

ヒト肺炎症モデルの作成とその薬理的応用

濱 寛,^a 小野 信文,^{*a} 阿部 正義^b**A Study for an Allergic Inflammation Model Using Human Lungs
and Its Pharmacological Application**Hiroschi HAMA,^a Nobufumi ONO,^{*a} and Masayoshi ABE^b^aPharmaco-Informatics Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,
and ^bDepartment of Pharmacology, School of Medicine, Fukuoka University,
Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

(Received January 5, 2007)

The complement system, which plays an important role in innate immunity, is considered to be important in the pathophysiology of allergic asthma. A patient with allergic asthma shows the reversible characteristic system of bronchoconstriction, increased mucus secretion, and complicated airway inflammation. Various cytokines secreted from Th2 cells contribute to the system. Cysteinyl-leukotrienes (CysLTs) are also considered to be one of the important mediators involved in asthmatic pathophysiology. However, the effects of a drug on humans may not be the same as those on animals due to species differences in complement-related molecules. In this series of experiments, we tried to establish a model in which the effects of a drug on the production of CysLTs from human lung preparations were evaluated following an anaphylactic reaction. CysLT production increased when the passively sensitized lung tissues were stimulated with anti-IgE antibody. The coaddition of anaphylatoxin, C5a, with the anti-IgE antibody potentiated CysLT production. The response to C3a was weaker when compared with that to C5a. In addition, increased production of CysLTs by adding serum at a specific ratio was dose dependently inhibited by nonpeptide C5a receptor antagonist, W-54011, or a novel complementary peptide inhibitor of C5a, acetyl peptide A. From these results, it is suggested that C5a potentiates cysLT production from human lung tissues and contributes to allergic inflammation like asthma, and thus acetylated peptide A and W-54011 are useful for suppressing allergic inflammation in the lungs.

Key words—allergic asthma; C5a inhibitor; cysteinyl-leukotrienes; anaphylatoxin; human lung tissue

1. はじめに

気管支喘息は、可逆的な気道収縮と気道過敏性増大を特徴とする疾患であり、わが国を始め多くの先進国においてその有病率が増加し、新たな治療法の開発が必要とされている。近年、その成因にはマスト細胞を主体とする即時型アレルギー反応のほかに好酸球やリンパ球を介した気道炎症が深く関与することが明らかになってきたが、その病態機序はいまだ不明なところも多く、特に治療薬の開発は進展しているものの根治的な薬物の開発は遅れている。

炎症の発現機構として、Th2細胞とそれから分泌

されるIL-4、IL-5、IL-13などのサイトカインが好酸球に働き、気道の炎症や過敏性において重要であることが示されている。¹⁾ その中でも、脂質性メディエータであるcysteinyl-leukotrienes (CysLTs: LT C₄, LT D₄, LT E₄)が気管支収縮、²⁾ 血管透過性の亢進、³⁾ 気管支粘液の分泌亢進、⁴⁾ 好酸球の走化性の亢進⁵⁾等により喘息の病態に関与していることが基礎的にも臨床的研究からも報告されている。⁶⁾ さらに、最近になり補体の活性化産物であるアナフィラトキシン(特にC5a及びC3a)が喘息の炎症に寄与していることが示唆されている。⁷⁾

このような研究の多くは、動物モデルで行われ、C5a及びC3aの喘息における重要性が蓄積されてきているが、ヒト疾患での詳細な関与は不明である。アナフィラトキシンは喘息以外の様々な難治性炎症疾患、例えば敗血症、関節リウマチ等への関与

^a福岡大学薬学部医薬品情報学教室 (〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1), ^b同医学部薬理学教室 (〒814-0180 福岡市城南区七隈 7-45-1)

*e-mail: ononob@fukuoka-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムGS-1で発表したものを中心に記述したものである。

が想定されそれらの治療のために C5a 受容体 (C5aR) 拮抗剤の開発が試みられてきたが,⁸⁾ アナフィラトキシンを含め補体系分子は一次構造での種差が大きいことも知られている。⁹⁾

