

プロスタグランジンD2受容体を標的とした 皮膚アレルギー炎症治療法開発

東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野

佐藤 貴浩

Biological activities of prostaglandin D2 (PGD2) are thought to be mediated by the classical DP receptor and CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells). In the present study, to examine the role of PGD2-CRTH2 interaction in development of allergic inflammation, we generated mice that contain a targeted disruption of the CRTH2 gene. We used these mice to characterize chronic cutaneous inflammatory processes, including IgE-mediated very-late-phase responses and chronic contact hypersensitivity induced by repeated hapten application. The present findings indicate that IgE-mediated cutaneous responses are dependent on PGD2. Ear swelling responses were suppressed by administration of HQL-79, which is a PGD synthase inhibitor. CRTH2-deficient mice failed to develop IgE-induced very-late-phase cutaneous responses, which are histologically characterized by a decrease in infiltrative lymphocytes, eosinophils and basophils, associated with inhibited production of MDC and RANTES. However, local production of IL-4 and IFN γ was not affected by lack of CRTH2. In chronic contact hypersensitivity models, CRTH2 deficiency also resulted in diminished skin responses and serum IgE production. These findings indicate that PGD2 signaling via the CRTH2 receptor plays important roles in IgE-mediated cutaneous responses and chronic contact hypersensitivity reactions. CRTH2 may represent a novel therapeutic target for the treatment of chronic allergic skin inflammation, such as atopic dermatitis.

1. 緒言

PGD2は主に肥満細胞から分泌され、血管拡張作用や気管支収縮作用などの生理活性をもつ物質として知られる。またかねてより炎症反応においても何らかの役割を果たす可能性のあることが示唆されてきていた。最近になりPGD合成酵素を恒常的に発現するマウスにおいて気管支喘息反応の増強や好酸球浸潤など、いわゆるTh2型反応の亢進のみられることがわかり¹⁾、アレルギー性炎症におけるPGD2の役割があらためて大きな注目を集めるようになってきている。

PGD2の受容体として古くからDP受容体が知られている。そしてDP受容体の欠損マウスでは気管支喘息反応が弱まるとされる²⁾。一方最近になってもう一つ受容体としてCRTH2 (chemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells) が知られるようになった。これは当初、Th2細胞に特異的に発現される分子としてクローニングされたものであるが、その後、好酸球や好塩基球などの表面にも発現していることがわかり、さらにPGD2の受容体として機能し、細胞の遊走や活性化に関わることが明らかにされた³⁾。今回の研究は、PGD2またはそれらの受容体の慢性アレルギー性皮膚反応における

役割を解析し、これらを標的とした治療法を開発、検討することを主な目的としている。

アレルギー性皮膚炎として知られる代表的な皮膚疾患はアトピー性皮膚炎である。そこで今回はマウスモデルとしてIgE依存性皮膚反応とハプテン繰り返し塗布による慢性接触過敏反応を選び検討を加えた。

2. 実験

2. 1 CRTH2欠損マウスの作成

CRTH2欠損マウスは図1に示す方法で作成した。その後BALB/cマウスと10代以上交配して用いた。

2. 2 IgE依存性皮膚反応の誘導

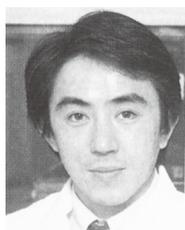
マウス耳介皮下に抗dinitrophenyl (DNP) 特異IgE抗体を投与 (1.25 μ g)。その翌日に0.5%のジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を塗布 (20 μ l/耳介) して、その後経時的に耳介腫脹を測定した。

2. 3 慢性接触過敏反応の誘導

マウス剃毛腹部に5%トリニトロクロロベンゼン (TNCB) を塗布して感作した。そして5日後に1% TNCBを耳介に塗布して惹起を行った。その後惹起を2日ごとに繰り返し25日目までおこなった。

2. 4 浸潤細胞数の測定

耳介皮膚の浸潤細胞は組織切片をギムザ染色し、光学顕微鏡下においてカウントした。また好塩基球の測定は皮膚組織をcollagenase IIIで処理後、浸潤細胞を回収。FITC標識抗Fc ϵ R1抗体、R-PE標識抗c-kit抗体、PE-Cy5.5標



Therapeutic approach for allergic skin diseases via blocking prostaglandin D2 receptors

