

# モルモットのアレルギー性気道反応におけるプロスタグランジンD2の役割

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4508">http://hdl.handle.net/2297/4508</a>

## モルモットのアレルギー性気道反応における プロスタグランジン D<sub>2</sub> の役割

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻細胞移植学

(旧講座名：内科学第三)

(主任：中尾真二教授)

吉 見 雄 三

気管支喘息は可逆性の気管支平滑筋収縮と気道過敏性の亢進を特徴とする疾患と考えられてきた。しかし近年、その本態は慢性好酸球性気道炎症であることが明らかとなり、気管支喘息の治療も吸入ステロイドをはじめとした気道炎症を標的とする治療法が中心となっている。プロスタグランジン D<sub>2</sub> (prostaglandin D<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>) は肥満細胞における主要なアラキドン酸代謝産物であり、アレルギー性気道炎症に深く関与していることが示唆されている。本研究では、アレルギー性気道反応における PGD<sub>2</sub> の役割を解明するために、能動感作モルモットの抗原吸入24時間後のメサコリン気道過敏性亢進と咳感受性亢進モデルを用いて、PGD<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の影響を検討した。能動感作したモルモットに抗原を吸入すると、即時型気道収縮と24時間後のカプサイシン咳感受性亢進、メサコリン気道過敏性亢進および気管支肺胞洗浄液中の好酸球増多がみられた。咳感受性測定、気道過敏性測定のそれぞれ1時間前に PGD<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 compound20・Na塩を腹腔内投与すると、カプサイシン咳感受性亢進と気管支肺胞洗浄液中の好酸球数増多は影響を受けなかったが、メサコリン気道過敏性亢進は有意 (p<0.05) に抑制された。PGD<sub>2</sub> の受容体には以前より知られている PGD receptor (DP受容体) と近年クローニングされた chemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2受容体) があり、両受容体の生物活性には相違がみられるが、compound20・Na塩はDP受容体に対する選択的拮抗薬である。したがって、本研究の成績はアレルギー反応による気道過敏性の亢進にDP受容体を介して PGD<sub>2</sub> が関与することを示している。また今回の実験系による結果からはアレルギー反応による気道への好酸球浸潤や咳感受性亢進には、DP受容体の関与はあきらかでなかった。

**Key words** bronchial hyperresponsiveness, cough hypersensitivity, prostaglandin D<sub>2</sub>, prostaglandin D<sub>2</sub> receptor antagonist

気管支喘息は可逆性気管支平滑筋収縮と気道過敏性亢進を特徴とする反復性の急性気道疾患と考えられてきた。しかし近年、好酸球やリンパ球などの炎症細胞浸潤を主体とする慢性気道炎症と気道過敏性亢進を基本病態とする慢性気道疾患であることが明らかになってきている<sup>1)</sup>。このような疾患概念の変遷に伴い、気道炎症が気管支喘息治療の第一標的となり、吸入ステロイド薬をはじめ、ロイコトリエン受容体拮抗薬、トロンボキサン A<sub>2</sub> 合成阻害薬、トロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体拮抗薬などの喘息長期管理薬 (controller) が開発され、実際の臨床でも広く使用されている<sup>2)</sup>。ロイコトリエン受容体拮抗薬およびトロンボキサン A<sub>2</sub> 合成阻害薬/受容体拮抗薬 (トロンボキサン A<sub>2</sub> 阻害薬) は喘息治療のガイドライン<sup>3)</sup> において軽症から重症までの全てのステップの喘息患者に対する長期管理薬として位置付けられている。実際、ロイコトリエン受容体拮抗薬の気管支喘息に対

する効果は、従来より使用されているテオフィリンと同等か<sup>4)</sup>、それ以上<sup>5)</sup> と報告されている。またロイコトリエンやトロンボキサン A<sub>2</sub> 以外のケミカルメディエーター阻害薬に関しても、気道炎症や気道過敏性に対する抑制効果が動物モデルを用いて評価されつつあり、有効性が示されれば、将来、臨床薬への応用も期待される。

プロスタグランジン D<sub>2</sub> (prostaglandin D<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>) は、肥満細胞から IgE 依存性の機序によって産生・放出される主要なアラキドン酸代謝産物である<sup>6)7)</sup>。またマクロファージや気道上皮細胞も PGD<sub>2</sub> を産生することが知られている<sup>8)9)</sup>。PGD<sub>2</sub> のアレルギー性気道反応における役割を示唆する報告は過去にも散見されるが、定まった見解は得られていない。本研究では選択的 PGD<sub>2</sub> 受容体拮抗薬を用いることにより、気道のアレルギー反応による好酸球性気道炎症、気道過敏性亢進および咳感受性亢

平成15年6月2日受付, 平成15年8月1日受理

Abbreviations : Alum, aluminum hydroxide; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; CRTH2, chemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells; DK-PGD<sub>2</sub>, 13-14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub>; DP receptor, prostaglandin D receptor; IFN, interferon; IL, interleukin; OA, ovalbumin; Pao, pressure at the airway opening; PGD<sub>2</sub>, prostaglandin D<sub>2</sub>; TX, thromboxane

進におけるPGD<sub>2</sub>の役割について検討した。

### 対象および方法

#### 1. 実験動物

体重200gのハートレー系雄性モルモット(三共ラボ, 東京)を購入し, 金沢大学動物実験施設内の空調飼育室(室温23±2℃, 湿度55±5%)にて1週間以上飼育し, 肉眼的観察により健常と判断した動物を実験に使用した。

#### 2. 能動感作

以下の方法により, 能動感作を行った(図1)。すなわち, モルモットにシクロフォスファミド30mg/kgを腹腔内投与し, 2日後に卵白アルブミン(OA)8mg/kgと水酸化アルミニウム(Alum)400mg/kgを腹腔内投与した。さらにその3週間後にOA40μg/kg, Alum400mg/kgを腹腔内投与し, 2週間後に実験を行った。

#### 3. 抗原吸入即時型気道収縮反応とカプサイシン咳感受性測定

モルモットの呼吸機能として, 小動物用ダブルチャンバー体プレチスモ(model PMUA+SAR, Buxco Electronics, Sharon, CT)を用いて気道抵抗を測定した<sup>10)</sup>。体プレチスモ内にモルモットを固定し, ジェットネブライザーにてOA10mg/mlを30秒間吸入させた。OA吸入後の気道抵抗を経時的に測定し, OA吸入後の気道抵抗の最大値とOA吸入前の気道抵抗値の差を気道収縮反応の指標とした。OA吸入の1時間前にPGD<sub>2</sub>受容体拮抗薬compound20・Na塩<sup>11)</sup>1mg/kg, 0.1mg/kg, 0.01mg/kg, または溶媒としての生理食塩水を腹腔内投与した。また陰性対照群では, 生理食塩水を腹腔内投与した1時間後にOAの代わりに生理食塩水を吸入させた。この方法によりOA吸入群では抗原吸入即時型気道収縮反応の出現を確認した。陰性対照群では

