、抗原刺激で

様々なメディエーターが放出される中での PGD<sub>2</sub> の EAR への寄与は部分的と考えられる。気道における PGD<sub>2</sub> のプロスタノイド DP 受容体を介した刺激は、即時型の直接的な気道狭窄よりも、LAR、気道過敏性および炎症性細胞浸潤のような炎症性の気道反応により強く寄与している可能性が示唆される。この結果は、プロスタノイド DP 受容体欠損マウスにおいて気道過敏性、気道への炎症性細胞浸潤およびサイトカイン産生のような炎症反応が野生型マウスと比べて明らかに減少するという Matsuoka らの結果と一致する<sup>40)</sup>。一方、ヒツジを用いた本検討では、以前のマウス<sup>40)</sup> やモルモット<sup>44)</sup> を用いた試験結果と気道への浸潤細胞に違いが認められた。マウスやモルモットでは、抗原暴露後に強い好酸球浸潤が認められるが、ヒツジを用いた本検討では、好酸球浸潤はごくわずかであり、マクロファージ、次いで好中球で総細胞数の 80-90% を占めていた。さらに、S-5751 30 mg/kg の投与は、抗原暴露 1 日後においてもマクロファージおよび好中球浸潤に対して抑制傾向を示し、7 日後においては有意な抑制作用を示した。S-5751 の抗原誘発マクロファージ浸潤の抑制作用の強度は、モルモットを用いた以前の報告と一致する<sup>44)</sup>。したがって、ヒツジの実験的喘息モデルにおいてはマクロファージおよび好中球が炎症の惹起に関与しており、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬はこれらの細胞を抑制することによって、抗喘息効果を発揮していると推測される。喘息におけるマクロファージおよび好中球の関与は明確でないが、マクロファージは喘息への関与が知られているアラキドン酸代謝物や炎症性サイトカインの産生細胞の 1 つであり<sup>70,71)</sup>、好中球も難治性喘息への関与が知られている<sup>72)</sup>。プロスタノイド DP 受容体拮抗薬の抗喘息メカニズムについては、さらに検討が必要であるが、本拮抗薬がヒトにおいても有用な喘息治療薬になることは十分に期待できる。

本検討において、S-5751 が CysLT 受容体拮抗薬である montelukast と類似した抑制作用を示したため、S-5751 の CysLT 受容体への直接作用が懸念された。しかし、*in vitro* の検討において、モルモット肺への [<sup>3</sup>H]-LTD<sub>4</sub> の結合に対し、S-5751 は結合阻害活性を示さなかった (IC<sub>50</sub> > 10 μM)。さらに、*in vivo* においてヒツジに LTD<sub>4</sub> を吸入暴露して誘発される気道閉塞を 30 mg/kg の S-5751 は全く抑制作用を示さなかった。したがって、S-5751 の気道炎症抑制作用が CysLT 受容体との

直接的なクロストークを介したものである可能性はないと考えられる。また、LTD<sub>4</sub>はプロスタノイド DP 受容体を直接刺激しないことが報告されている<sup>73)</sup>。

以上の成績から、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は、CysLT 受容体拮抗薬の代替薬となる可能性や組み合わせ投与によって相加的あるいは相乗的な作用を発揮する可能性があり、新たな治療薬として喘息の治療に貢献する可能性が示唆される。

## 第 4 章 ラット抗原誘発気道過敏性ならびに気道炎症モデルにおけるプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響

### 1. 緒言

第 3 章では、ヒツジの実験的喘息モデルを用いてプロスタノイド DP 受容体拮抗薬が抗喘息作用を発揮することを示した。本章ではラットの実験的喘息モデルを用い、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬と prednisolone の作用を比較検討した。

ラットの実験的喘息モデルでは、ヒツジの実験的喘息モデルと同様に強いマクロファージ・単球および好中球浸潤が誘導されると共に、マウス<sup>40)</sup> やモルモット<sup>44)</sup> の実験的喘息モデルと同様に顕著な好酸球浸潤が認められる。このような炎症像は、臨床における重症の慢性喘息<sup>74)</sup> や喘息の急性増悪時<sup>75)</sup> の症状に類似する特徴である。また、種々の分子生物学的アプローチが可能な点でヒツジより優れており、化合物の分子メカニズムの解析に適するモデルと考えられる。そこで、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬の分子メカニズムを解析する目的で、肺の抗原誘発サイトカインおよびケモカイン mRNA 発現に対するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響を検討するとともに肺における本受容体の発現細胞の同定を試みた。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 薬物および試薬

プロスタノイド DP 受容体拮抗薬として S-5751 および pinagladin を使用した。Prednisolone は Sigma Aldrich より購入した。

### 2.2 実験動物

実験には体重 240～400 g の雄性 Brown Norway ラット（日本チャールス・リバー、Yokohama、Japan）を使用した。動物は 6 週齢で購入し、室温  $23 \pm 3$  °C、湿度 30～70%、12 時間ごとの明暗サイクルによる人工照明の環境下で、固形飼料および水道水を自由摂取させ、1 週間予備飼育した後、実験に使用した。すべての動物実験は塩野義製薬動物実験適正運用委員会の規定に準拠して実施した。

### 2.3 実験方法

#### 2.3.1 動物の感作および反応惹起

実験は Fig. 10 に示す実験プロトコールに従って行った。ラットは 100  $\mu\text{g}$  OVA と 1 mg 水酸化アルミニウムゲルの混合液を day 0 に腹腔内投与して感作した。Day 12、19、26 および 33 に超音波ネブライザー（NE-U17、オムロン、Kyoto、Japan）を用いて 1% OVA 生理食塩水溶液を 30 分間暴露した。陰性対照群には、1% OVA の代わりに生理食塩水溶液を同じスケジュールで 30 分間暴露した。気道反応性の測定および BALF の回収は、最終抗原暴露の 1 日後（day 34）に行った。



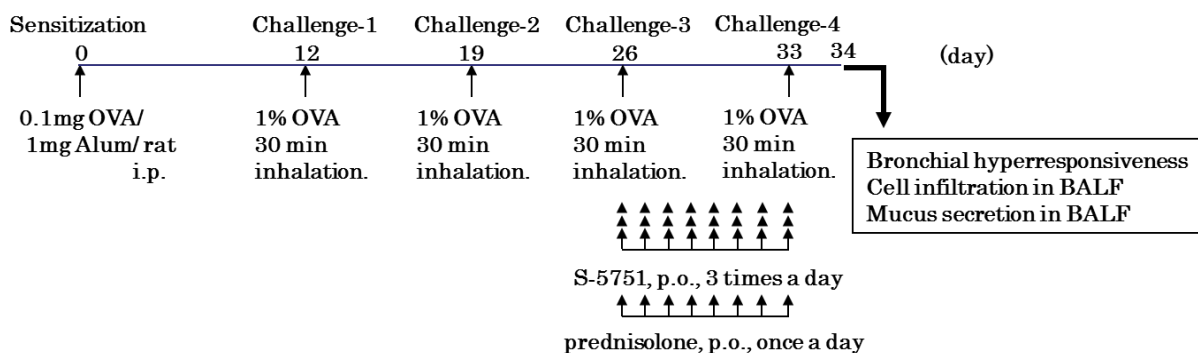


Fig. 10 Experimental protocol for an asthma-like model on rats

### 2.3.2 薬物の投与

S-5751 および pinagladin はラットにおいてはバイオアベイラビリティが低く (100 mg/kg の S-5751 経口投与において 6.9%)、血中での消失時間も早い (S-5751 の経口投与において約 4 時間) ため、100 mg/kg を最高用量とし、1 日 3 回の経口投与を行った。Prednisolone は 3 mg/kg の用量で 1 日 1 回経口投与した。薬物投与は 3 回目の抗原暴露日 (day 26) から最終抗原暴露日 (day 33) までの連日、計 8 日間行った。なお、抗原暴露日には、暴露 1 時間前に薬物の投与を行った。

### 2.3.3 Acetylcholine に対する気道反応性の測定

気道反応性の測定は有村らの方法<sup>74)</sup>に従って行った。最終抗原暴露 24 時間後、sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) による麻酔下でラットの気管および頸静脈を切開し、カニューレを装着した。気道のカニューレに人工呼吸器 (SN-480-7、シナノ、Tokyo、Japan) を接続して一定の空気を肺に送り (1 回換気量 3 ml、換気回数 60 回/分)、呼吸を維持するとともに、この送気に必要な圧の変化を側枝に装着したトランスデューサー (TP-400T、日本光電、Tokyo、Japan) で測定し、気道抵抗の指標とした。ベースラインの気道抵抗を測定した後、種々の濃度の acetylcholine (3.9、7.8、15.6、31.3、62.5、125、250 および 500  $\mu$ g/kg) を 5 分後ごとに漸増

的にカニューレから投与することによって得られる気道抵抗の用量反応曲線の曲線下面積 (AUC) を測定し、気道過敏性の指標とした。

#### 2.3.4 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の回収と細胞分類法

気道反応性の測定後、気道にカニューレを連結し、5 mlのシリンジを用いて5 mlの生理食塩水を3度注入と吸引を繰り返して気道内腔の洗浄を行い、BALFを回収した。BALFはTürk液 (和光純薬、Osaka、Japan) によって染色を行い、顕微鏡下で総細胞数を計測した。さらに、BALFを生理食塩水で $1 \times 10^6$  cells/mlになるよう調整し、Cytospin 3を用いて塗沫標本を作成した。塗沫標本はMay-Grünwald Gimusa染色 (Merck & Co. Inc., Darmstadt, Germany) で染色した後、顕微鏡下で細胞200個中のマクロファージおよび単球、好中球、好酸球、リンパ球の数から各炎症性細胞の比率を計測し、総細胞数との乗算により各炎症性細胞数を算出した。

#### 2.3.5 BALF 中の mucin 量の測定

気道における粘液分泌量の指標として enzyme-linked lectin assay 法により BALF 中の mucin 量の測定を行った。96 穴プレート (Immulon IV、Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) に BALF サンプルあるいは mucin の standard 溶液を入れ、37 °C で 2 時間インキュベートした。0.05% Tween 20 を含む PBS 溶液でプレートを洗浄した後、Block-Ace (大日本製薬、Osaka、Japan) を入れ、37 °C で 30 分間インキュベートした。洗浄後、2.5 µg/ml のビオチン化 Jacalin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) PBS 溶液を入れ、37 °C で 1 時間インキュベートした。さらにプレート洗浄後、PBS で 1,000 倍希釈した streptavidin-conjugated alkaline phosphatase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。洗浄後、p-nitrophenyl phosphate 溶液 (Sigma-Aldrich) を添加して発色反応を行った。3 N NaOH で発色反応を停止し、405 nm の波長における吸光度を吸光光度計で測定した。

### 2.3.6 Real-time 定量 PCR による肺組織中サイトカインおよびケモカイン mRNA の測定

最終抗原暴露の 6 時間後、ラットの肺左葉を摘出して即座に液体窒素で凍結し、RNA 抽出まで凍結保存した。肺の total RNA 抽出は TRIzol Reagent (Invitrogen, CA, USA) および RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて行った。cDNA 合成には SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) を用いた。Real-time 定量 RT-PCR は ABI PRISM 7000 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) により SYBR Premix ExTaq (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて 95 °C、10 分間、続いて 95 °C、5 秒間および 60 °C、34 秒間を 40 サイクル繰り返して mRNA の増幅を行った。各遺伝子発現の結果は、内因性標準遺伝子である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の発現量で補正した後、陰性対照群における遺伝子発現の平均値に対する相対発現比で表した。本試験で用いた各遺伝子特異的プライマーを Table 5 に示す。

**Table 5 Gene-specific primers for real-time quantitative RT-PCR**

Gene	Forward	Reverse
IL-4	5'-TGCACCGAGATGTTTGTACCAGA-3'	5'-TTGCGAAGCACCCCTGGAAG-3'
IFN- $\gamma$	5'-AGGCCATCAGCAACAACATAAGTG-3'	5'-GCTAGATTCTGGTGACAGCTGGTG-3'
CCL11	5'-TGCTGCTTTACCATGACCAGTAAGA-3'	5'-TCCAGGTGCTTTGTGGCATC-3'
IL-1 $\beta$	5'-GCTGTGGCAGCTACCTATGTCTTG-3'	5'-AGGTGTCATCATCCCACGAG-3'
IL-6	5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3'	5'-GTGCATCATCGCTGTTTCATACAATC-3'
CXCL1	5'-AGGCTTGCCTTGACCCTGAA-3'	5'-ACGCCATCGGTGCAATCTATC-3'
GAPDH	5'-GACAACCTTGGCATCGTGGA-3'	5'-ATGCAGGGATGATGTTCTGG-3'

### 2.3.7 組織標本の作製

最終抗原暴露の 6 時間後、ラットを sodium pentobarbital による麻酔下で PBS による心臓還流の後に 4%の paraformaldehyde を含む PBS 溶液を還流して固定した。肺を摘出後、さらに 16 時間、4%の paraformaldehyde を含む PBS 溶液に浸して固定した。その後、パラフィン包埋し

て薄切切片を作成した。すべての操作において組織中 mRNA の分解を防ぐため、diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水を用いた。

### 2.3.8 In situ hybridization (ISH)

Anti-sens および sens cRNA プローブは、ヒト脳の QUICK-Clone cDNA (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA) から増幅したラットのプロスタノイド DP 受容体の 399 bp から成る cDNA フラグメント (60-458, GenBank NM\_022241) を用い、DIG RNA Labeling Kit (Roshe Diagnostics, Basel, Switzerland) によって合成した。前項において作製した組織標本を脱パラフィン後、PBS で洗浄し、4  $\mu\text{g/ml}$  の proteinase K (Roshe Diagnostics) と 37 °C、10 分間インキュベートして膜透過処理した。Hybridization には以前に報告された方法<sup>75)</sup>を用いた。すなわち、膜透過処理した組織標本を DIG 標識された cRNA プローブで hybridize した。未標識の cRNA プローブは RNase によって分解した。Hybridization 後、家兔血清で blocking を行い、続いて anti-DIG sheep polyclonal 抗体 (Roshe Diagnostics) と共にインキュベートした。染色は Vectastain Elite ABC Peroxidase Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて行った。組織標本の対比染色には Mayer's Hematoxylin を用いた。さらに、細胞種の同定のために、マクロファージおよび単球特異的抗体である horseradish peroxidase (HRP) 結合 ED-1 抗体と DAB (3,3'-Diamino Benzidine) 基質 (Roshe Diagnostics) を用いた免疫組織学的染色を行い、chromotrope 2R による化学組織染色によって好酸球染色を行った。

### 2.3.9 ヒト肺組織の免疫組織染色

ヒト肺組織のプロスタノイド DP 受容体の発現解析を行う目的で、2 人の喘息患者 (19 歳男性 および 79 歳女性) と 2 人の非喘息患者 (共に 75 歳女性) の組織を Asterand Plc. (Royston, UK) からパラフィン包埋ブロックの状態で購入した。これらの組織から薄切切片を作成し、脱パラフィン後、抗ラットプロスタノイド DP 受容体マウスモノクローナル抗体 (自社製) を反応させ、抗マウスビオチン化抗体、HRP-conjugated streptavidin および diaminobenzidine (DAB)

を用いてプロスタノイド DP 受容体陽性細胞を染色した。核の対比染色には 1.5% methyl green (Merck & Co. Inc.) を用いた。また、肺組織全体像の確認には、hematoxylin & eosin (H&E) 染色を行った。

#### 2.3.10 統計解析

成績は平均値±標準誤差で表した。有意差検定は、2 群間の比較には Student's *t*-test あるいは Welch's *t*-test を用い、多群間比較には Dunnett's test を用いて行った。