そこでわれわれは、ヒトの喘息におけるアナフィラトキシンの役割を解明するために、ヒト肺組織を用いた実験モデルの作成を試み、さらに薬理的に応用を行ったので概説する。

2. 補体とアレルギー性気道炎症

喘息におけるアレルギー性気道炎症の発現機序は、大きく自然免疫系と獲得免疫系の2要因からなると考えられる。

補体系は自然免疫系の主要な成分と考えられ、その活性化には3つの経路が考えられている。^{10,11)} すなわち、古典経路、第2は代替経路又は第2経路並びにレクチン経路といい、マンノース結合レクチン (MBL) と呼ばれるタンパク質が侵入抗原の糖鎖を認識し補体系が活性化されていく3経路である (Fig. 1)。また、C3、C4、C5のそれぞれが活性化されると分解産物として C3a、C4a、C5a が産生され、これらはアナフィラトキシンと呼ばれ、免疫系では重要な働きを担っている。

獲得免疫系では、抗原刺激により T リンパ球が活性化されマクロファージの遊走・活性化を促進する細胞性免疫と、Th2 細胞より産生されたサイトカインが B 細胞を刺激し抗体を産生させる液性免疫がある。その中で IgE 抗体は好酸球や肥満細胞の受容体に結合し、そこに抗原が結合すると種々のメ

ディエータが放出され炎症が起こる。なかでも CysLTs は喘息の病態で重要なメディエータと考えられている。このように、以前は自然免疫と獲得免疫は別々に働くと考えられていたが、最近両者は密接に関連し、またこの2つの橋渡しをする機構の存在が明らかになり、抗原の侵入により抗原提示細胞は未熟 T 細胞を副刺激分子の助けを得て抗原提示することにより Th1 や Th2 細胞に分化させる。¹²⁾ このときアナフィラトキシンの C5a や C3a は抗原提示細胞に受容体を介して結合し、T 細胞の分化に影響を与えている。¹³⁾ C5aR には最近2種類の受容体 CD88 (一般にこちらを C5aR という) と C5L2 (C5a-like receptor 2) が発見され、C5L2 は C5aR の第2の受容体として報告された。¹⁴⁾ C5adesArg (アナフィラトキシンからアルギニンが取れた一次代謝物) は CD88 よりも C5L2 に10倍以上の親和性で結合することが示された。¹⁵⁾

C5aR において、CD88 を介したシグナル伝達は IL-12 産生を促進し Th1 反応を誘導するが、C5L2 を介したシグナル伝達は IL-12 を抑制し Th2 反応を促進する。一方、C3 分解産物である C3b や iC3b は IL-12 を抑制し Th2 反応を促進する。¹⁶⁾ このように C3a と C5a は、T 細胞反応の分化において Th1/Th2 反応を進める中心的役割を演じている。これらのことから、自然免疫と獲得免疫が密接な関係にあると考えられるようになった。

3. ヒト肺組織からの CysLTs の産生

液体クロマトグラフィーによる分離・精製後、CysLTs EIA Kit を用いて定量した。Figure 2 に示すように、CysLTs 産生量は、ヒト IgE 抗体と抗ヒト IgE 抗体との反応時間 30 分まで増加し、また抗ヒト IgE 抗体量・肺重量の増加に比例して増加した。

抗ヒト IgE 抗体を加えて 30 分間インキュベーションするとアナフィラキシー反応により CysLTs が産生されるが、この反応液中に血清 (Serum)、血漿 (Plasma)、フサン添加血漿 (Plasma+Futhan) を加えると、CysLTs 産生量はさらに増加するが、3 者間でその強度に差はみられなかった (Fig. 3)。

血清の量については、5% を添加した場合、対照に比べ CysLTs 産生量をさらに増加させた。しかし、10% 以上ではそれ以上の増加はみられなかった (Fig. 4)。

