

ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体遺伝子発現機構を標的とするアレルギー疾患治療薬の意義

福井 裕行

**Role of Therapeutics for Allergic Diseases in Targeting Histamine H<sub>1</sub> Receptor Gene Expression**

Hiroyuki FUKUI

*Department of Molecular Pharmacology, Graduate School of Health Biosciences, The University of Tokushima, 1-78-1 Shomachi, Tokushima City 770-8505, Japan*

(Received August 31, 2006)

Histamine H<sub>1</sub> receptors are down-regulated as one step in receptor desensitization. Five phosphorylation sites of the H<sub>1</sub> receptor seem to play a key role in receptor down-regulation. In contrast, an increase in the H<sub>1</sub> receptor expression level following its mRNA elevation was found in the nasal mucosa in hypersensitivity model rats. Up-regulation of the H<sub>1</sub> receptor was induced by the direct stimulation of the H<sub>1</sub> receptor. H<sub>1</sub> receptor up-regulation was suppressed by pretreatment with antiallergic agents.

**Key words**—histamine; receptor; allergic disease

**1. はじめに**

ヒスタミンはアレルギー疾患の主要メディエーターであり、標的細胞のヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体を介して主要症状が発現される。そして、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬（抗ヒスタミン薬）はアレルギー疾患の主要治療薬である。すなわち、抗ヒスタミン薬はヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体を介するシグナルの遮断を利用したアレルギー疾患治療であると言える。抗ヒスタミン薬以外のアレルギー疾患治療薬にもそれぞれのシグナルの遮断を介した治療薬が含まれる (Fig. 1)。一方、アレルギー疾患は代表的な多因子疾患である。アレルギー疾患において発現異常が引き起こされている種々の疾患関連遺伝子が見出されている。そして、疾患関連遺伝子の中から、アレルギー疾患治療に有用な疾患感受性遺伝子の選択が現在の疾患治療法確立の重要な戦略である。ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体発現レベルの低下は受容体脱感作機構の1つとして見出された。<sup>1)</sup>そして、この機構はヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体自身のリン酸化がキーとなるス

テップであることが明らかになった。<sup>2-4)</sup>これに対して、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体発現レベルは遺伝子発現機構によっても調節を受けていると考えられる。<sup>5,6)</sup>遺伝子発現機構の詳細は不明の点が多いが、少なくとも両機構のバランスの上にヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体発現レベルが決定されると考えられる (Fig. 2)。アレルギー疾患患者組織において、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 mRNA レベルの上昇が報告されており、同遺伝子がアレルギー疾患関連遺伝子であることが明らかにされた。<sup>7,8)</sup>そこで、次の重要なステップはヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体遺伝子がアレルギー疾患治療に対する疾患感受性遺伝子であるか否かについて明確にする必要がある。本稿において、受容体脱感作機構と遺伝子発現機構によるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体発現調節機構と H<sub>1</sub> 受容体遺伝子発現機構が種々の薬物の標的であり、遺伝子発現亢進の抑制によるアレルギー疾患の新規治療法の展望について述べる。

**2. 受容体脱感作機構を介したヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体ダウン調節**

ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の反復刺激及び持続的刺激は受容体脱感作を引き起こし、受容体反応が低下することが知られている。リコンビナントヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体を発現させたチャイニーズハムスター卵

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子薬物学分野 (〒770-8505 徳島市庄町 1-78-1)

e-mail: hfukui@ph.tokushima-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S21 で発表したものを中心に記述したものである。

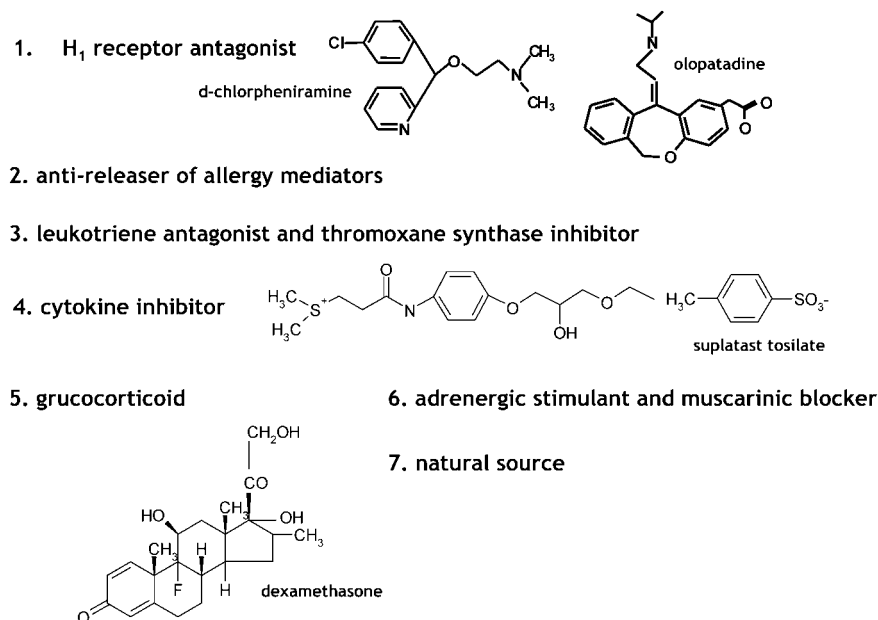
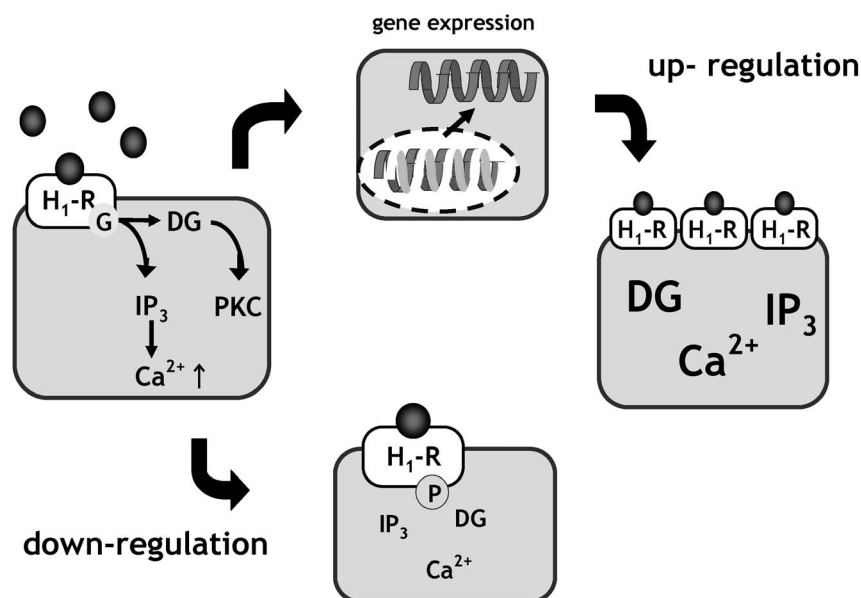