### 3. 実験成績

#### 3.1 Acetylcholine による気道過敏性に対するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用

抗原の繰り返し暴露は、生理食塩水の暴露と比較して acetylcholine に対する気道反応性の有意な亢進を誘発した。プロスタノイド DP 受容体拮抗薬である S-5751 (10 mg/kg および 100 mg/kg) および pinagladin (100 mg/kg) は抗原誘発気道過敏性を有意に抑制した (Fig. 11A および B)。また、prednisolone 3 mg/kg も抗原誘発気道過敏性を有意に抑制した (Fig. 11C)。

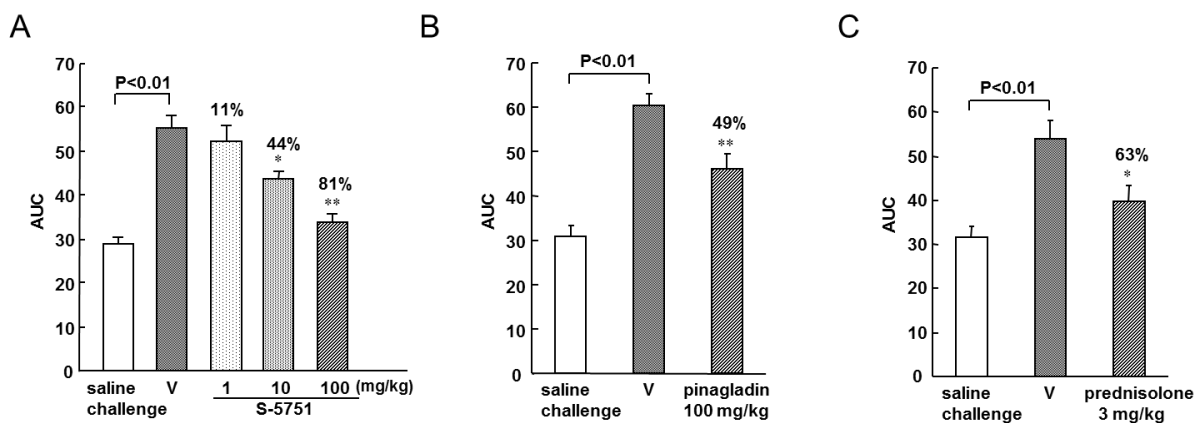
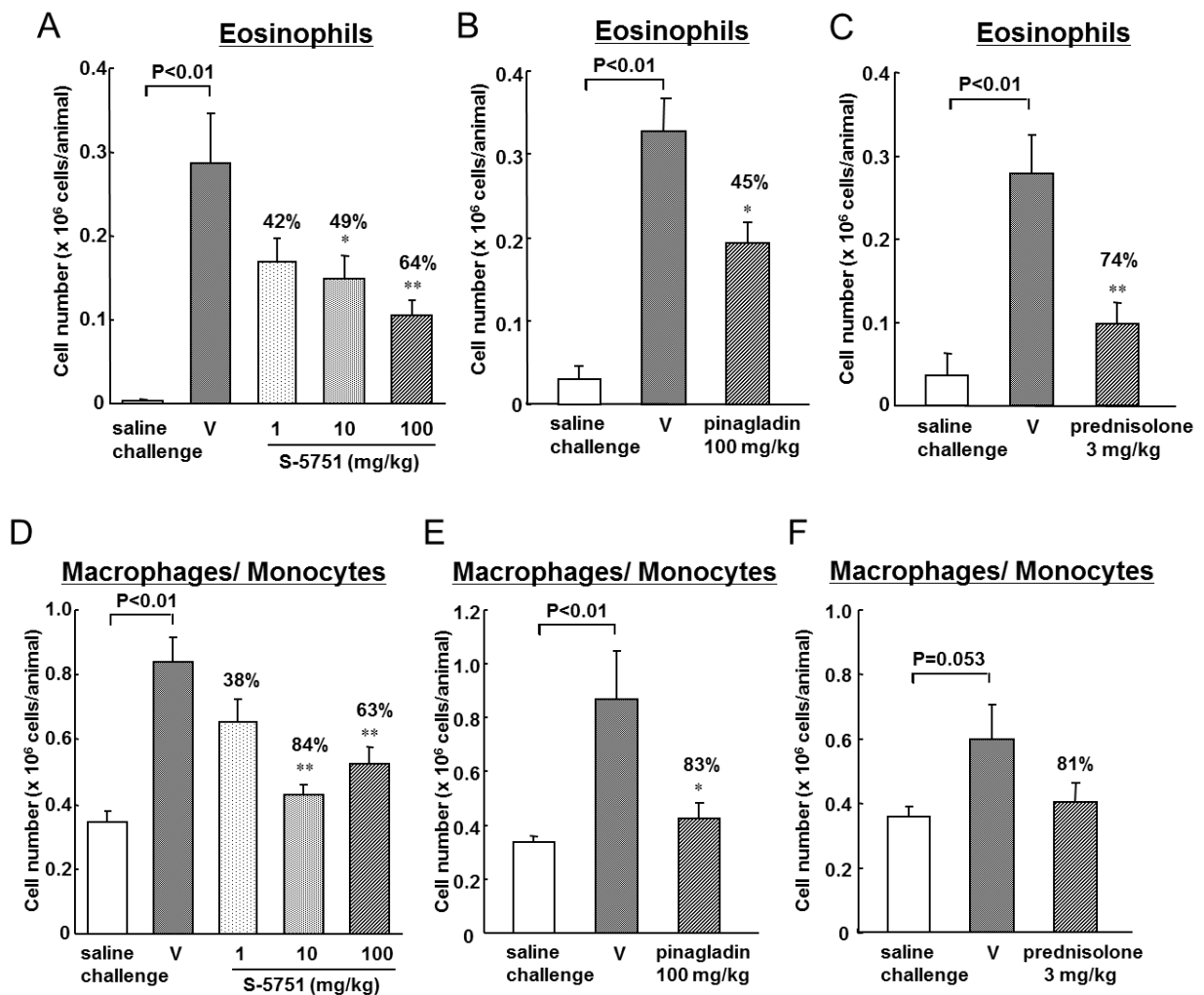


Fig. 11 Effects of prostanoid DP receptor antagonists and prednisolone on bronchial hyperresponsiveness to acetylcholine in a rat asthma model

The bronchial hyperresponsiveness was measured 24 h after the last challenge and was expressed as the AUC. S-5751 (A) and pinagladin (B) were administered orally three times a day for 8 days. Prednisolone (C) was administered orally once a day for 8 days. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 8 animals (S-5751), 5 (saline group)- 7 animals (pinagladin) and 9 (saline group)- 10 animals (prednisolone). V: vehicle control. \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  for each drug-treated group vs. vehicle-treated group (Dunnett's test, A, Welch's  $t$ -test, B and C).

### 3.2 抗原誘発炎症性細胞浸潤に対するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用

抗原の繰り返し暴露により、BALF 中の好酸球、マクロファージ・単球および好中球数は生理食塩水暴露と比較して有意に増加した。BALF 中の好中球数は好酸球数の約 10 倍であった (Fig. 12)。S-5751 は 10 mg/kg の経口投与によって BALF 中の好酸球およびマクロファージ・単球の増加を有意に抑制し、100 mg/kg の投与によって、好酸球、好中球およびマクロファージ・単球の増加を有意に抑制した (Fig. 12A、D および G)。また、pinagladin 100 mg/kg の経口投与も同様に、BALF 中の好酸球、好中球およびマクロファージ・単球の増加を有意に抑制した (Fig. 12B、E および H)。一方、prednisolone 3 mg/kg は BALF 中の好酸球の増加を有意に抑制したが、好中球の増加を抑制しなかった (Fig. 12C および I)。なお、prednisolone は BALF 中のマクロファージ・単球の増加に対しては、抑制傾向を示した (Fig. 12F)。



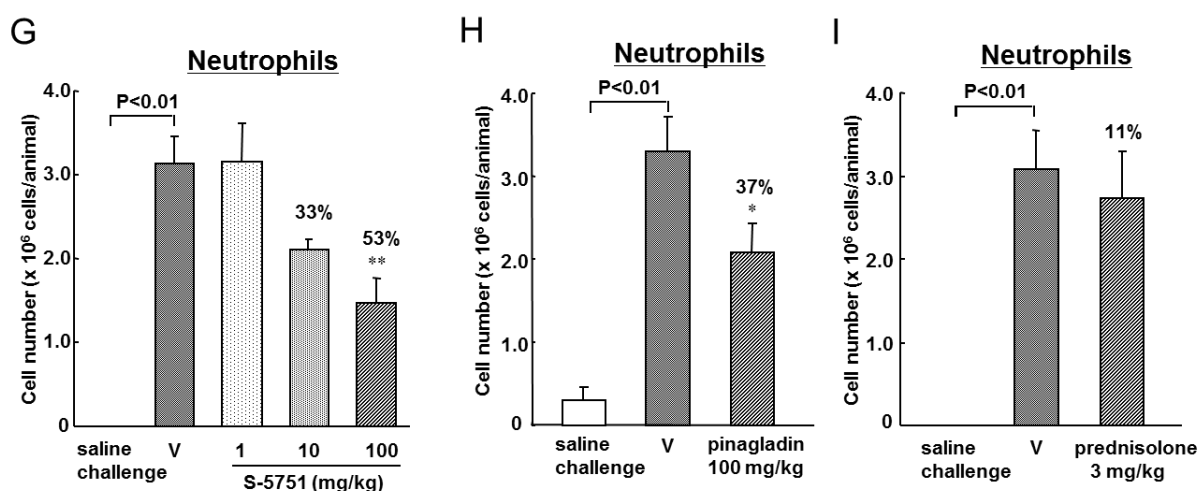


Fig. 12 Effects of prostanoid DP receptor antagonists and prednisolone on infiltration of inflammatory cells in lung in a rat asthma model

The bronchial alveolar lavage fluids were collected 24 h after the last challenge. The number of various cells in bronchial alveolar lavage fluids was microscopically counted. S-5751 (A, D and G) and pinagladin (B, E and H) were administered orally three times a day for 8 days. Prednisolone (C, F and I) was administered orally once a day for 8 days. Number of eosinophils (A, B and C), macrophages/monocytes (D, E and F), and neutrophils (G, H and I) is shown. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 8 animals (S-5751), 5 (saline group)- 7 animals (pinagladin), and 9 (saline group)- 10 animals (prednisolone). V: vehicle control. \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  for each drug-treated group vs. vehicle-treated group (Dunnett's test, A, D and G, Welch's  $t$ -test, B, C, E, F, H and I).



### 3.3 気道における粘液分泌に対するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の作用

抗原の繰り返し暴露により、BALF 中の mucin 量は生理食塩水暴露と比較して有意に増加した (Fig. 13A、B および C)。Fig. 13A および B に示すように、S-5751 (10 mg/kg および 100 mg/kg) および pinagladin (100 mg/kg) は BALF 中の mucin 量の増加を有意に抑制した。一方、3 mg/kg の prednisolone は BALF 中の mucin の増加を抑制しなかった (Fig. 13C)。

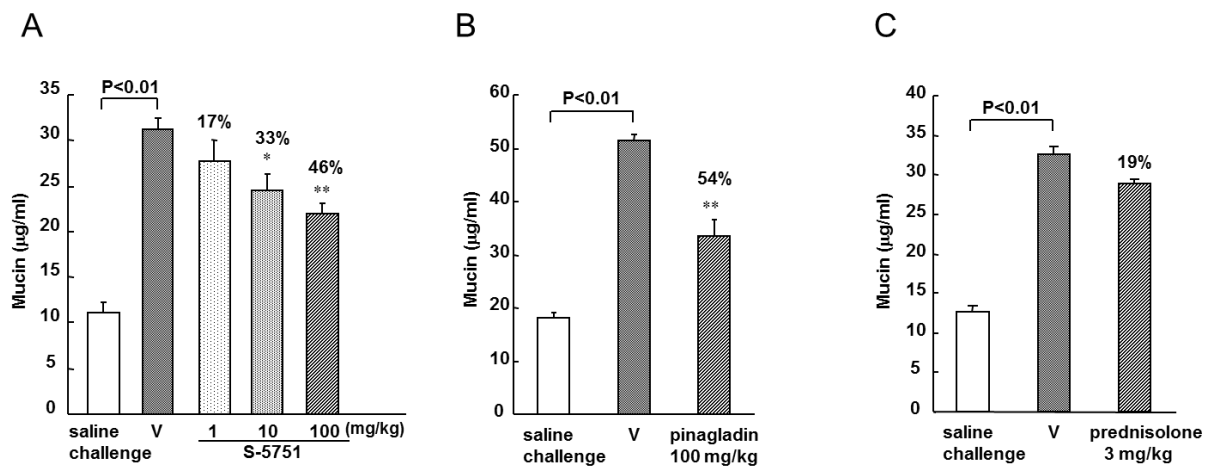


Fig. 13 Effects of prostanoid DP receptor antagonists and prednisolone on mucus secretion in lung in a rat asthma model

The bronchial alveolar lavage fluids were collected 24 h after the last challenge. The volume of mucin in bronchial alveolar lavage fluids was measured by enzyme linked assay system. S-5751 (A) and pinagladin (B) were administered orally three times a day for 8 days. Prednisolone (C) was administered orally once a day for 8 days. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 8 animals (S-5751), 5 (saline group) - 7 animals (pinagladin), and 5 animals (prednisolone). V: vehicle control. \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  for each drug-treated group vs. vehicle-treated group (Dunnett's test or Welch's  $t$  test).

### 3.4 抗原暴露による肺のサイトカインおよびケモカイン mRNA 発現亢進に対する DP 受容体拮抗薬の作用

抗原の繰り返し暴露により、肺の interleukin (IL) -4、interferon (IFN)  $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、CCL (CC Chemokine Ligand) 11 (eotaxin) および CXCL (CXC Chemokine Ligand) 1 (GRO- $\alpha$ ) mRNA の発現は生理食塩水暴露群と比較して有意に亢進した (Fig. 14)。3 mg/kg の prednisolone は IL-4 および CCL11 mRNA の発現亢進を有意に抑制したが、100 mg/kg の pinagladin は抑制しなかった (Fig. 14A および C)。一方、100 mg/kg の pinagladin は IL-1 $\beta$ 、IL-6 および CXCL1 mRNA の発現亢進を有意に抑制したが、prednisolone はこれらの発現亢進を抑制しなかった (Fig. 14D、E および F)。IFN- $\gamma$  mRNA の発現亢進はいずれの薬物によっても抑制されなかった (Fig. 14B)。