Takahiro Satoh

Department of Dermatology Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

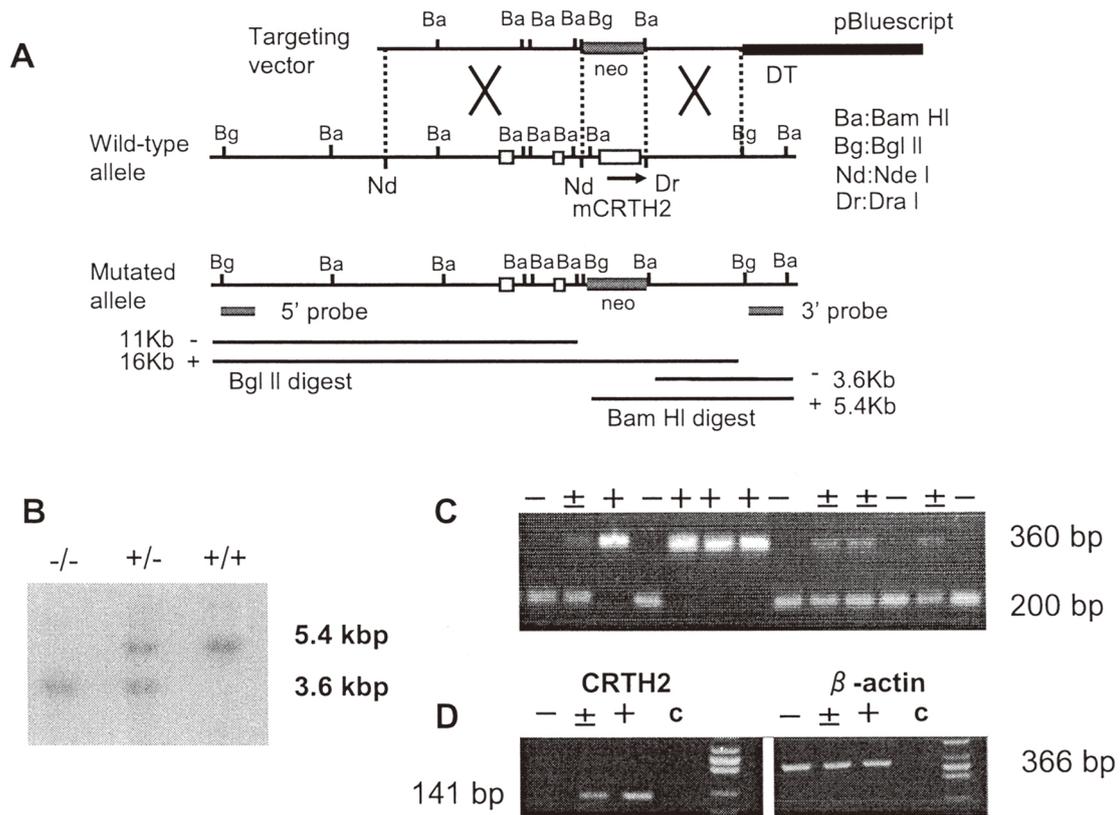


図 1

識抗 Gr-1 抗体にて染色してフローサイトメトリーにて観察。FcεRI (+), c-kit (-), Gr-1 (-) 細胞を好塩基球としてカウントした。

2. 5 サイトカイン・ケモカインの測定

耳介皮膚を 0.1% Tween 20 含有 PBS を用いて粉碎しホモゲネートを作成。15,000g で 10 分遠心後に上清を回収。それぞれにおけるサイトカイン・ケモカインを ELISA 法にて測定した。

3 結果

3. 1 CRTH2 欠損マウスにおける IgE 依存性皮膚反応

まず、CRTH2 の *in vivo* における役割を IgE 依存性皮膚反応を用いて検討した。その結果、皮膚反応の顕著な減弱が確認された (図 2 A,B)。また浸潤細胞の変化を検討したところリンパ球、好中球、好酸球、肥満細胞のいずれもが CRTH2 の欠損により減少した (図 2 C)。さらに興味深いことに IgE 依存性の第 III 相反応の成立に必須とされる好塩基球⁴⁾ の浸潤も減少していた (図 2 D)。

次に局所におけるサイトカイン・ケモカインの産生量を測定した。その結果、CRTH2 欠損マウスにおいては MDC, RANTES, TARC の産生が少ないことがわかった。

その一方、IL-4, IFN- γ , eotaxin は CRTH2 欠損の影響を受けなかった (図 3)。

3. 2 血球型 PGD 合成酵素 (H-PGDS) 抑制薬の効果

CRTH2 欠損において IgE 依存性皮膚反応が減弱していたことから、PGD2 の合成にかかわる酵素 (H-PGDS) の抑制薬 (HQL-79) がこの反応に対して治療効果をもたらすか否かを検討した。その結果 IgE 依存性皮膚反応は HQL-79 の経口投与により著明に抑制された (図 4 A)。

