

肥満細胞からの炎症メディエーター 放出抑制物質探索に関する基礎的研究

高野 克彦*

Substances that inhibit the release of mast cell-derived inflammatory mediator

Katsuhiko Takano *

Received November 2, 2009

Abstract

In order to explore the anti-allergic / inflammatory agent(s), in the present study, inhibitory effect of 20 chemical compounds on β -hexosaminidase release from rat basophilic leukemia cell line, RBL-2H3 cell stimulated with calcium ionophore, A23187, was investigated. As a result, some of tested compounds showed inhibitory effect on the release of β -hexosaminidase from RBL-2H3 cells. Some of two types compounds of three depending on the chemical structure were effective. These results are nothing more than the fact that these compounds showed an inhibitory effect to one index. In future, further investigation on these compounds, therefore, should be required in detail.

緒言

炎症反応，アレルギー反応は元来，起炎物質や抗原・アレルゲンに対する生体の防御反応でありながら，その過剰な反応が結果として生体に害を及ぼしている。従って，これらの治療を考える際に，起炎物質・アレルゲンと対峙するために残すべき因子と，生体に害を及ぼさないために抑制・阻害すべき因子との線引きが必要となる。このためにも，一連の反応に関与する因子の全容の解明が急務である。

アレルギーに関するメディエーターといえば，ヒスタミンは欠かせないが，ヒスタミン作用の阻害などを目指して，古典的（第一世代）抗ヒスタミン薬（塩酸ジフェンヒドラミンなど），抗アレルギー薬の中でも，フマル酸ケトチフェンに代表される第二世代抗ヒスタミン薬（ヒス

* 薬学部
Faculty of Pharmaceutical Sciences

タミンH1拮抗薬), メディエーター遊離抑制薬 (クロモグリク酸ナトリウム) といった薬剤が現在, 臨床で治療に用いられている。

ヒスタミン同様に, 肥満細胞などからの脱顆粒の指標として測定されるのが, β -ヘキソサミニダーゼである^{1,2)}。 β -ヘキソサミニダーゼのようなリソソーム酵素が先天的に欠損する疾患は, リソソーム病と呼ばれる。近年, リソソーム病の一種であるムコ多糖症II型治療薬 (イデュルスルファーゼ) がスピード承認されたのは, 記憶に新しいところである。 β -ヘキソサミニダーゼが欠損する場合には, G_{M2} ガングリオシドが蓄積するTay-Sachs病, ならびにSandhoff病が知られている。しかしながら, ここではあくまでも脱顆粒の指標として, β -ヘキソサミニダーゼを捉えている。つまり, β -ヘキソサミニダーゼは, ヒスタミンと同様に抗原刺激などにより早期に脱顆粒され, その放出はヒスタミンとパラレルであると考えられている。このため, 抗アレルギー薬の探索の指標として, ヒスタミンとならび, β -ヘキソサミニダーゼが用いられているのである。同様の発想に基づき, β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制能を持つ物質の探索は既に行われており, 「 β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制剤及びそれを含有する抗炎症用食品」として, 特許も取られている³⁾。

富山工業高等専門学校物質工学科の後藤道理教授は, 化学合成の観点から, 抗炎症・抗アレルギー性物質の探索・合成を行っている^{4,5)}。本研究では, その一部, 20種の化合物を供与いただき検討を行った。これらは, 大きく3系統, His系, Tx系, Ros系に分類され, それぞれ14種, 4種, 2種である (Unpublishedな化合物のため, 詳細は省略)。また以下, 系統名と通し番号にて各化合物を呼称する。

アレルギーの治療は, アレルギー自体の成立のメカニズムからして完治は難しいのも事実であるが, 現在治療に用いられている薬物だけでは不十分なのも事実である。このことは, 俗に言うさらに切れ味のよい薬物が開発されるか, 作用点の異なる薬物が開発されるべきことを意味するものと考ええる。

本研究では, こうした新規の薬物の探索を目的として, 供与いただいた20種類の化合物群について, RBL-2H3細胞からの β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制能を検討した。これらのうちのいくつかについて, β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制能が認められたため, 報告する。

実験材料と方法

1. 実験材料及び試薬

以下の実験材料を用いて本研究を行った。なお, 購入先については特に記載していないものについては, すべて和光純薬工業のものを用いた。

1) 10% FCS/ EMEM (Eagle's minimum essential medium)