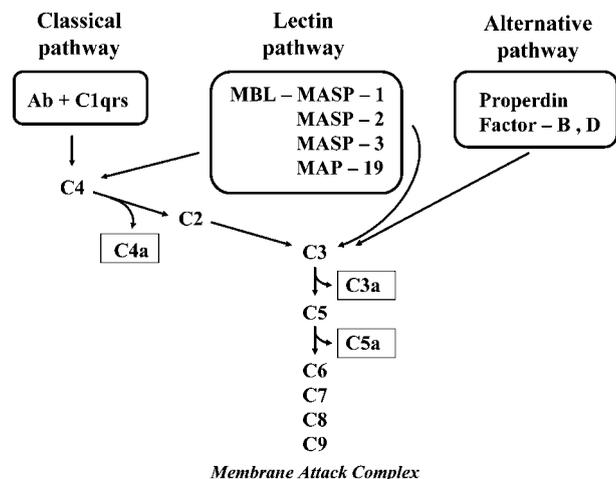


Fig. 1. Activation Pathway of Complement and Anaphylatoxins

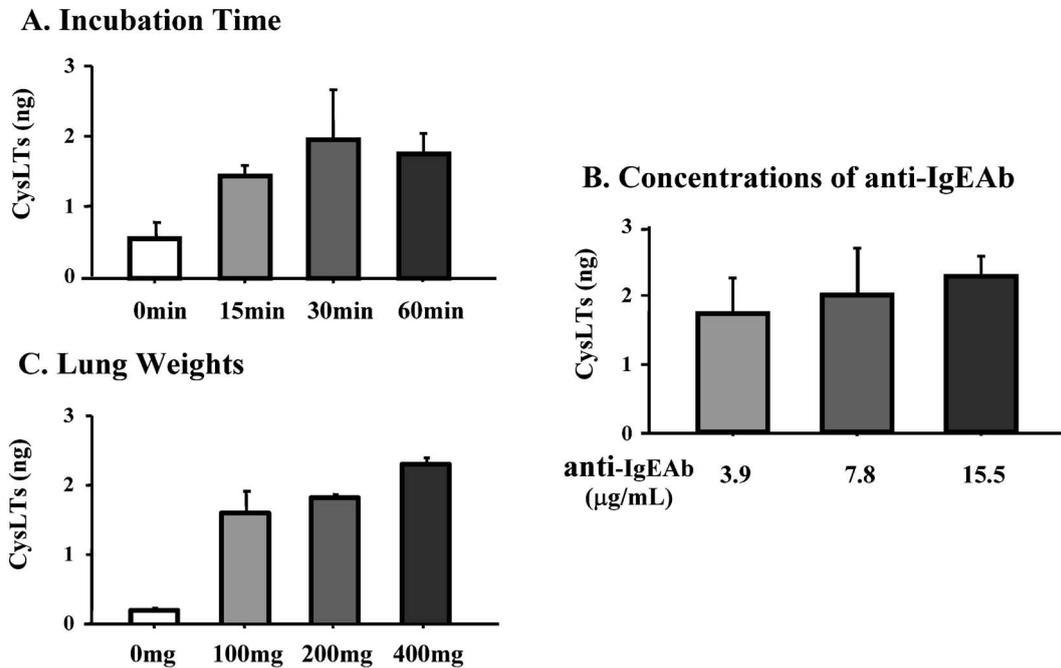


Fig. 2. Influences of Various Incubation Conditions on Amount of CysLTs ($n=3-4$).

A: changes in incubation time of human IgE antibody and anti-human IgE antibody, B: changes in concentrations of aIgEAb (3.9–15.5 microg/ml), C: changes in lung weights ($n=3-4$).