3. 3 CRTH2 拮抗薬の効果の検討

PGDS 抑制薬の効果が CRTH2 受容体を介したものであることを確認するため、CRTH2 拮抗薬であるラマトロバンの投与効果を観察した。その結果、IgE 依存性皮膚反応は CRTH2 欠損マウスにおいてみられたように減弱していた (図 4 B)。

3. 4 CRTH2 欠損マウスにおける慢性接触過敏反応

アトピー性皮膚炎にみられる慢性皮膚反応のもう一つのモデルである慢性接触過敏反応の変化を CRTH2 欠損マウスを用いて観察した。慢性接触過敏反応は 5% TNCB にて感作後、1% TNCB による惹起を隔日で繰り返すことに

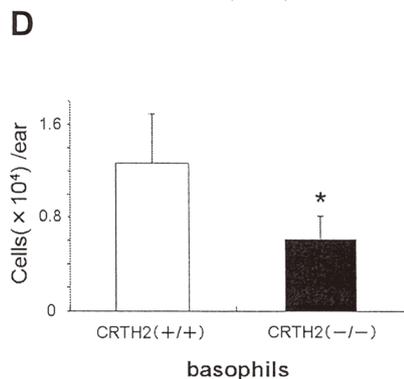
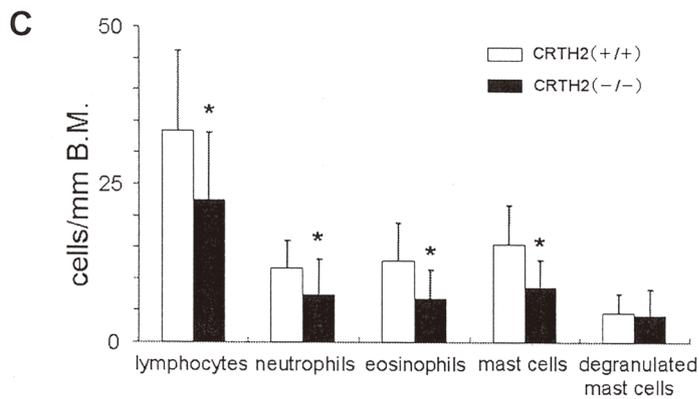
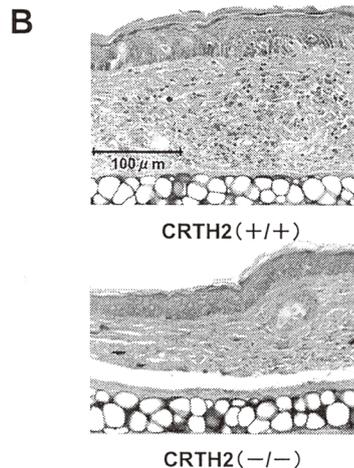
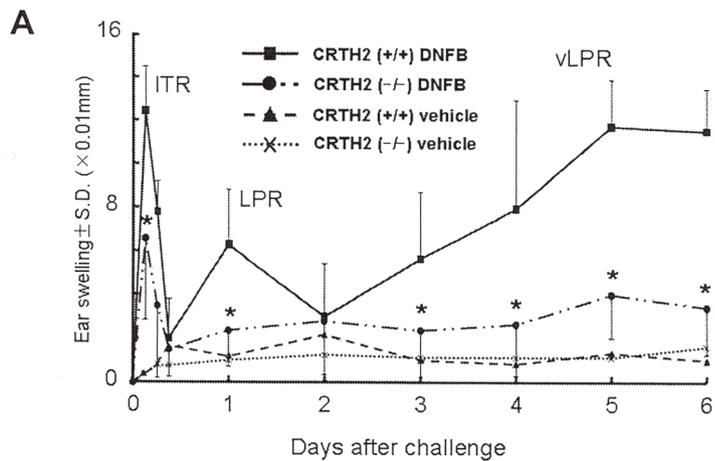


