

誘導性ヒスタミンによる自然免疫応答の制御機構

森 秀治,^{*,a} 高橋 英夫,^b 西堀 正洋^bInducible Histamine Protects Mice from Hepatitis through H₂-receptor StimulationShuji MORI,^{*,a} Hideo K TAKAHASHI^b, and Masahiro NISHIBORI^b^aSchool of Pharmacy, Shujitsu University, 1-6-1 Nishigawara, Okayama City 703-8516, Japan and^bDepartment of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 2-5-1 Shikata-cho, Okayama City 700-8558, Japan

(Received August 22, 2007)

Histamine is well known for its roles in allergic diseases and anaphylaxis through H₁-receptor stimulation. The H₁-receptor stimulation by histamine results in an increase in vascular permeability, vasodilatation, and stimulation of nerve terminals in primary sensory neurons, thereby accelerating the inflammatory responses. On the other hand, histamine has been demonstrated to be involved in the regulation of innate and acquired immune responses through H₂-receptors. In a previous study with human peripheral blood mononuclear cells, we observed that histamine exerts various regulatory effects on monocyte/macrophage function. In this review, we discuss how inducible histamine protects mice from lethal hepatitis, induced by heat-killed *P.acnes* (1 mg, *i.v.*) followed by challenge with a low dose of lipopolysaccharide (1 μg), by reducing the excessive cytokine response in the liver. In addition, from *in vivo* studies with histidine decarboxylase knockout and H₁-, H₂-receptor knockout mice, the protective effect of histamine against fulminant hepatitis is shown to be elicited through H₂-receptor stimulation.

Key words—inducible histamine; hepatitis; H₂-receptor

1. はじめに

ヒスタミンは花粉症等に代表されるアレルギー疾患の主要なメディエーターの1つである。ヒスタミンのH₁受容体刺激を介した作用によって、血管透過性の亢進、血管弛緩、知覚神経刺激などの反応が生じ、炎症応答の促進に働く。H₁受容体刺激によるこれらの反応に加えて、近年、ヒスタミンがH₂受容体刺激を通じて自然免疫応答に係わっていることが明らかになってきた。¹⁻⁵⁾ 例えば、*in vitro* 培養実験系において、インターロイキン (IL)-18 でヒト末梢血単核球を刺激すると単球細胞表面に存在する接着因子である ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 分子の発現亢進や IL-12, インターフェロン (IFN)-γ といったサイトカインの産生が生

じるが、外からヒスタミンを添加するとヒスタミンは濃度依存的にこれらの反応を抑えることが報告されている。²⁾ さらに、ヒスタミンは IL-18 共存下でのリンパ球混合培養反応における ICAM-1 発現にも抑制的に働き、受容体作動薬や遮断薬を用いた解析から、このようなヒスタミンによる作用は H₂ 受容体刺激を介したものであることが明らかとなっている。^{3,6)}

ヒスタミン産生細胞には、肥満細胞や好塩基球、エンテロクロマフィン様 (ECL, enterochromaffin-like) 細胞などがあり、ヒスタミンは顆粒内に貯蔵され、刺激に応じて細胞外へと放出されて作用を発揮する考え方が一般的とされている。一方、顆粒内へ貯蔵されているヒスタミンとは異なり、細胞刺激に応じて生合成される「誘導性ヒスタミン」の存在様式が以前から指摘され、⁷⁾ 免疫機能などとの関連性が示唆されている。⁸⁾

本稿においては、ヒスタミン受容体欠損マウスやヒスタミン合成酵素欠損マウスを用いて実験的肝炎モデルを作成し、これらを用いた解析結果^{9,10)} に基

^a就実大学薬学部応用薬学分野生体情報学 (〒703-8516 岡山市西川原 1-6-1)

^b岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学 (〒700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1)

*e-mail: morimori@shujitsu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 127 年会シンポジウム S41 で発表したものを中心に記述したものである。

