【総 説】

アレルギー喘息におけるプロスタノイドの役割

国 方 友 紀 瀬 木(西田) 恵 里 成 宮 周

京都大学大学院医学研究科 神経細胞薬理学講座

The Roles of Prostanoids on Allergic Asthma

Tomonori KUNIKATA, Eri SEGI-NISHIDA and Shuh NARUMIYA

Department of Pharmacology and Faculty of Medicine, Kyoto University

Summary

Allergy is a major health problem, and this is especially true for type I allergy, such as bronchial asthma and allergic rhinoconjunctivitis, with more than 20% of the world population being affected by these conditions. Affected individuals exhibit a high titer of immunoglobulin E (IgE) antibodies specific for allergens such as those associated with house dust mites and plant pollen. Exposure of such individuals to these allergens induces the activation of mast cells through antigen-antibody-mediated cross-linking of IgE receptors on the cell surface. Activated mast cells release allergic mediators, such as histamine, cysteinyl leukotrienes, and various cytokines. These substances not only mediate acute allergic responses but also induce the late phase of inflammation by stimulating local synthesis of various chemokines such as CCL11 (eotaxin) and CCL17 (TARC) and recruiting T helper 2 (Th2) lymphocytes and eosinophils. Repeated exposure to allergens enhances inflammation characterized by infiltration of these cells and can cause tissue remodeling. However, how this course of responses is regulated and why it becomes exaggerated in some population to develop diseases remains unknown. Prostaglandins (PGs) including PGD₂ and PGE₂ are produced during allergic reactions. We have shown PGD₂, which was released from activated mast cell, plays a role as a causative substance in allergic inflammation of airway. The concentrations of Th2 cytokines and the extent of lymphocyte accumulation in the lung of ovalbumin challenged PGD₂ receptor (DP) deficient mice were greatly reduced compared with those in wild-type animals. Moreover, DP deficient mice showed only marginal infiltration of eosinophils and failed to develop airway hyper-reactivity. Whereas PGD₂ functions as an allergic mediator, aspirin-like drugs are generally ineffective in allergic disorders, suggesting that another PG-mediated pathway prevents the development of allergic reactions. Recently, we have shown that PGE₂ acting at the EP3 receptor plays such a role. Mice lacking EP3 developed allergic inflammation markedly more pronounced than that in wild-type mice or mice deficient in other EP subtypes. Conversely, an EP3-selective agonist suppressed the inflammation. This suppression was effective when the compound was administered 3 h after antigen challenge and was associated with inhibition of antigen-induced changes in gene expression. Thus, PGD₂ functions as a mast cell-derived mediator to trigger asthmatic responses. In contrast, the PGE₂-EP3 pathway negatively modulates these reactions.

緒 言

アレルギー疾患，中でも気管支喘息やアレルギー性鼻炎等のI型アレルギー疾患は年々増加傾向にあり¹⁾，現代社会において重大な問題となっている。今日，これらの疾患は好酸球を主体としたアレルギー性炎症疾患として認知されており，炎症と非常に関わりの深いプロスタノイドがこれらの疾患の発症において重要な役割を果たしている可能性が高い。

プロスタグランジン (PG) およびトロンボキサン (TX) よりなるプロスタノイドは，アラキドン酸から，

シクロオキシゲナーゼ (COX) および各々のプロスタノイドに特異的な合成酵素によって合成される生理活性脂質である。アラキドン酸は，種々の生理的・病理的な刺激に応じて活性化されたホスホリパーゼ A₂ の作用によって膜リン脂質より遊離し，プロスタノイドが合成される。プロスタノイドはその合成直後に細胞外に放出されるが，その生理学的半減期は極めて短い。このような性質から，プロスタノイドは産生された局所で作用し，ホメオスタシスの維持や種々の病態形成に関与するオータコイドと考えられる。また，プロスタノイドは非常に多彩な作用を示し，その作用は全身の臓器・組織に及ぶと言っても過言ではない。また，これらの作用は標的細胞上に存在する各々のプロスタノイドに特異的な受容体を介して発揮される。プロスタノイド受容体としては，PGD₂，PGE₂，PGF_{2α}，PGI₂，TXA₂ に特異的な受容体として，各々DP，EP，FP，IP，TP の5種類が存在しており，さらにEPにはEP1，EP2，EP3，EP4の4種類のサブタイプが存在する^{2,3)}。

