

博 士 論 文

マスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とした
化合物による抗アレルギー機構の解明

浅 井 遥

令和六年提出

目次

略語	1
緒論	4
第一章 DDH を用いたヒスタミン定量法の最適化	
第一節 序説	7
第二節 DDH の合成と測定条件の検討	9
第三節 培養液中のヒスタミンのダンシル誘導体化法の検討	13
第四節 DDH を用いた BMMC から遊離するヒスタミンの定量	16
第五節 DDH を用いたヒスタミン定量法の精度の検討	21
第六節 小括	23
第二章 PerD のマスト細胞での標的タンパク質とメディエーター遊離への影響	
第一節 序説	24
第二節 PerD のメディエーター遊離への効果	25
第三節 PerD の細胞内情報伝達系への効果	37
第四節 PerD の標的タンパク質の検討	41
第五節 小括	47
第三章 KA のマスト細胞での標的タンパク質とメディエーター遊離への影響	
第一節 序説	49
第二節 KA のメディエーター遊離への効果	50
第三節 KA の細胞内情報伝達系への効果	59
第四節 KA の標的タンパク質の検討	64
第五節 KA の抗アレルギー作用の検討	70
第六節 小括	75
総括	77
参考文献	78
発表論文	91
謝辞	92

略語

Ab	antibody
AChE	acetylcholinesterase
Ag	antigen
Ala	alanine
AMP-PNP	adenylyl-imidodiphosphate
Asn	asparagine
Asp	aspartic acid
BMMC	bone marrow-derived mouse mast cell
CH ₂ Cl ₂	dichloromethane
CH ₃ CN	acetonitrile
CH ₃ OH	methanol
Cys	cysteiny
DDH	didansyl histamine
Dex	dexamethasone
DH	diphenhydramine hydrochloride
DNP	2,4-dinitrophenyl
DMSO	dimethyl sulfoxide
EI	electron ionization
Epn	epinastine
Erk	extracellular signal-regulated kinase
ESI	electrospray ionization
Et ₃ N	triethylamine
Et ₂ O	diethyl ether
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
FcεRI	high-affinity IgE receptor I

FD	fluorescence detection
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fyn	fibroblast Yes related novel
Gab2	GRB2 associated binding protein 2
Glu	glutamic acid
HR-EIMS	high-resolution electron ionization mass spectrometry
HRP	horseradish peroxidase
HSA	human serum albumin
IgE	immunoglobulin E
IL	interleukin
Ile	isoleucine
KA	kamebakaurin
LAT	linker activator for T-cells
Leu	leucine
LT	leukotriene
Lys	lysine
Met	methionine
MEK	MAPK/ERK kinase
MK	MK-886
NaOH	sodium hydrate
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
OPA	<i>ortho</i> -phthalaldehyde
ODS	octadecylsilyl
p38	p38 mitogen-activated protein kinases
PDB	Protein Data Bank
PerD	perrottetin D
PG	prostaglandin
PI	propidium iodide

PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
RP	ragweed pollen
Ser	serine
SFK	Src family kinase
Syk	spleen tyrosine kinase
TB	trypan blue
TNF	tumor necrosis factor
Thr	threonine
Val	valine

緒論

I型アレルギーの病態形成に重要な役割を果たすマスト細胞は immunoglobulin E (IgE) と抗原の結合によって起こる high-affinity IgE receptor I (FcεRI) の架橋をきっかけに活性化する (Burd *et al.* 1989)。

