

ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体遺伝子発現機構のアレルギー疾患における病理学的意義

水口博之,<sup>\*,a</sup> 北村嘉章,<sup>b</sup> 近藤勇人,<sup>a</sup> 黒田若菜,<sup>b</sup> 吉田陽香,<sup>a</sup>  
宮本裕子,<sup>a</sup> 服部将史,<sup>a</sup> 武田憲昭,<sup>b</sup> 福井裕行<sup>a</sup>

**Histamine H<sub>1</sub> Receptor Gene as an Allergic Diseases-sensitive Gene and Its Impact on Therapeutics for Allergic Diseases**

Hiroyuki MIZUGUCHI,<sup>\*,a</sup> Yoshiaki KITAMURA,<sup>b</sup> Yuto KONDO,<sup>a</sup>  
Wakana KURODA,<sup>b</sup> Haruka YOSHIDA,<sup>a</sup> Yuko MIYAMOTO,<sup>a</sup>  
Masashi HATTORI,<sup>a</sup> Noriaki TAKEDA,<sup>b</sup> and Hiroyuki FUKUI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Molecular Pharmacology, Institute of Health Biosciences The University of Tokushima Graduate School, 1-78-1 Sho-machi, Tokushima 770-8505, Japan, and <sup>b</sup>Department of Otolaryngology, Institute of Health Biosciences The University of Tokushima Graduate School, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan

(Received August 31, 2010)

Therapeutics targeting disease-sensitive genes are required for the therapy of multifactorial diseases. There is no clinical report on therapeutics for allergic disease-sensitive genes. We are focusing on the histamine H<sub>1</sub> receptor (H<sub>1</sub>R) as a sensitive gene. H<sub>1</sub>R mediates allergy histamine signals. H<sub>1</sub>R is a rate-limiting molecule of the H<sub>1</sub>R signal because the signal is increased with elevated receptor expression level. We discovered that the stimulation of H<sub>1</sub>R induced H<sub>1</sub>R gene expression through PKC $\delta$  activation, resulting in receptor upregulation. The mechanism of H<sub>1</sub>R gene expression was revealed to play a key role in the receptor expression level in studies using cultured HeLa cells and allergic rhinitis model rats. Preseasonal prophylactic treatment with antihistamines is recommended for the therapy of pollinosis. However, the mechanism of the therapy remains to be elucidated. We demonstrated that repeated pretreatment treatment with antihistamines in the allergic rhinitis model rats resulted not only in improvement of symptoms but also in suppressed elevation of H<sub>1</sub>R mRNA levels in the nasal mucosa. A clinical trial was then initiated. When symptoms and H<sub>1</sub>R mRNA levels in the nasal mucosa of pollinosis patients with or without preseasonal prophylactic treatment with antihistamines were examined, both symptoms and high levels of H<sub>1</sub>R mRNA were significantly improved in treated compared with untreated patients. These results strongly suggest that H<sub>1</sub>R is an allergic disease-sensitive gene.

**Key words**—allergic disease-sensitive gene; gene expression; histamine H<sub>1</sub> receptor gene; preseasonal prophylactic treatment with antihistamine; PKC $\delta$

**1. はじめに**

アレルギー疾患は様々な遺伝子の発現異常を伴う難治性多因子疾患である。これらの遺伝子はその発現状態がアレルギー症状の重篤性に大きく係わるためアレルギー疾患感受性遺伝子と呼ばれる。アレルギー疾患感受性遺伝子の発現異常を是正する薬物はこれまでにない新規な作用基盤を持つ抗アレルギー

薬として有望であると考えられる。アレルギー疾患において、Fc $\epsilon$ RI や CD-40, HMC クラス II などいくつかの遺伝子が疾患感受性候補遺伝子として提案されているが、その証明は進んでいないのが現状である。

ヒスタミンは即時型アレルギー反応における主要なケミカルメディエーターであり、その作用は主として G タンパク共役型受容体 (GPCR) であるヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体 (H<sub>1</sub>R) を介して起こる。一般に、GPCR はアゴニストの反復投与によりダウンレギュレーションを受け、受容体数が減少することが知られている。これは、細胞内に必要以上の過剰なシグナルを入れないという生体にとって合目的的

<sup>a</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子情報薬理学分野 (〒770-8505 徳島市庄町 1-78-1), <sup>b</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部耳鼻咽喉科学分野 (〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15)

\*e-mail: guchi003@ph.tokushima-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S48 で発表したものを中心に記述したものである。

な防御機構であると考えられる。これに対して、われわれは、H1Rを内在性に発現しているHeLa細胞において、H1Rがヒスタミン刺激によりアップレギュレーションを受け、H1R遺伝子発現が亢進することを見出し、これが、H1R刺激によるPKC $\delta$ の活性化を介することを見出した (Fig. 1).<sup>1)</sup> このヒスタミンによるH1R遺伝子アップレギュレーションは他の受容体ではほとんど報告はなくH1Rに特異的であるが、これは、アレルギー反応において発作誘発により放出されたヒスタミンが標的細胞においてH1R発現量を増加させ自身のヒスタミンに対する感受性を高め、より重度な症状を引き起こすというアレルギー増悪化の一因であると考えられた (Fig. 2).