今回我々は，これらプロスタノイド受容体を遺伝的に欠損したマウスや受容体特異的な作用薬を用いることにより，アレルギー喘息における各種プロスタノイドの作用についての検討を行った。

アレルギー反応促進性プロスタノイド

アレルギー性喘息における PGD₂ の役割

PGD₂ は，I型アレルギー反応において主体となる

Fig. 1 Effects of DP deficiency on asthmatic responses in an OVA-induced asthma model. (A) Protocol for OVA immunization and challenge. (B) Infiltration of inflammatory cells in BAL fluid. The numbers of total cells (upper left), eosinophils (upper right), macrophages (lower left), and lymphocytes (lower right) recovered in BAL fluid of OVA-challenged or saline-treated wild-type and DP deficient mice are shown. N.D., not detected. (C) Reactivity of the airway to acetylcholine in wild-type and DP deficient mice. The dose-response curves of acetylcholine-induced bronchoconstriction in saline-treated (○) and OVA-challenged (●) wild-type mice and saline-treated (△) and OVA-challenged (▲) DP deficient mice are shown. All data are means±SEM of values from six mice per group. **p*<0.05 versus the respective saline control group; †*p*<0.05 the OVA-challenged wild-type versus DP deficient mice.

肥満細胞から多量に産生放出される主要なケミカルメディエーターの一つであるが⁴⁾、その役割に関しては不明であった。そこで、I型アレルギー反応を主体とする気管支喘息モデルを用い、PGD₂の役割についての検討を行った。

野生型 C57BL/6 マウスおよび DP 欠損マウス⁵⁾に 50 µg の Ovalbumin (OVA) を 0 日目と 12 日目に腹腔内投与することにより感作を行い、その後、1% OVA を 22 日目、26 日目、30 日目に 30 分間吸入させることによりアレルギー喘息モデルマウスを作製した⁶⁾ (Fig. 1 A)。

上記の通り、野生型マウスに抗原曝露を行ったところ、気道過敏性や粘液産生細胞の増加などの気管支喘息に特有の病態形成が認められた。一方、DP 欠損マウスでは、気道過敏性や粘液産生細胞の増加はほとんど認められなかった (Fig. 1 C, 2)。また、アレルギー喘息に特徴的な、好酸球やリンパ球の組織への浸潤について検討を行ったところ、DP 欠損マウスでは野生型マウスに比べ、これらの炎症性細胞の浸潤は著明に低下していた (Fig. 1 B)。次に、これらの細胞の組織への誘導には Th2 サイトカインが重要であることから、その気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の濃度の定量を行った。その結果、DP 欠損マウスでは野生型マウスに比べ、IL-4、IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカイン濃度の低下が認められた。一方、Th1 サイトカインである IFN- γ の濃度は野生型のものと差を認めなかった。更に肺における DP の発現部位について検討を行ったところ、DP の発現は無刺激の状態や腹腔内への抗原感作時のマウス肺組織ではほとんど認められないが、気道への抗原曝露によって気道上皮や肺胞上皮に強く誘導されることが確認された (Fig. 3)。

これらの結果から、アレルギー喘息において肥満細胞から産生放出される PGD₂ が、アレルギー性喘息の病態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。DP 受容体が抗原刺激により気道や肺胞上皮に発現誘導されることから、PGD₂ によって刺激を受けた上皮細胞がサイトカインやケモカインの産生を促進して好酸球やリンパ球の動員を制御している可能性が考えられる (Schema 1)。