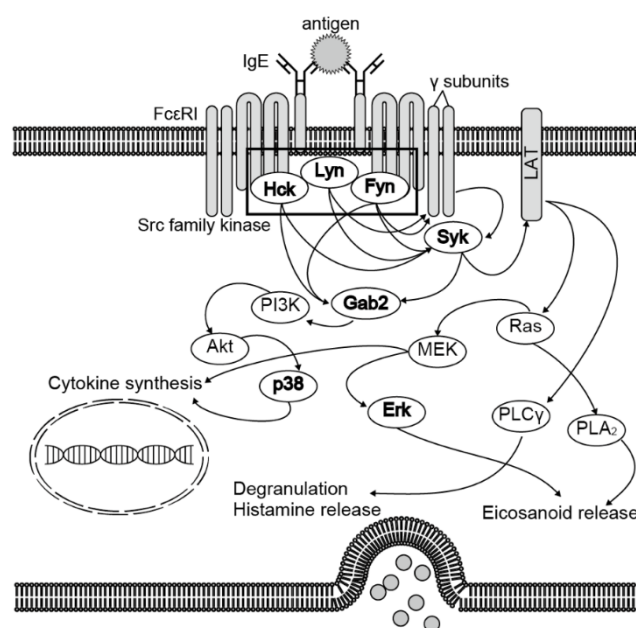


Figure 1 抗原抗体反応におけるマスト細胞内の情報伝達経路

FcεRI の架橋は fibroblast Yes related novel (Fyn) や Hck、Lyn などの src family kinase (SFK) を活性化し、続いて FcεRIγ 鎖や Syk をリン酸化する (Figure 1)。リン酸化された Syk はキナーゼ活性を発揮し、Linker Activator for T-Cells (LAT) のリン酸化を経由して、phosphoinositide phospholipase C (PLCγ) を活性化し、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を惹起する (Barker *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000)。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞内にあらかじめ生成されているヒスタミンや tumor necrosis factor (TNF) -α を貯蔵する顆粒の放出につながる (Caughey *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2014; Olszewski *et al.*, 2007; Schechter *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 2000)。また、リン酸化された Syk は LAT のリン酸化を経由して、Ras を活性化し、phospholipase A₂ や MAPK/ERK kinase (MEK)、extracellular signal-regulated kinase (Erk) のリン酸化を惹起する。これらのタンパク質の活性化やリン酸化は、ロイコトリエン (LT) B₄ や cysteinyl (Cys) -LTs の遊離につながる。(Nam *et al.*, 2017; Nunes

et al., 2016; Okabe *et al.*, 2006; Uozumi *et al.*, 1997)。さらに、SFK やリン酸化された Syk は GRB2 associated binding protein 2 (Gab2) のリン酸化を経由して、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) の活性化、Akt や p38 mitogen-activated protein kinases (p38) のリン酸化を惹起する。p38 のリン酸化はマスト細胞からの interleukin (IL) -4 の遊離につながる (Barbu *et al.*, 2010; Frossi *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2015)。

このような細胞内情報伝達系の活性化により遊離する種々のメディエーターは慢性的な瘙痒感や腫脹、鼻閉、呼吸困難など I 型アレルギー症状を引き起こす (Carion *et al.*, 2022; Ford-Hutchinson *et al.*, 1980; Fu *et al.*, 2018; Méndez-Enríquez *et al.*, 2019; Ryan, 1997; Samuelsson *et al.*, 1987; Simons, 2004; Thurmond *et al.*, 2008; Wills-Karp, 1999)。そのため、抗アレルギー薬は、ヒスタミンや LTs の受容体遮断薬、マスト細胞の膜安定化によるメディエーター遊離抑制薬、サイトカインやエイコサノイドの合成抑制薬を中心に開発されてきた。中でも、ヒスタミン H₁ 受容体遮断作用を持つ薬剤は I 型アレルギーの症状を強力に抑制することから、数多く開発されてきた。しかし、これらの薬剤は眠気や倦怠感などの副作用が依然として問題となっているだけでなく、効果が不十分な患者もいるため、新たな機序の抗アレルギー薬が求められている。

そこで近年では、IgE やサイトカイン、サイトカイン受容体を標的とするモノクローナル抗体製剤や、サイトカイン受容体の細胞内情報伝達を担う Janus kinase を標的とする低分子化合物が抗アレルギー薬として開発されてきている。主に、モノクローナル抗体製剤が開発されているが、この製剤は他の抗アレルギー薬と比べ高価であり、投与経路も皮下投与しかない。一方、細胞内情報伝達を担うタンパク質を標的とした薬剤は低分子化合物であり、モノクローナル抗体製剤と比べ、安価であるだけでなく、経口や塗布など豊富な投与経路をもっている。そこで本研究では、マスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とした抗アレルギー薬を開発すべく、候補となる低分子化合物を用いた解析を行うことにより、マスト細胞の細胞内情報伝達を担うタンパク質の中でアレルギー治療に有効な標的を見出した。

この研究を行うためには、抗原抗体反応によって活性化したマスト細胞からのヒスタミンの遊離に対する候補化合物の影響を検討する必要があり、マスト細胞として簡便に得られる培養マスト細胞の骨髓由来マスト細胞 (BMMC) を用いることとした。しかし、

一般的なヒスタミン定量法で BMMC s から遊離するヒスタミンを定量する場合、煩雑な前処理や高価な機器を必要とするだけでなく、感度が不十分となる場合がある。そこで、第一章では、煩雑な前処理のない、高感度なヒスタミン定量法を BMMC s から遊離するヒスタミンの定量に最適化した。

次に、第二章と第三章では、抗原抗体反応によって活性化したマスト細胞からのメディエーターの遊離に対する perrottetin D (PerD) および kamebakaurin (KA) の影響を検討し、抗アレルギー薬の標的となるタンパク質を同定した。これら 2 つの化合物の検討から、マスト細胞の細胞内情報伝達を担うタンパク質のうち、アレルギー治療に有効な標的を見出した。