づいて「誘導性ヒスタミン」の存在意義とその調節作用を中心に概説したい。

2. 誘導性ヒスタミンとは

誘導性ヒスタミンとは、貯蔵型のヒスタミンとは異なり、生体組織においてヒスタミン生合成活性は検出されるものの、その貯蔵顆粒や組織におけるヒスタミンの存在自体を検出し難いタイプの存在様式である。誘導性ヒスタミンの生合成に必要なヒスタミン合成酵素である HDC (histidine decarboxylase) 活性の誘導は、リポポリサッカライド (LPS) や炎症性サイトカインによる刺激によって生じることが明らかにされている。^{11,12)} 誘導性ヒスタミンは、生合成ののちに直ちに細胞外へ放出されるタイプのヒスタミンであり、組織損傷や治癒過程の組織やタンパク合成が盛んな組織において検出⁹⁾されることから、生体防御との関連性が示唆されている。抗 HDC 抗体を用いた免疫組織学的な検討や *in situ* hybridization によって、HDC 発現細胞である T 細胞、B 細胞、マクロファージ、好中球、血管内皮細胞などが誘導性ヒスタミン産生細胞として明らかにされている。これらの細胞は主として免疫担当細胞であり、このことは誘導性ヒスタミンと免疫機能との関連性を推察させる知見である。次に、実験的肝炎モデルを用いた誘導性ヒスタミンの機能解析の成果を紹介する。^{9,10)}

3. 肝炎モデルにおける誘導性ヒスタミンの保護的な役割

マウスにあらかじめ *P.acnes* 菌 (熱処理死菌) を静脈投与し、一定期間 (7 日) 後に低用量のリポポリサッカライド (LPS) を投与することによって、肝炎を実験的に惹起することができる。この肝炎惹起モデル系をヒスタミン H₂ 受容体欠損マウス (H₂R^{-/-}) やヒスタミン合成酵素欠損マウス (HDC^{-/-}) に適用し、さらにいくつかのヒスタミン作動薬、遮断薬、ヒスタミン分解酵素である HMT (histamine N-methyltransferase) の阻害薬などを用いて、Fig. 1 に示したプロトコールで検討を行った。⁹⁾

はじめに、野生型マウスを用いて肝炎惹起に伴う生存率の推移に及ぼすヒスタミン受容体遮断薬の影響について検討を加えた (Fig. 2(a))。次に、HDC 欠損マウス (HDC^{-/-}) や受容体欠損マウス (H₂R^{-/-}) を用いて、肝炎における障害の程度を野生型マウスの結果と比較検討した (Fig. 2(b), 2(c))。

その結果、野生型マウスに肝炎を誘導した場合、H₂ 受容体遮断薬であるファモチジン (5 mg/kg, SC, 2 回) やラニチジン (10 mg/kg, SC, 2 回) を投与した群では、生理食塩水投与群に比べて顕著な生存率の低下、すなわち病態の増悪傾向がみられた。一方、H₁ 受容体遮断薬であるクロルフェニラミン (4 mg/kg, SC, 2 回) 投与群においては、生理食塩水投与群と比べて有意な変化は認められなかった (Fig. 2(a))。

この知見を裏付けるように、HDC 欠損マウス及び H₂ 受容体欠損マウスに同様にして肝炎惹起を引き起こし生存率の変化を検討したところ、HDC 欠損マウス (HDC^{-/-}) 及び H₂ 受容体欠損マウス (H₂R^{-/-}) の両者ともに著しい生存率の低下が認められた (Fig. 2(b), 2(c))。加えて、HDC 欠損マウスにヒスタミンを皮下投与 (4 mg/kg, SC, 2 回) したところ、低かった生存率は野生型マウスの生存率レベルまで回復することも同時に明らかとなった (Fig. 2(b))。

Figure 2(a) で行った肝炎惹起モデル実験において、それぞれの処置マウスで経時的に血液を採取し肝臓の逸脱酵素であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST, aspartate aminotransferase) 活性並びにアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT, alanine aminotransferase) 活性を測定することによって肝障害の程度を検討した (Fig. 3)。*P.acnes*/LPS 処置によって、AST と ALT の両活性の増加が認められ、肝障害が惹起されていることが確認された。肝炎惹起時に H₂ 受容体遮断薬 (ファモチジン) を投与した群では、さらに有意な AST 及び ALT 活性の増大、すなわち肝機能低下がみられ (Fig. 3)、Fig. 2(a) で述べた生存率の低さとの関連性を裏付ける結果が得られた。一方、この場合も H₁ 受容体遮断薬であるクロルフェニラミン投与群は対照群と比べて大きな変化をもたらさなかった。