日水製薬より購入したイーグルMEM培地「ニッスイ」① (05900; Lot 572707) 4.7gを超純水に溶解し, 全量を500mlとした後, 121℃で20分間高圧蒸気滅菌した。室温まで冷やした培地に, 別に高圧蒸気滅菌しておいた10% NaHCO_3 溶液13mlを加えた。さらに別途濾過滅菌しておいたL-glutamine 0.292g (074-00522; Lot DSR3105), 牛胎児血清50ml (Biowest; S1820;

Lot S05391S1820) を加え使用した。

2) DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)

和光純薬より購入したD-MEM (低グルコース; 041-29775; Lot WDM7051, WDM7081, WDM7091) に, Penicillin G potassium (終濃度100 units/ml; 023-07731; Lot DPE3331), Streptomycin sulfate (終濃度100 μ g/ml; 196-08511; Lot DPK6762) を加えて使用した。

3) HEPES-Tyrode's-BSA buffer

NaCl 4.09 g (140 mM; 191-01665; Lot 8058), KCl 0.10 g (2.7 mM; 163-03545; Lot WKH5522), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.13 g (1.8 mM; 031-00435; Lot WKM6786), glucose 0.51 g (5.6 mM; 041-00595; Lot TLF4729), NaHCO_3 0.51 g (12 mM; 191-01305; Lot SKK3493), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g (0.37 mM; 192-02815; Lot CAR2854), HEPES 2.98 g (25 mM; 346-01373; Lot DN126), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g (0.49 mM; 135-00165; Lot LEE2725), bovine serum albumin 0.5 g (0.1%; Sigma-Aldrich; A7030; Lot 016K0739) を超純水に溶解し, 全量を500 mlとした。

4) 0.4 M citrate-0.2 M sodium phosphate (pH 4.5) : 基質溶解溶液

5) 0.2 M glycine-NaOH (pH 10.7) : 反応停止液

6) A23187

CALBIOCHEMより購入したA23187, Free Acid (100105; Lot B74555) を使用した。100 mMとなるようDMSOに溶解し, 4 $^{\circ}\text{C}$ で保管した。

7) 基質 (4-Nitrophenyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide)

4-Nitrophenyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide (N9376; Lot 105K5000) は, Sigma-Aldrichより購入した。用時, 0.4 M citrate-0.2 M sodium phosphate (pH 4.5) に2 mMとなるよう溶解し, 使用した。

8) 被験化合物

富山工業高等専門学校の後藤教授より供与いただいた化合物は, いずれもその一部を秤量し, 100 mMとなるようDMSOで溶解し4 $^{\circ}\text{C}$ で保管した。用時, 融解後使用した。ただし, His-13, -14については, DMSO溶液 (原液) の濃度を30 mMとした。

2. 実験方法

1) RBL-2H3細胞の培養

液体窒素, または-80 $^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに凍結保存されているRBL-2H3細胞を約37 $^{\circ}\text{C}$ で急速融解し, あらかじめDMEMを入れた遠沈管に移して, 400 \times g, 5分間, 4 $^{\circ}\text{C}$ で遠心した。遠心後, 上清を捨て, 新しい10% FCS/EMEMで細胞を懸濁し, 調製した細胞懸濁液を10 cm culture

dishで湿度100%, 5% CO₂/95% Air気相下, 37 °Cで培養した。

3～4日に1回, 培養液を交換し, 細胞がconfluenceの70～80%に達した時点で継代した。継代は0.25% Trypsin/ 0.01% EDTA/ PBSで細胞をシャーレからはがし, 400×g, 5分間, 4 °Cで遠心した。遠心後, 上清を捨て, 新しい10% FCS/EMEMで細胞を懸濁し, 5×10⁴ cells/mlまたは適当な濃度となるよう調製した細胞懸濁液を10 cm culture dishで湿度100%, 5% CO₂/95% Air気相下, 37 °Cで培養した。

2) A23187刺激によるβ-ヘキソサミニダーゼ放出に対する被験物質の抑制能の検討

継代時に5×10⁵ cells/mlとなるよう10% FCS/ EMEMで細胞を調製し, 200 μl/wellずつ, 96穴マイクロプレートにて一晚培養した。翌日, ウェルをDMEM 200 μlで洗浄後, DMEM 200 μlを加え, 湿度100%, 5% CO₂/95% Air気相下, 37 °Cで培養した。4時間後, DMEMを除去し, 30 μM A23187存在下, 所定の濃度の被験物質を含むHEPES-Tyrode's BSA buffer 100 μlを加え, 37 °Cで30分間インキュベーションした。インキュベーション後, 96穴マイクロプレートを氷上に5分間置き, 反応を停止させた後, 400×g, 5分間, 4 °Cで遠心した。上清40 μlを回収し, 別の96穴マイクロプレートに移し, 基質溶液100 μlを加え, 37 °Cで30分間インキュベーションした。インキュベーション後, 反応停止液を200 μl加え反応を停止させた後, マイクロプレートリーダーにて, 405 nmにおける吸光度を測定した。