即時型気道収縮反応はみられなかった。咳感受性を測定するため, 抗原吸入即時型気道収縮反応測定の24時間後に胴体に入るチャンバーと頭部に入る1600mlのチャンバーから構成される小動物用ボックス内にモルモットを固定し, 1.6l/分の圧縮空気によって作動させたジェットネブライザー(Devilbiss646 nebulizer, Delviss Co., Somerset, PA, 出力0.037ml/分)を用いてカプサイシン溶液(10<sup>-4</sup>mol/ml)を1分間吸入させた(図2)。カプサイシン吸入中と吸入後2分間の計3分間に肉眼的観察および差圧トランスデューサーにて感知した咳の回数をカウントした。咳感受性測定の1時間前に生理食塩水またはcompound20・Na塩(1mg/kg, 0.1mg/kg, 0.01mg/kg)を腹腔内投与した。

#### 4. メサコリン気道過敏性測定

カプサイシン咳感受性測定の5時間後に生理食塩水またはcompound20・Na塩(1mg/kg, 0.1mg/kg, 0.01mg/kg)を腹腔内投与し, その1時間後に以下の実験装置および方法を用いてメサコリン気道過敏性を測定した(図3)。ベントバルビタール(75mg/kg)を腹腔内投与してモルモットを麻酔した後, 仰臥位にて胸骨上縁より一横指頭側で気管切開を行って気管カニューレを装着し, 小動物用従量式レスピレーター(Model 1680, Harvard Co, Inc, South Natic, USA)を用いて陽圧呼吸を行った。気管カニューレはポリエチレン性で外径2.5mm, 内径2.1mmを用いた。1回換気量は10ml/kg, 換気回数は毎分60回とした。気道収縮反応の指標として気管カニューレの側圧(pressure at the airway opening, Pao)を差圧トランスデューサー(TP-603T, 日本光電, 東京)を用いて測定した。Paoは気道収縮反応を中枢側から末梢側までの総和として反映する指標である<sup>12)</sup>。気道収縮反応はメサコリン吸入直前のPao値を基礎値として, この基礎値に対するPao値の増加率として表した。メ

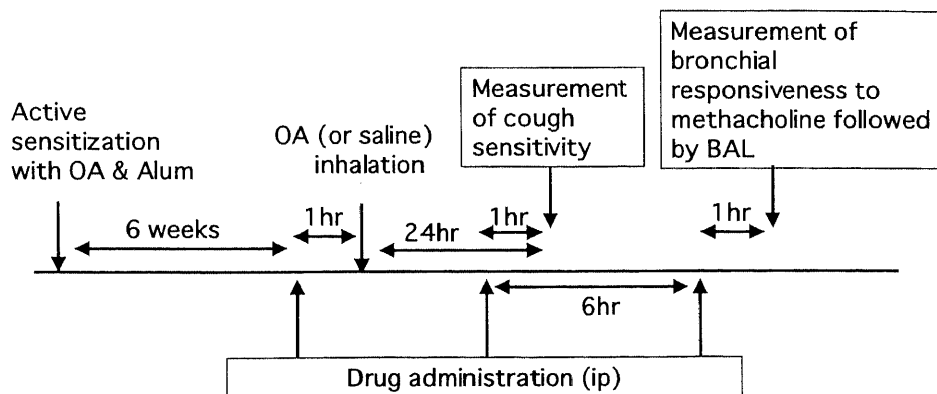


Fig. 1. Chart of experimental study design to examine the effect of prostaglandin D<sub>2</sub> receptor antagonist on bronchial responsiveness and cough sensitivity in actively sensitized guinea pigs. Cough sensitivity to inhaled capsaicin was measured 24 hrs after aerosolized antigen (OA) challenge in actively sensitized guinea pigs. Bronchial hyperresponsiveness to methacholine was measured 6 hrs after the cough sensitivity measurement. Each dose of the prostaglandin D<sub>2</sub> receptor antagonist compound20・Na salt or saline was administered intraperitoneally 1 hr before capsaicin provocation and 1 hr before methacholine challenge. Negative control group, aerosolized saline provocation in stead of OA and saline administration as the vehicle of compound20・Na salt; Positive control, aerosolized OA provocation and saline administration as the vehicle of compound20・Na salt; 1 group, aerosolized OA challenge and 1 mg/kg compound20・Na salt administration; 0.1 group, aerosolized OA challenge and 0.1 mg/kg compound20・Na salt administration; 0.01 group, aerosolized OA challenge and 0.01 mg/kg compound20・Na salt administration. i.p., intraperitoneal administration; BAL, bronchoalveolar lavage; OA, ovalbumin.

サコリンの吸入投与は、南ら<sup>13)</sup>が開発した超音波ネブライザーを改良した小動物用吸入負荷装置を使用し、呼吸状態を変化させることなく、安静換気下で20秒間吸入することにより行った。メサコリンを25, 50, 100, 200 $\mu$ g/mlの順に吸入し、各濃度のメサコリン吸入終了後、5分間Paoを連続的に測定した。吸入後5分間のPaoの最大値を各濃度のメサコリンによる気道

収縮の指標とした。

#### 5. 気管支肺胞洗浄液細胞成分分析

メサコリン気道過敏性測定終了後に10ml注射器(テルモ, 東京)を用いて生理食塩水10mlを気管カニューレから注入し、直ちに徒手でゆっくり回収する手技を2回繰り返し、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)を採取した。採取