次に、ヒスタミンの不活化代謝酵素である histi-



森 秀治

就実大学薬学部応用薬学分野生体情報学教授。1962 年徳島県生まれ。1989 年岡山大学大学院自然科学研究科博士課程修了。岡山大学医学部助教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科助教授を経て、2006 年より現職。組織リモデリングや再生に働く活性因子群の分子機能解析と創薬。

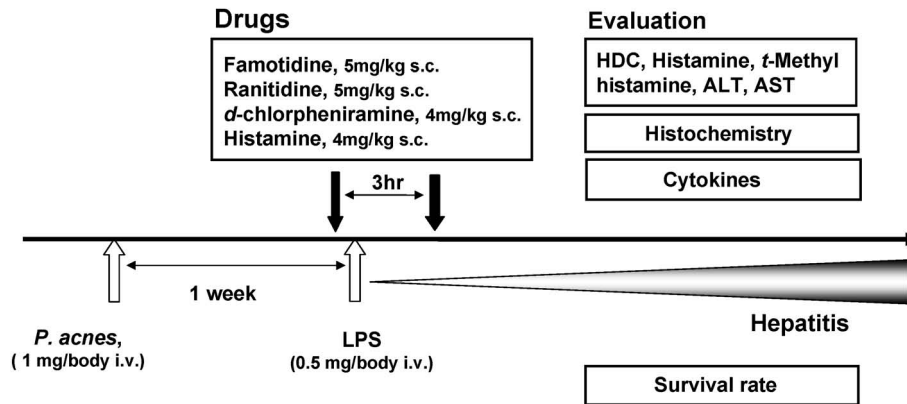


Fig. 1. Protocol for Preparation of *P.acnes*-Primed and LPS Induced Hepatitis in Mice

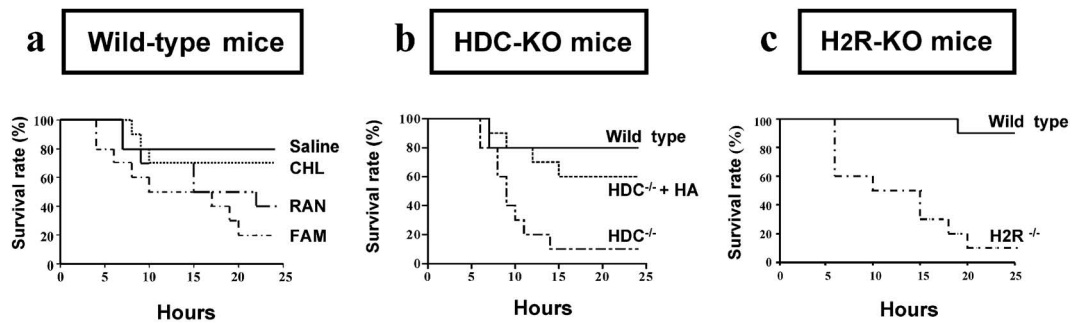


Fig. 2. Survival Rates of Wild-Type, HDC^{-/-} and H2R^{-/-} Mice with *P.acnes*-Primed LPS Induced Hepatitis

The mice received an *i.v.* injection of 1 mg *P.acnes* suspended in 100 μ l saline, followed by an *i.v.* injection of 0.5 mg LPS in 100 μ l saline 7 days later. The wild-type mice were treated with *d*-chlorpheniramine (CHL), famotidine (FAM) or ranitidine (RAN) (a), and HDC^{-/-} mice were treated with histamine (HA) (b). The histamine receptor antagonists or histamine were injected into mice 10 minutes before and 2 hours after the challenge with LPS. (c) The survival rate of H2R^{-/-} mice was compared with the respective wild-type mice. cited from Ref. 9)