H1Rを介するシグナルはH1R発現レベルに依存する<sup>2)</sup>ことから、H1Rはシグナル伝達の律速分子でありH1R遺伝子の発現状態はアレルギー症状の重篤性に大きく係わると考えられる。実際、アレルギー患者では、H1R遺伝子発現が亢進している。<sup>3)</sup> また、鼻過敏症アレルギーモデルラットにおいてヒスタミンを鼻粘膜に直接塗布することによりH1R遺伝子発現が亢進し (未発表データ)、発作誘発により亢進したH1R遺伝子発現を抑制する薬物がアレルギー症状を軽減すること<sup>4)</sup>から、H1R遺伝子がアレルギー疾患感受性遺伝子であることが強く示唆されたが、これに対する検証は行われていなかった。本稿では、われわれがアレルギー疾患感受性遺伝子としてのH1R遺伝子の確立のために行ってきた

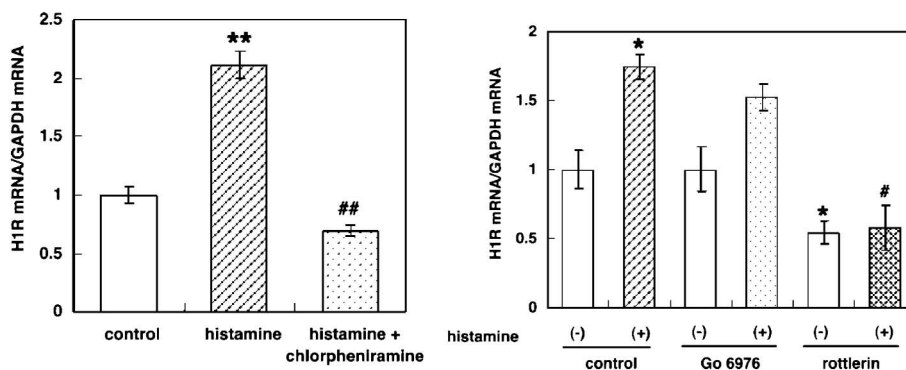


Fig. 1. Stimulation of H1R with Histamine Causes Upregulation of H1R Gene Expression via PKC $\delta$  Activation

(a), Effect of histamine (10  $\mu$ M) on H1R mRNA expression in HeLa cells. \*\* $p < 0.01$  vs. control; \*\* $p < 0.01$  vs. histamine ( $n = 4$ ). (b), Effect of PKC inhibitors on histamine-induced upregulation of H1R mRNA in HeLa cells. \* $p < 0.05$  vs. control/histamine (-); # $p < 0.05$  vs. control/histamine (+) ( $n = 4$ ).

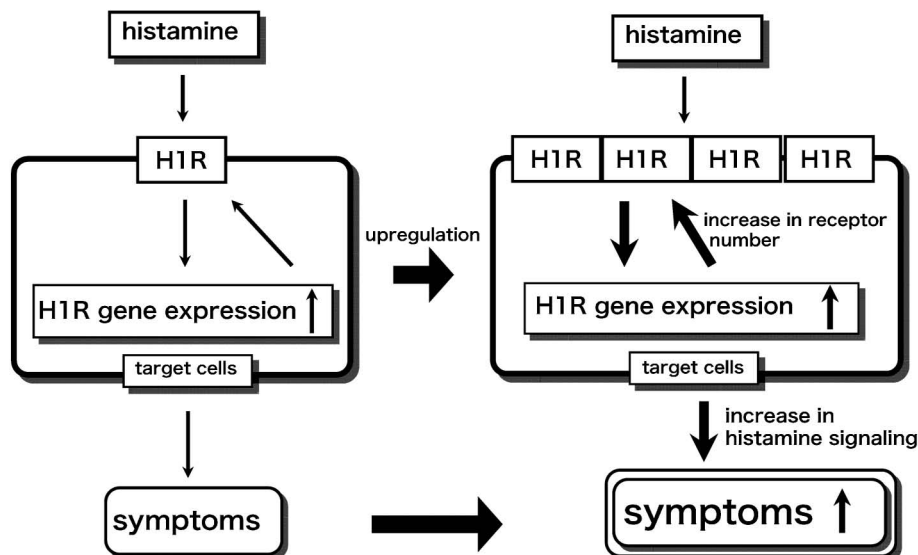


Fig. 2. Positive Feedback Circuit between Histamine and H1R Exacerbates Allergic Symptoms