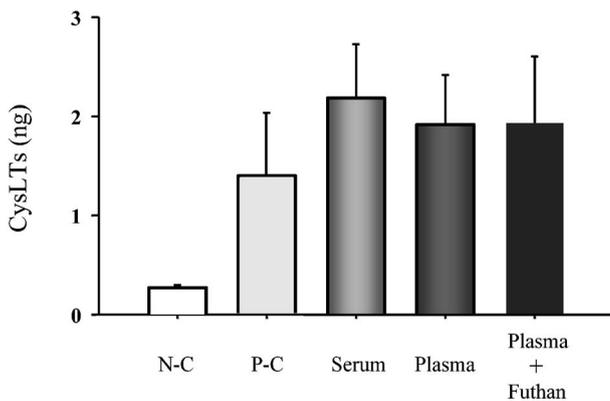


Fig. 3. Effects of Co-addition of Serum, Plasma and Futhan on CysLTs Production by Human Chopped Lung Fragments Following the Anaphylactic Reaction

The lung fragments were incubated with or without human IgE at 22 °C for 15 hr to passively sensitize. After washing with Tyrode's buffer, the fragments were stimulated with anti-human IgE antibody (7.8 µg/ml) at 37 °C for 30 min. After the termination of the reaction, CysLTs in the supernatants were assayed by purification with high performance liquid chromatography and EIA. N-C: negative control, without anti-human IgE antibody, P-C: positive control, with anti-human IgE antibody ($n=3-6$).

アナフィラトキシンであるヒト C5a 及び C3a の添加量についてみると、C5a では 1.0 ng/ml 時に、C3a では 100 ng/ml 以上のときに同程度の CysLTs 産生量を増加させる強い作用がみられ、C5a と C3a の作用の強さには 100 倍以上の差がみられた。これ

らから、血清及び血漿には補体が含まれているが、¹⁷⁾ その中で補体の活性化産物であるアナフィラトキシンが CysLTs 産生量を増加させた可能性が示唆される (Fig. 5)。

さらに、抗 IgE 抗体を添加しない C5a 及び C3a 単独刺激では、CysLTs 産生は認められなかった (Fig. 6)。しかしながら、C5a 又は C3a 存在下にアナフィラキシー反応を起こすと、CysLTs 産生は有意に増加したが、C5a と C3a の作用強度には約 100 程度の違いがあることがヒト肺組織においても証明された。また実験成績は示さないが、この実験系ではヒト肺組織からアナフィラキシー反応によりアナフィラトキシンは産生されなかった。

4. 薬理的解析への応用：W-54011 並びに ac-Pep-A の効果

前述の実験系を用いて、非ペプチド性の C5aR 拮抗剤である W-54011 及び C5a 阻害剤である acPep-A の効果を検討すると、Figs. 7, 8 に示すように、両剤とも C5a 存在下のアナフィラキシー反応による CysLTs 産生量を濃度依存的に抑制したが、C3a 存在下での CysLTs 産生量の抑制はみられなかった。このことは本モデルの評価をする上で大きな意味をもち、W-54011 がヒトに特異性を持っている