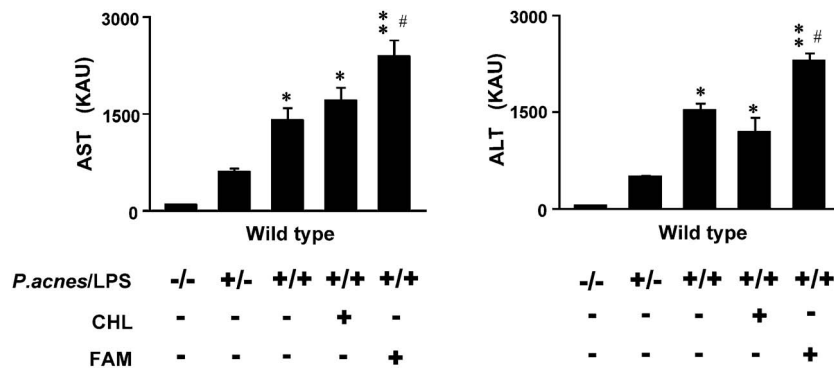


Fig. 3. Change of Plasma AST and ALT Levels in Wild-Type Mice with *P.acnes*-Primed LPS-Induced Hepatitis

The plasma AST and ALT levels in wild-type mice treated with *d*-chlorpheniramine (CHL) or famotidine (FAM) 6 hours after the challenge with LPS. Histamine receptor antagonists were injected into mice 10 minutes before and 2 hours after the challenge with LPS. **p*<0.05 compared with the value by treatment with *P.acnes* alone. #*p*<0.05 compared with the value by treatment with *P.acnes* plus LPS. cited from Ref. 9)

dine *N*-methyltransferase (HNMT) の阻害薬であるアモジアキンの効果について、野生型マウスでの肝炎惹起モデルを用いて検討した。¹⁰⁾ アモジアキン投与によって HNMT 活性が抑えられるなら、マウス体内で内因性に産生されるヒスタミンの濃度上昇

が予想され、ヒスタミンによる肝炎に対する保護作用の増大、すなわち生存率の向上につながる事が予想された。その結果を Fig. 4 に示す。 *P.acnes*/LPS 投与によって 24 時間後に 40% の生存率であった対照群に比べて、アモジアキン投与群 (2 mg/kg,

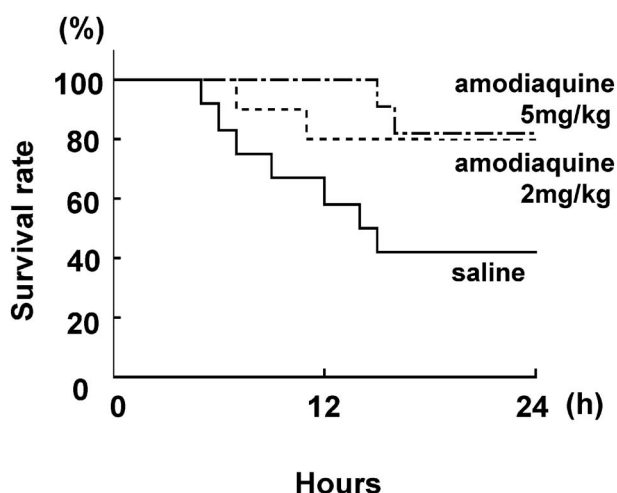


Fig. 4. Effect of Amodiaquine, a Specific Inhibitor of Histamine *N*-Methyltransferase, on the Survival Rate of Mice with *P.acnes*/LPS- Induced Hepatitis

The wild-type mice received an *i.v.* injection of 1 mg *P.acnes* suspended in 100 μ l of saline, followed by an *i.v.* injection of 1 mg of LPS in 100 μ l of saline 7 days later. Amodiaquine was administered to mice 10 min before challenge with LPS. cited from Ref. 10)

5 mg/kg) では濃度依存的に有意な生存率の改善が認められた. この際の血中 ALT 活性並びに AST 活性を Fig. 5 に示す. 生存率の改善を示す結果を裏打ちするように, 血中 ALT 及び AST 活性ともにアモジアキン投与群の方が対照群に比べて有意に活性が低かった.