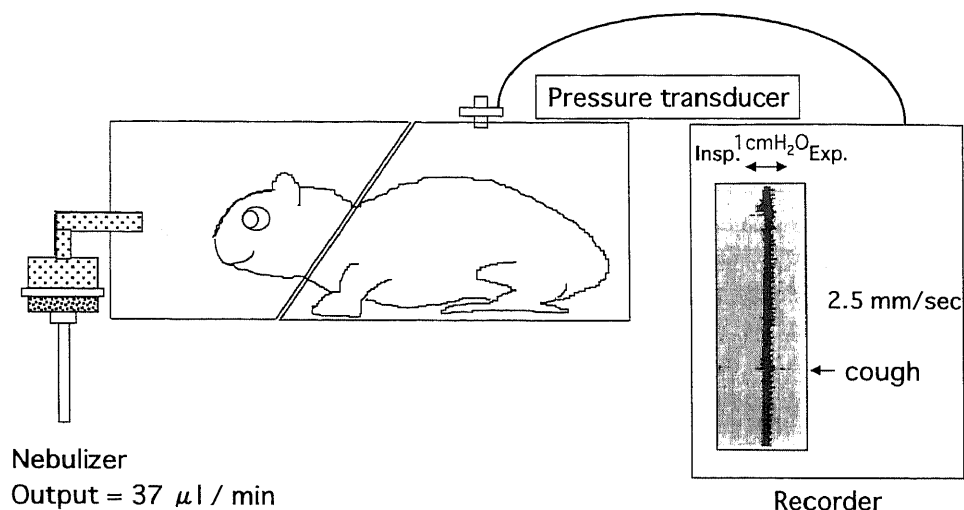


Fig. 2. Design of the cough sensitivity measurement system. A conscious guinea pig was placed in an airtight custom-built plastic box consisting of a head chamber (1600 ml volume) isolated from the body chamber, and pressure in the body chamber was recorded. Coughs were detected as a transient change in the pressure (a rapid inspiration followed by rapid expiration). Coughs were counted by the characteristic change in the animal posture and the pressure transducer recordings. Capsaicin solution ( $10^{-4}$  M) was inhaled for 2 min from a nebulizer. The total number of coughs was recorded during a 1 min inhalation of capsaicin solution plus additional 2 min. Insp., inspiration; Exp., expiration.

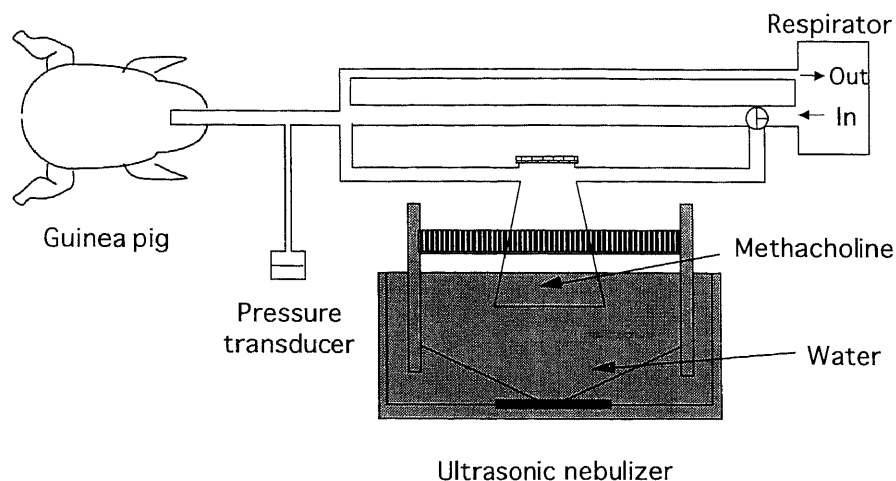


Fig. 3. Design of the bronchial responsiveness measurement system. An anesthetized guinea pig was placed in the supine position and the trachea was cannulated with a polyethylene tube. The animal was artificially ventilated by a small animal respirator and nebulized with methacholine. Pressure at the airway opening was continuously recorded as an overall index of bronchial response to methacholine using a pressure transducer.

したBALFについてはビュルケル-チュルク計算板を用いて総細胞数を測定するとともに、サイトスピン (Cytospin 2, Shandon Southern Products Ltd, Cheshier, UK)を用いて細胞標本を作成し、ギムザ染色を施して細胞分画を算定した。

### 使用薬物

使用した薬物は以下のとおりである。卵白アルブミン (Sigma, St Louis, USA), 水酸化アルミニウム (和光純薬工業, 大阪), compound20・Na塩 (塩野義製薬, 大阪より提供), ペントバルビタール (Abott Laboratories, North Chicago, USA), メサコリン (和光純薬工業), シクロフォスファミド (塩野義製薬), カプサイシン (Sigma)。

### 統計解析

全ての測定結果は平均値±標準誤差 ( $\bar{X} \pm SE$ )にて示した。各群間の有意差の検討にはMann-WhitneyのU検定を用いた。メサコリン吸入後のPaoの基礎値からの増加率の経時変化に関して差を検定する際には、繰り返しのあるANOVAを用いた。危険率5%未満を有意差ありと判定した。

### 成績

#### 1. カプサイシン咳感受性 (図4)

前日にOAの代わりに生理食塩水を吸入し、カプサイシン咳感受性測定の前1時間前に生理食塩水を腹腔内投与した群 (陰性対照群)では、カプサイシン吸入によって誘発された咳回数は $8.2 \pm 0.7$ 回であった。前日にOAを吸入し、カプサイシン咳感受性測定の前1時間前に生理食塩水を腹腔内投与した群 (陽性対照群)では、カプサイシン吸入誘発咳回数は $17.4 \pm 1.9$ 回であった。前日にOAを吸入し、カプサイシン咳感受性測定の前1時間前にcompound20・Na塩を1mg/kg腹腔内投与した群では、カ

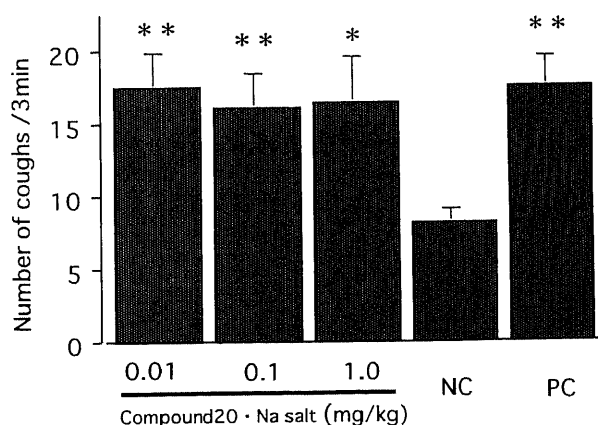


Fig. 4. Effect of Compound20・Na salt on cough sensitivity to capsaicin. Each bar represents  $\bar{X} \pm SE$ . \*  $p < 0.05$  compared with negative control group and \*\*  $p < 0.01$  compared with negative control group. NC: negative control, PC: positive control.