アレルギー反応抑制性プロスタノイド

上記のように、我々は、DP 欠損マウスを用いた解析により、PGD₂ が DP 受容体を介してアレルギー喘息の亢進に働いていることを明らかにしてきた⁵⁾。し

かしながら、一方で、成人喘息患者の約 10% に COX 阻害薬である非ステロイド系抗炎症薬を処置することにより喘息発作が誘発されることが知られている (アスピリン喘息)⁷⁾。また、マウス喘息モデルにおいても、インドメタシン処置 (免疫時および抗原曝露時) により、BALF 中の炎症性細胞数の増加が認められ (未発表)、Sheller 等のグループによっても同様の結果が報告されている⁸⁾。さらに、COX-1 および COX-2 の欠損マウスにおいても、アレルギー喘息が増悪されることが報告されている⁹⁾。

これらの結果は、プロスタノイドにはアレルギー促進性の PGD₂ と、それとは逆に、抗アレルギー作用を有するその他のプロスタノイドが存在することを示唆するものである。

1) アレルギー性喘息における PGE₂ の役割

我々は過去の報告^{10,11)} から、アレルギー抑制性に作用するプロスタノイドとして PGE₂ に着目し、その効果および作用機序の解明を試みた。

野生型マウスおよび各種 PGE₂ 受容体 (EP1-EP4) 欠損マウス¹²⁻¹⁴⁾ を用い、前述の方法によりアレルギーモデルを作製したところ、EP3 受容体欠損マウスにおいてのみ好酸球をはじめとする炎症性細胞の著明な浸潤増加が認められた (Fig. 4 A)。また、EP3 欠損マウスでは野生型マウスに比べ、IL-4、IL-5、IL-13 などの Th2 サイトカイン濃度の著明な増加が観察されたが、Th1 サイトカインである IFN- γ の濃度は野生型のものと差を認めなかった。この結果は PGE₂ が EP3 受容体を介して、アレルギーに対して抑制的に働いていることを示唆するものである。そこで我々は、次に、EP3 受容体の選択的作用薬を用いて検討を行った。EP3 作用薬を 10 µg/kg の用量で 12 時間おきに 1 日 2 回皮下投与を行うことにより炎症性細胞浸潤の著明な低下が認められ、その効果はプレドニゾロン 5 mg/kg 用量に匹敵する程であった (Fig. 4 B)。さらに我々は、PGE₂/EP3 のアレルギー喘息に対する抑制メカニズムの解明を試みた。まず、EP3 がアレルギー喘息発症のどの時点において影響を及ぼすのかについて検討を行うために、EP3 作用薬の投与タイミングを変えて比較検討を行った。その結果、EP3 作用薬を抗原曝露の 30 分前のみ処置した群において有意ではないがアレルギー炎症に対する抑制効果が認められ、一方、抗原曝露の 3 時間後のみ処置した群においては有意な抑制効果が認められた (Fig. 4 C)。この結果か

Fig. 2 Histological examination of lung tissue of OVA-challenged wild-type and DP deficient mice. (A to C) Hematoxylin and eosin staining. Accumulation of inflammatory cells (A) and formation of BALT (B) are apparent in the lungs of OVA-challenged wild-type mice, but not in those of antigen-challenged DP deficient mice (C). (D and E) Periodic acid-Schiff staining. Mucus secretion by the airway epithelial cells is apparent in antigen-challenged wild-type mice (D) but not in OVA-challenged DP deficient mice (E). Original magnification, $\times 200$.