なお, 細胞に試料を添加する際, 溶液中のDMSO濃度が0.1%以下となるように調製した。また, A23187と被験物質が共存しない実験条件においては, 被験物質をDMEMに所定の濃度となるよう溶解した。

細胞毒性確認のため, 試料添加の前後に顕微鏡下, 細胞数, 形態の確認を行い, その変化を観察した。

3) 統計処理

データは, 平均±SEMで表した(データ数は原則5)。Studentのt検定を行い, p値が0.05以下の場合に統計的有意であると判断した。

実験結果

1. His系化合物のβ-ヘキソサミニダーゼ遊離抑制能

His系化合物14種類について, β-ヘキソサミニダーゼ遊離抑制能を検討した。このうち, A23187をHis-13あるいはHis-14と同時に添加した場合に, いずれも濃度依存的なβ-ヘキソサミニダーゼ遊離の抑制傾向が認められた (Fig. 1)。しかし, 遊離の抑制は最大濃度においても35～40%程度であった。またこの条件では, 顕微鏡観察下, 細胞の形態の変化, および細胞数の減少は認められなかった。

データには示していないが, このほかのHis系化合物のうちいくつかの化合物でも, 100 μMの濃度において見かけの遊離量の減少が認められたが, いずれも同濃度において細胞毒性が認められ, β-ヘキソサミニダーゼ遊離抑制と認められなかった。

2. Tx系化合物の β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制能

Tx-1あるいはTx-2で4時間細胞を前処理しておき、これらを取り除かずにA23187で刺激を行った。その結果、Tx-2では10 μ M以上の濃度で有意な β -ヘキソサミニダーゼ遊離の抑制が認められた (Fig. 2)。Tx-1については、100 μ Mで有意な抑制が認められた。またこの条件では、顕微鏡観察下、いずれも100 μ Mでやや細胞の形態の変化、および細胞数の減少が認められた。

Tx-1あるいはTx-2をA23187と同時に添加した場合、30分前ないしは4時間前から前処理しこれらを取り除いた上で刺激した場合、のいずれにおいてもTx-2は100 μ Mで有意な抑制を示した (data not shown)。しかし、いずれの場合においても、顕微鏡観察をした場合に、その大小はともかく細胞毒性を示していると思われる観察結果であった。

A23187をTx-3あるいはTx-4と同時に添加した場合に、Tx-4については100 μ Mで有意な抑制が認められた (Fig. 3)。これに対し、Tx-3の抑制能は認められず、またこの条件では、顕微鏡観察下、細胞の形態の変化、および細胞数の減少は認められなかった。

考 察

本研究で使用したRBL-2H3細胞は、ラット由来の細胞としては、特にヒスタミンの遊離、あるいはその抑制などのアッセイによく利用される細胞である¹⁾。こうした中で、本研究では、測定の簡便化の目的で、刺激物質としてカルシウムイオノフォアであるA23187を、また β -ヘキソサミニダーゼを脱顆粒の指標として用いた。富山工業高等専門学校物質工学科の後藤道理教授は、化学合成の観点から、抗炎症・抗アレルギー性物質の探索・合成を行っている^{4,5)}。本研究では、その一部、20種の化合物をご供与いただいて検討を行った。

これら化合物について、RBL-2H3細胞へのA23187刺激と同時に被験化合物を所定の濃度で添加し、その後の β -ヘキソサミニダーゼ遊離に与える影響を検討した。一部化合物についてはさらに、RBL-2H3細胞に対して、30分間ないしは4時間被験化合物を共存させておいた後、直ちにA23187を加える、あるいは一旦培地中の被験化合物を洗浄した後にA23187を加え、 β -ヘキソサミニダーゼの遊離量を測定した。その結果、RBL-2H3細胞へのA23187との同時添加により、His系化合物ではHis-13, 14に、Tx系化合物ではTx-4に抑制効果が認められた (Figs. 1, 3)。このほかの化合物でも、100 μ Mの濃度において見かけの遊離量の減少が認められたが、いずれも同濃度において細胞毒性が認められ、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制と認められなかった。また、データには示していないが、Ros系化合物については、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制能は認められなかった。加えて、Fig. 1から3に示したものの他はデータには示していないが、20種類のいずれの化合物においても、被験化合物を単独でRBL-2H3細胞に加えても、 β -ヘキソサミニダーゼの遊離を促進する活性も認められなかった。