プサイシン吸入によって誘発された咳回数は $16.4 \pm 2.9$ 回であった。同様にcompound20・Na塩を0.1mg/kg, 0.01mg/kg腹腔内投与した群では、カプサイシンによって誘発された咳回数はそれぞれ $16.2 \pm 2.0$ 回,  $17.5 \pm 2.2$ 回であった。陰性対照群と比較して陽性対照群では有意 ( $p=0.0026$ ) に咳回数が増加した。compound20・Na塩 1mg/kg, 0.1mg/kgおよび0.01mg/kg投与群の咳回数は、陽性対照群の咳回数と差を認めなかった。

#### 2. メサコリン気道過敏性 (図5)

メサコリン気道過敏性測定の前24時間前にOAの代わりに生理食塩水を吸入し、1時間前に生理食塩水を腹腔内投与した陰性対照群ではメサコリン吸入前値に対するPao増加率は、メサコリン 25, 50, 100および200 $\mu$ g/ml各濃度において $109.3 \pm 2.9$ ,  $137.4 \pm 12.7$ ,  $289.8 \pm 52.8$ , および $490.6 \pm 75.5\%$ であった。また24時間前にOAを吸入し、1時間前に生理食塩水を腹腔内投与した陽性対照群では、25, 50, 100および200 $\mu$ g/mlのメサコリン吸入によるPao増加率は $185.5 \pm 50.7$ ,  $294.3 \pm 62.3$ ,  $560.9 \pm 73.6$ , および $770.5 \pm 52.4\%$ であった。24時間前にOAを吸入し、1時間前にcompound20・Na塩 1mg/kgを腹腔内投与した1mg/kg群のPao増加率は、メサコリン 25, 50, 100および200 $\mu$ g/mlの各濃度において $152.2 \pm 22.9$ ,  $217.0 \pm 30.2$ ,  $398.2 \pm 61.4$ , および $620.6 \pm 73.3\%$ であった。同様に0.1mg/kg群のPao増加率は、メサコリン 25, 50, 100および200 $\mu$ g/ml各濃度において $142.9 \pm 14.8$ ,  $198.4 \pm 26.3$ ,  $355.4 \pm 65.5$ , および $598.1 \pm 56.0\%$ であり、0.01mg/kg群のPao増加率は $161.3 \pm 28.4$ ,  $276.0 \pm 48.4$ ,  $523.6 \pm 64.5$ , および $718.0 \pm 67.2\%$ であった。メサコリン誘発気道収縮反応は陰性対照群と比較して陽性対照群では約1.6から2.1倍の有意 ( $p < 0.0001$ ) な増強を認め、アレルギー反応による気道過敏性亢進を示した。陽性対照群と比較して1mg/kg群, 0.1mg/kg群では過敏性亢進の有意な ( $p < 0.05$ ) 低下を認めたが, 0.01mg/kg群では有意差を認めず,

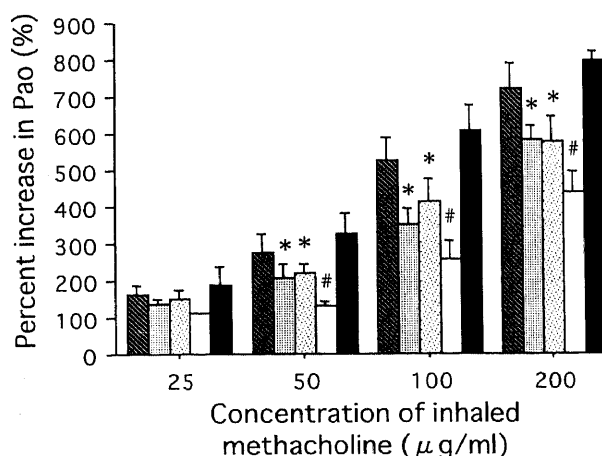


Fig. 5. Effect of Compound20・Na salt on bronchial responsiveness to methacholine. Each bar represents  $\bar{X} \pm SE$ . \*  $p < 0.05$  and #  $p < 0.01$  compared with positive control group. □ negative control group, ■ positive control group, ▨ 0.01 group, ▩ 0.1 group, ▧ 1 group, Pao: pressure at the airway opening

compound20・Na塩はアレルギー反応による気道過敏性亢進を用量依存的に抑制した。

### 3. BALF中細胞成分

BALF中総細胞数は、陰性対照群、陽性対照群、1mg/kg群、0.1mg/kg群、および0.01mg/kg群において $27.8 \pm 2.9$ 、 $90.4 \pm 7.9$ 、 $95.7 \pm 7.5$ 、 $100.1 \pm 12.8$ 、および $84.7 \pm 5.9 \times 10^3/\mu\text{l}$ であった。陰性対照群と比較して陽性対照群では有意 ( $p < 0.0001$ ) な総細胞数の増加を認めた。compound20・Na塩投与群と陽性対照群の間には有意差を認めなかった (図6)。

BALF中好酸球数は、陰性対照群、陽性対照群、1mg/kg群、0.1mg/kg群、および0.01mg/kg群において $6.3 \pm 1.2$ 、 $45.9 \pm 6.0$ 、 $44.4 \pm 3.6$ 、 $38.6 \pm 6.3$ 、および $35.9 \pm 3.5 \times 10^3/\mu\text{l}$ であった。陰性対照群と比較して陽性対照群では有意 ( $p < 0.0001$ ) な好酸球数の増加を認めたが、compound20・Na塩投与群と陽性対

照群の間には有意差を認めなかった (図7)。

BALF中好中球数は、陰性対照群、陽性対照群、1mg/kg群、0.1mg/kg群、および0.01mg/kg群において $1.6 \pm 0.4$ 、 $10.3 \pm 2.6$ 、 $7.9 \pm 1.7$ 、 $9.4 \pm 2.6$ 、および $7.3 \pm 1.7 \times 10^3/\mu\text{l}$ であった。陽性対照群は、陰性対照群と比較して有意 ( $p = 0.0003$ ) な好中球数の増加を認めた。しかし、compound20・Na塩投与群と陽性対照群の間には差を認めなかった (図8)。

BALF中リンパ球数は、陰性対照群、陽性対照群、1mg/kg群、0.1mg/kg群、および0.01mg/kg群において $2.5 \pm 0.4$ 、 $7.4 \pm 1.9$ 、 $8.0 \pm 0.9$ 、 $8.4 \pm 2.3$ 、および $5.8 \pm 1.1 \times 10^3/\mu\text{l}$ であり、陰性対照群と比較して陽性対照群では有意 ( $p = 0.0075$ ) なリンパ球数の増加を認めた。compound20・Na塩投与群と陽性対照群の間には差を認めなかった (図9)。

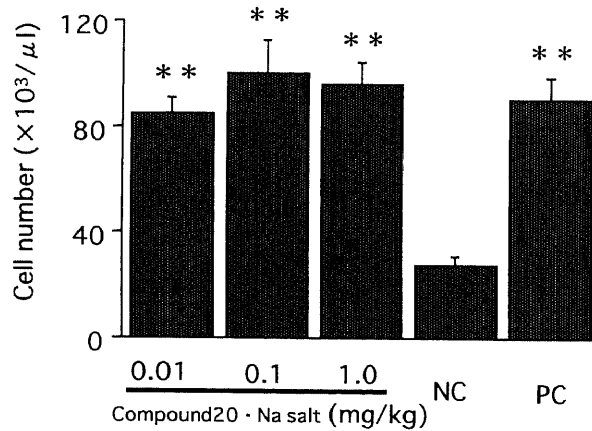


Fig. 6. Effect of Compound20・Na salt on the bronchoalveolar lavage total cell number. Each bar represents  $\bar{X} \pm \text{SE}$ . \*\*  $p < 0.01$  compared with negative control group. NC: negative control, PC: positive control.