データには示さないが, 野生型マウスを用いた肝炎惹起モデルの肝臓内において, LPS を投与して数時間以内に HDC 活性並びに HDC 量の増加が認められた. 同時に, 肝臓組織中のヒスタミン並びにヒスタミンの主要代謝物 (テレーメチルヒスタミン) の濃度が一過性に上がることも明らかになった. 肝臓におけるヒスタミン代謝物の濃度上昇は, 肝臓において生合成されたヒスタミンが貯蔵されることなく遊離され, その後速やかに代謝を受けることを意味していると考えられる.

次に, 免疫組織学的手法によって肝臓組織での HDC 発現誘導細胞の同定を試みた. 蛍光標識した抗体 [抗 HDC 抗体, 抗 CD68 抗体 (マクロファージ, クッパー細胞に反応), 抗 CD3 抗体 (T 細胞に反応)] を用いて肝炎惹起後の野生型マウス肝臓組織切片を免疫二重染色したところ, データには示さないが, HDC タンパク質を発現誘導した HDC 陽性細胞が肝臓組織中に観察され, これは抗 CD68 抗体による染色像と一致した染色パターンを示し, 一

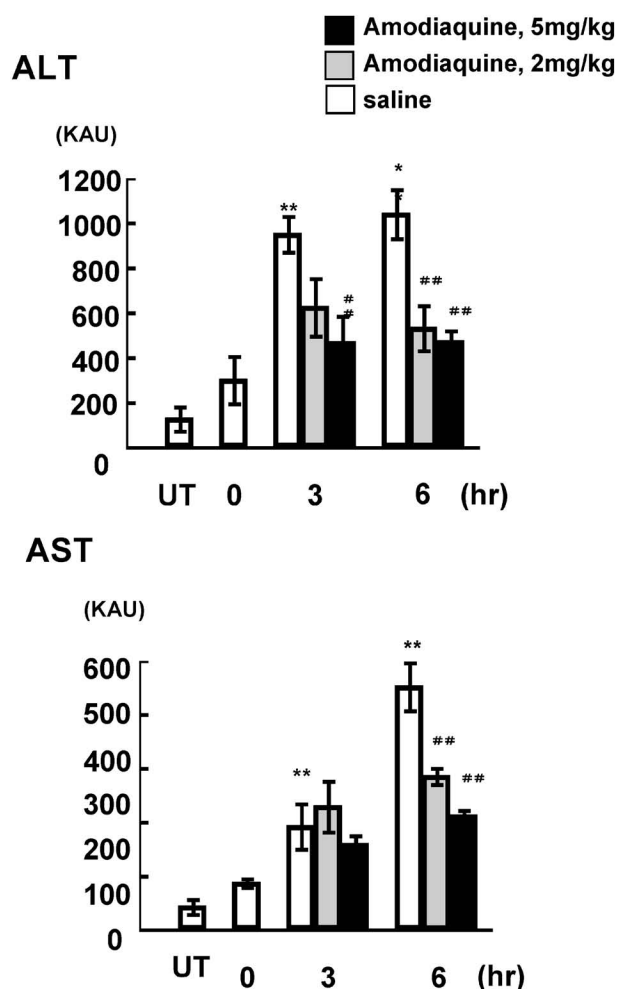


Fig. 5. Effect of Amodiaquine on the Serum Levels of ALT and AST in the *P.acnes*/LPS- Induced Hepatitis Mice

Serum ALT and AST levels in wild-type mice treated with amodiaquine 10 min before challenge with LPS. ** $p < 0.01$ in comparison to the value treated with *P.acnes* alone. ** $p < 0.01$ in comparison to the value treated with *P.acnes* plus LPS. cited from Ref. 10)

方, CD3 陽性細胞とは一致しなかった. このことから, 肝臓内での HDC 発現誘導細胞は, リンパ球ではなく, マクロファージ/クッパー細胞であることが推察された.