Fig. 1. Therapeutics for Allergic Diseases

Fig. 2. Up- and Down-regulations of Histamine  $H_1$  Receptor Expression through Receptor Gene Expression and Receptor Desensitization, Respectively

巢細胞 (CHO 細胞) を持続的にヒスタミン刺激することにより, ヒスタミン  $H_1$  受容体のダウン調節が引き起こされた.<sup>1)</sup> ヒスタミン  $H_1$  受容体の細胞内領域には蛋白キナーゼによるリン酸化部位となり得る多くのセリン, 及びスレオニン残基が存在する.  $H_1$  受容体の細胞内領域に相当する人工基質を用いる実験などを経て, 5 ヲ所のアミノ酸残基を変異させた部位特異的変異ヒスタミン  $H_1$  受容体がヒスタミンによる刺激を受けても全くダウン調節されない

ことを見出した (Fig. 3).<sup>3)</sup> 5 ヲ所のアミノ酸残基の個々の部位特異的変異ヒスタミン  $H_1$  受容体を用いる実験により, 5 ヲ所のアミノ酸残基すべてが受



福井裕行

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子薬物学分野教授. 1948 年大阪府生まれ. 大阪大学医学部, 同大学院医学研究科博士課程修了. 大阪大学医学部助手, 講師, 助教授を経て, 1997 年より現職. ヒスタミンシグナル調節機構の研究.

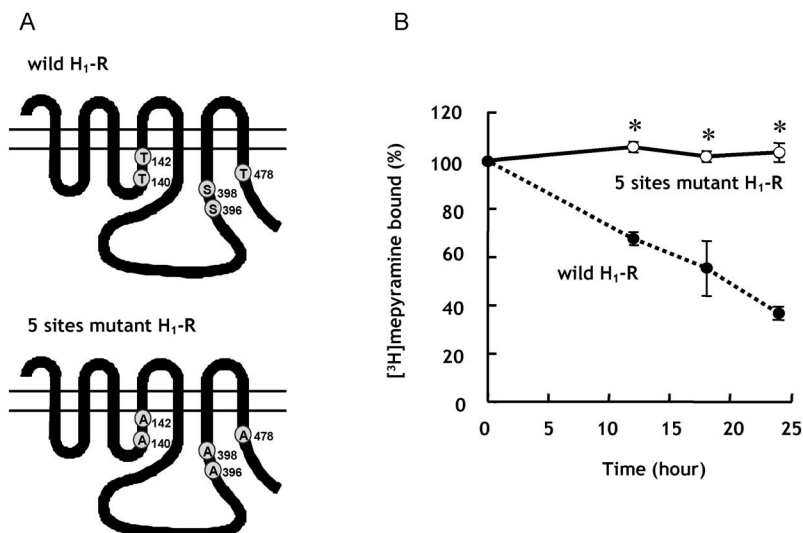


Fig. 3. Absence of Down-regulation in Mutant Histamine H<sub>1</sub> Receptor Lacking 5 Putative Phosphorylation Sites

A: structures of wild-type (wild H<sub>1</sub>-R) (upper) and site-directed mutant receptor (5 sites mutant H<sub>1</sub>-R) (lower). B: time-course of wild-type (●) and mutant (○) histamine H<sub>1</sub> receptor expression level determined with [<sup>3</sup>H]mepyramine binding assay in CHO cells after stimulation of 100 μM histamine. \**p*<0.001 vs. wild-type H<sub>1</sub>-R (*n*=6).

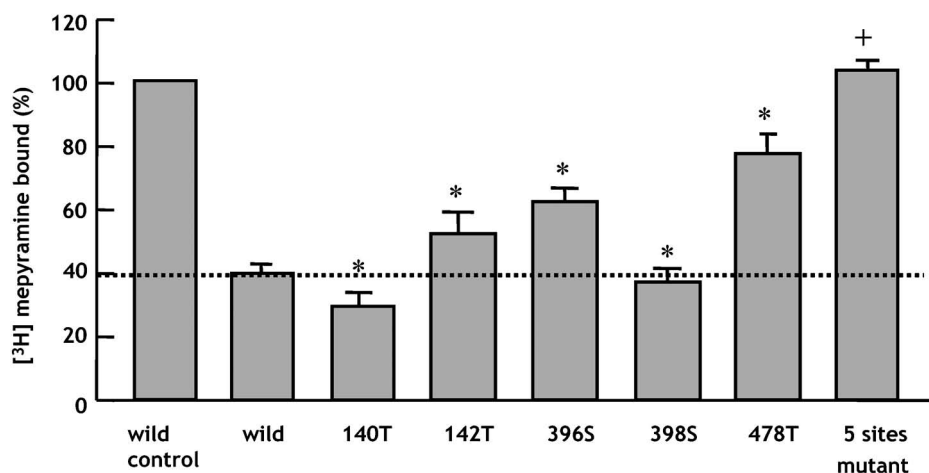


Fig. 4. Down-regulation of Five Mutant Histamine H<sub>1</sub> Receptors Having One Putative Phosphorylation Site among Five Putative Sites 24 Hours after Stimulation of 100 μM Histamine in CHO Cells

Histamine H<sub>1</sub> receptors were determined by [<sup>3</sup>H]mepyramine binding assay. Abbreviations are as follows: wild control: wild receptors without stimulation, wild: wild receptors stimulated with histamine, 140T, 142T, 396S, 398S and 478T: mutant receptors having one putative threonine (T) and serine (S) residues with position numbers, 5 sites mutant: mutant receptor lacking five putative phosphorylation sites. \**p*<0.001 vs. wild control (*n*=4), +*p*<0.001 vs. wild (*n*=4).