Fig. 3 Expression and localization of the DP receptor in the lung. (A) Northern blot analysis. Expression of the DP receptor mRNA was examined in the ileum (lanes 1 to 3), the spleen (lanes 4 to 6), and the lung (lanes 7 to 9) of unimmunized (lanes 1, 4, and 7) and immunized wild-type mice before (lanes 2, 5, and 8) and after (lanes 3, 6, and 9) the OVA challenge. Positions of DP mRNA are indicated. (B) Immunofluorescence microscopy for DP in the lung of immunized wild-type mice before (left) and after (middle) the OVA challenge and in immunized DP deficient mice after the challenge (right). Original magnification, $\times 20$. (C) Immunoelectron microscopy for DP in the lung of immunized wild-type mice after the OVA challenge. Immunogold particles are seen on the plasma and intracellular membranes of bronchiolar (left) and alveolar (right) epithelial cells. Original magnification, $\times 8000$.

Schema 1 Schema of the functions of PGD₂ and PGE₂ on allergic inflammation. In early phase of allergic reaction, a large amount of PGD₂ is released from mast cells in response to antigen stimulation and mediates allergic reactions. On the contrary, PGE₂ works on mast cells through EP3 receptor and suppresses allergic mediator release. In late phase, PGD₂ and PGE₂ work on airway epithelial cells through DP and EP3, respectively and exert opposite functions on the development of allergic inflammation.

Table 1 Effects of the EP3 agonist on asthma-related gene expression in the lungs.

Gene	Affymetrix gene ID	OVA vs. saline	EP3+OVA vs. OVA
<i>Ccl17</i> (TARC)	97783_at	113.3±6.1	-105.6±5.5
<i>Ccl11</i> (eotaxin)	92742_at	54.6±6.7	-42.7±11.6
<i>Ccl2</i> (MCP-1)	102736_at	25.2±2.3	-14.2±2.7
<i>Ccl8</i> (MCP-2)	92459_at	23.5±2.6	-9.4±2.7
<i>Ccl9</i> (MIP-1γ)	104388_at	17.8±3.7	-5.4±0.9
<i>Ccl7</i> (MCP-3)	94761_at	11.5±2.5	-10.7±2.3
<i>Cxcl10</i> (IP-10)	93858_at	9.0±1.2	-7.0±1.5
<i>Cxcl12</i> (SDF-1β)	160511_at	3.1±0.2	-2.5±0.2
<i>Mmp12</i>	95338_s_at	125.5±25.5	-15.2±2.8
<i>Clca3</i> (gob-5)	162287_r_at	101.6±6.4	-11.2±3.2
<i>Alox15</i> (15-lipoxygenase)	98758_at	24.4±4.1	-25.5±3.7
<i>Adam8</i>	103024_at	20.7±4.5	-3.4±0.5

Data are means±s.e.m. ($n=3$) and represent fold change in gene expression.

Comparisons are between vehicle-treated mice challenged with either OVA (OVA) or saline (saline), and between OVA-challenged mice treated with either EP3 agonist (EP3+OVA) or vehicle (OVA). Genes above the dotted line encode chemokines.

A

B

C

Fig. 4 Enhanced allergic responses in EP3 deficient mice and suppression of airway inflammation by an EP3 agonist. (A) Enhanced airway inflammation in EP3^{-/-} mice. Wild-type (WT), EP1^{-/-}, EP2^{-/-}, EP3^{-/-}, EP4^{+/+}, and EP4^{-/-} mice were immunized and challenged with OVA. The total number of cells in BALF collected 24 h after the last OVA inhalation was counted. Data are means±s.e.m. of values from six animals of each genotype. **p*<0.05 versus WT, EP1^{-/-}, or EP2^{-/-} mice. (B) Effects of an EP3 agonist (EP3 ago.), prednisolone (Pred), or dm-PGE₂ on inflammatory cell infiltration in the lungs. The drugs were administered (s.c.) to WT and EP3 deficient mice at doses of 10 μg/kg, 5 mg/kg, and 10 μg/kg, respectively. The total number of cells in BAL fluid collected 24 h after the last antigen challenge were determined. Data are means±s.e.m. (*n*=4 to 8). (C) Effect of time of administration of the EP3 agonist. EP3 agonist was administrated to WT mice (*n*=6 to 8) at various time points on days 22, 26, and 30, and the number of cells in BALF was determined. **p*<0.05 versus vehicle-treated, OVA-challenged group.