次に, マクロファージ等から産生され他の免疫担当細胞に働きかけて様々なサイトカイン産生を促すことことによって, 肝炎惹起においても重要な役割を果たすであろうことが推察される炎症性サイトカイン, 特に IL-18 と腫瘍壊死因子 (TNF, tumor necrosis factor)- α の発現に及ぼすヒスタミンの影響について検討を加えた. 肝炎惹起マウスに各種の処置を施したのちに, 肝臓を取り出し, 肝臓に存在する IL-18 並びに TNF- α の量をウェスタンブロット

にて見積もった。その結果、両サイトカインともに H₂ 受容体遮断薬であるファモチジンで処置した群が対照群に比べてタンパク発現が有意に上昇していることが明らかになった (Fig. 6)。H₁ 受容体遮断薬処置では、有意な変化は認められなかった。加えて、HDC 欠損マウス (HDC^{-/-}) を用いた肝炎惹起モデル系において HDC^{-/-}マウスでは、野生型に比べて肝炎惹起に伴う両サイトカインの発現量が極めて高いこと、これはヒスタミンを薬物として投与することによって野生型マウスの発現量レベルまで低下することが明らかになった (Fig. 6)。その

ほかに、肝炎惹起に伴う各種サイトカイン発現の推移を検討したところ、上述の IL-18 と TNF- α 以外に IL-12 や IFN- γ も肝炎によって発現増大することが明らかになった。マクロファージやクッパー細胞にヒスタミン誘導を促す因子についての詳細な解明は、その産生細胞も含めて今後の課題であるが、リポポリサッカライド (LPS) や TNF- α , IL-1 等のサイトカインにより骨髄、脾臓、肺そして肝臓にて HDC 活性の増大が起こることが報告されている。^{11,12)}