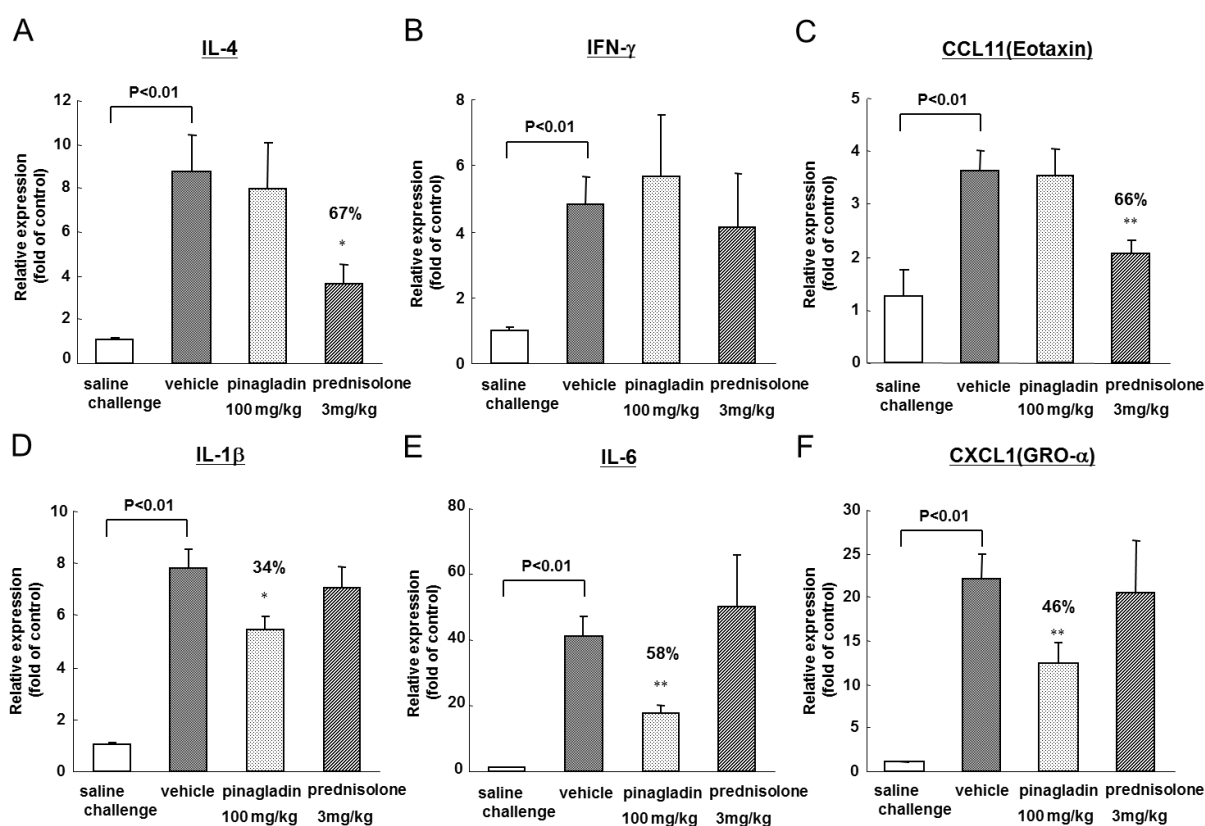


Fig. 14 Effects of pinagladin and prednisolone on production of cytokine and chemokine mRNA in lungs from a rat asthma model

The lung specimens were isolated 6 h after the last challenge. Cytokine and chemokine mRNA was detected by a real-time PCR system. Pinagladin was administered orally three times a day for 8 days. Prednisolone was administered orally once a day for 8 days. Data of IL-4 (A), IFN- $\gamma$  (B), CCL11 (C), IL-1 $\beta$  (D), IL-6 (E) and CXCL1 (F) are shown. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 4 animals. \*,  $p < 0.05$  and \*\*,  $p < 0.01$  for each drug-treated group vs. vehicle-treated group (Welch's  $t$ -test).

### 3.5 ラットの肺におけるプロスタノイド DP 受容体の発現解析

ラットの肺におけるプロスタノイド DP 受容体 mRNA の局在を ISH にて検討した。生理食塩水暴露群においてはプロスタノイド受容体 mRNA の発現はほとんど観察されなかった (Fig. 15A) が、抗原暴露群においては血管および細気管支周辺に局在する浸潤細胞にプロスタノイド DP 受容体の発現が認められた (Fig. 15B)。つぎに、プロスタノイド DP 受容体の ISH 染色と免疫組織染色あるいは化学組織染色の共染色により、プロスタノイド DP 受容体発現細胞の同定を試みた。その結果、プロスタノイド DP 受容体の発現細胞の 86%は ED-1 陽性のマクロファージあるいは単球であった (Fig. 15C)。また、4.9%は chromotrope 2R 陽性の好酸球であった (Fig. 15D)。一方、ED-1 陽性細胞に占めるプロスタノイド DP 受容体陽性細胞の割合は 18.2%、chromotrope 2R 陽性細胞に占めるプロスタノイド DP 受容体陽性細胞の割合は 1.6%であった。

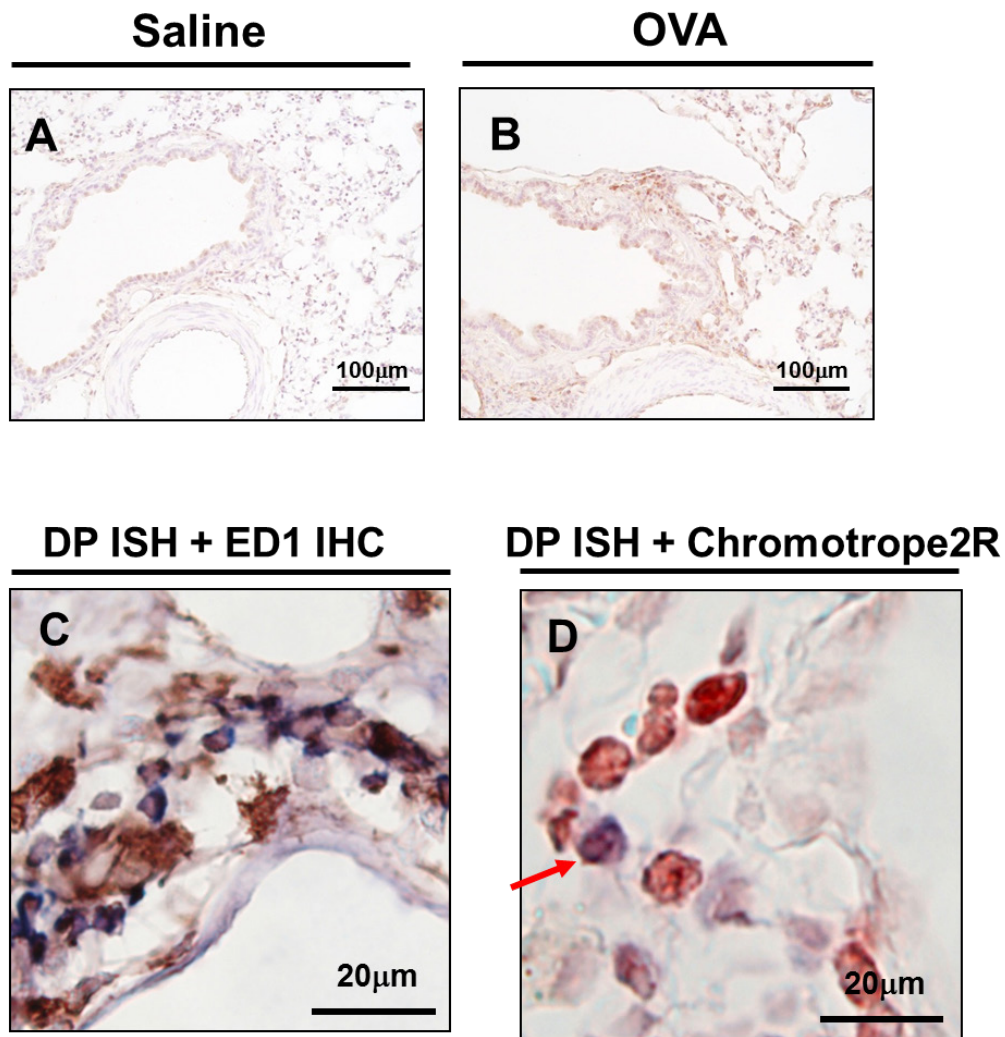


Fig. 15 Rat prostanoid DP receptor mRNA expression in the lung of ovalbumin-induced asthma model and identification of rat prostanoid DP receptor mRNA expressing cells  
 Prostanoid DP receptor mRNA was detected by in situ hybridization (ISH). Representative lung images were obtained by applying antisense probe from three ovalbumin-exposed rats (B) and three normal control rats treated with saline (A). The dark-brownish color signals developed with diaminobenzidine show prostanoid DP receptor mRNA. To identify the type of cells expressing prostanoid DP receptor mRNA, ISH/IHC (immunohistochemistry) double staining or ISH/chromotrope 2R histochemistry were performed. The dark-blue color signals developed with NBT (4-nitro-blue tetrazolium chloride) /BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) were prostanoid DP receptor mRNA, and dark-brownish color signals developed with DAB (3,3'-Diamino Benzidine) substrate were macrophage/monocyte positive for ED-1 antibody IHC (C) or eosinophils positive for chromotrope 2R histochemistry (D). Arrows indicate a typical double-positive cell with both the prostanoid DP receptor ISH and chromotrope 2R histochemistry.

### 3.6 喘息患者の肺におけるプロスタノイド DP 受容体の発現解析

ラットと同様にヒト肺におけるプロスタノイド DP 受容体の発現解析を行った。まず、H&E 染色により、健常肺と喘息肺の組織形態を検討したところ、喘息患者肺の細気管支周囲に明らかな気道狭窄、気道下組織の肥厚および炎症性細胞の浸潤が認められた (Fig. 16A および D)。また、喘息患者の肺実質においても組織の肥厚と炎症性細胞の浸潤が認められた (Fig. 16B および E)。プロスタノイド DP 受容体は喘息患者肺の気管支周囲 (成績には示さない) および肺実質 (Fig. 16F) に浸潤した炎症性細胞において観察されたが、健常肺においては全く観察されなかった (Fig. 16C)。形態的特徴からほとんどのプロスタノイド DP 受容体陽性細胞はマクロファージあるいは単球様細胞であった (Fig. 16F)。もう 1 名の喘息患者の肺組織におけるプロスタノイド DP 受容体の発現パターンもほぼ同様であった (成績には示さない)。

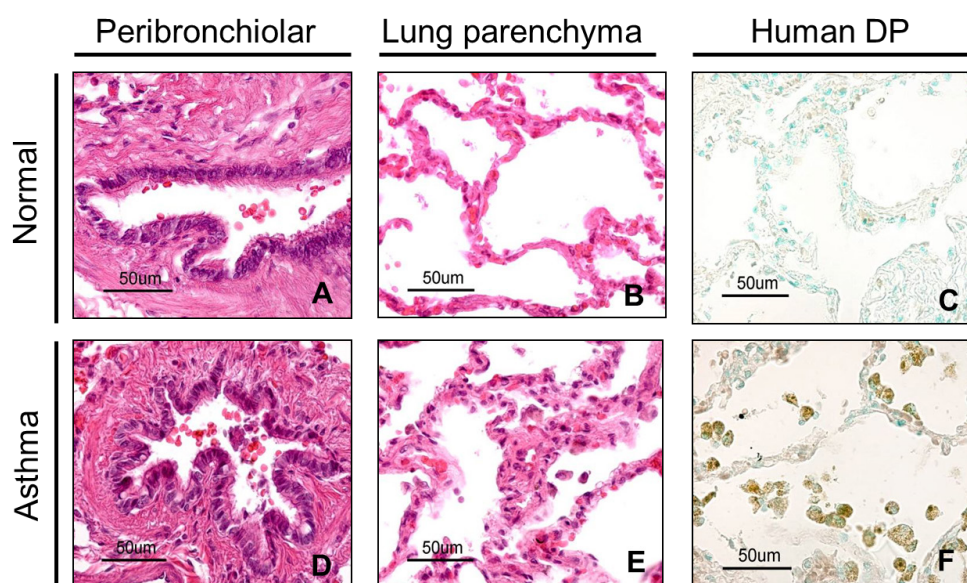


Fig. 16 Morphopathology/prostanoid DP receptor immunohistochemistry in human asthmatic lung

Peribronchiolar and parenchyma in normal (A and B) and asthmatic lungs (D and E) were stained by H&E. The lung tissues in normal (C) and asthmatic (F) were also immunostained with anti-prostanoid DP receptor monoclonal antibody. The positive signals were detected as diaminobenzidine deposits of dark-brownish color, and the nuclei were counterstained with methyl green. Bar indicates 50  $\mu$ m.

#### 4. 考察

本章では、ラットの実験的喘息モデルを用いてプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の抗喘息作用を、prednisolone のそれと比較検討した。本モデルにおいて、抗原暴露後、好酸球の浸潤が有意に増加したが、好中球の浸潤はより顕著に認められた。さらに、肺における IL-4 および CCL11 のような Th2 サイトカインおよびケモカイン mRNA のみならず、IL-1 $\beta$ 、IL-6 および CXCL1 のような炎症性サイトカインおよびケモカイン mRNA の発現増加も認められた。このような病態像は、臨床における重症の慢性喘息や喘息の急性増悪期のような活動性の病態に類似する<sup>76,77)</sup>。ステロイドは、臨床的に気道過敏性<sup>78,79)</sup>、好酸球および T 細胞<sup>69)</sup> の浸潤、Th2 サイトカイン産生<sup>69)</sup> および好酸球の生存<sup>80)</sup> を抑制するが、好中球浸潤に対しては効果を示さない<sup>81)</sup> ことが報告されている。本検討においても、prednisolone の経口投与は気道反応性の亢進、気道への好酸球浸潤、肺における IL-4 および CCL11 mRNA の発現増加を有意に抑制したが、気道への好中球浸潤をほとんど抑制しなかった。したがって、治療薬の薬効プロファイルの観点からも本モデルは臨床病態像に類似する。一方、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は気道過敏性および気道への好酸球浸潤を用量依存的かつ有意に抑制し、100 mg/kg の S-5751 および pinagladin は prednisolone 3 mg/kg とほぼ同程度の抑制効果を示した。これらの結果は、Matsuoka らのプロスタノイド DP 受容体欠損マウスを用いた試験結果<sup>40)</sup> と一致する。さらに、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は prednisolone とは異なり、好中球の浸潤を有意に抑制した。この結果は、第 3 章におけるヒツジの実験的喘息モデルを用いた検討の結果と一致している。

気管支喘息における好酸球の関与は多数報告されている<sup>82)</sup> が、気管支喘息への好中球の関与は明確となっていない。しかしながら、慢性喘息において、好酸球および好中球の増加は気道閉塞の指標である forced expiratory volume in 1 second (FEV<sub>1</sub>) の低下とそれぞれ独立した相関関係を有することが報告されている<sup>75,81)</sup>。また、Little らは、ステロイド治療によって改善されなかった気道閉塞が気道の好中球浸潤の程度と相関することを示している<sup>81)</sup>。これらの結果から、第 3 章および本章で示したプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の気道好中球浸潤抑制作用は、抗原

誘発気道閉塞の抑制に少なくとも部分的に関与していると考えられる。ステロイドと異なるこれらの薬効プロファイルは、新たな治療薬を提供する可能性を示している。

本検討において、気道の粘液分泌もプロスタノイド DP 受容体拮抗薬によって用量依存的かつ有意に抑制されたが、ステロイドではほとんど抑制されなかった。気道粘液の過剰分泌は慢性喘息や致死性の喘息のようなコントロールの困難な喘息患者に観察され、粘液栓が気道閉塞や気道過敏性の原因となることが報告されている<sup>83)</sup>。したがって、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬がステロイドとは異なる薬効プロファイルを有していることが明らかであり、喘息治療に有用な特徴を有していると考えられる。

本検討において、ラットの実験的喘息モデルおよび喘息患者におけるプロスタノイド DP 受容体発現細胞の大部分は浸潤マクロファージや単球であった。マクロファージや単球は IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインおよびケモカインの産生細胞である。今回の検討において、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は prednisolone とは異なり、Th2 サイトカインおよび CCL11 (eotaxin) mRNA 発現を抑制しなかったが、IL-1 $\beta$ 、IL-6 および CXCL1 mRNA 発現を抑制した。CXCL1 は強力な好中球遊走因子として知られている。また、doxycycline の投与によって肺特異的に IL-1 $\beta$ を過剰発現するトランスジェニックマウスは好中球とマクロファージ浸潤を伴う肺の炎症を発現し、粘液分泌も増大する<sup>84)</sup>。IL-6 もマウスの実験的喘息モデルで喘息における症状発現に関与することが報告されている<sup>85)</sup>。したがって、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は、マクロファージや単球によるこれらの炎症性サイトカインおよびケモカインの産生を抑制することによって抗喘息作用の一部を発現する可能性が示唆される。本検討では、一部の好酸球にもプロスタノイド DP 受容体の発現を確認した。Gervais らは PGD<sub>2</sub> のプロスタノイド DP 受容体を介した作用により、好酸球の自発的なアポトーシスが抑制され、好酸球が生存延長することを報告した<sup>41)</sup>。我々の予備検討においても、プロスタノイド DP 受容体刺激薬である BW245C による好酸球の生存延長が、S-5751 の処置によって完全に抑制されることを確認している（未公表の成績）。これらの結果から、本検討におけるプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の気道への好酸球浸