ら、EP3 作用薬の作用点は、喘息の初期および後期の両方において存在することが推察された。

そこで我々は次に喘息の初期・後期においてそれぞれで認められる反応について EP3 作用薬の効果を検討した。まず、初期反応として、抗原刺激後に短時間で誘発されるアレルギー性メディエーターの産生に対

する EP3 作用薬の効果について検討を行った。あらかじめ OVA で免疫したマウスの肺を 5 mm 角程度にチョップし、培養液中で抗原刺激を行い、30 分後の上清中に放出された histamine および cysteinyl leukotrienes (cysLTs) の産生量の測定を行った。その結果、PGE₂ および EP3 作用薬を抗原刺激の 10 分前に

Fig. 5 Localization of EP3 and CCL17 in the lungs. (A) Histochemical staining for EP3. Lung tissue from WT mice or from EP3 deficient mice harboring the β -galactosidase gene at the EP3 locus was stained for β -galactosidase activity with the substrate X-gal. Arrows indicate positive signals. Scale bar, 50 μ m. (B) OVA-induced expression of CCL17 in airway epithelial cells and its suppression by the EP3 agonist. The lungs of OVA-sensitized WT mice were isolated 24 h after the last challenge with saline or OVA; the animals were also treated with EP3 agonist or vehicle 3 h after each challenge. The tissue was then immunostained for CCL17. Arrows indicate positive signals. Scale bars, 50 μ m.

投与することによってアレルギー性メディエーターの産生が抑制されることが明らかとなった。histamine や cysLTs は肥満細胞が産生する主要なメディエーターであることから、PGE₂/EP3 の喘息初期における抑制作用は肥満細胞を介していることが示唆される。次に我々は遅発反応における EP3 作用薬の作用メカニズムを検討するために、どのような遺伝子発現変化が起こっているのか、3 回吸入 24 時間後の肺において DNA microarray を用いて検討を行った。その結果、抗原暴露群において、TARC や eotaxin 等、アレルギー炎症との関連性が示唆されているケモカイン^{15,16)}等の遺伝子発現の増加が起こること、またこの増加は EP3 作用薬処置により著明に抑制されることが明らかとなった (Table 1)。

次に我々は、マウスの肺における EP3 受容体の発現部位の同定を行った。EP3 受容体欠損マウスは、その欠損遺伝子上に β -galactosidase が組み込まれていることを利用し、肺切片を X-gal 染色することにより、EP3 受容体発現部位の同定を試みた。その結果、気道上皮において陽性染色が観察され (Fig. 5 A)、気道上皮における EP3 受容体の存在を示唆した。

加えて我々は、免疫組織化学的な手法を用い、これらケモカインの産生に対する EP3 作用薬の効果および産生細胞の同定を試みた。最終吸入 24 時間後の肺切片を抗 TARC 抗体で免疫染色を行ったところ、抗原チャレンジ群の気道上皮において陽性染色が観察され、このような染色像は、EP3 作用薬を抗原暴露の 3 時間後のみに投与した群においては著明に減少した (Fig. 5 B)。

これらの結果から、PGE₂ は EP3 受容体を介して喘息反応抑制性に働いており、その作用機序としては 2 つの異なる経路が考えられる。まず、喘息の初期相において PGE₂ は肥満細胞上の EP3 受容体に作用し、肥満細胞からのケミカルメディエーターの放出を抑制することにより喘息反応抑制効果を発揮し、一方で、後期相においては気道上皮細胞上の EP3 受容体に作用し、ケモカイン遺伝子の発現を抑制することにより喘息反応抑制効果を発揮するものと考えられる (Schema 1)。