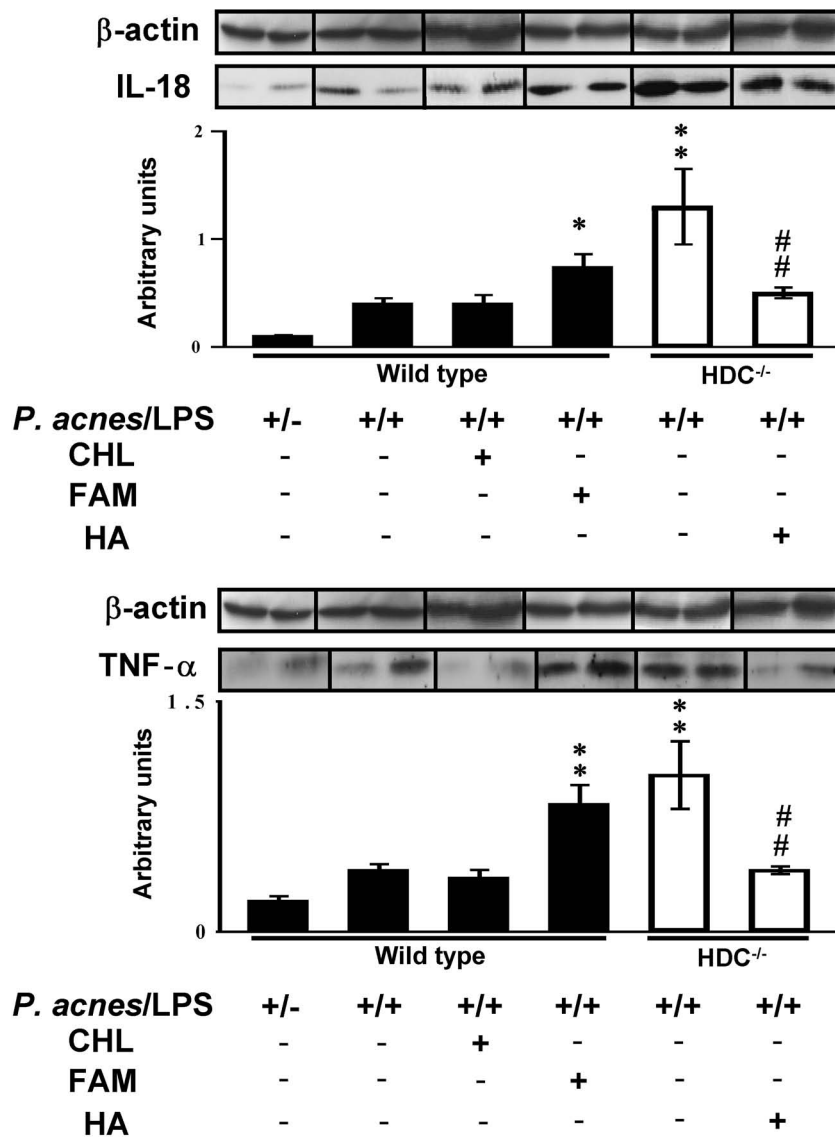


Fig. 6. Expression of Pro-IL-18 and TNF- α in the Liver of Wild-Type and HDC^{-/-} Mice Treated with *P.acnes* and LPS

Mice were administered *d*-chlorpheniramine (CHL), famotidine (FAM) or histamine (HA) 10 minutes before and 2 hours after the challenge with LPS. Three hours after LPS challenge, mice were killed, and liver samples were prepared for electrophoresis. Pro-IL-18 and TNF- α were detected by Western blotting, and the results quantified by image scanner were normalized by β -actin. * p <0.05, ** p <0.01 compared with the value in the respective wild-type mice treated with *P.acnes* and LPS. # p <0.01 compared with the value in the HDC^{-/-} mice treated with *P.acnes* plus LPS. cited from Ref. 9)

4. おわりに

本稿において、*P. acnes*/LPS 誘導肝炎モデルの系を用いてヒスタミンが H_2 受容体刺激を介して肝細胞保護的に働いていることを示した。*P. acnes*/LPS 刺激によって肝臓に存在するマクロファージ/クッパー細胞が活性化されて HDC 発現が上昇する。これによって「誘導性ヒスタミン」の生合成が生じ、直ちに細胞外に放出される。放出されたヒスタミンは H_2 受容体の刺激を通じて IL-18 や TNF- α などの炎症性サイトカインの発現分泌を抑え、結果的に肝障害や肝細胞死を抑制することとなる。

一方、薬物などで H_2 受容体をブロックした場合や H_2 受容体欠損マウス、ヒスタミン合成酵素欠損マウスにおいては、ヒスタミンの肝細胞保護的な作用が発揮できず、結果として肝臓障害が増悪してしまう。

これまでに日本人研究者を中心とした研究によって「誘導性ヒスタミン」の概念が確立し、生体内での多彩な現象を担っていることが明らかになってきた。^{8,11,12} 生化学的な興味から考えると、近年、アセチルコリンなどの神経伝達物質がリンパ球などの非神経系細胞で合成分泌され、様々な機能調節に働いているという知見¹³が報告されているが、「誘導性ヒスタミン」についてもオータコイドであるヒスタミンが貯蔵型としてではなく誘導型としていかなるメカニズムで細胞外へと放出されるのかは今後の解決すべき課題であろう。

本稿では肝炎惹起モデルを用いて肝臓組織での誘導性ヒスタミンの細胞保護的な作用を総括的に述べたが、一方でヒスタミンが誘導される場所の違いによって作用に多様性が生じてくる可能性が考えられる。例えば、担癌マウスにおける腫瘍増殖とヒスタミンとの係わり合いを調べた研究において、腫瘍組織に浸潤してきた好中球における高いヒスタミン産生の誘導と誘導性ヒスタミンによる H_2 受容体刺激を介した腫瘍免疫の抑制作用が報告されている。^{14,15} また、カゼインで惹起した腹膜炎モデル実験においても、腹腔に浸潤した活性化好中球が高い HDC 活性を示すことも報告されている。¹⁶ これら知見とは別に、血管新生反応に誘導性ヒスタミンが係わっていることも、HDC 欠損マウスとマスト細胞欠損マウスを用いた肉芽腫形成モデルによって明