た研究を紹介するとともに、H1R 遺伝子発現抑制を標的とした新規抗アレルギー薬を用いた治療戦略の展望について述べる。

## 2. 鼻過敏症アレルギーラットの作製

toluene 2,4-diisocyanate (TDI) はポリウレタンの原料であり、これを扱う作業者に喘息や鼻過敏症を引き起こすことが知られている。Brown-Norway ラットの鼻に TDI を 2 週間連続塗布し、1 週間の無処置期間の後に TDI を再度塗布することによりアレルギー発作を誘発すると、くしゃみや鼻汁・鼻閉など花粉症患者に類似したアレルギー症状を呈する (Fig. 3)。TDI による知覚神経の末梢枝に対する侵害刺激が軸索反射により別の末梢枝に逆行性に伝達され、末梢枝から Substance P や CGRP が遊離する。その結果、これらの神経ペプチドにより刺激を受けた鼻粘膜の肥満細胞からヒスタミンが遊離し、くしゃみや鼻汁などのアレルギー症状を引き起こす。<sup>5)</sup> また、鼻粘膜の三叉神経末梢枝に存在する神経ペプチドも逆行性に遊離し、血管拡張や透過性亢進、腺分泌亢進を引き起こす。TDI により引き起こされるアレルギー症状は神経原性炎症により起こり、IgE を介さないため、厳密にはアレルギー性鼻炎とは言えないが、非常に再現性よく、短期間に鼻過敏症を引き起こすことができ、また、ヒスタミン遊離以降のイベントは恐らく共通のメカニズムに

よるものであると考えられるため、われわれは、このモデルラットを用いて研究を行っている。

## 3. 苦参抽出液中に含まれる抗アレルギー成分の H1R 遺伝子発現及びアレルギー症状に対する影響

苦参は豆科のクララの根由来の抗アレルギー性生薬であるが、その抗アレルギー作用に対する科学的検証はこれまで行われていなかった。われわれは、苦参熱水抽出液が、鼻過敏症アレルギーモデルラットにおいて、症状を軽減するとともに発作刺激誘導に伴う H1R、ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC)、IL-4、及び IL-5 遺伝子発現亢進を有意に抑制することを見出した (Fig. 4)。<sup>6)</sup> この抽出液より RBL-2H3 細胞における抗原・抗体刺激に伴う IL-4 遺伝子発現亢進に対する抑制活性を指標に抗アレルギー成分を単離し、その構造を決定した。単離した化合物は HeLa 細胞において PMA 刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進を抑制した (Fig. 5, 未発表)。現在、この化合物を鼻過敏症アレルギーモデルラットに投与し、アレルギー症状の抑制効果を検討している。

## 4. トシル酸スプラタストの H1R シグナルに対する影響

スプラタストは Th2 サイトカイン阻害薬として臨床的に使用されているが、その抗アレルギー作用の分子基盤は明らかでなかった。われわれは、H1R 遺伝子発現亢進が抗ヒスタミン薬によりおよ

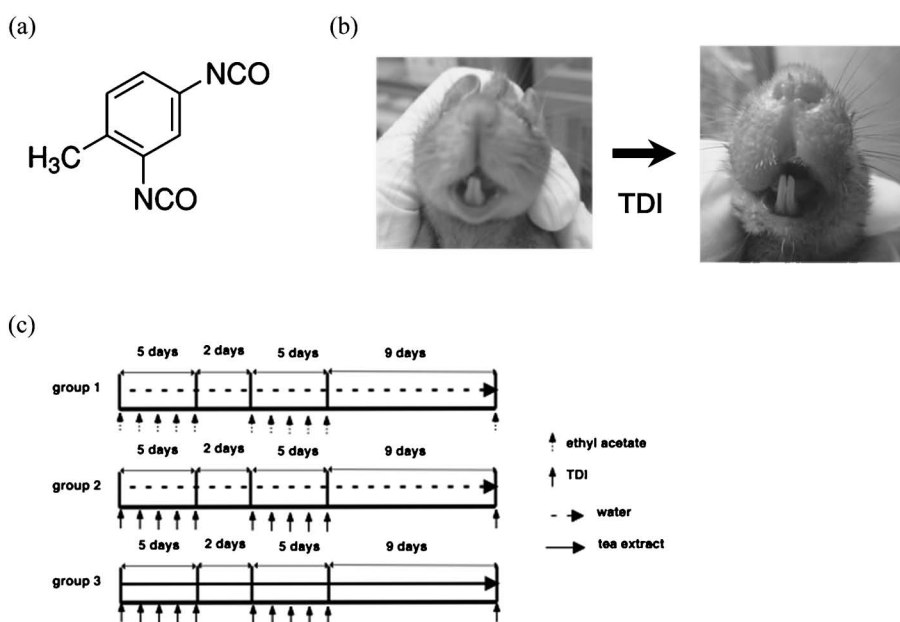


Fig. 3. Toluene 2,4-diisocyanate (TDI) Sensitized Allergy Model Rats

(a), Chemical structure of TDI. (b), Photos of rats before (left) and after (right) sensitized with TDI. (c), Experimental protocol for sensitization with TDI.