2) アレルギー性喘息における PGI₂ の役割

岐阜薬科大学の永井らのグループによる IP 欠損マウスを用いた実験により、PGI₂/IP 経路もアレルギー喘息に対して抑制性に働いていることが確認されてい

る¹⁷⁾。この IP 欠損マウスにおいては、感作段階において血中 IgE 濃度が野生型に比べて非常に高値であり、PGI₂/IP は免疫感作成立の段階において抑制作用を有することが示唆されている。

おわりに

PGD₂ がアレルギー炎症のメディエーターとして作用することは広く知られているが、前述した通り、アレルギー喘息に対して非ステロイド系抗炎症薬は無効であり、場合によっては悪化させることもある。今回、我々はアレルギー促進性のプロスタノイド経路 (PGD₂-DP 系) と抑制性のプロスタノイド経路 (PGE₂-EP3 系) を明らかにした。従って、非ステロイド系抗炎症薬の無効または悪化作用は、アレルギー抑制性のプロスタノイドの合成阻害によるものと考えられる。

今回の我々の研究はアレルギー喘息の発症機序の解明に一役を担うものであり、PGD₂、PGE₂ の 2 つの異なるプロスタノイドが同じ部位に作用することにより、全く逆の作用を発揮しうることには大変興味深い。これらの知見は個々の PG 受容体欠損マウスを用いた病態モデル動物の解析により初めて明らかとなったことであり、これら受容体に対する選択性の高い薬剤の開発が、ステロイドに代わる安全性の高い治療薬の開発に繋がるものと期待される。

文 献

- 1) Arshad SH, Holgate S. The role of IgE in allergen-induced inflammation and the potential for intervention with a humanized monoclonal anti-IgE antibody. *Clin. Exp. Allergy*. **31**: 1344-1351, 2001.
- 2) Ushikubi F, Hirata M, Narumiya S. Molecular biology of prostanoid receptors: an overview. *J. Lipid Mediat*. **12**: 343-359, 1995.
- 3) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties and functions. *Physiol Rev*. **79**: 1193-1226, 1999.
- 4) Murray JJ, et al. Release of prostaglandin D2 into human airways during acute antigen challenge. *N. Engl. J. Med*. **315**: 800-804, 1986.
- 5) Matsuoka T, et al. Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science*. **287**: 2013-2017, 2000.
- 6) Nagai H, Yamaguchi S, Maeda Y, Tanaka H. Role of mast cells, eosinophils and IL-5 in the development of airway hyperresponsiveness in sensitized mice. *Clin. Exp. Allergy*. **26**: 642-647, 1996.

- 7) Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**: 5-13, 1999.
- 8) Peebles RS, Dworski R, Collins RD. *et al.* Cyclooxygenase inhibition increases interleukin 5 and interleukin 13 production and airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**: 676-681, 2000.
- 9) Gavett SH, Madison SL, Chulada PC. *et al.* Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **104**: 721-732, 1999.
- 10) Gauvreau GM, Watson RM, O'Byrne PM. Protective effects of inhaled PGE2 on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**: 31-36, 1999.
- 11) Martin JG. *et al.* The immunomodulatory actions of prostaglandin E2 on allergic airway responses in the rat. *J. Immunol.* **169**: 3963-3969, 2002.
- 12) Ushikubi F. *et al.* Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* **395**: 281-284, 1998.
- 13) Hizaki H. *et al.* Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10501-10506, 1999.
- 14) Segi, E. *et al.* Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**: 7-12, 1998.
- 15) Christodoulouopoulos P, Cameron L, Durham S, Hamid Q. Molecular pathology of allergic disease II: Upper airway disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**: 211-223, 2000.
- 16) Irkec M, Bozkurt B. Epithelial cells in ocular allergy. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**: 352-357, 2003.
- 17) Takahashi Y. *et al.* Augmentation of allergic inflammation in prostanoid IP receptor deficient mice. *Br. J. Pharmacol.* **137**: 315-322, 2002.