容体ダウン調節に関与するが、セリン-140、及びスレオニン-398が主要な機能を担っていることが明らかとなった (Fig. 4).<sup>4)</sup> また、ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体は C キナーゼ、G キナーゼ、カルシウムカルモジュリン依存性蛋白キナーゼ II などの蛋白キナーゼによりリン酸化され、5 ヲ所のアミノ酸を変異させた H<sub>1</sub> 受容体のリン酸化レベルは顕著に低下した (Fig. 5).<sup>2)</sup> すなわち、種々の蛋白キナーゼの関与が考えられた。

### 3. 遺伝子発現亢進機構を介したヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体アップ調節

ヒト子宮がん由来培養細胞である HeLa 細胞はヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体を自然に発現している。この細胞をヒスタミンにより刺激したところ、刺激後 4—9 時間に亘るヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 mRNA レベルの上昇に引き続いて、24 時間後にヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体発現レベルの上昇が引き起こされた (Fig. 6).<sup>5)</sup> ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体遺伝子プロモーター活

性がヒスタミン刺激により上昇したこと、及び  $H_1$  受容体 mRNA の安定性がヒスタミン刺激のあるなしに係わらず変化がないことから、ヒスタミン  $H_1$  受容体刺激は  $H_1$  受容体遺伝子発現亢進を引き起こ

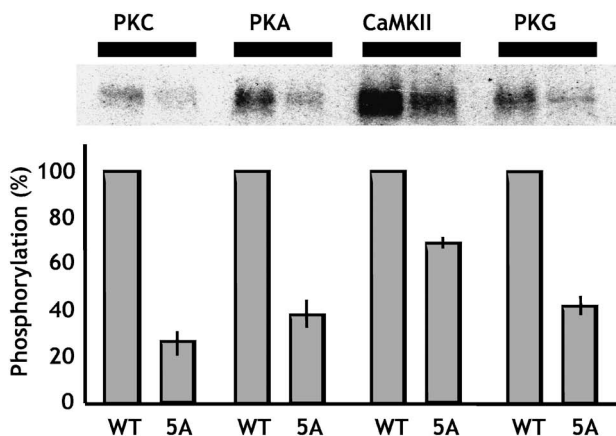


Fig. 5. *In vitro* Phosphorylation of Wild-type and Mutant Histamine  $H_1$  Receptors Expressed in sf9 Insect Cells

Receptors in membranes were incubated with  $10 \mu\text{Ci}$  of  $100 \mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP and various protein kinases, and phosphorylation was detected with radio-autography after SDS-PAGE (upper), and phosphorylation was quantified (lower). Abbreviations are as follows: WT: wild-type histamine  $H_1$  receptor, 5A: mutant histamine  $H_1$  receptor lacking five putative phosphorylation sites, PKC, PKA and PKG: protein kinases C, A and G, respectively, CaMKII: calcium calmodulin-dependent protein kinase II.

し、受容体アップ調節を引き起こされることが明らかとなった。前節では、プロモーターを持たないリコンビナントヒスタミン  $H_1$  受容体の刺激は顕著な受容体ダウン調節を引き起こすことを述べた。このことから、ヒスタミン  $H_1$  受容体の刺激により、受容体のアップ調節とダウン調節が同時に引き起こされ、受容体の代謝回転の亢進が引き起こされることが明らかとなった。そして、HeLa 細胞においては受容体アップ調節がダウン調節を上回ることから、受容体発現のバランスがアップ調節に傾いたと考えられる。  $H_1$  受容体刺激による  $H_1$  受容体遺伝子転写活性亢進に対して、蛋白キナーゼ C (PKC) の阻害薬 (Ro31-8220) により、  $H_1$  受容体刺激による  $H_1$  受容体遺伝子発現亢進は完全に抑制された。PKC アイソザイムのうち、 $\delta$  イソフォームの阻害薬 (Rottlerin) は  $H_1$  受容体遺伝子発現亢進を完全に抑制し、 $\alpha$  イソフォーム阻害薬 (Go-6976) は阻害作用を示さなかった (Fig. 7)。PKC 活性化ホルボールエステル (PMA) はヒスタミン  $H_1$  受容体 mRNA レベルを著明に上昇させた。以上の結果、 $\delta$  イソフォームに依存したシグナルがヒスタミン  $H_1$  受容体遺伝子発現亢進に関与することが示唆された。

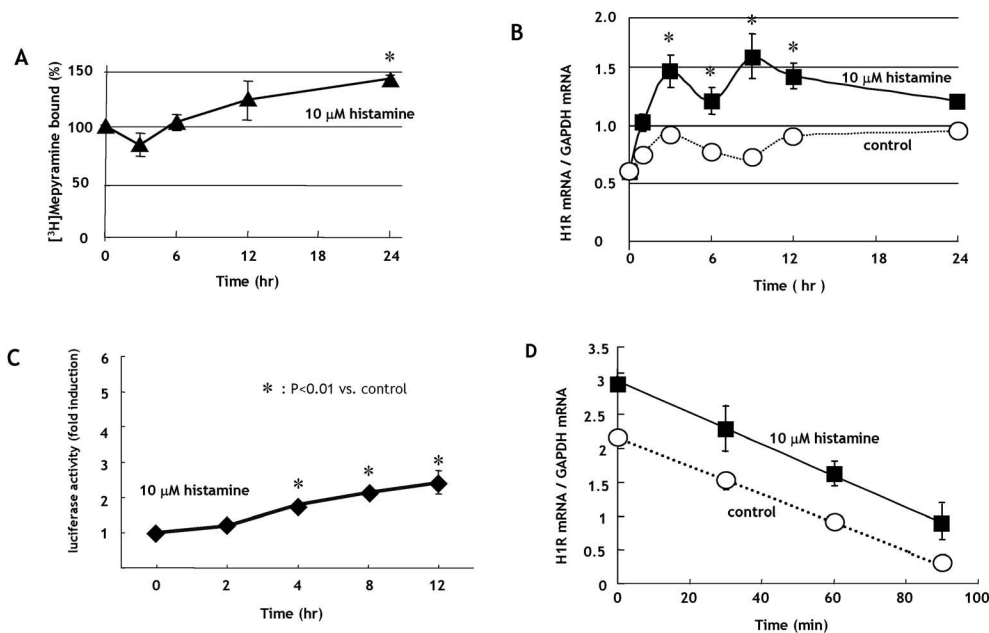


Fig. 6. Increase in Histamine  $H_1$  Receptor Gene Expression after Stimulation of  $H_1$  Receptor-bearing HeLa Cells with Histamine

HeLa cells were incubated in the absence of fetal bovine serum 24 hours prior to  $10 \mu\text{M}$  histamine stimulation. A: time-course of receptor expression level ( $\blacktriangle$ ). Histamine  $H_1$  receptors were determined with [ $^3\text{H}$ ] mepyramine binding assay. Control of receptor expression level at time zero without stimulation was represented as 100%. \* $p < 0.01$  vs. control ( $n = 4$ ). B: time-course of receptor mRNA level after histamine stimulation ( $\blacksquare$ ) and control ( $\circ$ ). \* $p < 0.01$  vs. control ( $n = 4$ ). C: time-course of histamine  $H_1$  receptor gene promoter activity ( $\blacklozenge$ ). \* $p < 0.01$  vs. control ( $n = 4$ ). D: decay of histamine  $H_1$  receptor mRNA level after protein synthesis termination. Protein synthesis was terminated with actinomycin D three hours after  $10 \mu\text{M}$  histamine stimulation ( $\blacksquare$ ) and control ( $\circ$ ).