潤抑制のメカニズムの少なくとも一部に、好酸球生存延長の抑制作用が関与している可能性が示唆される。

本検討において、prednisolone はマクロファージおよび単球の浸潤を部分的に抑制したにもかかわらず、肺における IL-1 $\beta$ 、IL-6 および CXCL1 の発現を抑制しなかった。したがって、マクロファージおよび単球の浸潤抑制作用において prednisolone とプロスタノイド DP 受容体拮抗薬は異なったメカニズムを有していることが示唆される。

以上の成績から、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は prednisolone とは異なったメカニズムで種々の気道反応を抑制する可能性が示唆される。特にプロスタノイド DP 受容体拮抗薬に認められる好中球浸潤抑制、炎症性サイトカインおよびケモカイン産生抑制および粘液分泌抑制作用はステロイドでは発揮されないことから、本受容体拮抗薬はステロイドとは異なった治療価値を提供する可能性がある。ステロイドの代替薬あるいは組み合わせ投与によって相加的あるいは相乗的な作用を示す可能性が考えられる。

## 第5章 PGD<sub>2</sub>によるヒト単球系細胞株 THP-1 細胞からのメディエーター産生増強作用に対するプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響

### 1. 緒言

第3章および第4章のヒツジおよびラットの実験的喘息モデルを用いた検討において、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は気道へのマクロファージおよび単球の浸潤に対して強い抑制効果を示すことを示した。また、第4章においてヒトの喘息患者と実験的喘息モデルラットの肺におけるプロスタノイド DP 受容体発現細胞の大部分が浸潤マクロファージあるいは単球であることを示した。しかしながら、マクロファージや単球におけるプロスタノイド DP 受容体の役割は明らかとなっていない。マクロファージは単球が組織へ移行して分化した細胞であり、特に炎症時には単球が炎症局所へ浸潤し、種々の刺激を受けることでマクロファージに分化することが知られている。本章ではヒト単球系細胞株である THP-1 細胞を用い、種々のサイトカインおよびケモカインの産生に対するプロスタノイド DP 受容体の役割について検討した。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 薬物および試薬

プロスタノイド DP 受容体拮抗薬として pinagladin を使用した。また、PGD<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)、1-methyl-3-(2-methylpropyl)-7H-purine-2,6-dione (IBMX、Sigma-Aldrich)、ヒトリコンビナント tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  (Peprotech EC、Margravine、London、UK)、(4S)-(3-[(3R,S)-3-cyclohexyl-3-hydroxypropyl]-2,5-dioxo)-4-imidazolidineheptanoic acid (BW245C、Cayman Chemicals、Michigan、USA)、N-[2-(P-Bromocinnamylamino)-ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide (H89、和光純薬) および dibutyryl cyclic AMP (db-cAMP、Sigma-Aldrich) を使用した。

### 2.2 細胞培養

ヒト単球細胞株 THP-1 細胞は American Type Culture Collection から購入して使用した。細胞は培養メディウム (10% FCS、10 mM HEPES、1.0 mM ピルビン酸ナトリウム、0.05 mM 2-メルカプトエタノール、100 U/ml ペニシリンおよび 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI1640) 中 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養し、2~3 日ごとに継代を行った。

### 2.3 実験方法

#### 2.3.1 細胞の調整と刺激

THP-1 細胞を培養メディウムに浮遊させ、48 穴プレートに 4 x 10<sup>5</sup> cells/well となるように調整した。さらに、THP-1 を 10 ng/ml の TNF- $\alpha$  と種々の濃度の PGD<sub>2</sub> の共存下、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。培養上清を回収し、種々のサイトカインおよびケモカインの測定を行った。また、サイトカインおよびケモカインの産生に及ぼす薬物の影響を検討する試験においては、pinagladin または H89 による前処置を行った 10 分後、TNF- $\alpha$  と PGD<sub>2</sub>、BW245C あるいは db-cAMP の共刺激を行った。

### 2.3.2 THP-1 細胞のプロスタノイド DP 受容体を介した cAMP シグナル解析

THP-1 細胞の浮遊液を 37 °C に加温した後、0.5 mM の IBMX を添加し、5 分間インキュベートした。さらに、10 μM の pinagladin あるいはメEDIUM で処置し、10 分後に PGD<sub>2</sub> あるいは BW245C を添加した。10 分間インキュベートした後、1 N の HCl で反応を停止し、1.2% の Triton X で細胞を破碎した。上清を回収し、上清中の cAMP 濃度を cAMP femto 2 (Cisbio International) で測定した。

### 2.3.3 RT-PCR 法を用いた THP-1 細胞におけるプロスタノイド DP 受容体の発現検討

THP-1 細胞から TRIzol 試薬 (Invitrogen Life Technologies) を用いて total RNA の抽出を行った。cDNA は random hexamer プライマーと逆転写酵素として Superscript reverse transcriptase III (Invitrogen Life Technologies) を用いて合成した。合成された cDNA を Takara Ex Taq (Takara Bio) と各種プライマー (Table 6) を用いて以下の反応条件で増幅した。なお、プロスタノイド DP 受容体 mRNA 発現の陽性コントロールとしてプロスタノイド DP 受容体導入 pcDNA3.1+ベクターを同様の条件下で増幅した。

- ① 98 °C、1 分間を 1 サイクル
- ② 98 °C、10 秒間、58 °C、45 秒間、72 °C、1 分間を 40 サイクル (プロスタノイド DP 受容体) あるいは 30 サイクル (β-actin)
- ③ 72 °C、5 分間を 1 サイクル

**Table 6 Gene-specific primers for RT-PCR**

Gene	Forward	Reverse
prostanoid DP receptor	5'-CTGGCTGCCTACGCTCAGA-3'	5'-AGCCCAAAGAAGGACATGAAGA-3'
β-actin	5'-CACGGCATCGTCACCAACT-3'	5'-TGATCTGGGTTCATCTTCTCGC-3'

### 2.3.4 プロテインアレイによる THP-1 細胞からのサイトカインおよびケモカイン産生の網羅的解析

2.3.1 項で示した方法で回収した培養上清中の IL-1 $\beta$ 、IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17、eotaxin、fibroblast growth factor (FGF) basic、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、IFN- $\gamma$ 、interferon gamma-induced protein 10 (IP-10)、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)、macrophage inflammatory protein (MIP) -1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、platelet-derived growth factor-bb (PDGF-bb)、regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES)、TNF- $\alpha$ およびvascular endothelial growth factor (VEGF) は、Bio-Plex Multiplex Human Cytokine 27-plex Assay Kit および Cytokine Reagent kit (Bio-rad Laboratories) を用い、Bio-Plex Suspension Array System (Bio-rad Laboratories) で定量した。なお、上記測定項目のうち TNF- $\alpha$ については細胞の刺激因子として使用しており、上清中に外因性 TNF- $\alpha$ が含まれるため、結果から除外した。

### 2.3.5 ELISA による MCP-1 および IL-8 測定

2.3.1 項で示した方法で回収した培養上清中の MCP-1 および IL-8 量は ELISA kit (R&D systems) を用いて測定した。

### 2.3.6 統計解析

成績は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。有意差検定は、2 群間比較には Student's *t*-test あるいは Welch's *t*-test を用い、多群間比較には Dunnett's test を用いて行った。

### 3. 実験成績

#### 3.1 THP-1 細胞におけるプロスタノイド DP 受容体の発現および機能解析

THP-1 細胞におけるプロスタノイド DP 受容体の存在を確認する目的で、プロスタノイド DP 受容体 mRNA 発現解析と PGD<sub>2</sub> 刺激による細胞内シグナルの変化について検討を行った。THP-1 細胞には程度は弱いプロスタノイド DP 受容体 mRNA の発現が認められた (Fig. 17A)。また、THP-1 細胞を PGD<sub>2</sub> で刺激すると有意な細胞内 cAMP の産生が認められ、その産生はプロスタノイド DP 受容体拮抗薬である pinagladin の前処置によって完全に抑制された (Fig. 17B)。さらに、プロスタノイド DP 受容体選択的刺激薬である BW245C の刺激によっても有意な cAMP 産生が認められ、pinagladin の前処置によって完全に抑制された (Fig. 17C、未投稿データ)。

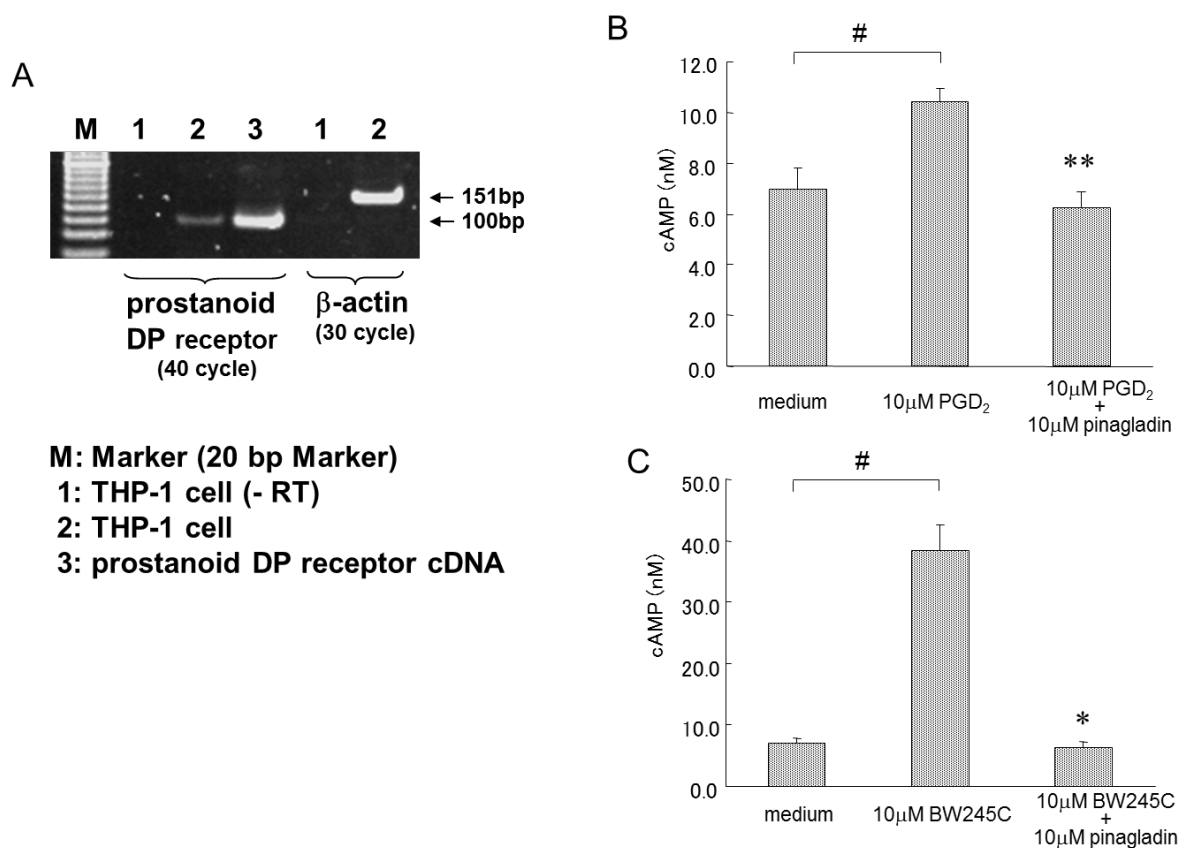
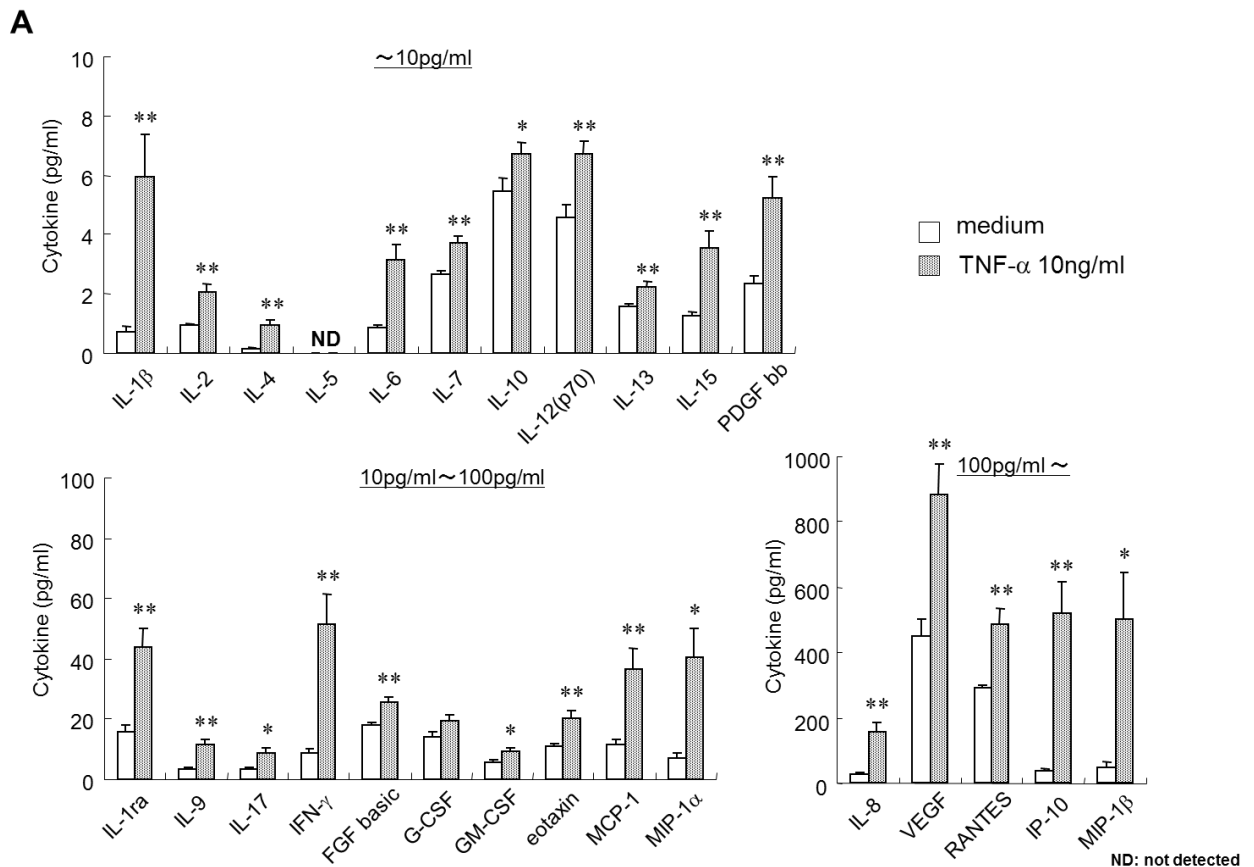


Fig. 17 Expression of mRNA and functional second signal for prostanoid DP receptor in THP-1 cells

Expression of prostanoid DP receptor mRNA in THP-1 cells was determined by RT-PCR (A) in the presence (lane 1) or absence (lane 2) of RT, using total RNA isolated from THP-1 cells. As a positive control, prostanoid DP receptor cDNA inserted into vectors was amplified by PCR (lane 3). Elevation of cAMP level after stimulation with PGD<sub>2</sub>, and its inhibition by pinagladin were determined (B). THP-1 cells were stimulated by 10 μM PGD<sub>2</sub> for 10 min with or without pre-treatment with 10 μM pinagladin. Each value represents means ± S.E.M. of three independent experiments. Significant differences were analyzed by Student's *t*-test. #, *p*<0.05 between vehicle-treatment and PGD<sub>2</sub>-treatment, \*, *p*<0.05 and \*\*, *p*<0.01 between with and without pre-treatment with pinagladin.