図 2

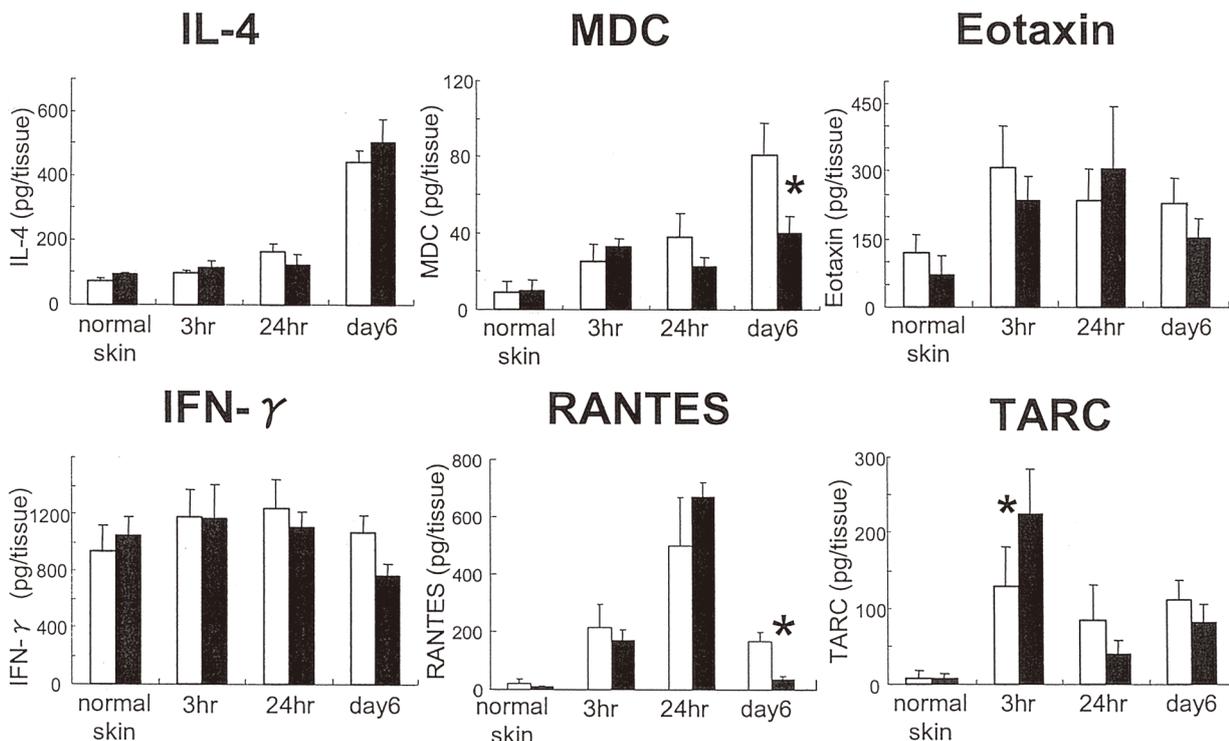


図 3

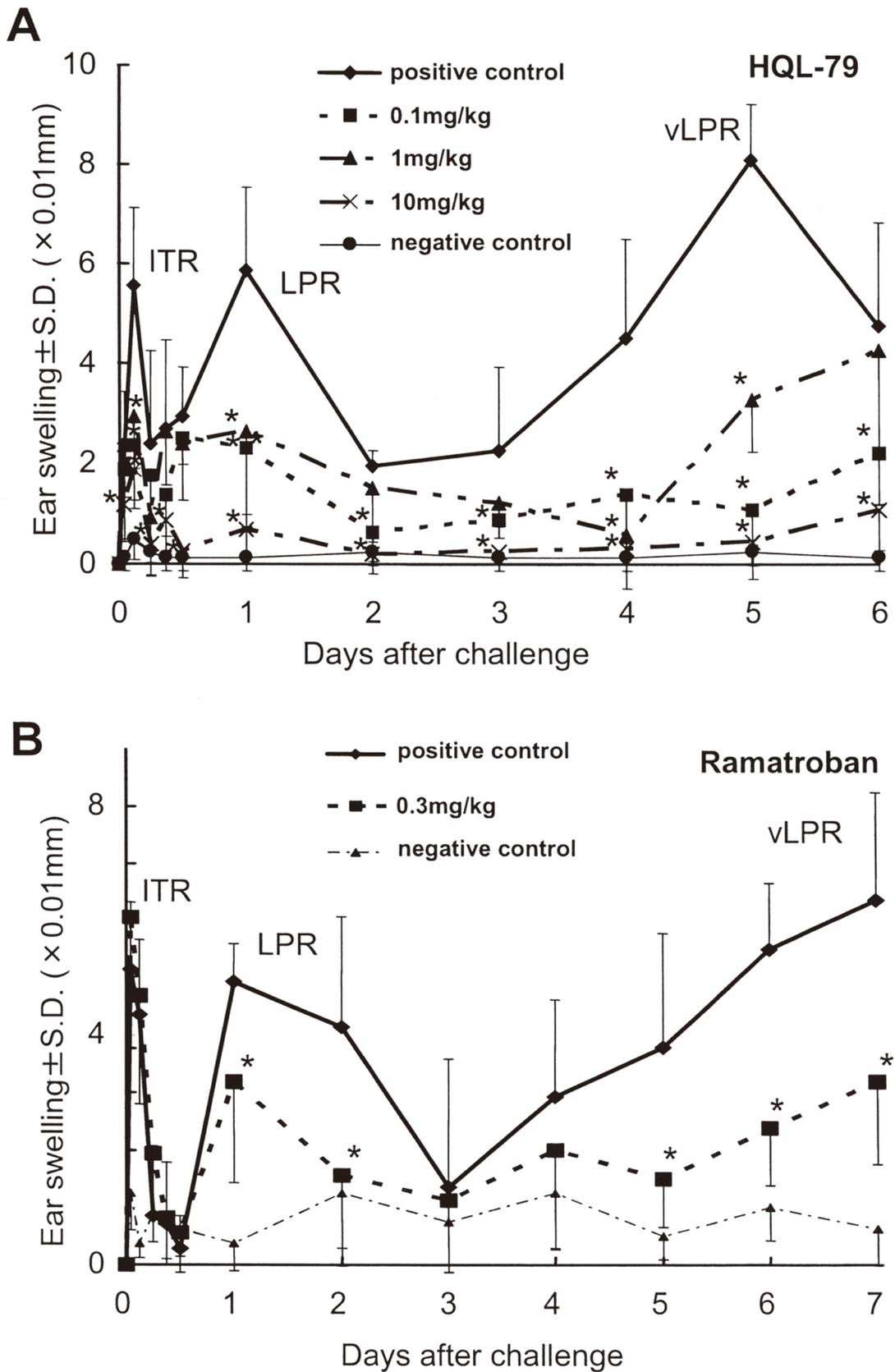


図4

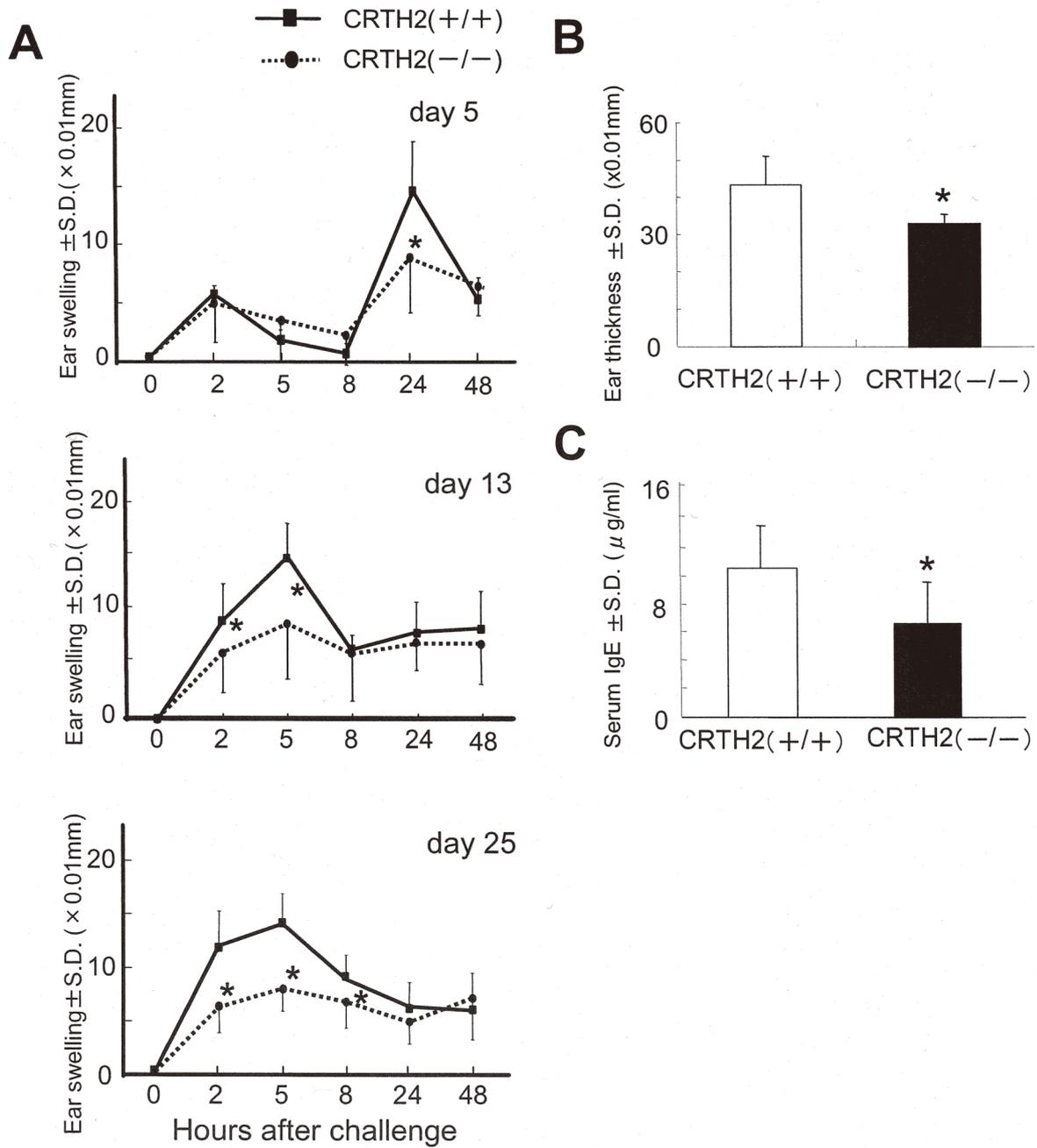


図 5

より誘導した。図5 Aにみるように皮膚反応は5日目では24時間後にピークがみられるが、惹起を繰り返すごとに早まり25日目には2から5時間目にピークをむかえるようになる。CRTH2欠損マウスでは反応ピークの移動はみられるものの、その強さは惹起を繰り返すごとに wild type マウスに比して減弱しその差が明瞭になっていくことがわかった。さらに27日目での耳介皮膚全体の厚さも wild type マウスより薄く(図5 B)、また血清IgEの産生も少なかった(図5 C)。

4 考 察

今回の研究においてPGD2受容体の一つであるCRTH2がIgE依存性皮膚反応の成立において重要であることがCRTH2欠損マウスを用いた実験によって初めて明らかとなった。さらにH-PGDS抑制薬であるHQL-79やCRTH2拮抗薬のラマトロバンが治療効果をもたらすことも見出された。CRTH2の重要性は慢性接触過敏反応においても確認された。以上のことからPGD2またはCRTH2受容体を標的とした治療法はアトピー性皮膚炎を含めて一部のアレルギー性皮膚疾患において有用である可能性があると思われる。