RBL-2H3細胞は、高親和性IgE受容体 (Fc ϵ RI) を有している。抗原 (アレルゲン) を介してIgEにより受容体が活性化された後には、脱顆粒に不可欠な細胞内へのCa²⁺イオンの流入が引き起こされる。この反応は、IgEによるFc ϵ RIの活性化のみならず、C3aやC5aなどのアナフィラトキシンによっても引き起こされる。著者らがかつて活性化補体フラグメントC3 β cに対して研究を行ったのも、このことと無関係ではない⁶⁻⁸⁾。この細胞内へのCa²⁺イオンの流入を

直接引き起こすのがA23187である。事例としては全く異なるが、受容体の活性化により細胞内へのCa²⁺イオンの流入が引き起こされ、かつ細胞の運動が引き起こされるが、両者は細胞内のシグナル伝達としては全く別物である、という事例がある⁹⁾。それ故、本研究において、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制を引き起こしたことで、Fc ϵ RIを介した場合に β -ヘキソサミニダーゼ遊離の抑制が起こるかどうかは全く別の事象であると認識しておくべきである。従って今後まず、本研究において抑制のみられた化合物についてFc ϵ RIを介しての β -ヘキソサミニダーゼ遊離とその抑制について検討しなければならない。さらには、抗炎症・抗アレルギーという多くの指標に対して有効性が確認される必要がある。

本研究においては、Tx-1, 2など一部の化合物に対してのみ、A23187刺激の前に被験物質による前処理を行っている。4時間の被験物質による前処理後、被験物質を取り除いた上でA23187処理をすると、Tx-2 100 μ Mにおいてのみ抑制効果が認められた (data not shown)。かつ、このときには明確な細胞数の減少が認められている。一方、同様の前処理後に被験物質を取り除かずにA23187刺激を行った場合には、Tx-2については10 μ Mより有意な抑制が認められた (Fig. 2)。この場合の細胞数の減少は前者の条件下で観察された減少ほどではない。Fig. 1などの場合と同じくTx-2をA23187と同時添加した場合にはやはり100 μ Mにおいてのみ抑制効果が認められた (data not shown)。このことは、Tx-2については、A23187刺激の時点でのTx-2と細胞との接触時間ならびに濃度が β -ヘキソサミニダーゼ遊離の抑制に影響しており、かつTx-2を取り除くことで抑制が認められなくなったことからTx-2は細胞表面に止まって抑制を示している可能性が推測される。しかし、細胞毒性についてはこの推測は成り立たない。本研究においては、細胞毒性に関しては検鏡下での観察に止まっている。本来であれば、色素排除法¹⁰⁾やその他適切な方法にて、生細胞数(率)を数値化すべきところであり、細胞種にもよると考えられるが、これら化合物のRBL-2H3細胞に対する毒性は明らかにしておく必要がある。また、本研究の結果からは、Tx-2が細胞表面に止まって抑制を示している可能

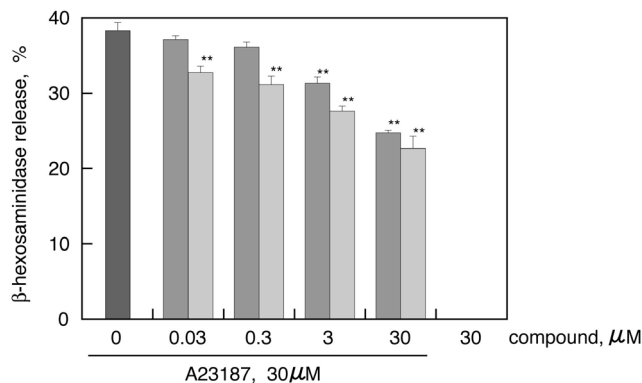


Fig. 1. Inhibitory effect of His-13, 14 on β -hexosaminidase release from A23187-stimulated RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were stimulated with A23187 in the presence of various concentration of His-13 (■) or His-14 (□) at 37°C for 30 min. Media were collected, then, β -hexosaminidase activities were measured. Data are expressed as means \pm SEM of 5 determinations. Significant difference from the control: **, $p < 0.01$.