### 3.2 THP-1 細胞からのサイトカインおよびケモカイン産生におけるプロスタノイド DP 受容体の関与

THP-1 細胞を 10  $\mu$ M の PGD<sub>2</sub> および BW245C で 24 時間刺激し、サイトカインおよびケモカインが産生されるか否か検討した。26 種類のサイトカインおよびケモカインのいずれにも有意な産生は認められなかった (成績には示さない)。一方、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  で 24 時間刺激したところ、26 種類中 IL-5 および G-CSF を除く 24 種類のサイトカインおよびケモカインの有意な産生が認められた (Fig. 18A)。つぎに、TNF- $\alpha$  の存在下に PGD<sub>2</sub> あるいは BW245C で共刺激すると、26 種類中 IL-8 および MCP-1 のみ 200% 以上の明らかな産生増強が認められた (Fig. 18B)。





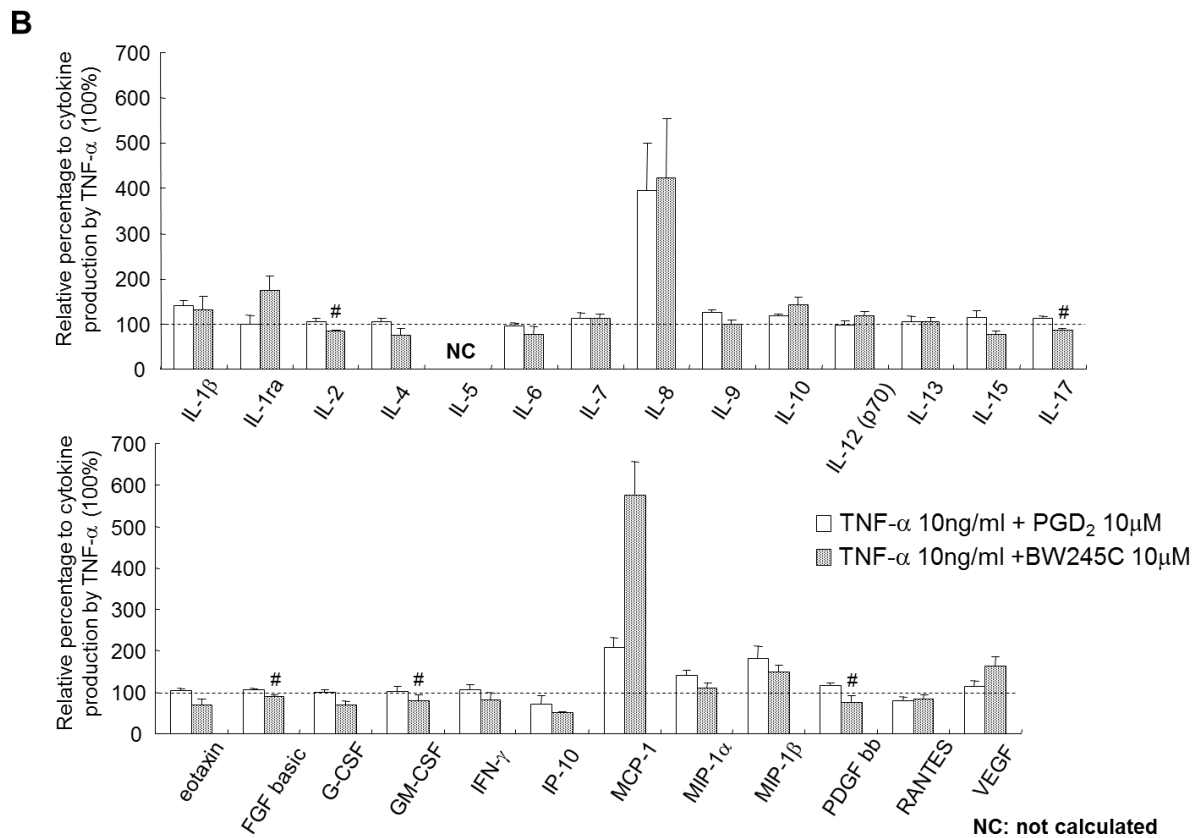


Fig. 18 Production profiles of cytokines and chemokines in THP-1 cells induced by TNF- $\alpha$  alone (A) and by costimulation with prostanoid DP activator and TNF- $\alpha$  (B)

THP-1 cells were stimulated by 10  $\mu$ M PGD<sub>2</sub> or 10  $\mu$ M BW245C in the presence of 10 ng/ml TNF- $\alpha$ . Cytokine and chemokine levels in the supernatants collected 24 h after each stimulation were measured using a Bioplex assay kit. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 8 (A) and 3-4 (B) independent experiments. #, the value was calculated from values of 2 independent experiments (B). Significant differences were analyzed by Student's *t*-test. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  between vehicle and TNF- $\alpha$ -treatment (A). The relative percentage of cytokine and chemokine production following control stimulation with TNF- $\alpha$  alone (expressed as 100% production,  $n = 3-4$ ) was represented (B).

### 3.3 PGD<sub>2</sub>による TNF- $\alpha$ 誘導 MCP-1 産生増強におけるプロスタノイド DP 受容体の関与

THP-1 細胞において PGD<sub>2</sub> の単独刺激による MCP-1 産生について検討したところ、30  $\mu$ M の PGD<sub>2</sub> 刺激においてわずかな MCP-1 産生の増加傾向が認められたものの有意ではなかった (Fig. 19A、小カラム)。一方、10 ng/ml の TNF- $\alpha$  の単独刺激では、有意な MCP-1 産生の増加が認められた。さらに、THP-1 細胞を TNF- $\alpha$  の存在下に種々の濃度の PGD<sub>2</sub> で共刺激したところ、3  $\mu$ M および 10  $\mu$ M の PGD<sub>2</sub> 刺激によって有意な MCP-1 産生の増強が認められた (Fig. 19A)。PGD<sub>2</sub> による MCP-1 産生増強作用の EC<sub>50</sub> 値は 2.69  $\mu$ M であった。つぎに、PGD<sub>2</sub> による MCP-1 産生増強作用がプロスタノイド DP 受容体依存的であるかどうか検討する目的で、pinagladin を用いた実験を行った。その結果、10 ng/ml の TNF- $\alpha$  存在下に 3  $\mu$ M の PGD<sub>2</sub> で共刺激すると MCP-1 産生が増強されるが、pinagladin の前処置によって濃度依存的かつ 10  $\mu$ M 以上の pinagladin の処置により完全に抑制された (Fig. 19B)。その IC<sub>50</sub> 値は 1.23  $\mu$ M であった。さらに、PGD<sub>2</sub> による MCP-1 産生の増強作用は、プロスタノイド受容体選択的の刺激薬である BW245C を用いても再現された。Pinagladin は BW245C による MCP-1 産生増強作用も濃度依存的かつ 30  $\mu$ M でほぼ完全に抑制し、IC<sub>50</sub> 値は 5.79  $\mu$ M であった (Fig. 19C および D)。

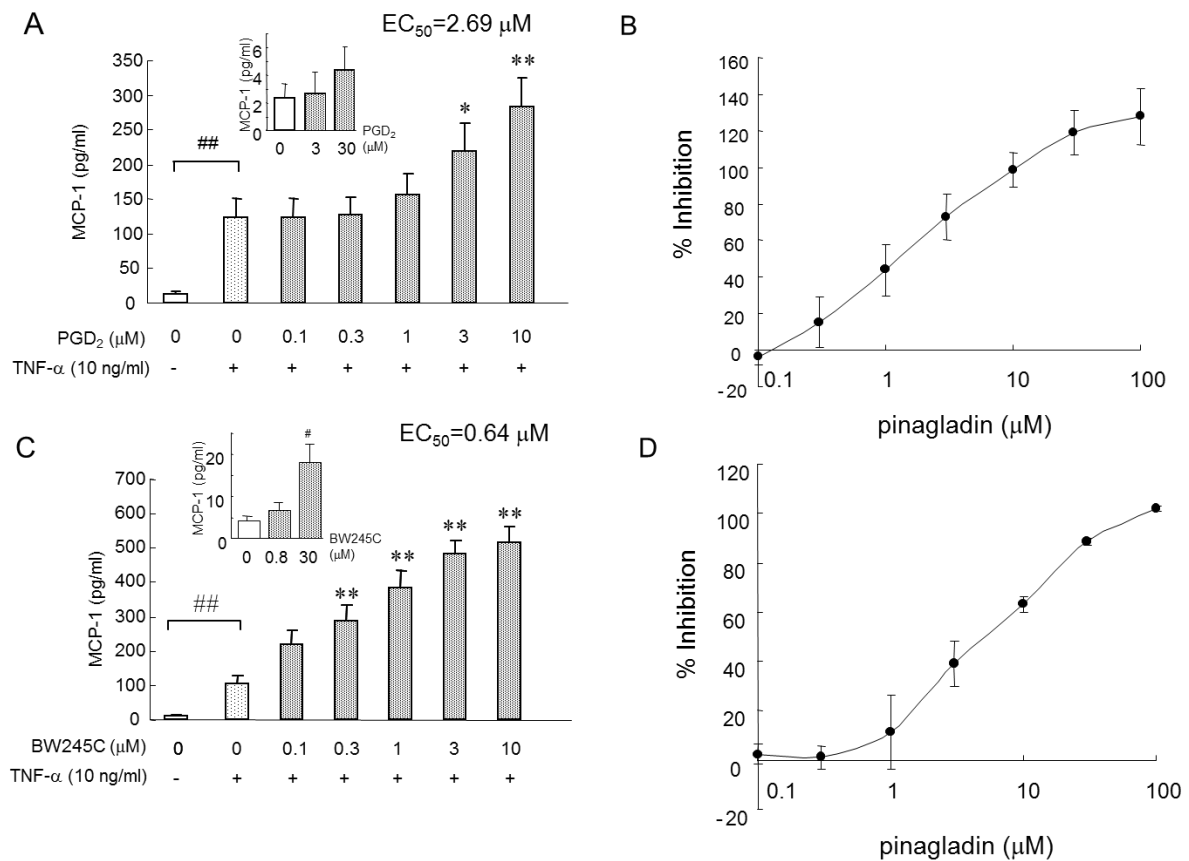


Fig. 19 Effects of PGD<sub>2</sub> (A) or BW245C (C) on TNF-α-induced MCP-1 production and inhibitory effects of pinagladin on the enhanced MCP-1 production by PGD<sub>2</sub> (B) or BW245C (D)

THP-1 cells were stimulated by various concentrations of PGD<sub>2</sub> and BW245C in the presence or absence of 10 ng/ml TNF-α (A and C). THP-1 cells pre-treated with various concentrations of pinagladin were stimulated by 10 ng/ml TNF-α and 3 μM PGD<sub>2</sub> (B) or 0.8 μM BW245C (D). MCP-1 levels in the supernatant collected 24 h after each stimulation were measured using ELISA. Each value represents the mean ± S.E.M. of 4-8 independent experiments (A and B, n=7-8, C, n=5, D, n=4). Significant differences between vehicle and TNF-α stimulation were analyzed by Student's *t*-test (##, *p*<0.01), and between TNF-α stimulation and combined stimulation with TNF-α and PGD<sub>2</sub> or BW245C were analyzed by Dunnett's test (\*, *p*<0.05, \*\*, *p*<0.01).

### 3.4 プロスタノイド DP 受容体を介した MCP-1 産生増強作用における cAMP および protein kinase A (PKA) シグナル経路の関与

THP-1 細胞のプロスタノイド DP 受容体を介した TNF- $\alpha$  誘導 MCP-1 産生の増強作用が、プロスタノイド DP 受容体のセカンドシグナルである cAMP およびその下流シグナルである PKA の活性化を介するかどうかを検討した。THP-1 細胞を TNF- $\alpha$  存在下に cAMP のアナログである db-cAMP で共刺激したところ、db-cAMP の濃度依存的に MCP-1 産生増強作用が認められ、100  $\mu$ M で有意な効果が認められた (Fig. 20A)。つぎに、本増強作用に対する PKA 阻害剤 H89 の作用について検討した結果、PGD<sub>2</sub> および BW245C のいずれのプロスタノイド DP 受容体刺激薬による MCP-1 産生の増強作用も H-89 によって濃度依存的かつ有意に抑制された (Fig. 20B および C)。

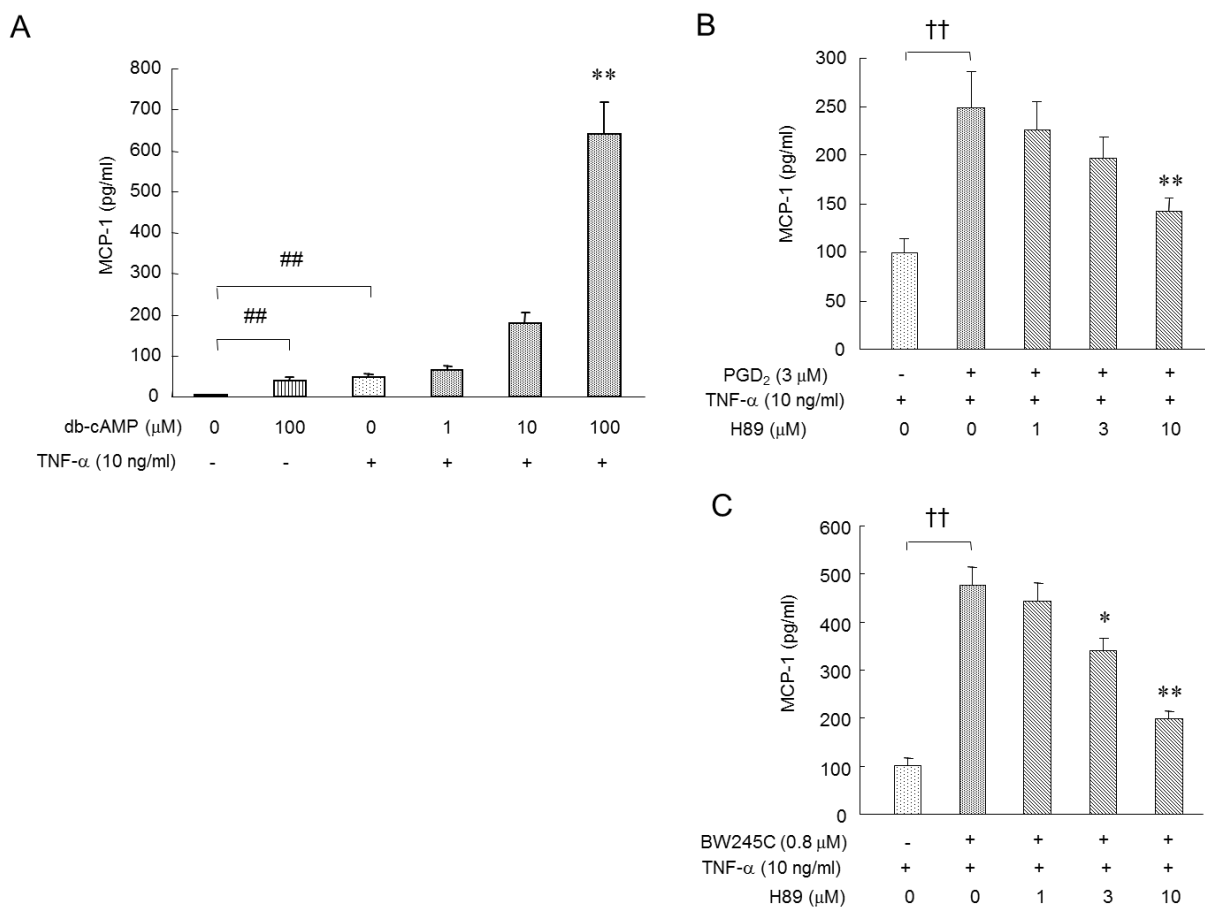


Fig. 20 Involvement of cAMP/PKA signaling in prostanoid DP receptor-dependent enhancement of MCP-1 production

THP-1 cells were stimulated by several concentrations of db-cAMP in the presence of 10 ng/ml TNF-α (A). The effect of H89 on TNF-α-induced MCP-1 production enhanced by PGD<sub>2</sub> (B) or BW245C (C) in THP-1 cells was examined. THP-1 cells pre-treated with various concentrations of H89 were stimulated with 10 ng/ml TNF-α and 3 μM PGD<sub>2</sub> (B) or 0.8 μM BW245C. MCP-1 levels in the supernatants collected 24 h after each stimulation were measured using ELISA. Each value represents the mean ± S.E.M. of 8 independent experiments (A, B and C). ##,  $p < 0.01$  between non-stimulated and TNF-α or db-cAMP single-stimulated group by Student's *t*-test, \*\*,  $p < 0.01$  vs. TNF-α single-stimulated group by Dunnett's test (A). ††,  $p < 0.01$  between TNF-α single-stimulated and TNF-α and PGD<sub>2</sub> (B) or BW245C (C) costimulated group by Student's *t*-test, \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  vs. TNF-α and PGD<sub>2</sub> (B) or BW245C (C) costimulated group by Dunnett's test (B and C).