IgE依存性皮膚反応の抑制機序についてはまだ十分には解明できていないが、おそらくCRTH2を介したPGD2に対する炎症細胞の遊走が抑制されたためと推測される。またIgE依存性第III相反応に必須とされる好塩基球の浸潤が抑制されたために、その後に生じる種々の炎症カスケードが影響を受けたためとも考えられる。

CRTH2はヒトのリンパ球においてはTh2細胞に発現されているが、CRTH2欠損マウスでの局所サイトカインプロファイルは必ずしもTh1, Th2のいずれへの偏りもみられなかった(図3)。これはマウスにおいてはCRTH2が

Th1細胞にも発現されていることに起因すると考えられる⁵⁾。

今回はCRTH2受容体を中心に慢性皮膚アレルギー性反応における役割を解析してきた。今後、もう一つの受容体DPについても同様の解析を行い、さらに他のハプテンに対する反応を含めて種々の皮膚炎症反応にけるCRTH2, DP, PGD2の重要性を検討したい。そして疾患ごとの治療の標的と治療の選択につき検討を進めたい。

(引用文献)

- 1) Fujitani Y, Kanaoka Y, Aritake K, et al.: Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J. Immunol.*, 168, 443-449, 2002.
- 2) Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, et al.: Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science*. 287, 2013-2017, 2000.
- 3) Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, et al.: Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper 2 type cells, eosinophils and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J. Exp. Med.*, 193, 255-262, 2001.
- 4) Mukai K, Matsuoka K, Taya C, et al.: Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity*, 23, 191-202, 2005.
- 5) Abe H, Takeshita T, Nagata K. et al.: Molecular cloning, chromosome mapping and characterization of the mouse CRTH2 gene, a putative member of the leukocyte chemoattractant receptor family. *Gene*, 227, 71-77, 1999.