性を推測することしかできないが、今後こうした抑制のメカニズムを明らかにする必要がある。

本研究の結果から、いくつかの化合物については、抗アレルギー・抗炎症活性を有する可能性が示唆された。しかし、細胞毒性の有無、また他の指標についても抑制しうるか、などの検討が不十分であり、今後詳細な検討がなされることが期待される。

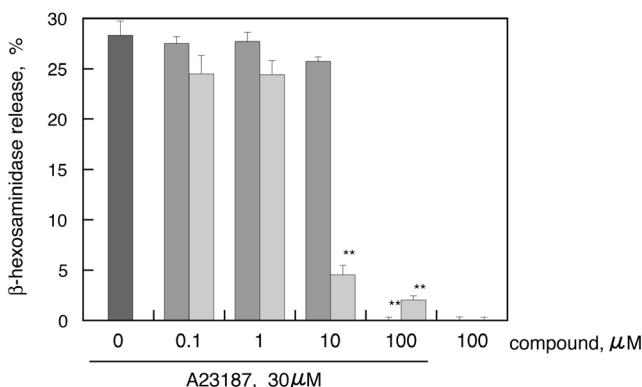


Fig. 2. Inhibitory effect of Tx-1, 2 on β -hexosaminidase release from A23187-stimulated RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were pre-treated with various concentration of Tx-1 (■) or Tx-2 (□) for 4 hr, thereafter, stimulated with A23187 at 37°C for 30 min. Media were collected, and then, β -hexosaminidase activities were measured. Data are expressed as means \pm SEM of 5 determinations. Significant difference from the control; **, $p < 0.01$.

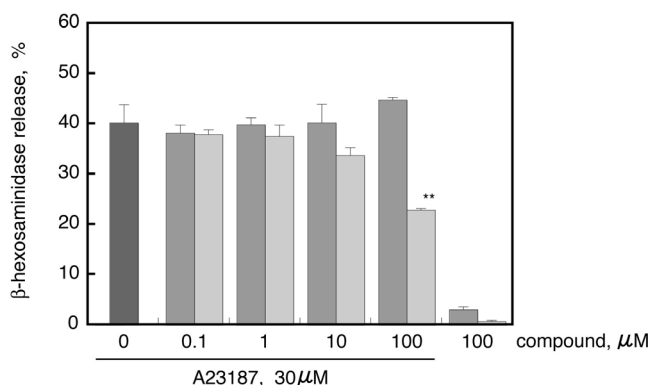


Fig. 3. Effect of Tx-3, 4 on β -hexosaminidase release from A23187-stimulated RBL-2H3 cells. RBL-2H3 cells were stimulated with A23187 in the presence of various concentration of Tx-3 (■) or Tx-4 (□) at 37°C for 30 min. Media were collected, then, β -hexosaminidase activities were measured. Data are expressed as means \pm SEM of 5 determinations. Significant difference from the control; **, $p < 0.01$.

謝 辞

本研究実施にあたり、研究助成金（平成19年度、ならびに20年度北陸大学学内助成）を提供していただいた北陸大学に深謝いたします。

本研究を進めていく上で、多大なるご協力を頂き、また機器類を快くお貸しいただきました本学の各研究室の先生方に深い感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) Pierini L, Harris NT, Holowka D, Baird B. *Biochemistry*, 36, 7447-7756 (1997) .
- 2) Han EH, Park JH, Kim JY, Chung YC, Jeong HG. *Food Chem. Toxicol.*, 47, 1069-1075 (2009) .
- 3) <http://www.j-tokkyo.com/2000/A23L/JP2000-236848.shtml>
- 4) Kawasaki M, Asano Y, Katayama K, Inoue A, Hiraoka C, Kakuda H, Tanaka A, Goto M, Toyooka N, Kometani T. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 54, 93-102 (2008) .
- 5) Goto M, Kataoka H, Araya Y, Kawasaki M, Oyama K, Semma M, Ito Y, Ichikawa A, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 30, 781-782 (2009) .
- 6) Nakagawa H and Komorita N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194, 1181-1187 (1993) .
- 7) Nakagawa H, Sunada Y, Ando Y. *Immunology*, 94, 253-257 (1998) .
- 8) 高野克彦, 活性化補体フラグメントを標的とした抗アレルギー・抗炎症治療に関する基礎的研究, 北陸大学紀要第32号, 13-24 (2008) .
- 9) Shibata F, Konishi K, Nakagawa H. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 1217-1219 (2002) .
- 10) Takano K, Nakaima K, Nitta M, Shibata F, Nakagawa H. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4571-4576 (2004) .