らかにされている。肉芽腫形成時の血管新生において、ヒスタミンが血管内皮細胞増殖因子 (VEGF, vascular endothelial growth factor) を介して血管新生を促して肉芽腫形成を誘導すること、肉芽腫モデルにおけるヒスタミン産生細胞はマスト細胞ではなくマクロファージであることが明らかにされている。¹⁷

肝炎惹起モデルマウス系を中心に誘導性ヒスタミンの働きを紹介した。炎症やアレルギー反応では H_1 受容体刺激を通じてヒスタミンが促進的に作用するのに対して、免疫細胞上の H_2 受容体刺激を介した反応は免疫細胞の機能を調節することで細胞保護的に働くことが明らかとなってきた。今後は、免疫細胞に高発現している H_4 受容体の機能も併せて考えながら、ポストゲノムの時代に利用可能な DNA チップを始めとするハイスループット解析ツールとモデル実験系を組み合わせ、誘導性ヒスタミンの多彩な生理作用とその存在意義について深く検討して行く必要がある。

謝辞 本稿で紹介しました研究において、ご協力とご指導を下さいました渡邊 武先生 (理化学研究所)、渡邊建彦先生 (東北大学)、大津 浩先生 (東北大学)、吉野 正先生 (岡山大学)、横山 穰博士 (岡山大学)、横山 玲博士 (岡山大学) に深謝いたします。

REFERENCES

- 1) Jutel M., Watanabe T., Klunker S., Akdis M., Thomet O. A., Malolepszy J., Zak-Nejmark T., Koga R., Kobayashi T., Blaser K., Akdis C. A. *Nature*, **413**, 420–425 (2001).
- 2) Takahashi H. K., Yoshida A., Iwagaki H., Yoshino T., Itoh H., Morichika T., Yokoyama M., Akagi T., Tanaka N., Mori S., Nishibori M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 227–235 (2002).
- 3) Itoh H., Takahashi H. K., Iwagaki H., Yoshino T., Morimoto Y., Saito S., Yagi T., Akagi T., Nishibori M., Tanaka N., *Transplantation*, **74**, 864–870 (2002).
- 4) Morichika T., Takahashi H. K., Iwagaki H., Yoshino T., Tamura R., Yokoyama M., Mori S., Akagi T., Nishibori M., Tanaka N., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **304**, 624–633 (2003).

- 5) Nishibori M., Kohka-Takahashi H., Mori S., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **118**, 29–35 (2001).
- 6) Nishibori M., Takahashi H. K., Mori S., *J. Pharmacol. Sci.*, **92**, 7–12 (2003).
- 7) Kahlson G., Rosengren E., *Physiol. Rev.*, **48**, 155–196 (1968).
- 8) Takamatsu S., Nakashima I., Nakano K., *J. Immunol.*, **156**, 778–785 (1996).
- 9) Yokoyama M., Yokoyama A., Mori S., Takahashi H. K., Yoshino T., Watanabe T., Watanabe T., Ohtsu H., Nishibori M., *Gastroenterology*, **127**, 892–902 (2004).
- 10) Yokoyama A., Mori S., Takahashi H. K., Kanke T., Wake H., Nishibori M., *Eur. J. Pharmacol.*, **558**, 179–184 (2007).
- 11) Endo Y., *Biochem. Pharmacol.*, **38**, 1287–1292 (1989).
- 12) Endo Y., Kikuchi T., Nakamura M., *Br. J. Pharmacol.*, **107**, 888–894 (1992).
- 13) Kawashima K., Fujii T., *Front. Biosci.*, **9**, 2063–2085 (2004).
- 14) Takahashi K., Tanaka S., Ichikawa A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 1113–1119 (2001).
- 15) Takahashi K., Tanaka S., Furuta K., Ichikawa A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 1205–1210 (2002).
- 16) Tanaka S., Deai K., Konomi A., Takahashi K., Yamane H., Sugimoto Y., Ichikawa A., *Eur. J. Immunol.*, **34**, 1472–1482 (2004).
- 17) Ghosh A. K., Hirasawa N., Ohtsu H., Watanabe T., Ohuchi K., *J. Exp. Med.*, **195**, 973–982 (2002).