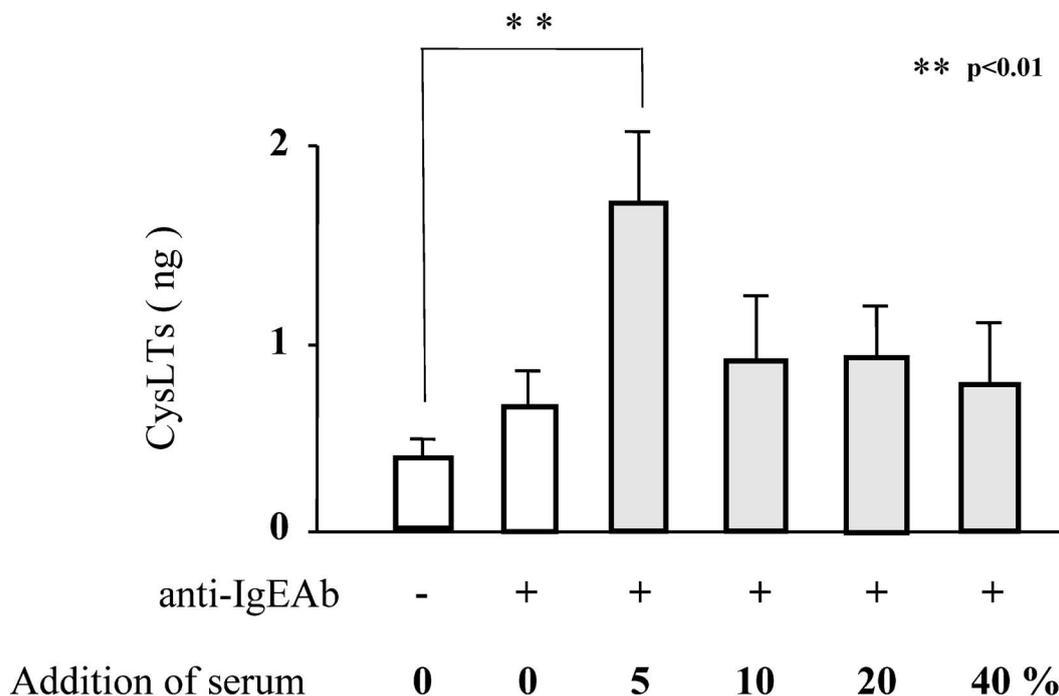


Fig. 4. Influence of Addition of Serum (0—40%) on CysLTs Production by Human Chopped Lung Fragments Following the Anaphylactic Reaction

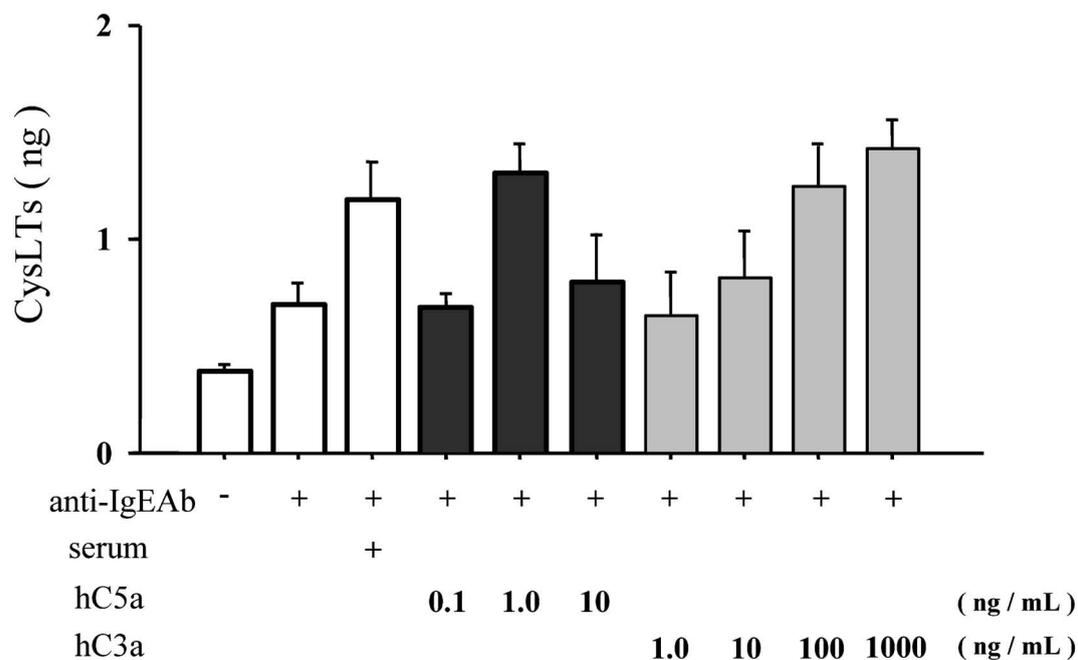


Fig. 5. Effects of Co-addition of Human C5a, C3a or Serum on CysLTs Production by Human Chopped Lung Fragments Following the Anaphylactic Reaction

