

氏名（本籍） 白 石 宗 重

学位の種類 博士（薬学）

学位記番号 薬博第 259 号

学位授与年月日 平成 11 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学位論文題目 アレルギー性炎症の遅延相におけるヒスタミン産生機構の解析

論文審査委員 (主査) 教授 大内 和雄 教授 山 添 康
教授 永 沼 章

論文内容要旨

ヒスタミンは H_1 レセプターを介して血管透過性の亢進や気管支平滑筋の収縮を誘発する作用があり、また H_2 レセプターを介して白血球の浸潤を抑制する作用があることから、アレルギー性炎症を制御する因子として重要である。

ラットのアレルギー性空気嚢型炎症モデルにおいて、炎症滲出液中のヒスタミン量は、抗原刺激後30分以内（アナフィラキシー相）に急激に増加したのち一旦減少するが、その後24時間をピークとして再び、しかも持続的に増加する（遅延相）。アナフィラキシー相のヒスタミンは炎症局所の肥満細胞の脱顆粒により放出され、 H_1 レセプターを介して血管透過性の亢進に関与しているのに対し、遅延相のヒスタミンは炎症局所で持続的に産生され、 H_2 レセプターを介して白血球浸潤を負に制御している。肥満細胞の脱顆粒機構に関しては精力的に解析が進められ、その詳細な機序が明らかにされてきたが、遅延相におけるヒスタミン産生機構の解析は遅れている。当教室では、遅延相の炎症滲出液中には、ヒスタミン産生に関与するサイトカイン様の因子、即ち histamine-production-increasing factor-1 (HPIF-1) が存在し、この HPIF-1 が遅延相の持続的なヒスタミン産生を誘発していることをすでに明らかにしている。本研究では、遅延相のヒスタミン産生機構を明確にすることを目的として、HPIF-1 の作用発現に関与している protein kinase について解析を行い（第一章）、HPIF-1 の実体についての解析も行った（第二章）。さらに、アレルギー性炎症を誘発して慢性期の炎症滲出液中には、HPIF-1 によるヒスタミン産生増大をさらに増強する活性因子（HPIF-2）が存在することを見出したので、この HPIF-2 のヒスタミン産生増大増強作用、及び生化学的特性について解析を行った（第三章）。

第一章 HPIF-1 の作用機序の解析

SD 系雄ラットに抗原 ABA-AcBSA を皮内注射して感作し、その9日後に背部皮下に空気を注入して空気嚢を作製した。翌日、空気嚢内に抗原溶液を注入することによりアレルギー性炎症を誘発し、8時間後に空気嚢内液を回収し、遠心により浸潤白血球を除去して得た上清を Hanks' balanced salt solution に透析し、HPIF-1 を含む炎症滲出液試料とした。この炎症滲出液試料存在下で骨髄細胞、末梢血白血球、脾臓細胞、リンパ節細胞、あるいは胸腺細胞を24時間培養し、培養液上清中のヒスタミン量を測定したところ、骨髄細胞に最も強いヒスタミン産生増大が見られたため、以後の実験では骨髄細胞を使用した。骨髄細胞を、炎症滲出液試料（HPIF-1）及び各種 protein kinase 阻害薬等を含む EMEM 培地中で24時間培養後のヒスタミン産生量を測定したところ、protein kinase C (PKC) 阻害薬 H-7, staurosporine 及び K-252a は炎症滲出液試料（HPIF-1）によるヒスタミン産生増大を強く抑制した。また、PKC 活性化薬 TPA により骨髄細胞のヒスタミン産生が増大したことから、HPIF-1 の作用発現には PKC の活性化が関与している可能性が示唆された。しかし、TPA によるヒスタミン産生増大は HPIF-1 によるヒスタミン産生増大よりも弱いことから、HPIF-1 の作用発現には PKC の活性化以外の作用も関与していると考えられた。そこで、チロシンキナーゼと cAMP 依存性キナーゼ (PKA) の関与について解析した。

その結果、チロシンキナーゼ阻害薬 genistein は PKC 阻害薬の場合と同様に、炎症滲出液試料 (HPIF-1) によるヒスタミン産生増大を強く抑制した。一方、PKA阻害薬である H-89 はヒスタミン産生増大を抑制しなかった。以上の結果から、HPIF-1 の作用発現には PKA ではなく、PKC とチロシンキナーゼの活性化が関与することが強く示唆された。

第二章 RBL-2H3 細胞培養液上清中に存在する HPIF-1 様活性因子の精製

炎症滲出液中に存在する HPIF-1 は、pl 4~5, 分子量約30kDa の糖蛋白質であることが明らかにされている。一方、RBL-2H3 細胞を A23187 で刺激して8時間後の培養液上清中にも、炎症滲出液中の HPIF-1 と同じ活性を持つ因子が存在することが明らかになり、この因子の生化学的特性が HPIF-1 と極めて類似することから、炎症滲出液中の HPIF-1 と PBL-2H3 細胞培養液上清中の HPIF-1 は同一の因子である可能性が考えられた。そこで HPIF-1 の実体を明らかにするため、RBL-2H3 細胞培養液上清から HPIF-1 の精製を試みた。RBL-2H3 細胞を A23187 で刺激して8時間後の培養液上清を陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相 HPLC で精製し、得られた活性画分を SDS-PAGE で調べたところ、分子量30kDa に単一のバンドが確認できた。精製した蛋白質の部分アミノ酸配列を解析した結果、ラット GM-CSF のアミノ酸配列の一部と一致した。RBL-2H3 細胞を A23187 で刺激すると GM-CSF mRNA レベルが上昇すること、また、リコンビナント GM-CSF には骨髄細胞のヒスタミン産生を増大させる活性があることから、HPIF-1 は GM-CSF である可能性が示唆された。アレルギー性炎症の遅延相における持続的なヒスタミン産生に GM-CSF が関与しているかどうかは、抗 GM-CSF 抗体を用いた中和実験を行う必要があり、今後の研究課題である。