### 3.5 PGD<sub>2</sub>による TNF- $\alpha$ 誘導 IL-8 産生の増強作用におけるプロスタノイド DP 受容体活性化シグナルの関与

THP-1 細胞の PGD<sub>2</sub>による TNF- $\alpha$ 誘導 IL-8 産生の増強作用においても、プロスタノイド DP 受容体を介して cAMP/PKA のシグナル経路が関与するか否かを検討した。Fig. 21A および C に示すように、PGD<sub>2</sub>による IL-8 産生増強作用は pinagladin および H89 によって有意に抑制された。また、TNF- $\alpha$ による IL-8 産生は db-cAMP の共刺激によって有意に増強された (Fig. 21B)。しかしながら、BW245C による TNF- $\alpha$ 誘導 IL-8 産生増強作用は 100  $\mu$ M の pinagladin により完全に抑制された (Fig. 21D) のに対し、PGD<sub>2</sub>による IL-8 産生増強作用に対する抑制作用は限定的であった (66.2%、Fig. 21A)。

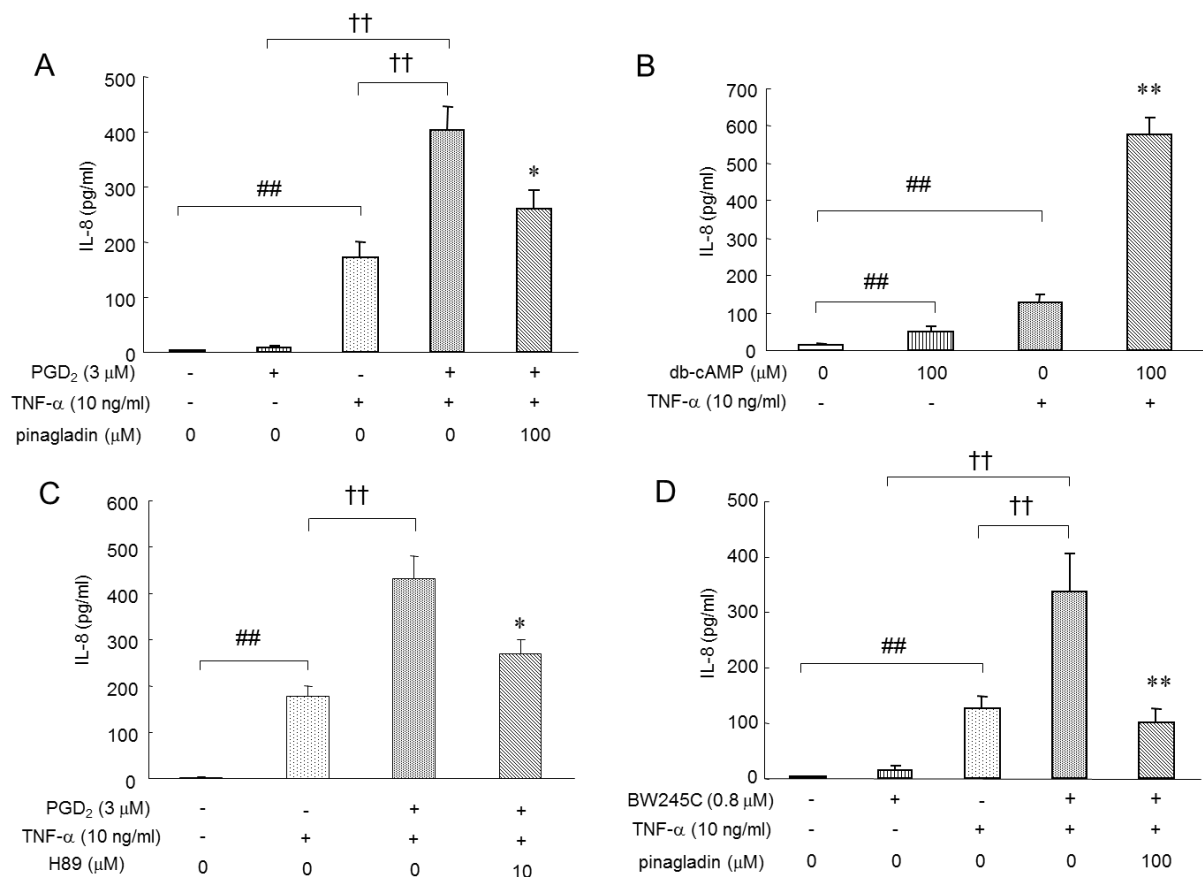


Fig. 21 Enhancement of IL-8 production by activation of prostanoid DP receptor

Three effect of pinagladin on TNF- $\alpha$ -induced IL-8 production enhanced by PGD<sub>2</sub> (A) or BW245C (D) was examined. THP-1 cells pre-treated by 100  $\mu$ M pinagladin were costimulated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  and 3  $\mu$ M PGD<sub>2</sub> (A) or 0.8  $\mu$ M BW245C (D). Involvement of cAMP and PKA in IL-8 production was also determined using db-cAMP (B) and H89 (C). THP-1 cells were stimulated by 100  $\mu$ M db-cAMP in the presence of 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (B). H89 at 10  $\mu$ M was pre-treated following stimulation with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  and 3  $\mu$ M PGD<sub>2</sub> (C). IL-8 levels in the supernatants collected 24h after each stimulation were measured using ELISA. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 4-8 independent experiments (A, n=4, B, n=8, C, n=7, D, n=8). Significant differences were analyzed by Student's *t*-test. ##,  $p < 0.01$  between vehicle stimulation and TNF- $\alpha$  (A, B, C and D) or db-cAMP (B) stimulation, ††,  $p < 0.01$  between single stimulation with TNF- $\alpha$  (A, C and D), PGD<sub>2</sub> (A) or BW245C (D) and combined stimulation with TNF- $\alpha$  and PGD<sub>2</sub> (A and C) or BW245C (D), \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$  vs. combined stimulation with TNF- $\alpha$  and PGD<sub>2</sub> (A and C) or BW245C (D), \*\*,  $P < 0.01$  vs. TNF- $\alpha$  alone (B).

#### 4. 考察

本章における検討では、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞がプロスタノイド DP 受容体 mRNA を発現していること、PGD<sub>2</sub> あるいはプロスタノイド DP 受容体の選択的刺激薬である BW245C の刺激によって受容体の下流シグナルである cAMP の上昇が誘導され、その反応が受容体拮抗薬である pinagladin によって完全に抑制されたことから、THP-1 細胞が機能的なプロスタノイド DP 受容体を発現していることが明らかとなった。

本検討において、THP-1細胞をPGD<sub>2</sub>あるいはBW245Cで刺激し、24時間後の上清中のサイトカインおよびケモカインについて検討したところ、いずれのサイトカインおよびケモカインの産生も認められなかった。そこで、TNF- $\alpha$ 刺激によって産生されるサイトカインおよびケモカインに対するプロスタノイドDP受容体の役割について検討した。TNF- $\alpha$ は強力な多機能炎症性サイトカインであり、炎症局所において肥満細胞、マクロファージなどの細胞から産生される。喘息<sup>86)</sup>、アレルギー性鼻炎<sup>87)</sup> などのアレルギー疾患、その他の様々な炎症性疾患の病態形成に重要な役割を演じることが知られている。また、炎症性細胞をTNF- $\alpha$ で刺激すると種々のサイトカインおよびケモカインが産生される<sup>88-91)</sup>。本検討においても、TNF- $\alpha$ 刺激により、THP-1細胞は検討した26種類中24種類のサイトカインおよびケモカインを産生した。興味深いことに、THP-1細胞をTNF- $\alpha$ の存在下でプロスタノイドDP受容体刺激薬と共刺激すると、TNF- $\alpha$ 刺激によって産生される24種類のサイトカインおよびケモカインのうち、MCP-1およびIL-8の産生のみが強く増強された。このうち、TNF- $\alpha$ によるMCP-1産生はPGD<sub>2</sub>あるいはBW245Cによって濃度依存的に増強され、その産生増強はpinagladinの前処置によって濃度依存的かつ完全に抑制された。さらに、このプロスタノイドDP受容体刺激薬によるTNF- $\alpha$ 誘導MCP-1産生増強作用は、TNF- $\alpha$ とcAMPのアナログであるdb-cAMPの共刺激によって再現され、PKA阻害剤であるH-89により有意に抑制されたことから、cAMP / PKAのシグナル経路を介して誘導されることが明らかとなった。また、TNF- $\alpha$ によるIL-8産生はBW245Cにより濃度依存的に増強され(成績には示さない)、その産生増強はpinagladinの前処置により完全に抑制された。しかし、PGD<sub>2</sub>によるIL-8産生増強は100  $\mu$ M



の高濃度のpinagladinの処置によっても完全には抑制されなかった。PGD<sub>2</sub>によるTNF- $\alpha$ 誘導IL-8の産生増強作用も、db-cAMPとTNF- $\alpha$ の共刺激によって再現され、H-89の前処置によって有意に抑制されたことから、プロスタノイドDP受容体を介したcAMP / PKA経路が関与していることは明らかである。一方、PGD<sub>2</sub>によるIL-8産生増強メカニズムにはプロスタノイドDP受容体非依存的な経路が存在する可能性も示唆される。実際、Chibaらは気道上皮細胞において、PGD<sub>2</sub>の刺激がCRTH2およびプロスタノイドDP受容体ではない未知のGi共役型受容体を介してIL-8産生を誘導することを示している<sup>92)</sup>。さらに、PGD<sub>2</sub>の代謝産物の1つである15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>もTHP-1細胞においてperoxysome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) を介してIL-8 mRNA発現を誘導することが報告されている<sup>93)</sup>。

本章における検討の結果から、PGD<sub>2</sub>のプロスタノイドDP受容体を介したTNF- $\alpha$ 誘導MCP-1およびIL-8産生増強の機序にcAMP / PKAのシグナルが関与していることは明らかであるが、それ以降の分子メカニズムは不明である。詳しい成績は示さないが、THP-1細胞のTNF- $\alpha$ およびPGD<sub>2</sub>共刺激による、MCP-1 mRNAの発現増強に、転写因子であるNF- $\kappa$ Bの核内移行が関与するか否か検討した。THP-1細胞をTNF- $\alpha$ で刺激するとNF- $\kappa$ Bの核内移行が観察されたが、この核内移行はPGD<sub>2</sub>で共刺激しても増強されなかった。したがって、プロスタノイドDP受容体を介したMCP-1の産生増強機構の作用点は、NF- $\kappa$ Bの核内移行後であるが、MCP-1 mRNAの転写より前であると推測される。Jaramilloらはマウスのマクロファージ様細胞株を用い、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激によるMCP-1遺伝子転写はNF- $\kappa$ B、activator protein (AP) -1およびcAMP-dependent cAMP response element binding protein (CREB) の3つの転写因子が複合体を形成することによって最大化されると報告している<sup>94)</sup>。TNF- $\alpha$ はNF- $\kappa$ BおよびAP-1の活性化を誘導し<sup>95)</sup>、PGD<sub>2</sub>はcAMPの活性化を介してCREBを活性化すること<sup>42)</sup> が知られていることから、THP-1細胞において、TNF- $\alpha$ とPGD<sub>2</sub>が共存することで、NF- $\kappa$ B、AP-1およびCREBの複合体が形成され、MCP-1およびIL-8の転写活性が増強された可能性が示唆される (Fig. 22)。

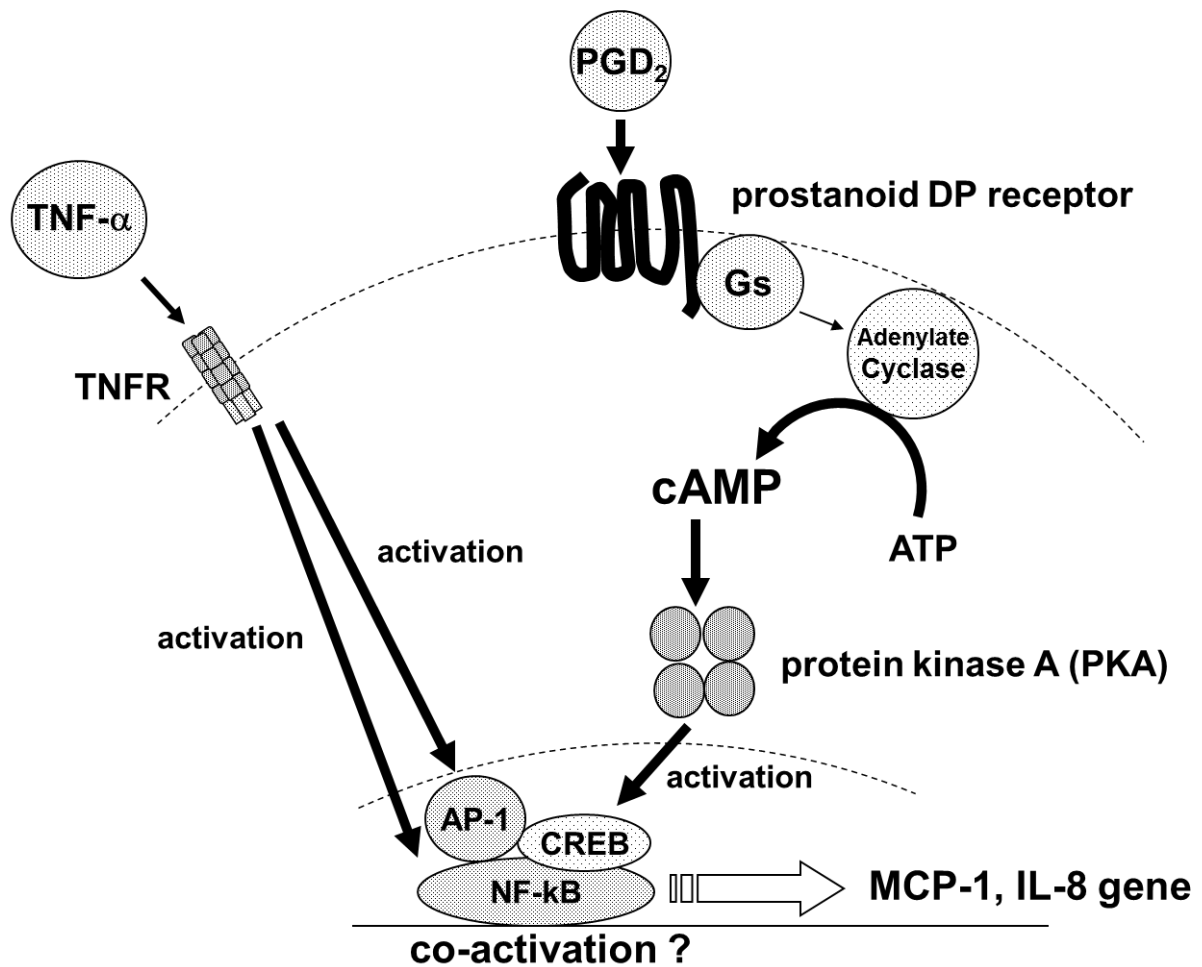


Fig. 22 Hypothetical model of MCP-1 and IL-8 produced by combined stimulation with PGD<sub>2</sub> and TNF-α in THP-1 cells

Following stimulation of prostanoid DP receptor, the cAMP/PKA pathway was activated. TNF-α might activate NF-κB and AP-1, and PGD<sub>2</sub> might activate CREB via cAMP/PKA pathway. The formation of complex of these three transcription factors might induce synergistic production of MCP-1 and IL-8.