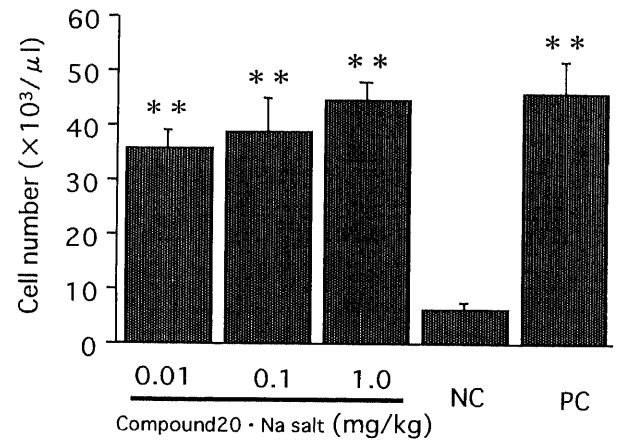


Fig. 7. Effect of Compound20・Na salt on the bronchoalveolar lavage eosinophil number. Each bar represents  $\bar{X} \pm \text{SE}$ . \*\*  $p < 0.01$  compared with negative control group. NC: negative control, PC: positive control.

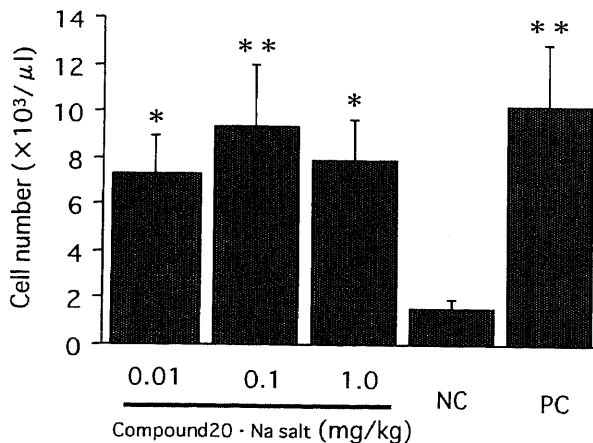


Fig. 8. Effect of Compound20・Na salt on the bronchoalveolar lavage neutrophil number. Each bar represents  $\bar{X} \pm \text{SE}$ . \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  compared with negative control group. NC: negative control, PC: positive control.

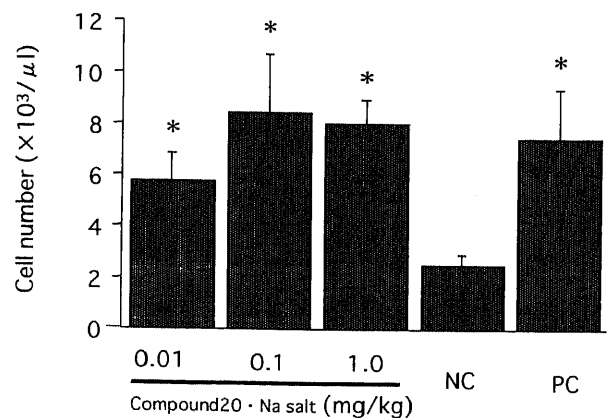


Fig. 9. Effect of Compound20・Na salt on the bronchoalveolar lavage lymphocyte number. Each bar represents  $\bar{X} \pm \text{SE}$ . \*  $p < 0.05$  compared with negative control group. NC: negative control, PC: positive control.

## 考 察

モルモットを用いた本研究では、選択性PGD<sub>2</sub>受容体拮抗薬 compound20・Na塩は気道のアレルギー反応によって惹起された気道過敏性亢進を有意に抑制したが、気道への炎症細胞浸潤と咳感受性亢進には影響しなかった。すなわちPGD<sub>2</sub>は、気管支喘息の基本病態の一つである気道炎症には関与していないが、もう一つの基本病態である気道過敏性亢進の機序に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、PGD<sub>2</sub>がアトピー咳嗽<sup>14)</sup>に代表されるアレルギー性の咳感受性亢進に関与していないことも示唆された。

気管支喘息におけるPGD<sub>2</sub>の関与を示唆する研究成績として以下の報告がある。動物モデルを用いた研究ではOA感作モルモットにOAを暴露すると血中PGD<sub>2</sub>濃度が上昇し、このPGD<sub>2</sub>濃度は血中ヒスタミン濃度と相関した<sup>15)</sup>。また人工呼吸下のイヌの気道にPGD<sub>2</sub>を投与すると、有意な好酸球の集積が気道にみられた<sup>16)</sup>。ヒトにおいては軽症喘息患者を対象として、抗原(Dermatophagoides pteronyssinus)吸入の前後でBALFを採取したところ、吸入後のBALF中PGD<sub>2</sub>濃度が吸入前に比べて約150倍増加したこと<sup>17)</sup>や、気管支喘息患者のBALF中PGD<sub>2</sub>濃度が正常人に比較して高値であったという報告<sup>18)</sup>がある。またPGD<sub>2</sub>には気管支平滑筋収縮作用があり、気管支喘息患者にPGD<sub>2</sub>を吸入投与すると気道における気体の伝導性(コンダクタンス)が低下することが示されている<sup>19)</sup>。さらにPGD<sub>2</sub>の気管支平滑筋収縮作用は、ヒスタミンより強力であったと報告されている<sup>20)</sup>。これらの成績は、気管支喘息における気道への好酸球浸潤や気管支平滑筋収縮にPGD<sub>2</sub>が関与していることを示唆するものである。また気管支喘息の生理学的基本病態である気道過敏性亢進におけるPGD<sub>2</sub>の関与に関しては、マウスを用いた成績が報告されている。すなわち、Matsuokaら<sup>21)</sup>はDP受容体欠損マウスでは感作後の抗原曝露によって生じる気道への好酸球浸潤と気道過敏性亢進の両者とも減弱したと報告している。

