

## アレルギー疾患の新規病理機構、NFAT シグナルを作用点とする新規治療戦略

- 1) 徳島大学大学院医歯薬学研究部・生命薬理学分野、
- 2) 大阪大谷大学薬学部 薬理学講座、
- 3) 徳島大学大学院医歯薬学研究部 耳鼻咽喉科学分野、4) 徳島大学

湧川 朝治<sup>1)</sup>、水口 博之<sup>2)</sup>、北村 嘉章<sup>3)</sup>、福井 裕行<sup>4)</sup>

### 1.緒言

花粉症は、1970年代から増加の一途を辿り、現在、国民の30%が罹患する難治性疾患である。社会的活動の高い年齢層の有病率が高く、年間の医療費が3,000億円であり、それによる経済的損失はたいへん大きい。主要治療薬である抗ヒスタミン薬の単独投与による効果は不十分である。ステロイドの併用、舌下免疫療法などが試みられているが、満足できる治療法に至っていない。

本研究は、新規に花粉症の病理機構解明を行い、それに基づき、花粉症症状を高度に改善する治療法開発を目的とする。そのために、ヒスタミンが関与する病理機構解明を行った。その結果、ヒスタミンH<sub>1</sub>受容体(H<sub>1</sub>R)刺激により、蛋白キナーゼC-δ(PKCδ)の活性化を介して、H<sub>1</sub>R遺伝子発現を亢進させることが、くしゃみや鼻汁の症状悪化に関与することを明らかにした。この機構は、抗ヒスタミン薬の作用点であると考えられる。アレルギー性鼻炎モデルラットにおいて、抗ヒスタミン薬の単独投与では症状の60%しか改善できなかった。改善できない症状は、未知の機構が関与すると考えられる。阿波番茶、あるいは、レンコンエキスは、抗ヒスタミン薬との併用投与により、症状を90%改善できることを見だし、アレルギー性鼻炎の第2の病理機構に作用することが考えられた。第2の病理機構は、NFATシグナルを介するIL-9遺伝子発現亢進による症状悪化機構であることが明らかにし(図1)、阿波番茶およびレンコンエキスに含まれるNFATシグナル抑制薬が、それぞれピロガロールおよびエピガロカテキンポリマーであることを明らかにした。

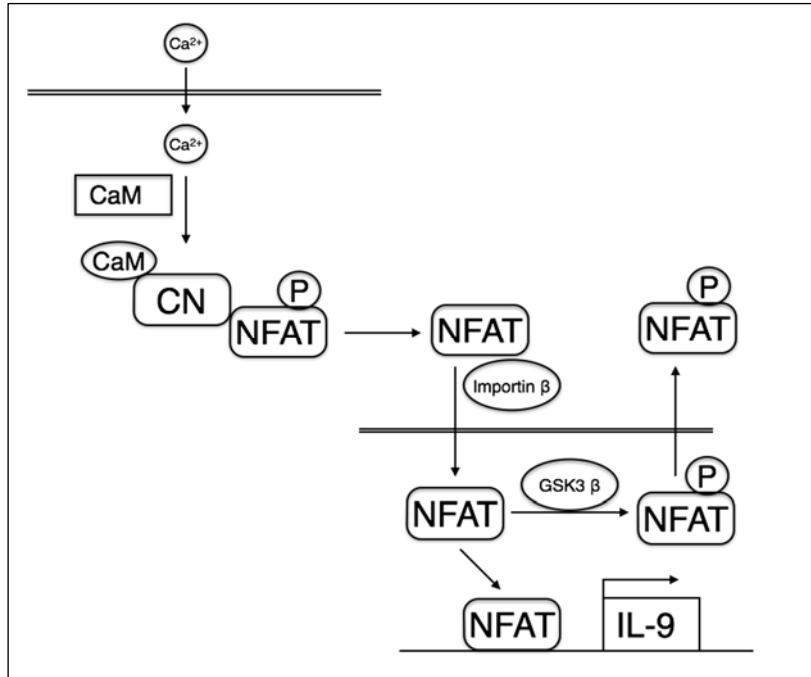


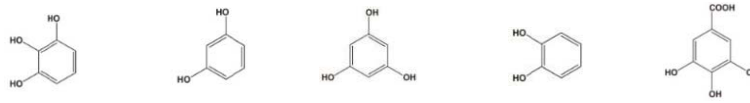
図 1. IL-9 遺伝子発現亢進に関与する NFAT シグナル機構。阿波晩茶に含まれるピロガロール、及び、レンコンエキスに含まれるエピガロカテキンポリマーの作用点。アレルギー性鼻炎の症状発現への関与が考えられる。

具体的には、(1)NFAT 抑制薬であるピロガロール、及び、エピガロカテキンポリマーの標的分子を同定する。(2) ピロガロール、及び、エピガロカテキンポリマーの NFAT シグナル抑制の分子薬理機構を明らかにする。(3) アレルギー性鼻炎モデルラットを用いて、ピロガロール、及び、エピガロカテキンポリマーの薬効を明らかにする。以上の研究目的を本年度中に可能な限り推進させる。