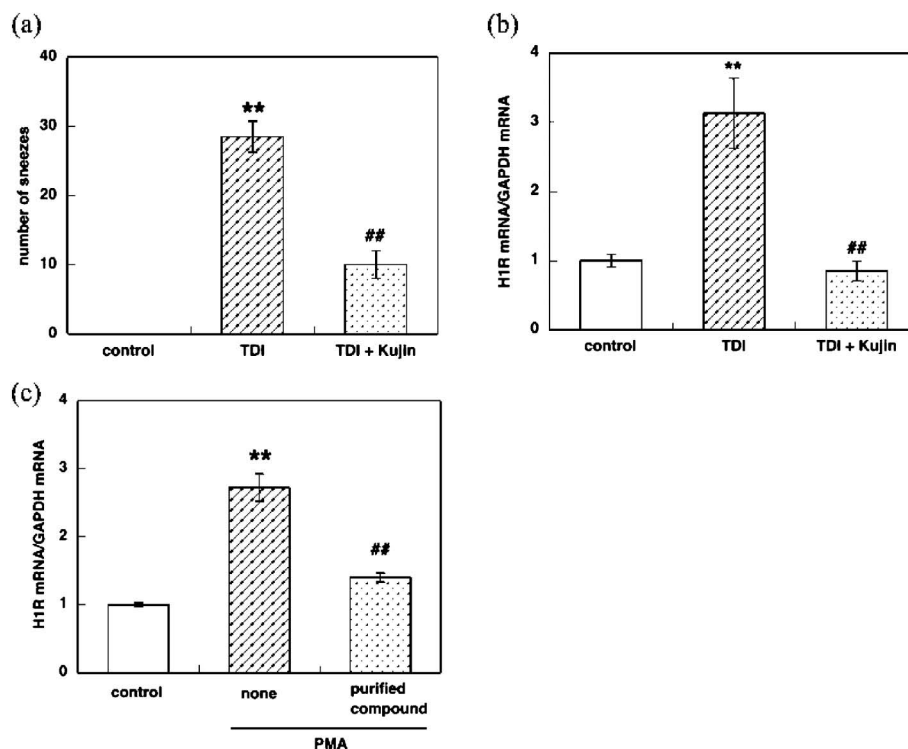


Fig. 4. Effect of Kujin on Allergic Symptom and H1R mRNA Expression

(a) and (b), Effect of Kujin extract on sneezing (a) and H1R mRNA expression in TDI-sensitized rats.  $**p < 0.01$  vs. control;  $**p < 0.01$  vs. TDI ( $n=4$ ). (c), Effect of the active compound purified from Kujin extract on PMA-induced upregulation of H1R mRNA in HeLa cells.  $**p < 0.01$  vs. control;  $**p < 0.01$  vs. PMA ( $n=3$ ).

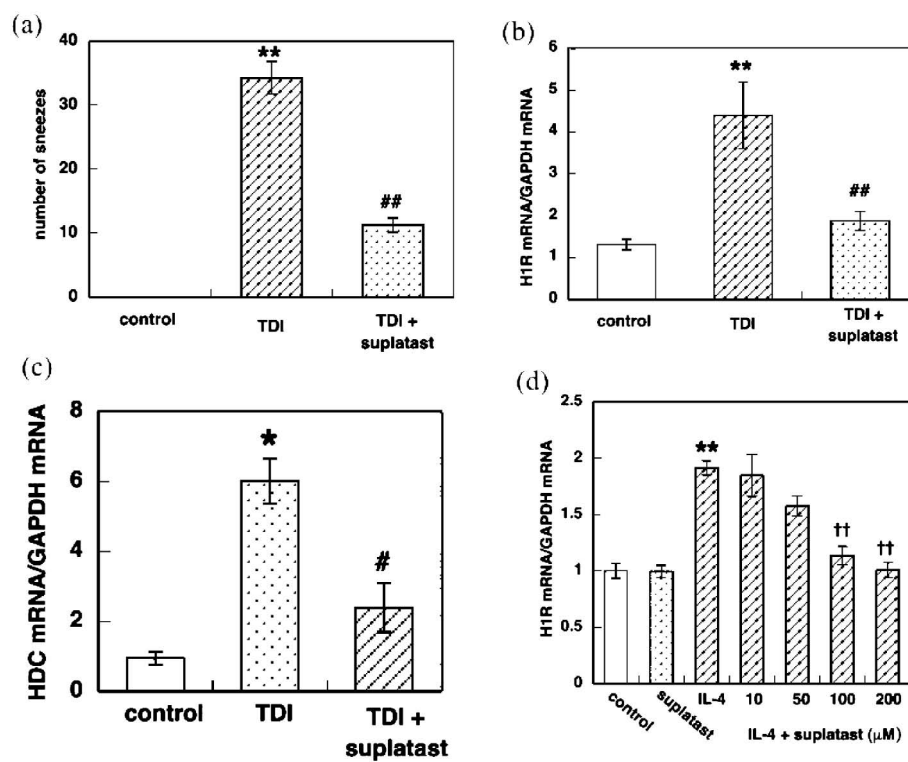


Fig. 5. Effect of Suplatast on Allergic Symptom and Histamine Signaling

(a), (b), and (c), Effect of suplatast on sneezing (a) and expression of H1R (b) and HDC (c) mRNA in TDI-sensitized rats.  $**p < 0.01$  vs. control;  $**p < 0.01$  vs. TDI ( $n=4$ ). (d), Effect of suplatast on IL-4-induced upregulation of H1R mRNA in HeLa cells.  $**p < 0.01$  vs. control;  $*p < 0.01$  vs. IL-4 ( $n=3$ ).