プロスタノイドは各種PGとトロンボキサン(TX)の総称であり、シクロオキシゲナーゼによってアラキドン酸から生成される。プロスタノイドはそれぞれの特異的膜結合受容体へ結合することによって様々な生物活性を発揮する<sup>22)</sup>。プロスタノイド受容体はそれぞれのアゴニストを基に分類されている。すなわち、TP受容体、IP受容体、EP受容体、FP受容体、およびDP受容体が同定されており、それぞれTXA<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、およびPGD<sub>2</sub>が対応している<sup>23)</sup>。PGD<sub>2</sub>に対応するDP受容体は回腸、肺、胃、子宮、脳において発現が確認されている<sup>23)</sup>。また最近、7回膜貫通構造をもち、G蛋白と連関するchemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2)受容体と呼ばれる受容体がクローニングされた<sup>24)</sup>。この受容体は構造的には他のプロスタノイド受容体よりもロイコトリエン受容体やホルミルペプチド受容体に類似している。CRTH2受容体はTh2細胞、好酸球、好塩基球に選択的に発現されており<sup>25)</sup>、DP受容体とは独立して、活性化した肥満細胞から放出されたPGD<sub>2</sub>に反応し、細胞内へのCa<sup>2+</sup>イオン流入を調節する機能を持ったもう一つのPGD<sub>2</sub>受容体であることが明らかとなっている<sup>26)</sup><sup>27)</sup>。PGD<sub>2</sub>は血管拡張<sup>28)</sup><sup>29)</sup>、血管平滑筋弛緩<sup>30)</sup>、気管支平滑筋収縮<sup>31)</sup>、血小板凝集抑制<sup>32)</sup>、微小血管透過性亢進<sup>33)</sup>、好酸球浸潤<sup>33)</sup>、などの生物活性を有する。こ

れらの生物活性うち、血管拡張、血管平滑筋弛緩、血小板凝集抑制などの作用はDP受容体の特異的作働薬であるBW245Cによって再現されることより、DP受容体を介しているものと考えられている<sup>34)</sup>。しかし、微小血管透過性亢進や好酸球浸潤などはBW245Cでは再現されていない<sup>35)</sup>。またPGD<sub>2</sub>はヒト好酸球に対して形態の変化や脱顆粒を引き起こすが、この作用はCRTH2受容体の選択的作働薬である13-14-dihydro-15-keto-PGD<sub>2</sub> (DK-PGD<sub>2</sub>)によって再現されるが、DP受容体の選択的作働薬であるBW245Cでは再現されない<sup>25)</sup>。さらに、*in vitro*においてはPGD<sub>2</sub>による好酸球の活性化が、DP受容体の特異的拮抗薬であるBWA868Cによって減弱されずむしろ増強する<sup>36)</sup>。したがって現時点では、PGD<sub>2</sub>が有する好酸球の活性化、遊走などの生物活性は、DP受容体ではなくCRTH2受容体を介した作用であり、むしろDP受容体を介する作用は好酸球活性化を抑制する方向へ働くと考えられている。

本研究では、compound20・Na塩投与はアレルギー反応によるBALF好酸球数増加には影響しなかった。compound20・Na塩はDP受容体の特異的拮抗薬である。compound20・Na塩自体のCRTH2受容体に対する阻害作用については検討されていないが、compound20・Na塩に類似の一連の化合物には、CRTH2受容体に対する阻害作用が認められないことから、compound20・Na塩にもCRTH2受容体に対する阻害作用はないと考えられる。以上より、本研究においてcompound20・Na塩が、アレルギー反応によるBALF好酸球増加に影響しなかったのはcompound20・Na塩がPGD<sub>2</sub>のCRTH2受容体を介する作用に影響しなかったためと考えられる。一方、DP受容体欠損マウスでは感作後の抗原曝露による気管支好酸球浸潤と気道過敏性亢進が減弱していたという報告がある<sup>21)</sup>。この報告では正常マウスと比較して、DP受容体欠損マウスではIL-4、IL-5、IL-13などのTh2サイトカインが減少していたのに対してIFN-γなどのTh1サイトカインは減少していない。この成績は*in vivo*マウスにおけるDP受容体を介したPGD<sub>2</sub>による好酸球の遊走が、Th2サイトカイン産生の増加などを介した間接的作用によることを示唆している。さらに、このMatsuokaら<sup>21)</sup>の成績と本研究の成績の不一致はマウスとモルモットという種差による可能性もある。*in vivo*において、DP受容体を欠損させることやDP受容体拮抗薬を投与することによってPGD<sub>2</sub>のDP受容体を介する作用をブロックした場合、上述したようなTh2サイトカイン産生の抑制を介して気道への好酸球浸潤が間接的にブロックされる反面、DP受容体を介する好酸球活性化抑制作用もブロックされるため、両者のバランスによっては好酸球活性化が増強、抑制、不変のいずれの方向にも傾く可能性があると考えられた。PGD<sub>2</sub>が好酸球の気道への浸潤や活性化に対して作用する際には、様々な生体内活性物質が互いに影響を及ぼしていることを示すもので、今回の実験系のみでそれら全てを検証することは難しく、今後の検討課題である。

気道過敏性については、モルモットを用いた実験でPGD<sub>2</sub>を吸入投与した後ではアセチルコリンに対する気道過敏性が亢進したという報告<sup>37)</sup>をはじめとして、PGD<sub>2</sub>が気道過敏性を亢進させるという報告が多い<sup>18)</sup><sup>38)</sup><sup>39)</sup>。CRTH2受容体の気道過敏性への関与を検討した報告はないが、DP受容体の気道過敏性への関与は検討されており、DP受容体欠損マウスでは感作抗原曝露後の気道過敏性亢進が抑制されたと報告されている<sup>21)</sup>。本研究でも同様に、選択的DP受容体拮抗薬compound20・Na塩

は抗原暴露後の気道過敏性亢進を抑制した。compound20・Na塩が抗原暴露によるBALF好酸球増加には影響を与えず、気道過敏性亢進を抑制したことより、PGD<sub>2</sub>の気道過敏性亢進に対する作用は主としてDP受容体を介すると考えられる。

抗原を吸入暴露した感作モルモットでは、吸入カプサイシンに対する咳感受性が24時間後に亢進する<sup>40)</sup>。本研究において、DP受容体拮抗薬compound20・Na塩は抗原吸入後のカプサイシン咳感受性亢進に対して影響しなかった。過去の報告では、この気道のアレルギー反応による咳感受性亢進はthromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)受容体拮抗薬であるS-1452によって抑制されている<sup>40)</sup>。すなわち、アレルギー反応によって生じる咳感受性亢進にTXA<sub>2</sub>が関与していることが示唆されている。PGD<sub>2</sub>の咳感受性に対する影響を検討した報告は過去にはないが、プロスタノイド受容体は対応するプロスタノイドと1対1で対応しているわけではなく<sup>41)</sup>、受容体拮抗薬も複数のプロスタノイド受容体に対して阻害作用を認めるものもある。例えばS-1452などのTP受容体拮抗薬はTP受容体だけではなく、DP受容体に対しても阻害作用を持つことが知られている<sup>42) 43)</sup>。この事実からは、S-1452の咳感受性抑制作用にはDP受容体を介した作用が関与している可能性も否定できない。しかし本研究では、DP受容体拮抗薬はアレルギー反応による咳感受性亢進に影響を及ぼさなかったことから、アレルギー反応時の咳感受性亢進にはDP受容体を介する作用が関与していないことが示唆された。しかしながら、CRTH2受容体と咳感受性の関係について検討した報告はなく、またCRTH2受容体がPGD<sub>2</sub>以外のプロスタノイドに対して親和性を持つかどうかについても不明である。PGD<sub>2</sub>自体や他のプロスタノイドがCRTH2受容体を介して咳感受性に関与しているかどうかは、今後の重要な研究課題である。