TNF-αとプロスタノイドDP受容体刺激薬によるMCP-1産生の増強は、THP-1細胞と同じヒト単球系細胞株であるU937においても認められた（成績には示さない）。また、THP-1細胞において、TNF-αと同様にNF-κBの活性を誘導するlipopolysaccharide（LPS）とBW245Cを共刺激した場合でもMCP-1産生増強作用が認められた（成績には示さない）。したがって、プロスタノイドDP受容体を介したMCP-1の産生増強作用は、THP-1に特有の反応ではないこと、また、TNF-α

刺激の際のみならず、NF- $\kappa$ Bの活性化を誘導する他の因子によっても認められる現象であると考えられる。

以上の成績より、PGD<sub>2</sub>はプロスタノイドDP受容体に結合してcAMP / PKAシグナル経路を活性化し、TNF- $\alpha$ によって産生されるMCP-1およびIL-8産生を増強することが明らかとなった。その機序として転写因子が関与する可能性が示唆されるが、今後さらに検討することが必要である。また、本反応で認められる増強作用が他のプロスタノイドDP受容体発現細胞においても同様に認められるか否かについても、今後の検討課題である。

## 総括および結論

本研究では、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬の免疫薬理学的作用を明らかにすることを目的に、モルモットのケミカルメディエーター誘発鼻閉モデル、ヒツジおよびラットの実験的喘息モデル、およびヒト単球系細胞株 THP-1 を用い、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬である S-5751 あるいは pinagladin の影響を検討した。

第 1 章では S-5751 および pinagladin の種々のプロスタノイド受容体に対する選択性について検討した。その結果、S-5751 および pinagladin のヒトプロスタノイド DP 受容体に対する親和性は、他のヒトプロスタノイド受容体に対する親和性と比べ、それぞれ 40~3,000 倍以上および 100~2,700 倍以上強力であることが明らかとなった。また、S-5751 はモルモット、ヒツジおよびラットにおいてもヒトと同様に PGD<sub>2</sub> のプロスタノイド DP 受容体への結合に対して拮抗作用を示した。以上より、モルモット、ヒツジおよびラットの疾患モデルはプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の免疫薬理学的解析に適することが明らかとなった。

第 2 章ではモルモットのケミカルメディエーター誘発鼻閉モデルに及ぼすプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響について検討した。その結果、S-5751 は非感作モルモットに histamine または TXA<sub>2</sub> を経鼻暴露して誘発される鼻腔抵抗の増加に対して抑制作用を示さなかったが、抗原の繰り返し経鼻暴露によって鼻過敏になったモルモットに histamine または TXA<sub>2</sub> を経鼻暴露して誘発される鼻腔抵抗の増加に対しては、強力な抑制作用を示した。単独では非感作モルモットに鼻腔抵抗の増加を誘発しない低濃度の PGD<sub>2</sub> と histamine または TXA<sub>2</sub> の同時暴露によっても感作モルモット鼻腔抵抗の増加が誘発されたが、S-5751 の投与によってほぼ完全に抑制された。以上の成績より、繰り返しの抗原暴露によって過敏となったアレルギー性鼻炎患者の鼻閉症状には PGD<sub>2</sub> のプロスタノイド DP 受容体を介した刺激が増強因子として作用し、その抑制には本受容体拮抗薬が有用である可能性が示唆された。

第3章ではヒツジの実験的喘息モデルに及ぼすプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響を検討した。その結果、S-5751 は *in vitro* 試験においてプロスタノイド DP 受容体シグナルを十分に遮断する血中暴露を促す 30 mg/kg の投与においてヒツジの EAR を部分的に、LAR を完全に抑制した。また、30 mg/kg の S-5751 は抗原暴露 1 日後および 7 日後の気道過敏性および気道炎症を有意に抑制した。これらの抑制は CysLT 受容体拮抗薬である montelukast と類似していた。S-5751 は *in vitro* の CysLT 受容体に対する親和性試験、LTD<sub>4</sub> 誘発気道収縮反応に対して全く影響を及ぼさなかったことから、S-5751 によるヒツジの喘息様症状の抑制作用は、直接的な CysLT 受容体拮抗作用によるものではないことが明らかとなった。以上の成績より、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は CysLT 受容体拮抗薬とは異なる喘息治療薬として有用である可能性が示唆された。また、ヒツジの実験的喘息モデルにおける気道の主要な浸潤細胞はマクロファージと好中球であり、S-5751 はこれらの細胞の浸潤に対して有意な抑制作用を示した。

第4章ではラットの実験的喘息モデルに及ぼすプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響とその作用メカニズムの解析を行った。本モデルは気道への好酸球浸潤のみならず強い好中球およびマクロファージの浸潤を伴い、肺における Th2 サイトカインおよびケモカイン mRNA の発現を伴うことが明らかとなった。これらの反応は重症喘息や喘息の急性増悪時のような活動期の喘息症状と類似していた。本モデルにおいて、S-5751 および pinagladin は prednisolone と同程度に気道過敏性および気道への好酸球浸潤を抑制した。一方、prednisolone は気道への好中球浸潤、気道の粘液分泌を抑制しなかったが、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬はこれらの反応も有意に抑制した。また、prednisolone は Th2 サイトカインおよび CCL11 mRNA 発現を抑制したが、pinagladin は炎症性サイトカインおよび CXCL1 mRNA 発現を有意に抑制した。以上の成績より、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は経口ステロイドと異なった作用メカニズムでラットの抗原誘発気道過敏性、炎症性細胞浸潤および気道の粘液分泌を抑制することが示唆された。さらに、実験的喘息モデルラットのおよび喘息患者の肺のプロスタノイド DP 受容体発現細胞を検討したと

ころ、主な発現細胞は浸潤マクロファージあるいは単球であった。プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は浸潤マクロファージあるいは単球に対して強い抑制作用を示し、これらの細胞に対する抑制作用がプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の抗喘息作用のメカニズムに関与している可能性が示唆された。

第 5 章ではヒトの単球系細胞株である THP-1 細胞からのサイトカインおよびケモカイン産生に及ぼすプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の影響について検討した。THP-1 細胞におけるプロスタノイド DP 受容体発現について検討したところ、機能的なプロスタノイド DP 受容体の発現が確認された。THP-1 細胞をプロスタノイド DP 受容体刺激薬で単独刺激した場合にはサイトカインおよびケモカインの産生増加は誘導されなかった。そこで、多機能サイトカインである TNF- $\alpha$  とプロスタノイド DP 受容体刺激薬の共刺激を行った。その結果、TNF- $\alpha$  単独刺激で産生された 24 種類のサイトカインおよびケモカインのうち、MCP-1 および IL-8 の産生に強い増強が認められた。この産生増強が pinagladin で濃度依存的かつ有意に抑制されたことからプロスタノイド DP 受容体を介する反応であることが明らかとなった。しかしながら、MCP-1 の場合と異なり、IL-8 産生増強作用は 100  $\mu$ M の pinagladin 処置によっても完全には抑制されず、プロスタノイド DP 受容体非依存的な反応も部分的に関与する可能性が示唆された。プロスタノイド DP 受容体依存的な MCP-1 および IL-8 の産生増強作用に寄与するシグナル解析を検討したところ、cAMP / PKA 経路の活性化を介することが明らかとなった。

以上本研究では、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬がアレルギー性鼻炎の鼻閉症状を抑制し、特に鼻過敏症の形成にプロスタノイド DP 受容体に関与する可能性が示唆された。また、プロスタノイド DP 受容体の気管支喘息における関与はこれまで相反するいくつかの報告がなされているが、本研究においては、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬は montelukast やステロイドとは異なる作用メカニズムによって実験的喘息モデルの気道狭窄、気道過敏性および気道炎症を抑制

することから、プロスタノイド DP 受容体拮抗薬が、CysLT 拮抗薬およびステロイドと異なった作用機序を有する喘息治療薬として有効性を発揮する可能性が示唆された。

さらに、本研究において、PGD<sub>2</sub>はプロスタノイド DP 受容体を介して、その直接作用によってアレルギー疾患の病態に関わるばかりでなく、他のメディエーターの作用の増強因子として病態形成に関与する可能性が示唆された。

本研究におけるプロスタノイド DP 受容体を介した気道の炎症反応の増強メカニズムの担当細胞の 1 つは、単球あるいは浸潤マクロファージであり、それらの産生する炎症性サイトカインおよびケモカインが少なくともラットの実験的喘息モデルの病態形成に関与している可能性が示唆された。しかしながら、種々のアレルギー性疾患における単球およびマクロファージの役割は明らかとなっておらず、気管支喘息における炎症性サイトカインおよびケモカインの役割も明確ではない。また、ヒト単球系細胞株を用いた試験においても PGD<sub>2</sub>はプロスタノイド DP 受容体を介して炎症性ケモカインである MCP-1 および IL-8 の産生増強を誘導したが、これらはラットの喘息モデルにおいてプロスタノイド DP 受容体拮抗薬で抑制された因子と一致していない。したがって、今回の研究結果でプロスタノイド DP 受容体拮抗薬の分子メカニズムを十分に解明したとは言えず、さらに研究を進めることが必要である。

## 謝辞

稿を終わるに臨み、本研究の遂行に際して、終始御指導と御鞭撻を賜りました恩師、岐阜薬科大学機能分子学大講座 薬理学研究室 稲垣 直樹 教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の機会を与えて頂いた塩野義製薬株式会社 永田 清 診断薬事業部長（元創薬研究所長）に心より感謝いたしますと共に、御校閲を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室原 英彰 教授、同 分子生物学研究室 古川 昭栄 教授ならびに医療薬剤学大講座 薬物治療学研究室 保住 功 教授に深謝いたします。

また、本研究遂行にあたり、終始御懇切なる御指導とご鞭撻を賜りました塩野義製薬株式会社 創薬疾患研究所 七條 通孝 博士に甚大なる謝意を表します。

さらに、本研究の遂行に際して、終始多大なご協力とご助言を賜りました塩野義製薬株式会社 創薬疾患研究所 安井 潔 博士、浅沼 富士夫 氏、池田 稔 博士、土田 順一 博士、柳本 徹 博士、北浦 基次 博士ならびに研究所諸氏に心より感謝いたします。



## 参考文献

1. Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* 1990; 323: 645-655.
2. Dessen A. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 40-47.
3. Hirabayashi T, Shimizu T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1488: 124-138
4. Ito S, Narumiya S, Hayaishi O. Prostaglandin D<sub>2</sub>: a biochemical perspective. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1989; 37: 219-234.
5. Urade Y, Hayaishi O. Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitam Horm* 2000; 58: 89-120.
6. Tanaka K, Ogawa K, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Differential production of prostaglandin D<sub>2</sub> by human helper T cell subsets. *J Immunol* 2000; 164: 2277-2280.
7. Shimura C, Satoh T, Igawa K, Aritake K, Urade Y, Nakamura M, Yokozeki H. Dendritic cells express hematopoietic prostaglandin D synthase and function as a source of prostaglandin D<sub>2</sub> in the skin. *Am J Pathol* 2010; 176: 227-237.
8. Lewis RA, Soter NA, Diamond PT, Austen KF, Oates JA, Roberts LJD. Prostaglandin D<sub>2</sub> generation after the activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J Immunol* 1982; 129: 1627-1631.
9. Tajima T, Murata T, Aritake K, Urade Y, Hirai H, Nakamura M, Ozaki H, Hori M. Lipopolysaccharide induces macrophage migration via prostaglandin D<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326: 493-501.

10. Söderström M, Wigren J, Surapureddi S, Glass CK, Hammarström S. Novel prostaglandin D<sub>2</sub>-derived activators of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  are formed in macrophage cell cultures. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1631: 35-41.
11. Urade Y, Ujihara M, Horiguchi Y, Ikai K, Hayaishi O. The major source of endogenous prostaglandin D<sub>2</sub> production is likely antigen-presenting cells: localization of glutathione-requiring prostaglandin D synthetase in histiocytes, dendritic, and Kupffer cells in various rat tissues. *J Immunol* 1989; 143: 2982-2989.
12. Vinall SL, Townsend ER, Pettipher R. A paracrine role for chemoattractant receptorhomologous molecule expressed on T helper type 2 cells (CRTH2) in mediating chemotactic activation of CRTH2<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T helper type 2 lymphocytes. *Immunology* 2007; 121: 577-584.
13. Hyo S, Kawata R, Kadoyama K, Eguchi N, Kubota T, Takenaka H, Urade Y. Expression of prostaglandin D<sub>2</sub> synthase in activated eosinophils in nasal polyps. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 133: 693-700.
14. Camacho M, Lopez-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity. *Circ Res* 1998; 83: 353-365.
15. Soler M, Camacho M, Escudero JR, Iniguez MA, Vila L. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ Res* 2000; 87: 504-507.
16. Naclerio RM, Meier HL, Kagey-Sobotka A, Norman PS, Lichtenstein LM. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 597-602.

17. Murray JJ, Tonnel AB, Brash AR, Roberts II LJ, Gosset P, Workman R, Capron A, Oates JA. Release of prostaglandin D<sub>2</sub> into human airways during acute antigen challenge. *N Engl J Med* 1986; 315: 800-804.
18. Proud D, Sweet J, Stein P, Settipane RA, Kagey-Sobotka A, Friedlaender MH, Lichtenstein LM. Inflammatory mediators on conjunctival provocation of allergic subjects with allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 896-905.
19. Charlesworth EN, Kagey-Sobotka A, Schleimer RP, Norman PS, Lichtenstein LM. Prednisolone inhibits the appearance of inflammatory mediators and the influx of eosinophils and basophils associated with the cutaneous late-phase response to allergen. *J Immunol* 1991; 146: 671-676.
20. Flower RJ, Harvey EA, Kingston WP. Inflammatory effects of prostaglandin D<sub>2</sub> in rat and human skin. *Br J Pharmacol* 1976; 56: 229-233.
21. Woodward DF, Nieves AL, Williams LS. Thromboxane A<sub>2</sub>-mimetics are potent microvascular permeability factors in the conjunctiva. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 255: 23-27.
22. Doyle W, Boehm S, Skoner DP. Physiologic responses to intranasal dose-response challenges with histamine, methacholine, bradykinin, and prostaglandin in adult volunteers with and without nasal allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 924-935.
23. Johnston SL, Freezer NJ, Ritter W, O'Toole S, Howarth PH. Prostaglandin D<sub>2</sub>-induced bronchoconstriction is mediated only in part by the thromboxane prostanoid receptor. *Eur Respir J* 1995; 8: 411-415.
24. Emery DL, Djokie TD, Graf PD, Nadel JA. Prostaglandin D<sub>2</sub> causes accumulation of eosinophils in the lumen of the dog trachea. *J Appl Physiol* 1989; 67: 959-962.