そ 50%抑制されるのに対し、スプラタストによりほぼ完全に抑制されることを見出した。<sup>7)</sup>このことから H1R 遺伝子発現経路には抗ヒスタミン薬感受性（すなわち H1R を介した）経路に加えて、H1R を介さない経路が存在し、スプラタストが両経路を遮断することが考えられた。しかし、これまでスプラタストのヒスタミンシグナルに対する影響に関する知見は皆無であった。そこで、鼻過敏症アレルギーモデルラットにおけるスプラタストの H1R 遺伝子発現抑制の分子基盤について検討を行った。その結果、スプラタストはアレルギー症状を軽減するとともに、TDI 刺激に伴う H1R、HDC、IL-4 遺伝子発現亢進を抑制した。また、HeLa 細胞において IL-4 刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進も抑

制することがわかった (Fig. 5)。これらのことから、H1R 遺伝子発現経路には、ヒスタミン刺激に伴う H1R を介する経路に加えて IL-4 刺激に伴う IL-4 受容体を介する経路の存在が明らかとなった。さらに、スプラタストは Th2 サイトカインである IL-4 遺伝子発現を直接抑制し、IL-4 刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進を抑制するとともに、HDC 遺伝子発現を抑制することで、ヒスタミン産生を抑制し、ヒスタミン刺激に伴う H1R 遺伝子発現亢進をも抑制することが明らかとなり、これが、スプラタストのヒスタミンシグナル抑制の分子基盤であると考えられた (Fig. 6)。<sup>8)</sup>

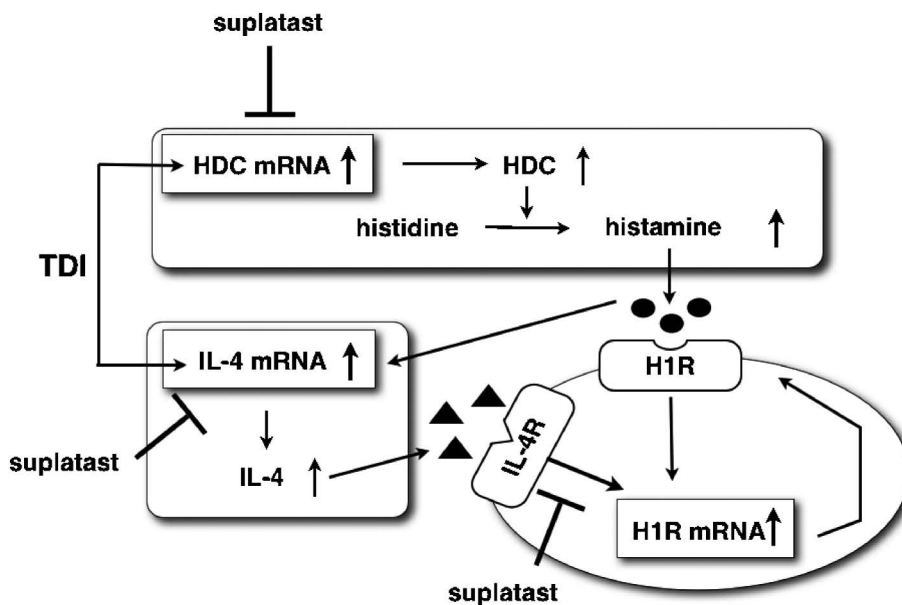


Fig. 6. Molecular Mechanism of Inhibition of Histamine Signaling by Suplatast

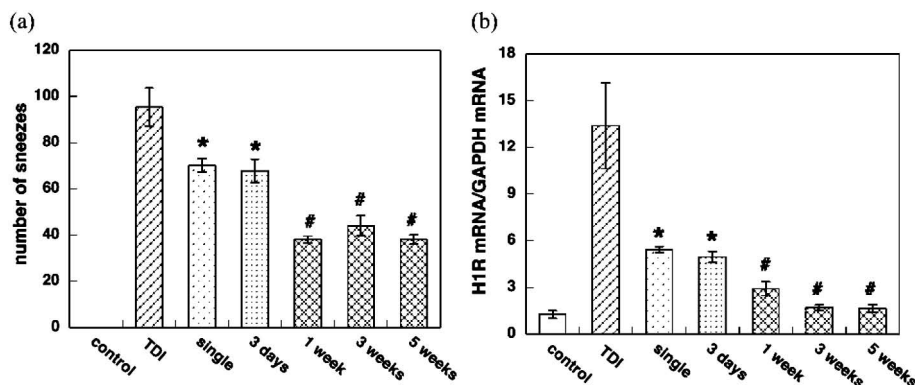


Fig. 7. Effect of Repeated Pre-treatment with Epinastine on Allergic Symptom (a) and H1R mRNA Expression (b)  
\* $p < 0.05$  vs. TDI; # $p < 0.05$  vs. single ( $n = 4$ ).