ことも考え合わせると、本実験モデル系は種差の問題を解決し、抗補剤を始めとする他の抗炎症薬の評価を行うことができ、新しい薬物の開発を促進する可能性を持つものと考えられる。

5. おわりに

われわれの実験結果を中心に、ヒト肺組織を用いた研究結果を述べたが、極めて有用なモデルと言える。¹⁸⁾ しかしながら、実際の研究では、サンプル

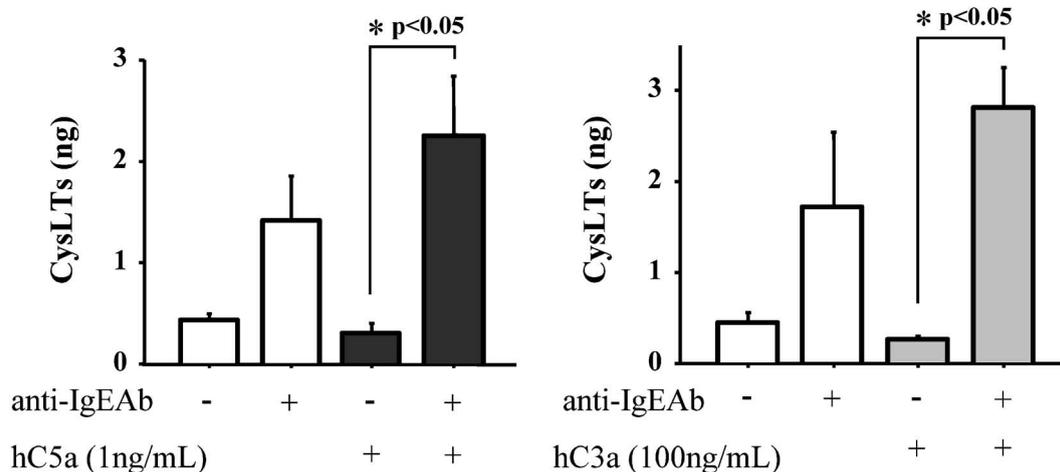


Fig. 6. Effects of Addition of Human C5a or C3a on CysLTs Production by Human Chopped Lung Fragments Following the Anaphylactic Reaction
* $p < 0.05$ ($n = 3-4$).