## 2.方法と結果

### (1) ピロガロールの標的分子同定

ピロガロール、及び、その類縁体の抗酸化活性、NFAT 脱リン酸化、及び、IL-9 遺伝子発現抑制作用を調べた (図 2)。その結果、ピロガロール、及び、没食子酸 (gallic acid) に NFAT シグナルに対する抑制活性が見いだされた。一方、カルシウムイオノフォアで刺激した RBL 2H3 細胞において、NFAT シグナルを介した IL-9 遺伝子発現亢進を明らかにした。そこで、没食子酸をリガンドとするアフィニティー樹脂を作成し、RBL 2H3 細胞抽出液から poly(U)-binding-splicing factor (PUF60) タンパクの精製・同定に成功した。



	pyrogallol	resorcinol	phlorogrucinol	catechol	gallic acid
抗酸化活性(%)	100	7.0	18.8	60.3	113.5
NFATの脱リン酸化阻害	○	no effect	no effect	no effect	○
IL-9 mRNAの遺伝子発現亢進抑制	○ IC <sub>50</sub> 32.9 μM	no effect	no effect	no effect	○ IC <sub>50</sub> 82.6 μM

図 2. ピロガロール (pyrogallol) とその類縁体の抗酸化活性、NFAT 脱リン酸化、及び、IL-9 遺伝子発現抑制作用。

NFAT シグナルには、カルモジュリン、カルシウム・カルモジュリン依存性蛋白キナーゼ II、カルシニューリン (CN)、及び、NFAT などのシグナル分子が関与する (図 1)。ピロガロールの標的分子は、NFAT 分子周辺に存在することを明らかにした。そこで、PUF60 の NFAT に対する親和性を検討した。共免疫沈降実験により、PUF60 と GFP-NFATc2 の結合が明らかとなった (図 3)。更に、ピロガロールが存在すると PUF60 と GFP-NFATc2 の結合が減弱することを明らかにした。

## (2) NFAT シグナル抑制の分子機構解明

NFAT は通常リン酸化された状態で細胞質に存在し、上流のシグナル分子であるカルシニューリンにより脱リン酸化され、核内に移行し、NFAT 依存性遺伝子転写を促進する。PUF60 と NFATc2 が結合状態で存在し、その結合がピロガロールにより減弱することを明らかにしている。そこで、RBL 2H3 細胞の PUF60 タンパクをノックアウトし、カルシウムイオノフォア刺激による IL-9 遺伝子発現亢進に対する影響を調べた (図 3)。その結果、カルシウムイオノフォア刺激による IL-9 遺伝子発現亢進は、ノックアウトした細胞において有意に減弱した。

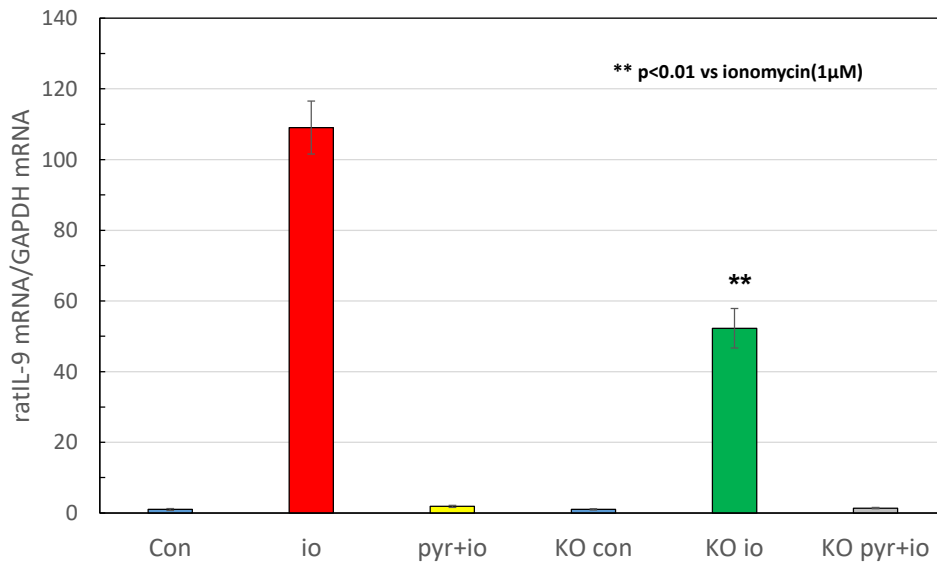


図3. カルシウムイオノフォア刺激 RBL 2H3 細胞における IL-9 mRNA レベル上昇に対する PUF60 タンパクのノックアウトによる IL-9 mRNA レベル上昇の抑制

### 3.考察

アレルギー性鼻炎の症状発現機構として、抗ヒスタミン薬に感受性を持つヒスタミン H1 受容体遺伝子発現亢進機構に加えて、第2の症状発現機構の存在を明らかにした。第2の機構は、カルシウムイオン流入が、カルシニューリン、NFAT を経て引き起こされる IL-9 遺伝子発現亢進が関与する機構であることを明らかにした。

第2の機構は、ピロガロールにより抑制される。ピロガロールは、PUF60 を標的とする。PUF60 は NFAT に結合した状態で存在する。ピロガロールが PUF60 に結合することにより、PUF60 は NFAT から解離する。PUF60 が NFAT から解離した状態では、NFAT シグナルは減弱し、IL-9 遺伝子発現亢進が低下すると考えられる。

抗ヒスタミン薬と阿波晩茶の併用投与が、ヒトのアレルギー性鼻炎の症状改善に有効であることを証明したい。