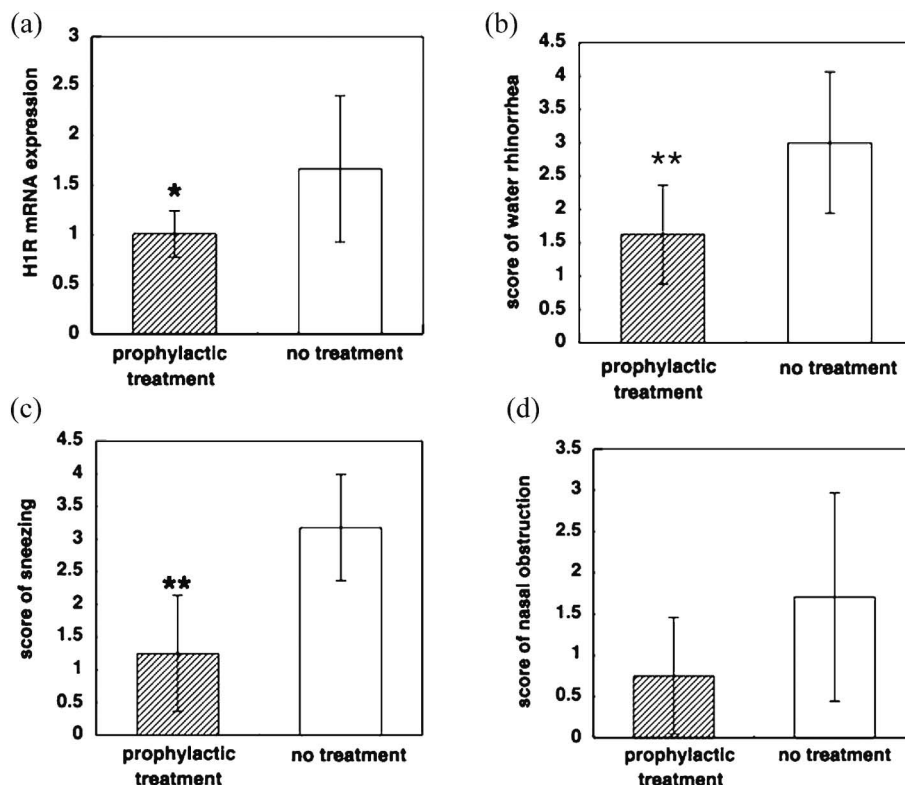


Fig. 8. Effect of Pre-seasonal Prophylactic Treatment with Antihistamines on Allergic Symptoms (a to c) and H1R mRNA Expression (d) in Patients with Cedar Pollinosis

Effect of pre-seasonal prophylactic treatment on sneezing (a), watery rhinorrhea (b), nasal obstruction (c), and H1R mRNA expression (d). Data are presented as mean ± S.D. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. no treatment group.

### 5. 抗ヒスタミン薬長期投与の H1R 遺伝子発現及びアレルギー症状に対する影響

花粉症に対して抗ヒスタミン薬を花粉飛散ピーク時の 2-4 週間前に服用する初期療法のガイドラインにおいて推奨されている。<sup>9)</sup>しかし、初期療法の分子基盤に対する科学的検証はこれまで行われていなかった。われわれは、鼻過敏症アレルギーモデルラットに初期療法を模して抗ヒスタミン薬を長期投与し、アレルギー症状と H1R 遺伝子発現への影響を検討した。その結果、抗ヒスタミン薬を 3 日前から投与した場合は TDI による発作誘発直前に抗ヒスタミン薬を単回投与した場合とアレルギー症状の軽減及び H1R 遺伝子発現抑制効果に違いは認められなかったが、抗ヒスタミン薬を発作誘発 1-5 週間前から長期投与することにより症状がより軽減し、H1R 遺伝子も有意に減少することが明らかとなった (Fig. 7)。<sup>10)</sup>このことから、抗ヒスタミン薬の長期投与による H1R 遺伝子発現の抑制が初期療法の分子基盤であることが示唆された。

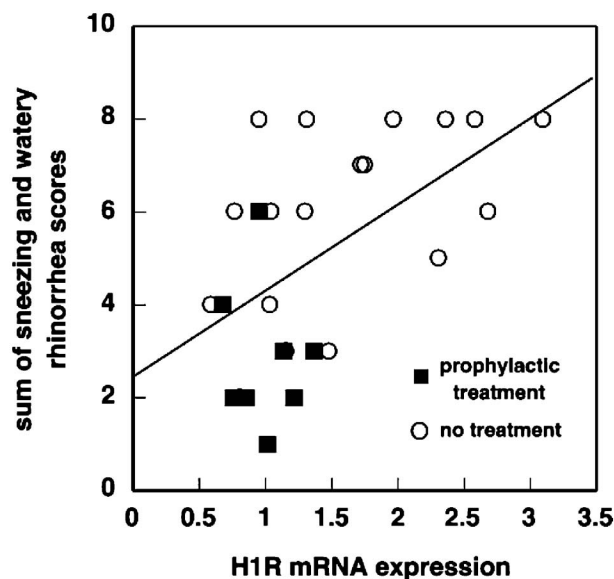


Fig. 9. Correlation between Allergic Symptoms and H1R mRNA Expression in the Patients with or without Pre-seasonal Prophylactic Treatment with Antihistamines

Data from patients with pre-seasonal prophylactic treatment with antihistamines (closed square) and from patients without treatment (open circle) are plotted.