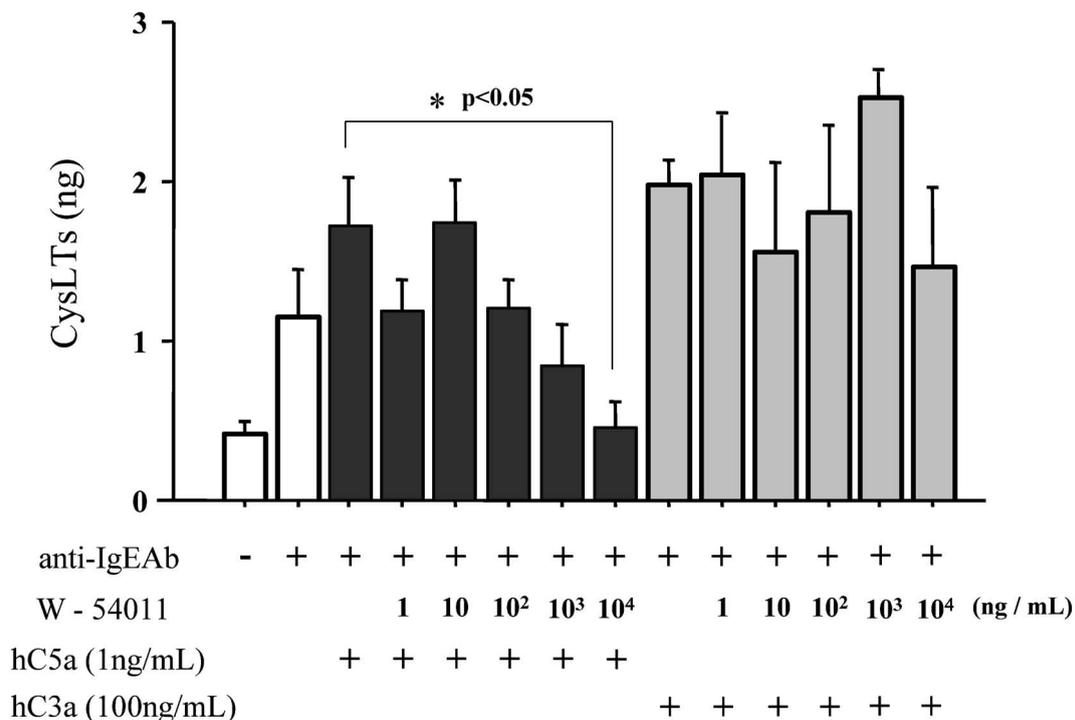


Fig. 7. Effects of W-54011 on CysLTs Production by Addition of Human C5a or C3a in the Human Chopped Lung Fragments Following the Anaphylactic Reaction
* $p < 0.05$ ($n = 3-8$).

が十分に供給されるには多くの困難があり、またいったん、得られたサンプルでも長時間の保存が問題となる。最近、阿部らは、ヒト肺組織を凍結することなしに-5°Cで5日間保存するスーパークーリングシステムを用いたヒト組織保存法を確立した。¹⁹⁾これにより、比較的安定的に研究することが可能となり、さらに補体が関与する肺炎症の機構の解明が

進むと思われる。なお、ヒト肺組織は、ガン患者の摘出肺からガン組織以外の部分の組織を使用した。また、摘出並びに研究への使用は福岡大学医学部倫理委員会の承認の下患者同意を得て行われた。

謝辞 ヒト肺組織を提供頂いた第二外科白日高歩教授に深謝する。

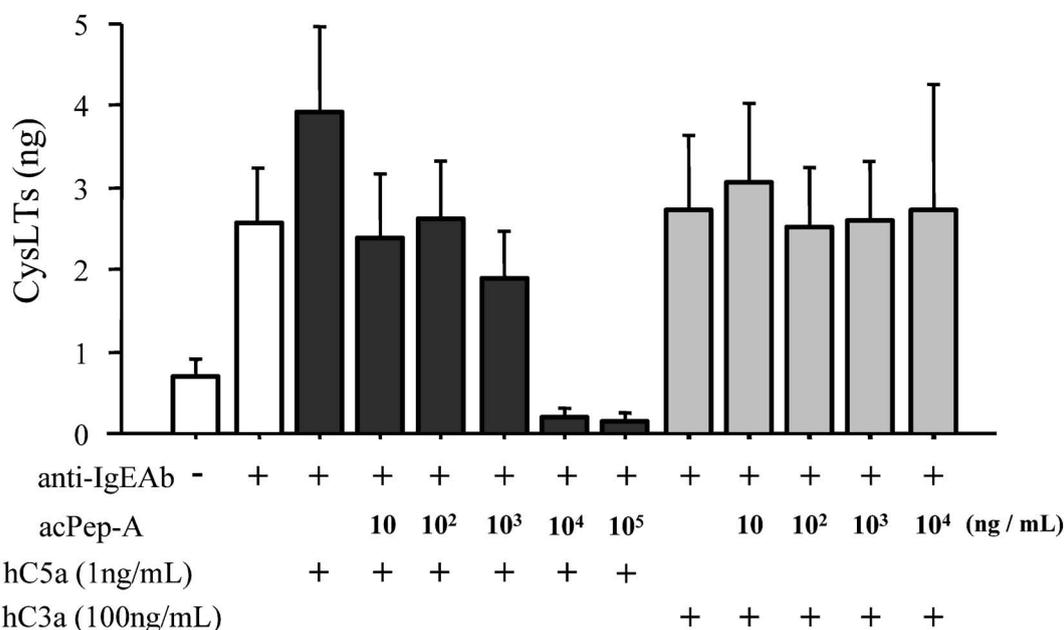


Fig. 8. Effects of acPep-A on CysLTs Production by Addition of Human C5a or C3a in the Human Chopped Lung Fragments Following the Anaphylactic Reaction

* $p < 0.05$ (n=3–10).