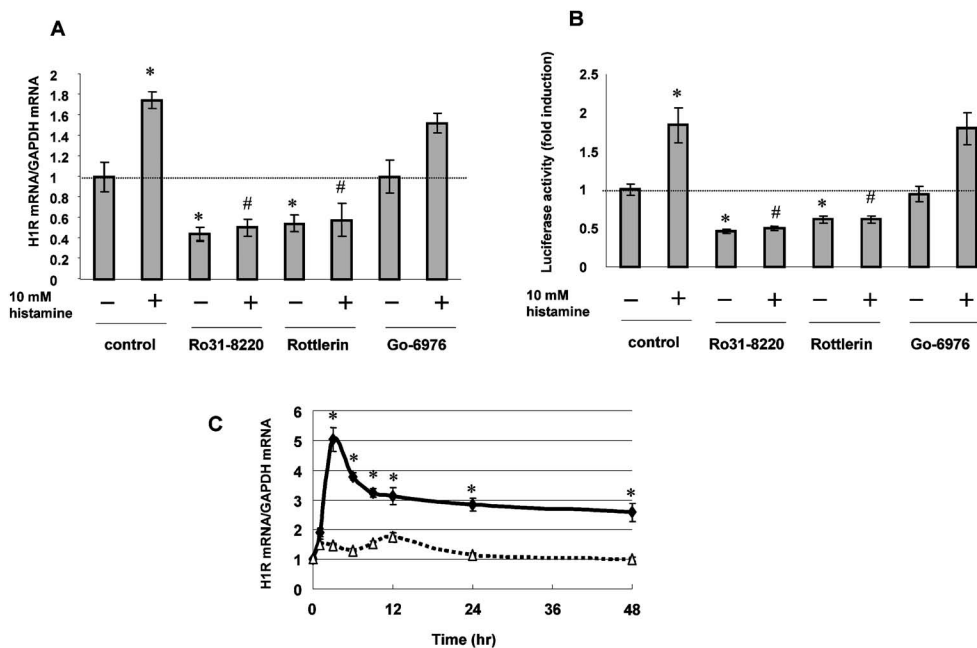


Fig. 7. Protein Kinase C-mediated Increase in Histamine H<sub>1</sub> Receptor Gene Expression in HeLa Cells

The receptor mRNA level (A) and the receptor gene promoter activities (B) were determined four hours after 10  $\mu$ M histamine stimulation in HeLa cells. Ro31-8220, rottlerin and Go-6976, protein kinase C inhibitors, were pre-treated one hour before histamine stimulation. A: histamine H<sub>1</sub> receptor mRNA was determined with quantitative real-time PCR. \* $p$ <0.05 vs. control without histamine ( $n$ =4), \* $p$ <0.05 vs. control with histamine ( $n$ =4). B: histamine H<sub>1</sub> receptor gene promoter activity was determined using luciferase reporter gene with H<sub>1</sub> receptor gene promoter from -8368 to -6277. \* $p$ <0.05 vs. control without histamine ( $n$ =4), \* $p$ <0.05 vs. control with histamine ( $n$ =4). C: time-course of histamine H<sub>1</sub> receptor mRNA level in HeLa cells with (◆) and without (△) protein kinase C-activation phorbol ester (PMA). \* $p$ <0.05 vs. control ( $n$ =4).

#### 4. アレルギーモデルラット鼻粘膜におけるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 mRNA レベル, 及びヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) mRNA レベルの上昇

通常, ラットはヒスタミンに対する感受性は低いが, ブラウンノルウェイラットはヒスタミンに対する感受性が比較的高く, アレルギー研究に適している. また, プラスチックのポリスチレンの製造工場では職業性喘息が多いことが知られている. ポリスチレンの原料であるトルエン 2,4-ジイソシアネート (TDI) をブラウンノルウェイラットの鼻粘膜に塗布することにより, アレルギーモデルラット (鼻過敏症モデルラット) の作成に成功した. Figure 8 は TDI の化学構造とアレルギーモデルラット作成のプロトコールを示す. TDI により感作されたアレルギーラット鼻粘膜に TDI を与えることにより, 顕著な鼻過敏症症状を示した (Fig. 9). 鼻過敏症症状を鼻症状スコアにより測定すると, 顕著なスコアの上昇が観察された (Fig. 10). それと平行して, ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 (Fig. 11), 及び HDC の mRNA レベルを測定したところ, 両方の mRNA レベルはともに顕著に上昇した.<sup>6,9)</sup> ヒスタミン H<sub>1</sub>

受容体 mRNA 上昇に引き続いて, H<sub>1</sub> 受容体自身もアップ調節された. アレルギー症状においてヒスタミン遊離はヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の脱感作に伴う受容体ダウン調節と H<sub>1</sub> 受容体刺激により引き起こされる H<sub>1</sub> 受容体アップ調節が同時に起こっていると考えられるが, アレルギーモデルラット鼻粘膜において, H<sub>1</sub> 受容体アップ調節が優位になっていることが明らかとなった. 一方, HDC mRNA レベルの上昇は鼻粘膜の HDC 活性, ヒスタミンレベルの上昇を伴った. 以上の結果は, アレルギー発作によりヒスタミンの合成亢進, 及びヒスタミンの受容体発現レベルの上昇を介するヒスタミンシグナルの増強が示唆される.

#### 5. アレルギーモデルラット鼻粘膜におけるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体, 及びヒスチジン脱炭酸酵素の mRNA レベル上昇に対するアレルギー疾患治療薬の影響

鼻過敏症の主たる治療薬は抗ヒスタミン薬とステロイドホルモンである. そこで, 抗ヒスタミン薬, ステロイドをアレルギーモデルラットに前投与し, 鼻過敏症発作誘発後の鼻粘膜ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容

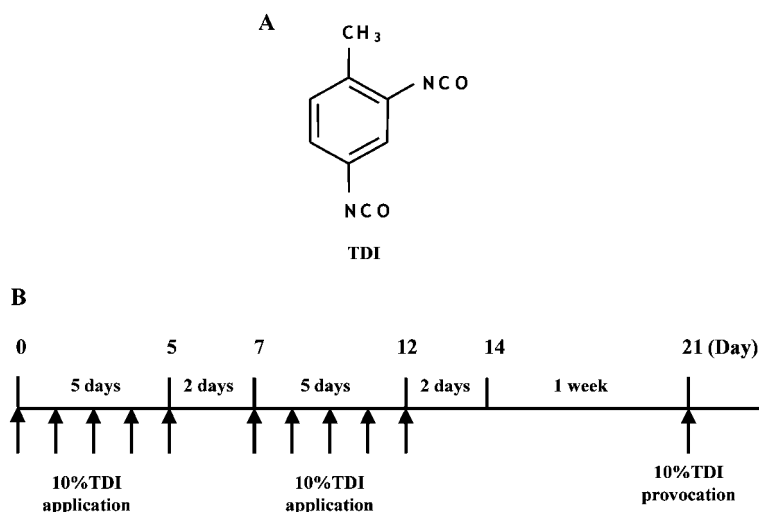


Fig. 8. Chemical Structure of Toluene 2,4-Diisocyanate (TDI) (A), and Experimental Schedule for the Preparation of TDI-induced Nasal Hypersensitivity Model Rats Using Brown-Norway Rats  
Arrows indicate sensitization time with 10% TDI.