第三章 アレルギー性炎症慢性期の滲出液中に存在する HPIF-1 活性増強因子 (HPIF-2) とその生化学的特性の解析

アレルギー性炎症を誘発すると、4~24時間後にかけて持続的なヒスタミン産生量の増大が見られるが、24時間後以降ではヒスタミン量は減少し、慢性期5日後にはほとんどヒスタミンは存在しない。慢性期では炎症の沈静化が起こっており、したがって、この時期の炎症滲出液中には、炎症の沈静化に関与している活性因子が存在している可能性が考えられる。そこで、急性期炎症滲出液中に存在する HPIF-1 と、慢性期炎症滲出液中に存在する活性因子 (HPIF-2) との間の相互作用について明らかにするため、骨髄細胞の培養液を用いてヒスタミン産生の観点から解析した。その結果、慢性期の炎症滲出液試料 (HPIF-2) 存在下で骨髄細胞を培養してもヒスタミン産生は増大しないが、急性期の炎症滲出液試料 (HPIF-1) と慢性期の炎症滲出液試料 (HPIF-2) が共存すると、慢性期の炎症滲出液試料 (HPIF-2) は、急性期の炎症滲出液試料 (HPIF-1) によるヒスタミン産生増大をさらに増強することを見出した。この慢性期の炎症滲出液試料 (HPIF-2) は、GM-CSF によるヒスタミン産生増大も増強した。次に、*in vivo* においても、慢性期の炎症滲出液試料 (HPIF-2) はヒスタミン産生増大増強活性を示すかどうか解析した。アレルギー性炎症を誘発して4時間後に5日後の炎症滲出液試料を空気嚢内に注入し、その20時間後の炎症滲

出液中のヒスタミン量を測定した。その結果、無感作ラットの空気嚢内に抗原溶液を注入しても24時間後のヒスタミンレベルは増大せず、また、5日後の炎症滲出液試料（HPIF-2）を抗原溶液と同時に注入してもヒスタミンレベルは増大しなかった。一方、感作ラットの空気嚢内に抗原溶液を注入することにより24時間後のヒスタミンレベルは増大し、5日後の炎症滲出液試料（HPIF-2）を抗原溶液と同時に注入することによりヒスタミンレベルはさらに増強した。したがって、慢性期炎症滲出液中に存在する HPIF-2 は、*in vivo* においてもヒスタミン産生を増強させる活性があることが明らかになった。次に、HPIF-2 の生化学的特性を解析したところ、熱に不安定であり、トリプシン感受性で、pI 7~8, 分子量100 kDa を示す蛋白質であることが明らかになった。このような生化学的特性を持ったヒスタミン産生増大増強活性因子についてはこれまでに報告されていないことから、HPIF-2 は新規の蛋白質である可能性が高い。HPIF-2 の実体及び *in vivo* における本質的な役割の解析は今後の重要な研究課題である。

アレルギー性空気嚢型炎症モデルの遅延相におけるヒスタミンは、 H_2 レセプターを介して白血球の浸潤を抑制することが明らかにされていることから、本研究の成果は、内因性ヒスタミン産生機構を亢進させることによる炎症性疾患の新しい治療法の開発に役立つものと思われる。

審査結果の要旨

本研究は、アレルギー性炎症の発症・進展に重要な役割を果たしているヒスタミンに関し、特に解析の遅れている遅延相での産生機構を明確にすることを旨としたものである。

アレルギー性炎症の遅延相における持続的なヒスタミン産生の増大は、ヒスタミン産生増大因子-1 (HPIF-1) によって誘発されること、またこの時期のヒスタミンはH₂レセプターを介して過剰な白血球の浸潤を抑制することが明らかにされている。本論文では、このHPIF-1の作用機構、HPIF-1の同定、およびHPIF-1の作用を増強する新規の因子(HPIF-2)について述べられている。まず、骨髓細胞の培養系を用いてHPIF-1の作用発現に関与するプロテインキナーゼについて薬理的に解析した結果、プロテインキナーゼCおよびチロシンキナーゼの活性化がHPIF-1の作用発現に重要であり、cAMP依存性プロテインキナーゼは関与していないことを明らかにした。次に、HPIF-1を精製してアミノ酸配列を決定し、HPIF-1として作用する因子のひとつはGM-CSFであることを明らかにし、アレルギー性炎症の遅延相における持続的なヒスタミン産生にGM-CSFが関与している可能性を示唆した。最後に、アレルギー性炎症を誘発して5日後の滲出液中には、単独では骨髓細胞のヒスタミン産生を増大させないが、HPIF-1によるヒスタミン産生増大をさらに増強する活性を持つ新たな因子が存在することを発見した。この因子は熱に不安定でトリプシンにより失活し、分子量約100 kDa, pI 7~8の蛋白質であることを明らかにし、HPIF-2と命名した。このような活性および生化学的特性をもつ蛋白質は現在報告されておらず、新規の蛋白質である可能性が高いことから、この知見はアレルギー性炎症における産生機構を解明するうえで、極めて重要なものである。

以上のように本研究により、アレルギー性炎症におけるヒスタミン産生機構の解明が大きく前進した。本研究で得られた成果は、ヒスタミン産生調節機構の観点から新しいタイプの医薬品を開発する上で役立つ理論を構築する糸口になるものと考えられる。したがって、本論文は博士(薬学)の学位論文として合格と認める。