REFERENCES

- Green R. H., Brightling C. E., Pavord I. D., Wardlaw A.J., *Postgrad. Med. J.*, **79**, 259 (2003).
- Dahlen S. E., Hedqvist P., Hammarstrom S., Samuelsson B., *Nature (London)*, **288**, 484–486 (1980).
- Dahlen S. E., Bjork J., Hedqvist P., Arfors K. E., Hammarstrom S., Lindgren J. A., Samuelsson B., *Proc Natl Acad Sci USA.*, **78**, 3887–3891 (1981).
- Coles S. J., Neill K. H., Reid L. M., Austen K. F., Nii Y., Corey E. J., Lewis R.A., *Prostaglandins*, **25**, 155–170 (1983).
- Henderson Jr., W. R., Lewis D. B., Albert R. K., Zhang Y., Lamm W. J., Chiang G. K., Jones F., Eriksen P., Tien Y.T., Jonas M., Chi E. Y., *J. Exp. Med.*, **184**, 1483–1494 (1996).
- Smith L. J., *Arch. Intern. Med.*, **156**, 2181–2189 (1996).
- Abe M., Shibata K., Akatsu H., Shimizu N., Sakata N., Katsuragi T., Okada H., *J. Immunol.*, **167**, 4651–4660 (2001).
- Woodruff T. M., Arumugam T. V., Shiels I. A., Reid R. C., Fairlie D. P., Taylor S. M., *J. Immunol.*, **171**, 5514–5520 (2003).
- Fukuoka Y., Ember J. A., Yasui A., Hugli T. E., *Int. Immunol.*, **10**, 275–83 (1998).
- Walport M. J., *N. Engl. J. Med.*, **344**, 1140–1144 (2001a).
- Walport M. J., *N. Engl. J. Med.*, **344**, 1058–1066 (2001b).
- Murphy K. M., Reiner S. L., *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 933–944 (2002).
- Ames R. S., Li Y., Sarau H. M., Nuthulaganti P., Foley J. J., Ellis C., Zeng Z., Su K., Jurewicz A. J., Hertzberg R. P., Bergsma D. J., Kumar C., *J. Biol. Chem.*, **271**, 20231–20234 (1996).
- Ohno M., Hirata T., Enomoto M., Araki T., Ishimaru H., Takahashi T. A., *Mol. Immunol.*, **37**, 407–412 (2000).
- Okinaga S., Slattery D., Humbles A., Zsengeller Z., Morteau O., Kinrade M. B., Brodbeck R. M., Krause J. E., Choe H. R., Gerard N. P., Gerard C., *Biochemistry.*, **42**, 9406–9415 (2003).
- Marth T., Kelsall B. L., *J. Exp. Med.*, **185**, 1987–1995 (1997).
- Hugli T. E., Gerard C., Kawahara M., Scheetz II, M. E., Barton R., Briggs S., Koppel G., Russell S., *Mol. Cell. Biochem.*, **41**, 59–66

- (1981).
- 18) Abe M., Hama H., Shirakusa T., Iwasaki A., Ono N., Kimura N., Hugli T. E., Okada N., Katsuragi T., Okada H., *Microbiol. Immunol.*, **49**, 981–986 (2005).
- 19) Abe M., Jimi S., Hama H., Shiraishi T., Iwasaki A., Ono N., Shirakusa T., Katsuragi T., *Ann. Thorac. Surg.*, **82**, 1085–1089 (2006).