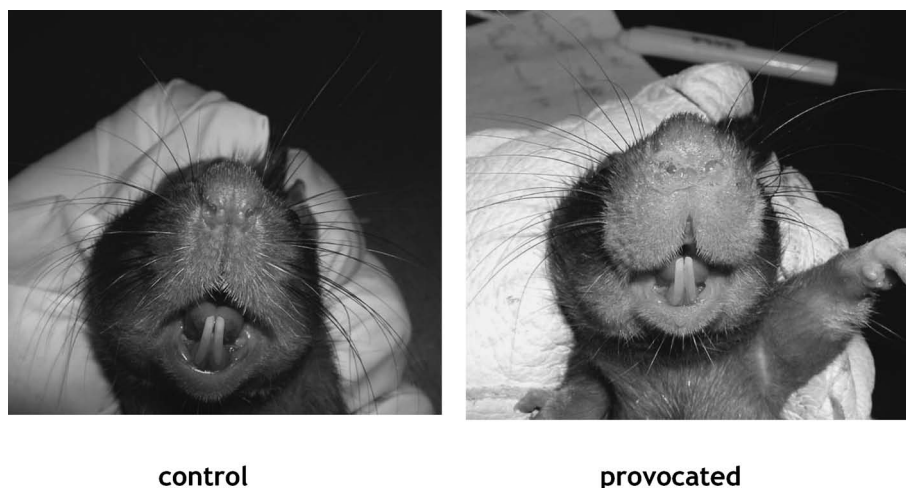


Fig. 9. Photographs of Control Brown-Norway Rats (Left) and Model Rats after TDI Provocation with TDI (Right)

体、及びヒスチジン脱炭酸酵素の mRNA レベル上昇に対する影響を調べた。抗ヒスタミン薬の前投与はヒスタミン  $H_1$  受容体 mRNA レベルの上昇を約半分に抑制した。HDC mRNA レベルの上昇に対しては、*d*-クロルフェニラミンは有意な抑制作用を示さなかったが、オロパタジンは有意な抑制作用を示した。 $H_1$  受容体 mRNA レベル上昇に対する抗ヒスタミン薬の抑制が部分的であったことは、鼻粘膜  $H_1$  受容体 mRNA 上昇に対する  $H_1$  受容体シグナルの関与とそれ以外のシグナルの関与が存在することを示唆する。HDC mRNA レベル上昇は  $H_1$  受容体を介するシグナルの関与はないと考えられる。

しかし、オロパタジンによる HDC mRNA レベルの上昇に対する部分的抑制はオロパタジンが  $H_1$  受容体以外の標的を介して HDC 遺伝子発現亢進を抑制していることが考えられる。そして、この標的が新たな鼻過敏症治療薬の標的となる可能性が考えられる。一方、ステロイドホルモンであるデキサメサゾンには鼻粘膜  $H_1$  受容体、及び HDC の両方の mRNA レベルの上昇を完全に抑制した。HeLa 細胞の  $H_1$  受容体刺激による  $H_1$  受容体 mRNA レベルの上昇、あるいは、HeLa 細胞を用いた  $H_1$  受容体プロモーターアッセイによるプロモーター活性上昇もデキサメサゾンは完全に抑制した。<sup>6)</sup> また、アレ

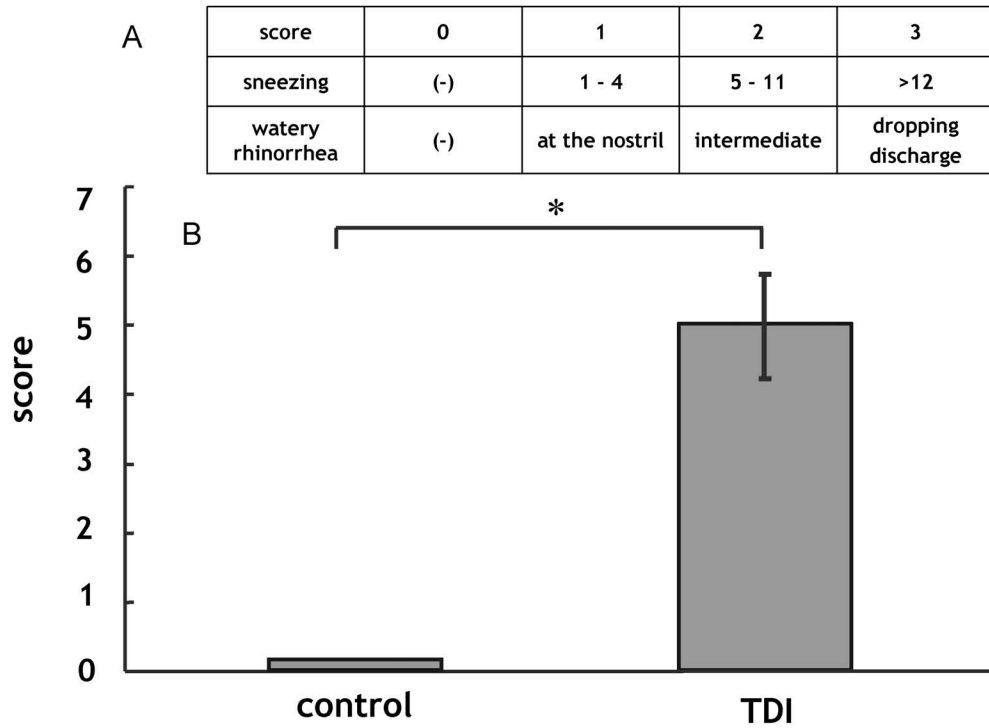


Fig. 10. Scoring Criteria for Symptoms of Nasal Hypersensitivity (A), and Scores of Control Rats and TDI-induced Hypersensitivity Rats (B)  
 \* $p < 0.01$  vs. control ( $n=4$ ).