## 6. 花粉症患者における H1R 遺伝子発現と花粉症症状との関連

上に述べたように、われわれは鼻過敏症モデルラットにおいて、発作誘発に伴い鼻粘膜 H1R、HDC 及びアレルギーサイトカイン遺伝子発現が亢進すること、抗ヒスタミン薬の長期投与により H1R 遺伝子発現亢進が有意に抑制されることを明らかにしてきた。この結果から、ヒトにおいても、抗ヒスタミン薬の長期投与により H1R 遺伝子発現が抑制され鼻症状が軽減する可能性が示唆された。そこで、スギ花粉症患者に初期療法を行い鼻症状と鼻粘膜 H1R 遺伝子発現量との関連について検討した。その結果、初期療法群では、花粉飛散ピーク時のくし

やみ及び鼻汁の症状が有意に軽減した (Fig. 8).<sup>11)</sup> H1R 遺伝子発現も有意に抑制されたが、鼻閉に関しては有意な抑制効果は認められなかった (Fig. 8).<sup>11)</sup> これは、くしゃみ・鼻汁はヒスタミンが主要メディエーターとして作用する鼻症状であるのに対し、鼻閉はロイコトリエンなどが主要メディエーターであるためと考えられた。<sup>12)</sup> くしゃみ及び鼻汁のスコアの合計と H1R 遺伝子発現量は、有意な相関を示した (Fig. 9).<sup>11)</sup> 以上の結果から、初期療法は、抗ヒスタミン薬の単回服用よりも鼻症状軽減に効果的であり、その分子基盤が、抗ヒスタミン薬の長期間服用による鼻粘膜 H1R 遺伝子発現抑制に伴うヒスタミンシグナルの抑制にあると考えられた。

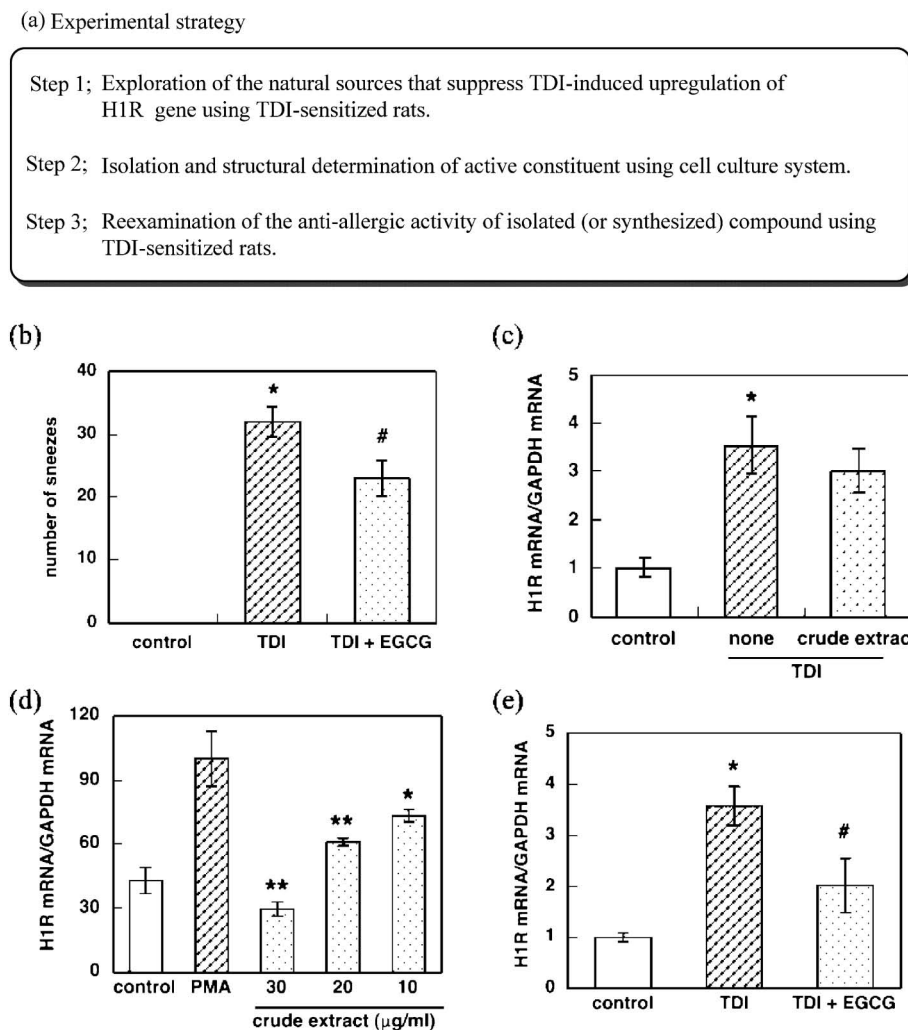


Fig. 10. Identification of Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) as an Active Constituent in Green Tea Extract That Suppresses Transcriptional Upregulation of H1R Gene