25. Woodward, DF, Nieves, AL, Friedlaender, MH. Characterization of receptor subtypes involved in prostanoid-induced conjunctival pruritis and their role in mediating allergic conjunctival itching. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 137-142.
26. Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D<sub>2</sub> selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 2001; 193: 255-261.
27. Hirata H, Kakizuka M, Aizawa M, Ushikubi F, Narumiya S. Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11192-11196.
28. Boie Y, Sawyer N, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M. Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 18910-18916.
29. Kohyama T, Wyatt TA, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Kim HJ, Rennard SI. PGD<sub>2</sub> modulates fibroblast-mediated native collagen gel contraction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 375-381.
30. Schuligoi R, Sturm E, Luschnig P, Konya V, Philipose S, Sedej M, Waldhoer M, Peskar BA, Heinemann A. CRTH2 and D-type prostanoid receptor antagonists as novel therapeutic agents for inflammatory diseases. *Pharmacology*. 2010; 85: 372-382.
31. Wheeldon A, Vardey CJ. Characterization of the inhibitory prostanoid receptors on human neutrophils. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 1051-1054.
32. Yoshimura-Uchiyama C, Iikura M, Yamaguchi M, Nagase H, Ishii A, Matsushima K, Yamamoto K, Shichijo M, Bacon KB, Hirai K. Differential modulation of human basophil functions through prostaglandin D<sub>2</sub> receptors DP and chemoattractant

- receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells/ DP2 . Clin Exp Allergy 2004; 34: 1283-1290.
33. Hammad H, de Heer HJ, Soullie T, Hoogsteden HC, Trottein F, Lambrecht BN. Prostaglandin D<sub>2</sub> inhibits airway dendritic cell migration and function in steady-state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. J Immunol 2003; 171: 3936-3940.
  34. Angeli V, Faveeuw C, Roye O, Fontaine J, Teissier E, Capron A, Wolowczuk I, Capron M, Trottein F. Role of the parasite-derived prostaglandin D<sub>2</sub> in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. J Exp Med 2001; 193: 1135-1147.
  35. Tanaka K, Hirai H, Takano S, Nakamura M, Nagata K. Effects of prostaglandin D<sub>2</sub> on helper T cell functions. Biochem Biophys Res Commun 2004; 316: 1009-1014.
  36. Chen Y, Perussia B, Campbell KS. Prostaglandin D<sub>2</sub> suppresses human NK cell function via signaling through D prostanoid receptor. J Immunol 2007; 179: 2766-2773.
  37. Torres D, Paget C, Fontaine J, Mallevaey T, Matsuoka T, Maruyama T, Narumiya S, Capron M, Gosset P, Faveeuw C, Trottein F. Prostaglandin D<sub>2</sub> inhibits the production of IFN-gamma by invariant NK T cells: consequences in the control of B16 melanoma. J Immunol 2008; 180: 783-792.
  38. Hammad H, Kool M, Soullie T, Narumiya S, Trottein F, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells. J Exp Med 2007; 204: 357-367.
  39. Arai I, Takano N, Hashimoto Y, Futaki N, Sugimoto M, Takahashi N, Inoue T, Nakaike S. Prostanoid DP1 receptor agonist inhibits the pruritic activity in NC/Nga mice with atopic dermatitis. Eur J Pharmacol 2004; 505: 229-235.

40. Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Ushikubi F, Aze Y, Eguchi N, Urade Y, Yoshida N, Kimura K, Mizoguchi A, Honda Y, Nagai H, Narumiya S. Prostaglandin D<sub>2</sub> as a mediator of allergic asthma. *Science* 2000; 287: 2013-2017.
41. Gervais FG, Cruz RP, Chateauneuf A, Gale S, Sawyer N, Nantel F, Metters KM, O'Neill GP. Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD<sub>2</sub> receptors CRTH2 and DP. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 982-988.
42. Gosset P, Bureau F, Angeli V, Pichavant M, Faveeuw C, Tonnel AB, Trottein F. Prostaglandin D<sub>2</sub> affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naïve Th cells. *J. Immunol.* 2003; 170: 4943-4952.
43. Mitsumori S, Tsuru T, Honma T, Hiramatsu Y, Okada T, Hashizume H, Kida S, Inagaki M, Arimura A, Yasui K, Asanuma F, Kishino J, Ohtani M. Synthesis and biological activity of various derivatives of a novel class of potent, selective, and orally active prostaglandin D<sub>2</sub> receptor antagonists. 2,6,6-dimethylbicyclo[3,1,1]heptane derivatives. *J Med Chem* 2003; 46: 2446-2455.
44. Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, Ohtani M, Arita H. Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 411-419.
45. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD. Prostanoid receptors: Subtypes and signaling. *An Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 661-690.
46. Naclerio RM, Baroody FM. Observation on the response of the nasal mucosa to allergens. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111: 355-363.
47. Bousquet J, Vignola AM, Campbell AM, Michel FB. Pathophysiology of allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 110: 207-218.

48. Raphael GD, Meredith SD, Baraniuk JN, Druce HM, Banks SM, Kaliner MA. The pathophysiology of rhinitis. II. Assessment of the sources of protein in histamine-induced nasal secretions. *Am Rev Respir Dis* 1989;139: 791-800.
49. Taylor-Clark T, Foreman J. Histamine-mediated mechanisms in the human nasal airway. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5: 214-220.
50. White MV, Kaliner MA. Mediators of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 699-704.
51. Atkinson TP, Kaliner MA. Vascular mechanism in rhinitis. In: Busse WW, Holgate ST, eds. *Asthma and Rhinitis*. Blackwell Scientific Publications, Boston 1995; pp. 777-788.
52. Rajakulasingam K, Howarth PH. Relation of disordered airway function to the treatment of rhinitis. In: Busse WW, Holgate ST, eds. *Asthma and Rhinitis*. Blackwell Scientific Publications, Boston, 1995; pp. 1247-1254.
53. Naclerio RM, Proud M, Togias AG, Adkinson Jr. NF, Meyers DA, Kagey-Sobotka A, Plaut M, Norman PS, Lichtenstein LM. Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N Engl J Med* 1985; 313: 65-70
54. Okano M, Fujiwara T, Sugata Y, Gotoh D, Masaoka Y, Sogo M, Tanimoto W, Yamamoto M, Matsumoto R, Eguchi N, Kiniwa M, Isik AU, Urade Y, Nishizaki K. Presence and characterization of prostaglandin D<sub>2</sub>-related molecules in nasal mucosa of patients with allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 2006; 20: 342-348.
55. Van-Hecken A, Depre M, De-Lepeleire I, Thach C, Oeyen M, Van-Effen J, Laethem T, Mazina K, Crumley T, Wenning L, Gottesdiener KM, Deutsch P, Clement P, Lai E, de-Hoon JN. 2007. The effect of MK- 0524, a prostaglandin D<sub>2</sub> receptor antagonist, on prostaglandin D<sub>2</sub>- induced nasal airway obstruction in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 135-141.

56. Johnston SL, Smith S, Harrison J, Ritter W, Howarth PH. The effect of BAYu 3405, a thromboxane receptor antagonist, on prostaglandin D<sub>2</sub>-induced nasal blockage. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 903-909.
57. Yasui K, Asanuma F, Furue Y, Arimura A. Involvement of thromboxane A<sub>2</sub> in antigen-induced nasal blockage in guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 112: 400-405.
58. Yamasaki M, Matsumoto T, Fukuda S, Nakayama T, Nagaya H, Ashida Y. Involvement of thromboxane A<sub>2</sub> and histamine in experimental allergic rhinitis of guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 1471-1479.
59. Fujita M, Yonetomi Y, Shimouchi K, Takeda H, Aze Y, Kawabata K, Ohno H. Involvement of cysteinyl leukotrienes in biphasic increase of nasal airway resistance of antigen-induced rhinitis in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 1999; 369: 349-356.
60. Flower RJ, Harvey EA, Kingston WP. Inflammatory effects of prostaglandin D<sub>2</sub> in rats and human skin. *Br J Pharmacol* 1976; 56: 229-233.
61. Rahman A, Inoue T, Ago J, Ishikawa T, Kamei C. Interactive effect of histamine and prostaglandin D<sub>2</sub> on nasal allergic symptoms in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 554: 229-234.
62. Niwa K, Iwata S, Takasu A, Senoo T, Miwa M, Kondoh Y, Komori M, Ibata K. Determination of prostaglandin D<sub>2</sub> contents in human nasal mucosa with and without allergic rhinitis. *Pract. Oto-Rhino-Laryngol* 1993; 65: 21-27.
63. National Asthma Education and Prevention Program. Expert panel report 2: guidelines for the diagnosis and management of asthma. Bethesda (MD): NIH / National Heart, Lung, and Blood Institute; April 1997. 97-4051.
64. Liu MC, Hubbard WC, Proud D, Stealey BA, Galli SJ, Kagey-Sobotka A, Bleecker ER, Lichtenstein LM. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen



- challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 51-58.
65. Abraham WM. Animal models of asthma. In: Busse WW, Holgate ST, eds. *Asthma & Rhinitis*. Oxford: Blackwell Science, 2000; pp. 1205-1227.
  66. Abraham WM, Burch RM, Farmer SG, Sielczak MW, Ahmed A, Cortes A. A bradykinin antagonist modifies allergen-induced mediator release and late bronchial responses in sheep. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:787-796.
  67. Sabater JR, Wanner A, Abraham WM. Montelukast prevents antigen-induced mucociliary dysfunction in sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:1457-1560.
  68. Spik I, Brénuchon C, Angéli V, Staumont D, Fleury S, Capron M, Trottein F, Dombrowicz D. Activation of the prostaglandin D<sub>2</sub> receptor DP2/CRTH2 increases allergic inflammation in mouse. *J Immunol* 2005; 174: 3703-3708.
  69. Liu MC, Proud D, Lichtenstein LM, Hubbard WC, Bochner BS, Stealey BA, Breslin L, Xiao H, Freidhoff LR, Schroeder JT, Schleimer RP. Effects of prednisone on the cellular responses and release of cytokines and mediators after segmental allergen challenge of asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 29-38
  70. Hsueh W. Prostaglandin biosynthesis in pulmonary macrophages. *Am J Pathol* 1979; 97 :137-148.
  71. Fuller RW. Asthma. Macrophages. *Br Med Bull* 1992; 48: 65-71.
  72. Macdowell AL, Peters SP. Neutrophils in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007; 7: 464-468.
  73. Shahbazian A, Heinemann A, Peskar BA, Holzer P. Differential peristaltic motor effects of prostanoid (DP, EP, IP, TP) and leukotriene receptor agonists in the guinea-pig isolated small intestine. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 1047-1054.

74. Arimura A, Asanuma F, Matsumoto Y, Kurosawa A, Jyoyama H, Nagai H. Effect of the selective thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist, S-1452, on antigen-induced sustained bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol* 1994; 260: 201–209.
75. Lan HY, Mu W, NG YY, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC. A simple, reliable, and sensitive method for nonradioactive in situ hybridization: use of microwave heating to improve hybridization efficiency and preserve tissue morphology. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 281-287.
76. Woodruff PG, Khashayar R, Lazarus SC, Janson S, Avila P, Boushey HA, Segal M, Fahy JV. Relationship between airway inflammation, hyperresponsiveness, and obstruction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 753-758.
77. Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B, Tonnel AB. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 394-402.
78. Barnes PJ. Effect of corticosteroids on airway hyperresponsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: S70-S76.
79. Bhagat RG, Grunstein MM. Effect of corticosteroids on bronchial responsiveness to methacholine in asthmatic children. *Am Rev Respir Dis* 1985; 131: 902-906.
80. Meagher LC, Cousin JM, Seckl JR, Haslett C. Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol* 1996; 156: 4422-4428.
81. Little SA, MacLeod KJ, Chalmers GW, Love JG, McSharry C, Thomson NC. Association of forced expiratory volume with disease duration and sputum neutrophils in chronic asthma. *Am J Med* 2002; 112: 446-452.
82. Wegmann M. Targeting eosinophil biology in asthma therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45: 667-674.

83. Rogers DF. Airway mucus hypersecretion in asthma: an undervalued pathology? *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 241-250.
84. Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1 $\beta$  causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 311-318.
85. Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, Haddad el-B, Lehr HA, Schmitt E, Bopp T, Kallen KJ, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld JM, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Renz H, Neurath MF, Galle PR, Finotto S. The IL-6R  $\alpha$  chain controls lung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 2005; 115: 313-325.
86. Gosset P, Tsicopoulos A, Wallaert B, Vannimenus C, Joseph M, Tonnel AB, Capron A. Increased secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 561-571.
87. Bradding P, Mediwake R, Feather IH, Madden J, Church MK, Holgate ST, Howarth PH. TNF  $\alpha$  is localized to nasal mucosal mast cells and is related in acute allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 406-415.
88. Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C. Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Immunol* 1992; 149: 2358-2366.
89. Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ, Barkans J, Meng Q, Collins PD, Kay AB. Expression and generation of interleukin-8, IL-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating

- factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . Immunology 1992; 77: 330-337.
90. Zhao B, Stavchansky SA, Bowden RA, Bowman PD. 2003. Effect of interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on gene expression in human endothelial cells. Am J Physiol, Cell Physiol 2003; 284: 1577-1583.
  91. Schwamborn J, Lindecke A, Elvers M, Horejschi V, Martin K, Rafigh M, Pfeiffer J, Prüllage M, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. Microarray analysis of tumor necrosis factor  $\alpha$  induced gene expression in U373 human glioblastoma cells. BMC Genomics 2003; 4: 46.
  92. Chiba T, Kanda A, Ueki S, Ito W, Kamada Y, Oyamada H, Saito N, Kayaba H, Chihara J. Prostaglandin D<sub>2</sub> induces IL-8 and GM-CSF by bronchial epithelial cells in a CRTH2-independent pathway. Int Arch Allergy Immunol 2006; 141: 300-307.
  93. Zhang X, Wang JM, Gong WH, Mukaida N, Young HA. Differential regulation of chemokine gene expression by 15-deoxy- $\Delta$ 12,14 prostaglandin J<sub>2</sub>. J Immunol 2001; 166: 7104-7111.
  94. Jaramillo M, Olivier M. Hydrogen peroxide induces murine macrophage chemokine gene transcription via extracellular signal-regulated kinase- and cyclic adenosine 5' -monophosphate (cAMP)-dependent pathways: involvement of NF- $\kappa$ B, activator protein 1, and cAMP response element binding protein. J Immunol 2002; 169: 7026-7038.
  95. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol 1997; 9: 240-246.

## 略語一覽

AHR : airway hyperresponsiveness

AP-1 : activator protein 1

AUC : area under the curve

BALF : bronchial alveolar lavage fluids

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CREB : cAMP response element binding protein

CRTH2 : chemoattractant receptor homologous molecule expressed on T-helper  
type 2 cells

CysLTs : cysteinyl leukotirienes

DAB : 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

EAR : early airway response

FEV<sub>1</sub> : forced expiratory volume in one second

FGF : fibroblast growth factor

G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor

GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor

H&E : hematoxylin & eosin

IC<sub>50</sub> : 50% inhibition concentration

IL : interleukin

INF- $\gamma$  : interferon-gamma

IP-10 : interferon gamma-induced protein 10

ISH : in situ hybridization

K<sub>i</sub> : inhibition constant

LAR : late airway response

LT : leukotriene

MIP-1 : macrophage inflammatory protein-1

NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappaB

PG : prostaglandin

TXA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>

mRNA : messenger ribonucleic acid

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

PAF : platelet activating factor

PBS : phosphate-buffered saline

PC<sub>400</sub> : provocative dose causing a 400% increase

PDGF-bb : platelet-derived growth factor-bb

PKA : protein kinase A

PLA<sub>2</sub> : phospho lipase A<sub>2</sub>

RANTES : regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted

R<sub>L</sub> : mean pulmonary flow resistance

Th : T helper

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor-alpha