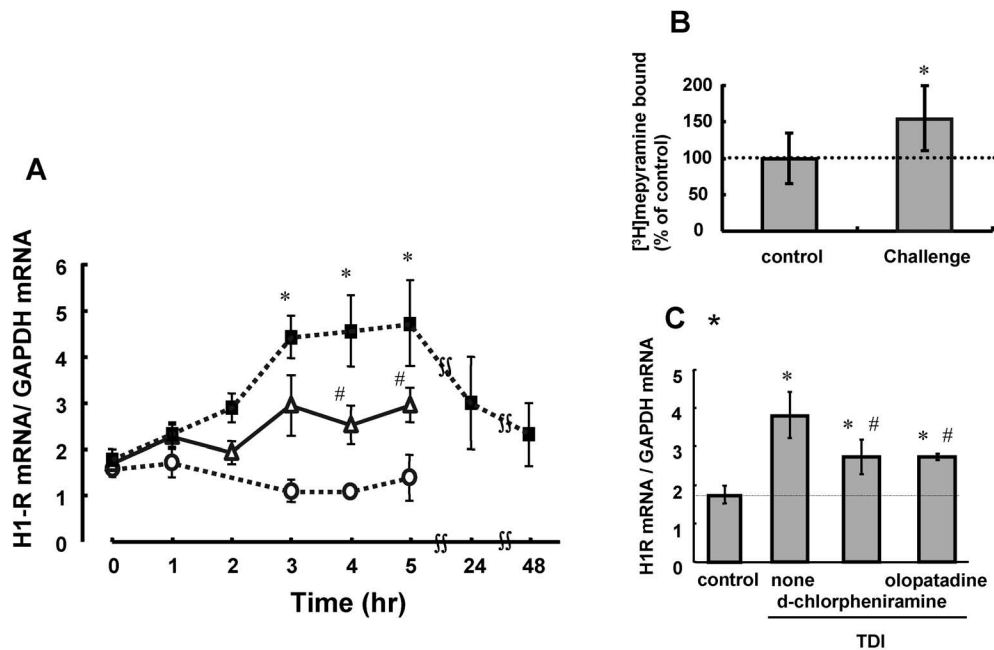


Fig. 11. Up-regulation of Histamine H<sub>1</sub> Receptor in Nasal Mucosa of TDI-sensitized Nasal Hypersensitivity Rats  
 A: time-course of histamine H<sub>1</sub> receptor mRNA level after provocation with TDI. Control (○), TDI provocation (■) and pretreatment of *d*-chlorpheniramine (30 mg/kg wt, *ip*) 15 min before TDI-provocation (△). \* $p < 0.01$  vs. control ( $n=4$ ) and \* $p < 0.01$  vs. TDI-provocation. B: expression level of histamine H<sub>1</sub> receptor in nasal mucosa of control rats and TDI-induced model rats 24 hours after provocation. The receptor was determined with [<sup>3</sup>H]mepyramine binding assay, and the control value was represented as 100%. \* $p < 0.05$  vs. control ( $n=4$ ). C: Suppression of histamine H<sub>1</sub> receptor mRNA elevation by pre-treatment of anti-histamines (*d*-chlorpheniramine and olopatadine, 30 mg/kg wt, *ip*) 15 min before provocation. \* $p < 0.05$  vs. control ( $n=4$ ), and \* $p < 0.05$  vs. TDI-none ( $n=4$ ).

ルギーモデルラット鼻粘膜における HDC 活性上昇, 及びヒスタミンレベル上昇に対してもデキサメサゾン<sup>9)</sup>は完全に抑制した。デキサメサゾンのプロモーター部位における抑制性転写調節部位の同定とその機構解明は興味深い。

アレルギー疾患治療薬には抗ヒスタミン薬, ステロイド以外に種々が開発されつつある。Th2 サイトカイン抑制薬のスプラタスト, 生薬の小青竜湯, 苦参 (Sophorae Radix) はアレルギー疾患の治療に用いられる。これらの薬物のアレルギーモデルラット鼻粘膜におけるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体, 及び HDC の mRNA レベル上昇に対する影響を調べた。3 種の薬物はヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 mRNA レベル上昇に対して強力な抑制作用を示した。特に, スプラタストは完全に近い抑制を示した。HeLa 細胞の H<sub>1</sub> 受容体刺激による H<sub>1</sub> 受容体 mRNA レベルの上昇に対する 3 種の薬物の影響を調べたところ, 3 種はともに影響を示さなかった。抗ヒスタミン薬, 及びステロイドホルモンの H<sub>1</sub> 受容体 mRNA レベル上昇に対する抑制作用は H<sub>1</sub> 受容体発現細胞のレベルで作用しているのに対し, 3 種の薬物はヒスタミンを含めた H<sub>1</sub> 受容体発現細胞に作用するメディエーター遊離機構に作用すると考えられる。

#### 6. アレルギーモデルラット鼻粘膜におけるアレルギーサイトカイン mRNA レベルの上昇とスプラタスト, 生薬による抑制

アレルギーモデルラット鼻粘膜におけるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体及びその mRNA レベルのアップ調節には遊離したヒスタミンによる H<sub>1</sub> 受容体刺激を介するシグナルとそれ以外のメディエーターによるシグナルが関与するが, スプラタスト, 及び生薬はヒスタミン遊離, 及びその他のメディエーター遊離に関係する機構を抑制すると考えられる。そこで, 上流のメディエーターとしてアレルギーサイトカインの産生に着目した。鼻過敏症発作後, 鼻粘膜のインターロイキン (IL) -4, IL-5, IL-9 のそれぞれの mRNA レベルは顕著に上昇した。IL-4 mRNA レベル上昇に対して, 3 種の薬物は強力な抑制作用を示した。特に, スプラタストはほぼ完全に抑制した。IL-5 mRNA レベル上昇に対しても, 非常に強力な抑制作用を示した。そして, 苦参, 小青竜湯はほぼ完全に抑制した。IL-9 mRNA レベル上昇に対して, スプラタストは無影響であった。ところが, 苦

参, 小青竜湯はともに IL-9 mRNA レベルの上昇をさらに増強した。

#### 7. 肥満細胞系培養細胞におけるアレルギーサイトカイン mRNA レベルの上昇とスプラタスト, 小青竜湯による抑制

RBL-2H3 細胞は塩基性白血病由来の培養細胞である。IgE 受容体を発現し, IgE 受容体刺激によりヒスタミン遊離が引き起こされ, 肥満細胞と類似した性質を有する。この培養細胞において, IgE 受容体刺激によるアレルギーサイトカイン (IL-4, 及び IL-5) の mRNA レベル上昇が報告されている。<sup>10)</sup> IL-9 mRNA レベルの上昇は文献的に明確ではないが, 筆者らの研究により, IL-9 mRNA レベルの上昇が引き起こされた。RBL-2H3 細胞への小青竜湯の前処置は IgE 受容体刺激による 3 種のアレルギーサイトカイン mRNA レベルの上昇に対して抑制作用を示さず, アレルギーモデルラット鼻粘膜における実験結果と全く異なる結果を得た。この差異に対する機構解明は今後の課題であるが, 3 種のアレルギーサイトカイン遺伝子発現機構に作用する上位のシグナル機構に対して, 小青竜湯が標的として作用すると考えられる。そして, その標的機構は RBL-2H3 細胞内には存在しないと考えられる。