(a), Experimental strategy. (b and c), Effect of green tea extract on sneezing (b) and H1R mRNA expression (c) in TDI-sensitized rats. \* $p < 0.05$  vs. control; # $p < 0.05$  vs. TDI ( $n = 4$ ). (d), Effect of green tea extract on PMA-induced upregulation of H1R mRNA expression. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs. PMA ( $n = 3$ ). (e), Effect of EGCG on TDI-induced upregulation of H1R mRNA expression in TDI-sensitized rats. \* $p < 0.05$  vs. control; # $p < 0.05$  vs. TDI ( $n = 4$ ).

## 7. おわりに

鼻過敏症アレルギーモデルラットを用いた研究及び花粉症患者に対する抗ヒスタミン薬初期療法の研究から、H1R 遺伝子発現状態がアレルギー症状の重篤性に大きく影響することが明らかとなり、H1R 遺伝子が、アレルギー疾患感受性遺伝子であることを明らかにすることができた。現在、われわれは、苦参や緑茶、ツクシ、インド伝統医療であるアユルヴェーダ医薬などの天然物医薬から H1R 遺伝子発現抑制作用を持つ化合物の探索・同定を行い、いくつかの化合物の同定に成功している (Fig. 10).<sup>13)</sup> これらの化合物は、現在アレルギー疾患治療薬の主流である抗ヒスタミン薬などアレルギーシグナル遮断薬とは異なる作用メカニズムを有するため、両者を併用することにより、より強力な抗アレルギー効果が期待でき、アレルギー疾患に対する新たな治療戦略の基盤が確立できると考えられる。また、現在、疾患患者の QOL の維持や医療コストの観点からセルフメディケーションの重要性が指摘されているが、これらの化合物は漢方薬やアユルヴェーダ医薬、機能性食品などの天然物医薬を起源としていることから、重篤な副作用も少ないと考えられ、セルフメディケーション実践のためのニーズに応えることのできるサプリメントの開発に応用できると考えられる。

本臨床研究は厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針に則り、徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の了承 (承認番号 121) を得て行った。

## REFERENCES

- 1) Das A. K., Yoshimura S., Mishima R., Fujimoto K., Mizuguchi H., Dev S., Wakayama Y., Kitamura Y., Horio S., Takeda N., Fukui H., *J. Pharmacol. Sci.*, **103**, 374–382 (2007).
- 2) Ohuchi Y., Yanai K., Sakurai E., Fukui H., Yanagisawa T., Watanabe T., *Int. J. Mol. Med.*, **1**, 355–360 (1998).
- 3) Iriyoshi N., Takeuchi K., Yuta A., Ukai K., Sakakura Y., *Clin. Exp. Allergy*, **26**, 379–385 (1996).
- 4) Kitamura Y., Miyoshi A., Murata Y., Kalubi B., Fukui H., Takeda N., *Acta Otolaryngol.*, **124**, 1053–1058 (2004).
- 5) Tanaka K., Okamoto Y., Nagaya Y., Nishimura F., Takeoka A., Hanada S., Kohno S., Kawai M., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **85**, 392–397 (1998).
- 6) Dev S., Mizuguchi H., Das A. K., Maeyama K., Horinaga S., Kato S., Tamada M., Hattori M., Umehara H., Fukui H., *J. Pharmacol. Sci.*, **109**, 606–617 (2009).
- 7) Fukui H., *J. Pharmacol. Sci.*, **106**, 325–331 (2008).
- 8) Shahriar M., Mizuguchi H., Maeyama K., Kitamura Y., Orimoto N., Horio S., Umehara H., Hattori M., Takeda N., Fukui H., *J. Immunol.*, **183**, 2133–2141 (2009).
- 9) “Practical Guideline for the Management of Allergic Rhinitis in Japan, 2009,” eds. by Baba K., Konno A., Takenaka H., Life Science, Tokyo, 2008.
- 10) Mizuguchi H., Hatano M., Matsushita C., Umehara H., Kuroda W., Kitamura Y., Takeda N., Fukui H., *J. Pharmacol. Sci.*, **108**, 480–486 (2009).
- 11) Mizuguchi H., Kitamura Y., Kondo Y., Kuroda W., Yoshida H., Miyamoto Y., Hattori M., Fukui H., Takeda N., *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* (in press)
- 12) Howarth P. H., *Allergy*, **52** (Suppl. 40), 12–18 (1997).
- 13) Matsushita C., Mizuguchi H., Niino H., Sagesaka Y., Masuyama K., Fukui H., *J. Trad. Med.*, **25**, 133–142 (2008).