## 結 論

選択的DP受容体拮抗薬であるcompound20・Na塩を用いて、アレルギー性気道反応の病態におけるPGD<sub>2</sub>の関与を検討し、以下の結果を得た。

- 1) 能動感作モルモットの抗原吸入曝露後の気道過敏性亢進は、compound20・Na塩投与により抑制された。
- 2) 能動感作モルモットの抗原吸入曝露後のBALF好酸球増多は、compound20・Na塩投与によって影響されなかった。
- 3) 能動感作モルモットの抗原吸入曝露後のカプサイシン咳感受性亢進は、compound20・Na塩投与によって影響を受けなかった。

これらの成績より、アレルギー反応によって惹起される気道過敏性亢進にPGD<sub>2</sub>がDP受容体を介して関与することが示唆された。一方、気道への好酸球浸潤と咳感受性亢進へのDP受容体の関与は否定的であった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師中尾眞二教授に深甚なる謝意を表します。また、御指導をいただきました藤村政樹助教授に心より謝意を表します。そして、御協力いただきました金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学講座の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。本論文の要旨は第50回日本アレルギー学会総会(2000年11月)において発表した。

## 文 献

- 1) Sterk PJ, Bel EH. Bronchial hyperresponsiveness: the

need for a distinction between hypersensitivity and excessive airway narrowing. *Eur Respir J* 2: 267-274, 1989

- 2) Kabe J. A double-blind placebo-controlled study of OKY-046 for the treatment of chronic asthma. *Jpn J Med* 28: 552-555, 1989

- 3) 厚生省免疫・アレルギー研究班. 喘息予防・管理ガイドライン1998第1版, 66-107, 協和企画通信, 東京, 1998

- 4) Schwartz HJ, Petty T, Dube LM, Swanson LJ, Lancaster JF. A randomized controlled trial comparing zileuton with theophylline in moderate asthma. *Arch Intern Med* 158: 141-148, 1998

- 5) Dempsey OJ, Fowler SJ, Wilson A, Kennedy G, Lipworth BJ. Effects of adding either a leukotriene receptor antagonist or low-dose theophylline to a low or medium dose of inhaled corticosteroid in patients with persistent asthma. *Chest* 122: 151-159, 2002

- 6) Lewis RA, Soter NA, Diamond PT, Austen KF, Oates JA, Roberts LJ. Prostaglandin D<sub>2</sub> generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. *J Immunol* 129: 1627-1631, 1982

- 7) Gundel RH, Kinkade P, Torcellini CA, Clarke CC, Watrous J, Desai S, Homon CA, Farina PR, Wegner CD. Antigen-induced mediator release in primates. *Am Rev Respir Dis* 144: 76-82, 1991

- 8) Laegreid WW, Taylor SM, Englen MD, Straub KM, Silflow RM, Liggitt HD, Leid RW. Stimulus-specific production of cyclooxygenase and lipoxygenase metabolites of arachidonic acid by bovine alveolar macrophages. *Inflammation* 13: 233-244, 1989

- 9) Wu T, Rieves RD, Logun C, Shelhamer JH. Platelet-activating factor stimulates eicosanoid production in cultured feline tracheal epithelial cells. *Lung* 173: 89-103, 1995

- 10) Pennock BE, Cox CP, Rogers RM, Cain WA, Wells JH. A noninvasive technique for measurement of changes in specific airway resistance. *J Appl Physiol* 46: 399-406, 1979

- 11) Tsurii T, Honma T, Hiramatsu Y, Okada T, Hashizume H, Mitsumori S, Inagaki M, Arimura A, Yasui K, Asanuma F, Kishino J, Ohtani M. Bicyclo[2.2.1]heptane and 6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]heptane derivatives: orally active, potent, and selective prostaglandin D<sub>2</sub> receptor antagonists. *J Med Chem* 40: 3504-3507, 1997

- 12) 藤村政樹. In vivo モルモットにおけるslow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A)による気道反応とステロイドの抑制作用. *アレルギー* 32: 365-375, 1983

- 13) 南真司, 岡藤和博, 佐賀努, 藤村政樹, 金森一紀, 宮保進, 服部絢一, 川井清. モルモットにおける定量的吸入装置の開発. *日胸疾患会誌* 21: 252-258, 1983

- 14) Fujimura M, Ogawa H, Nishizawa Y, Nishi K. Comparison of atopic cough with cough variant asthma: Is atopic cough a precursor of asthma? *Thorax* 58: 14-18, 2003

- 15) Turner NC, Dollery CT. Release of arachidonic acid metabolites and histamine from sensitized guinea-pig lung following antigen challenge. *Br J Pharmacol* 93: 751-758, 1988

- 16) Emery DL, Djokic TD, Graf PD, Nadel JA. Prostaglandin D<sub>2</sub> causes accumulation of eosinophils in the lumen of the dog trachea. *J Appl Physiol* 67: 959-962, 1989