一方, RBL-2H3 細胞へのスプラタストの前処置も IL-4 mRNA レベル上昇を抑制しなかった。IL-5 mRNA レベル上昇に対して抑制傾向を示したが, 有意差のある抑制作用を示さなかった。それに対して, IL-9 mRNA レベル上昇をほぼ完全に抑制した。小青竜湯の場合と同様, スプラタストの前処置においてもアレルギーモデルラット鼻粘膜と RBL-2H3 細胞におけるアレルギーサイトカイン mRNA レベルに対する影響において異なる結果が得られた。

*In vivo* における IL-4 mRNA レベル, 及び IL-5 mRNA レベルの上昇に対する強力な抑制作用が *in vitro* においてはみられないのに対し, *in vivo* において抑制作用を示さなかった IL-9 mRNA レベル上昇が *in vitro* ではほぼ完全に抑制された (Fig. 12)。この実験結果に対する機構も今後の課題であるが, RBL-2H3 細胞内にスプラタストの標的シグナル分子が存在することが明らかとなった。RBL-2H3 細胞に存在するスプラタストの分子標的を明確にすることにより, IL-9 遺伝子発現機構解明が進展すると考えられる。



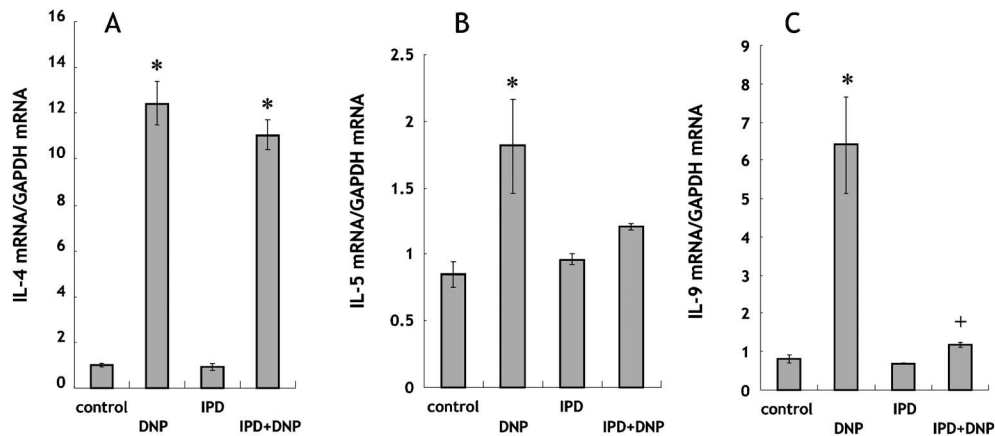


Fig. 12. Effects of Suplatast on IgE Receptor-mediated Elevation of Allergy Cytokine mRNAs in RBL-2H3 Cells

RBL-2H3 cells pre-treated with 100  $\mu$ M suplatast (IPD) were sensitized with 100 ng/ml anti-dinitrophenyl (anti-DNP) monoclonal antibody for 12 hours. IL-4 mRNA (A), IL-5 mRNA (B) and IL-9 mRNA (C) were determined one hour after the stimulation of sensitized cells by 100 ng/ml DNP-HAS (DNP). \* $p < 0.05$  vs. control ( $n=4$ ) and + $p < 0.05$  vs. DNP ( $n=4$ ).

## 8. おわりに

ヒスタミン  $H_1$  受容体はアレルギー疾患の主要メディエーターであるヒスタミンのシグナルを仲介し、アレルギー疾患の主要症状発現に関与する。抗ヒスタミン薬はヒスタミン  $H_1$  受容体を介するシグナルの遮断により、症状改善を引き起こしていることはほとんど疑いがない。本研究により、ヒスタミン  $H_1$  受容体発現レベルは脱感作機構、及び受容体遺伝子発現機構を介して調節されていることが明らかとなった。アレルギーモデルラットを用いる研究において、アレルギー発作誘発によりヒスタミン  $H_1$  受容体発現レベルは上昇することが明らかとなった。すなわち、アレルギー発作はヒスタミン  $H_1$  受容体発現レベルの上昇を引き起こし、症状を悪化させる可能性が考えられる。また、種々の生理機能及び病態において、ヒスタミン  $H_1$  受容体遺伝子発現と受容体アップ調節が明らかにされつつある。<sup>11-14)</sup>

アレルギー疾患モデルラット鼻粘膜ヒスタミン  $H_1$  受容体 mRNA レベル上昇に対して、抗ヒスタミン薬は約半分の部分的抑制を引き起こした。HeLa 細胞を用いる研究により、 $H_1$  受容体刺激は蛋白キナーゼ C のシグナルを介する  $H_1$  受容体遺伝子発現亢進を引き起こすことが明らかとなり、鼻粘膜においてもこの機構が引き起こされていると考えられる。抗ヒスタミン薬は鼻粘膜においてヒスタミン  $H_1$  受容体を介するシグナルの遮断のみならず、 $H_1$  受容体発現レベル上昇の抑制作用を介する症状

改善を引き起こしている可能性が示唆される。

それに対して、アレルギー疾患モデルラット鼻粘膜におけるヒスタミン  $H_1$  受容体 mRNA レベル上昇は種々のアレルギー疾患治療薬によりほぼ完全に近いレベルで抑制された。これらの治療薬はヒスタミン  $H_1$  受容体シグナルを遮断しないが、受容体発現レベルを強力に抑制することでシグナルの抑制に関与していると考えられる。しかし、それぞれの標的分子、及び作用機構は全く異なる。ステロイドホルモンはヒスタミン  $H_1$  受容体発現細胞に作用し、 $H_1$  受容体遺伝子プロモーター活性の抑制を介して作用を引き起こす (Fig. 13)。それに対して、小青竜湯、苦参などの和漢薬、及びスプラタストはヒスタミン遊離、及びヒスタミン以外のアレルギーメディエーター産生の抑制を介して作用を引き起こすと考えられる。IL-4 mRNA、及び IL-5 mRNA のレベルがアレルギー疾患モデルラット鼻粘膜において上昇し、3 種のアレルギー疾患治療薬により、強力に抑制された。これらのアレルギーメディエーターがヒスタミン  $H_1$  受容体遺伝子発現亢進を引き起こすという機構を明らかにする必要がある。IL-4、及び IL-5 は代表的な Th2 サイトカインであるが、肥満細胞においても産生される。<sup>15,16)</sup> そして、その遺伝子発現亢進シグナルには NF- $\kappa$ B の関与が明らかにされている。<sup>17)</sup> また、苦参は NF- $\kappa$ B の遺伝子発現亢進を抑制することが報告されている。<sup>18)</sup> ヒスタミン  $H_1$  受容体 mRNA レベル上昇の抑制作用において、作用する標的細胞の違いから、ステロイドホル

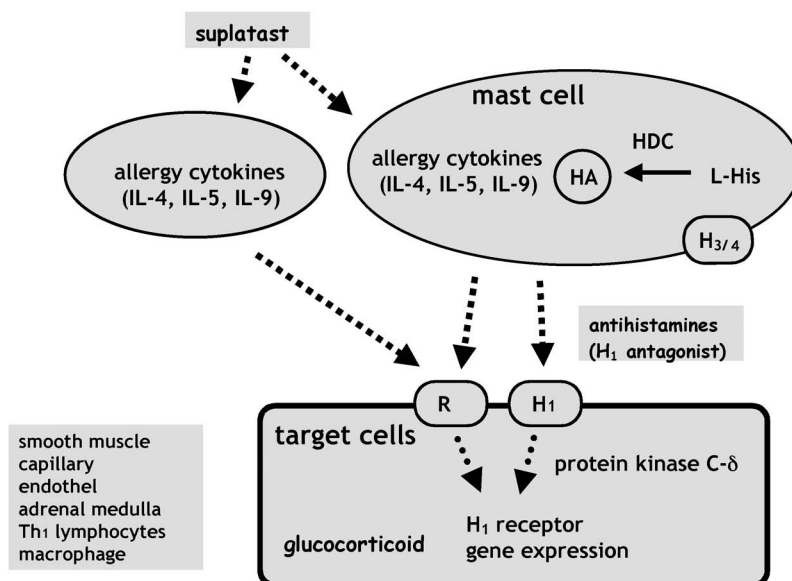


Fig. 13. Regulation Mechanism of Histamine H<sub>1</sub> Receptor Gene Expression as Target of therapeutics for Allergic Diseases

モンが短時間で作用を発現するのに対して、小青竜湯、苦参などの和漢薬、及びスプラタストが長時間を要すると思われる。

小青竜湯、苦参などの和漢薬、及びスプラタストの標的分子とその作用機構解明に興味を持たれる。アレルギーモデルラットを用いるアレルギー疾患関連遺伝子発現亢進に関する *in vivo* の研究結果を培養細胞を用いる *in vitro* の実験で再現できることがその研究目的の進展にたいへん重要である。RBL-2H3 細胞における種々のアレルギーサイトカインの mRNA レベル上昇に対する抑制作用を調べたが、*in vivo* の実験結果とよい一致が見出されなかった。この理由として、*in vivo* において、複雑なアレルギーシグナルネットワークが背後にあるためと考えられる。しかし、RBL-2H3 細胞の IgE 受容体刺激による IL-9 mRNA レベル上昇がスプラタストの投与によりほぼ完全に抑制されたことはこの薬物の標的分子がこの細胞内に存在することを意味している。今後、スプラタストの標的分子の同定と分子薬理作用機構を解明し、本研究進展のためのモデル研究にしたい。

スプラタスト、小青竜湯、及び苦参の作用は遺伝子発現調節機構を介して引き起こされると考えられる。そして、この種の薬物が今後の重要な治療薬として用いられるようになると考えられる。しかし、複雑なアレルギーシグナルネットワークの存在のため

に、この種の薬物の治療薬としての投与法の確立が重要である。

## REFERENCES

- 1) Smit M. J., Timmerman H., Hijzelendoorn J.C., Fukui H., Leurs R., *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 1071-1080 (1996).
- 2) Kawakami N., Miyoshi K., Horio S., Yoshimura Y., Yamauchi T., Fukui H., *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **25**, 685-693 (2003).
- 3) Horio S., Ogawa M., Kawakami N., Fujimoto K., Fukui H., *J. Pharmacol. Sci.*, **94**, 410-419 (2004).
- 4) Horio S., Kato T., Ogawa M., Fujimoto K., Fukui H., *FEBS Lett.*, **573**, 226-230 (2004).
- 5) Yoshimura S., Mishima R., Miyoshi K., Fujimoto K., Murata Y., Kitamura Y., Takeda N., Fukui H., *Inflamm. Res.*, **54**, S42-S43 (2005).
- 6) Kitamura Y., Miyoshi A., Murata Y., Calibi B., Fukui H., Takeda N., *Acta Otolaryngol.*, **124**, 1053-1058 (2004).
- 7) Iriyoshi N., Takeuchi K., Yuta A., Ukai K., Sakakura Y., *Clin. Exp. Allergy*, **26**, 379-385 (1996).
- 8) Dinh Q. T., Cryer A., Dinh S., Peiser C., Wu S., Springer J., Hamelmann E., Klapp B.F., Hept W., Fischer A., *Clin. Exp. Allergy*, **35**,

- 1443–1448 (2005).
- 9) Kitamura Y., Das A. K., Murata Y., Maeyama K., Dev S., Wakayama Y., Kalbi B., Takeda N., Fukui H., *Allergol. Int.*, **55**, 279–286 (2006).
- 10) Sewell W. A., Scurr W. A., Orphanides H., Kinder S., Ludowyke R.I., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **5**, 18–23 (1998).
- 11) Matsuda N., Jesmin S., Takahashi Y., Hatta E., Kobayashi M., Matsuyama K., Kawakami N., Sakuma I., Gando S., Fukui H., Hattori Y., Levi R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 786–795 (2004).
- 12) Jin C., Lintunen M., Panula P., *Exp. Neurol.*, **194**, 43–56 (2005).
- 13) Lozada A., Munyao N., Sallmen T., Lintunen M., Leurs R., Lindsberg P. J., Panula P., *Neuroscience*, **136**, 371–379 (2005).
- 14) Bryce P. J., Mathias C. B., Harrison K. L., Watanabe T., Geha R. S., Oettgen H. C., *J. Clin. Invest.*, **116**, 1624–1632 (2006).
- 15) Kawakami T., Galli S. J., *Nat. Rev.*, **2**, 773–786 (2002).
- 16) Gilfillan A. M., Tkaczyk C., *Nat. Rev.*, **6**, 218–230 (2006).
- 17) Marquardt D. L., Walker L. L., *J. Allergy Clin. Immunol.*, **105**, 500–505 (2000).
- 18) Kwon K. B., Kim E. K., Lim J. G., Shin B. C., Song Y. S., Seo E. A., Ahn K. Y., Song B. K., Ryu D. G., *Clin. Chim. Acta*, **348**, 79–86 (2004).