- 17) Murray JJ, Tonnel AB, Brash AR, Roberts LJ 2nd, Gosset P, Workman R, Capron A, Oates JA. Release of prostaglandin D2 into human airways during acute antigen challenge. *N Engl J Med* 315: 800-804, 1986
- 18) Liu MC, Bleecker ER, Lichtenstein LM, Kagey-Sobotka A, Niv Y, McLemore TL, Permutt S, Proud D, Hubbard WC. Evidence for elevated levels of histamine, prostaglandin D2, and other bronchoconstricting prostaglandins in the airways of subjects with mild asthma. *Am Rev Respir Dis* 142: 126-132, 1990
- 19) Hardy CC, Robinson C, Tattersfield AE, Holgate ST. The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D2 in normal and asthmatic men. *N Engl J Med* 311: 209-213, 1984
- 20) Schneider MW, Drazen JM. Comparative in vitro effects of arachidonic acid metabolites on tracheal spirals and parenchymal strips. *Am Rev Respir Dis* 121: 835-842, 1980
- 21) Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Ushikubi F, Aze Y, Eguchi N, Urade Y, Yoshida N, Kimura K, Mizoguchi A, Honda Y, Nagai H, Narumiya S. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science* 287: 2013-2017, 2000
- 22) Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A, Sheldrick RL. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 47: 151-168, 1994
- 23) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79: 1193-1226, 1999
- 24) Nagata K, Tanaka K, Ogawa K, Kemmotsu K, Imai T, Yoshie O, Abe H, Tada K, Nakamura M, Sugamura K, Takano S. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J Immunol* 162: 1278-1286, 1999
- 25) Gervais FG, Cruz RP, Chateaufneuf A, Gale S, Sawyer N, Nantel F, Metters KM, O'Neill GP. Selective modulation of chemokinesis, degranulation, and apoptosis in eosinophils through the PGD2 receptors CRTH2 and DP. *J Allergy Clin Immunol* 108: 982-988, 2001
- 26) Nagata K, Hirai H, Tanaka K, Ogawa K, Aso T, Sugamura K, Nakamura M, Takano S. CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). *FEBS Lett* 459: 195-199, 1999
- 27) Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, Ogawa K, Kenmotsu K, Takamori Y, Ichimasa M, Sugamura K, Nakamura M, Takano S, Nagata K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 193: 255-261, 2001
- 28) Toda N, Inoue S, Okamura T, Okunishi H. Mechanism underlying relaxations caused by prostaglandins and thromboxane A2 analog in isolated dog arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 11: 354-362, 1988
- 29) Lydford SJ, McKechnie KC, Dougall IG. Pharmacological studies on prostanoid receptors in the rabbit isolated saphenous vein: a comparison with the rabbit isolated ear artery. *Br J Pharmacol* 117: 13-20, 1996
- 30) Walch L, Labat C, Gascard JP, de Montpreville V, Brink C, Norel X. Prostanoid receptors involved in the relaxation of human pulmonary vessels. *Br J Pharmacol* 126: 859-866, 1999
- 31) Beasley RC, Featherstone RL, Church MK, Rafferty P, Varley JG, Harris A, Robinson C, Holgate ST. Effect of a thromboxane receptor antagonist on PGD2- and allergen-induced bronchoconstriction. *J Appl Physiol* 66: 1685-1693, 1989
- 32) Keery RJ, Lumley P. AH6809, a prostaglandin DP-receptor blocking drug on human platelets. *Br J Pharmacol* 94: 745-754, 1988
- 33) Woodward DF, Hawley SB, Williams LS, Ralston TR, Protzman CE, Spada CS, Nieves AL. Studies on the ocular pharmacology of prostaglandin D2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 138-146, 1990
- 34) Wright DH, Metters KM, Abramovitz M, Ford-Hutchinson AW. Characterization of the recombinant human prostanoid DP receptor and identification of L-644,698, a novel selective DP agonist. *Br J Pharmacol* 123: 1317-1324, 1998
- 35) Woodward DF, Spada CS, Hawley SB, Williams LS, Protzman CE, Nieves AL. Further studies on ocular responses to DP receptor stimulation. *Eur J Pharmacol* 230: 327-233, 1993
- 36) Monneret G, Gravel S, Diamond M, Rokach J, Powell WS. Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. *Blood* 98: 1942-1948, 2001
- 37) Brunelli G, Daffonchio L, Hernandez A, Sala A, Omini C, Berti F. PGD2 induces pulmonary hyperresponsiveness to acetylcholine in vivo in the guinea-pig. *J Auton Pharmacol* 7: 281-285, 1987
- 38) Sato T, Iwama T, Shikada K, Tanaka S. Airway hyperresponsiveness to acetylcholine induced by aerosolized arachidonic acid metabolites in guinea-pigs. *Clin Exp Allergy* 26: 957-963, 1996
- 39) 塚越秀男, 黒沢元博. プロスタグランジンD<sub>2</sub>静脈内投与によるモルモット気道反応性亢進とトロンボキサンA<sub>2</sub>拮抗薬の効果に関する研究. *日薬理誌* 99: 83-91, 1992
- 40) Liu Q, Fujimura M, Tachibana H, Myou S, Kasahara K, Yasui M. Characterization of increased cough sensitivity after antigen challenge in guinea pigs. *Clin Exp Allergy* 31: 474-484, 2001
- 41) Coleman RA, Kennedy I. Characterization of the prostanoid receptors mediating contraction of guinea-pig isolated trachea. *Prostaglandins* 29: 363-375, 1985
- 42) McKenniff MG, Norman P, Cuthbert NJ, Gardiner PJ. BAY u3405, a potent and selective thromboxane A2 receptor antagonist on airway smooth muscle in vitro. *Br J Pharmacol* 104: 585-590, 1991
- 43) Hamid-Bloomfield S, Payne AN, Petrovic AA, Whittle BJ. The role of prostanoid TP- and DP-receptors in the bronchoconstrictor effect of inhaled PGD2 in anaesthetized guinea-pigs: effect of the DP-antagonist BW A868C. *Br J Pharmacol*;100: 761-766, 1990

**Role of prostaglandin D<sub>2</sub> in allergic bronchial reactions in guinea pigs** Yuzo Yoshimi, Department of Cellular Transplantation Biology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa, 920-8640 – J. Juzen Med Soc., **112**, 94 – 102 (2003)

**Key words** bronchial hyperresponsiveness, cough hypersensitivity, prostaglandin D<sub>2</sub>, prostaglandin D<sub>2</sub> receptor antagonist

#### Abstract

Bronchial asthma used to be recognized as an airway disease characterized by acute recurrent reversible smooth muscle constriction and hyperresponsiveness of the airway. After being revealed that eosinophilic airway inflammation is a fundamental feature of asthma, treatment of asthma has been shifted from bronchodilator therapy to anti-inflammatory therapy using inhaled corticosteroids and leukotriene inhibitors. Prostaglandin D<sub>2</sub> is a main metabolite of arachidonic acid in mast cells. It may play an important role in the allergic airway inflammation. We examined the effects of prostaglandin D<sub>2</sub> receptor antagonist on bronchial hyperresponsiveness, cough hypersensitivity and an increase of eosinophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), all of which developed 24 hrs after an antigen inhalation in actively sensitized guinea pigs. Intraperitoneal administration of compound 20 · Na salt, a prostaglandin D<sub>2</sub> receptor antagonist, significantly ( $p < 0.05$ ) reduced the antigen-induced bronchial hyperresponsiveness, but did not affect the antigen-induced cough hypersensitivity or eosinophil counts in the BALF. The DP receptor and the CRTH2 receptor are known as prostaglandin D<sub>2</sub> receptor and compound 20 · Na salt is a selective DP receptor antagonist. The bioactivity is different in these two prostaglandin D<sub>2</sub> receptors. From the results of this study, it is suggested that prostaglandin D<sub>2</sub> is involved in antigen-induced bronchial hyperresponsiveness via the DP receptor while its role in antigen-induced cough hypersensitivity or eosinophilic bronchitis may not be significant.