第一章 DDH を用いたヒスタミン定量法の最適化

第一節 序説

生体内のヒスタミンの定量には、一般的に HPLC 法や ELISA 法が用いられる。その中で最も汎用されている方法は HPLC 法であるが、本法は、各種アミノ酸類を含む生体試料を HPLC で分離した後、*o*-phthalaldehyde (OPA) で蛍光標識し、ヒスタミンに由来するピークのみを検出する定量法である (Tagen *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013)。特にマスト細胞は、ヒスタミンと分離しにくいヒスチジンを多量に含んでおり、マスト細胞内のヒスタミンの定量にはヒスタミンを分離するための煩雑な前処理か、高価な陽イオン交換カラムやヒスタミン分離専用カラムを用いる必要がある。

また、本研究で用いる BMMCs は簡便かつ多量に培養できるマスト細胞であるが (Tagen *et al.*, 2009)、他の方法で得られるマスト細胞と比べてヒスタミン含有量が少ない (Table 1)。そのため、BMMCs から遊離するヒスタミンの正確な定量には高感度な定量法が求められる。しかし、OPA で蛍光標識したヒスタミン (OPA-ヒスタミン) は時間の経過とともに分解されやすいため、HPLC 法の感度が BMMCs から遊離するヒスタミンの定量において不十分となることもある。

Table 1 マスト細胞のヒスタミン含有量

実験で用いられているマスト細胞	各マスト細胞のヒスタミン量 (pg/cell)
mucosal mast cells	0.06 - 2
connective tissue mast cells	0.65 - 35
peritoneal cell-derived mast cells	8 - 10
fetal skin-derived cultured mast cells	5.7 - 7.7
bone marrow-derived mast cells	
IL-3 + stem cell factor	1.8 - 2.6
IL-3 + IL-4	0.5 - 1
IL-3	0.06 - 1

dansyl chloride は OPA と同じようにアミンを蛍光標識するが (Bolygo *et al.*, 2000)、dansyl chloride で蛍光標識したアミンは OPA で蛍光標識したアミンと比べ安定性が高い

ことが報告されている (Ertan *et al.*, 2004)。

そこで、第一章では、ダンシル誘導体化ヒスタミンを用いた定量法が BMMCs から遊離したヒスタミンを前処理なく高感度に定量できるかどうか検討した。

第二節 DDH の合成と測定条件の検討

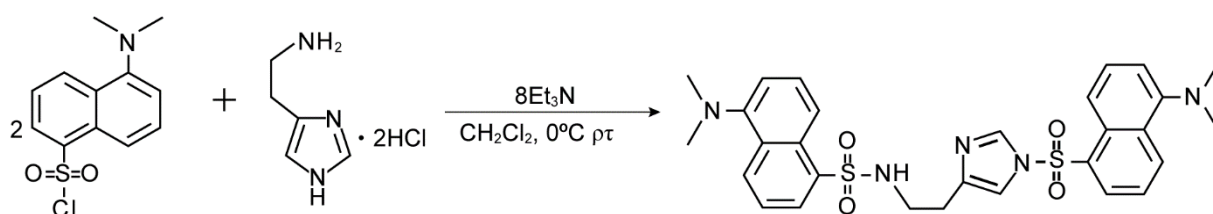
1 目的

ダンシル誘導体化ヒスタミンには、ヒスタミンに 2 つの dansyl 基が結合する didansyl histamine と、1 つの dansyl 基が結合する monodansyl histamine が存在する。一方、Bolygo ら (2000) や Warshawsky ら (1989) は、塩基性条件下でヒスタミンと dansyl chloride を反応させ、didansyl histamine を合成する方法を報告している。そこで、第一章 第二節では、ダンシル誘導体化ヒスタミンとして didansyl histamine を検出する条件の決定を目的とした。

2 実験方法

2-1 DDH の合成

N,N^{im}-didansylhistamine (DDH) は、Warshawsky ら (1989) の報告に基づいて、histamine dihydrochloride (Fujifilm-Wako, Osaka, Japan)、triethylamine (Et₃N) (Fujifilm-Wako)、dichloromethane (CH₂Cl₂) (Fujifilm-wako) の混合液に、dansyl chloride を加えて 0 °C で 1 時間反応させ合成した (Scheme 1)。



Scheme 1 報告されている *N,N*^{im}-didansylhistamine の合成法

合成した DDH の ¹H- (500 MHz) および ¹³C- (125 MHz) NMR スペクトルは JEOL ECA 500 spectrometer を用いて記録した。溶媒は deuterated chloroform (CDCl₃) を用いた。¹H-NMR スペクトルの化学シフトは、内部標準として tetramethylsilane (0.00 ppm) を用いた δ (ppm) スケールで解析した (Figure 2)。¹³C-NMR スペクトルの化学シフトは、溶媒の中心ピーク (77.16 ppm) からの ppm で解析した (Figure 3)。合成した DDH の electrospray ionization (ESI) -MS スペクトル (positive mode) は JEOL Accu TOF LC-plus (JMS-T100LP)

を用いて記録した (Figure 4)。

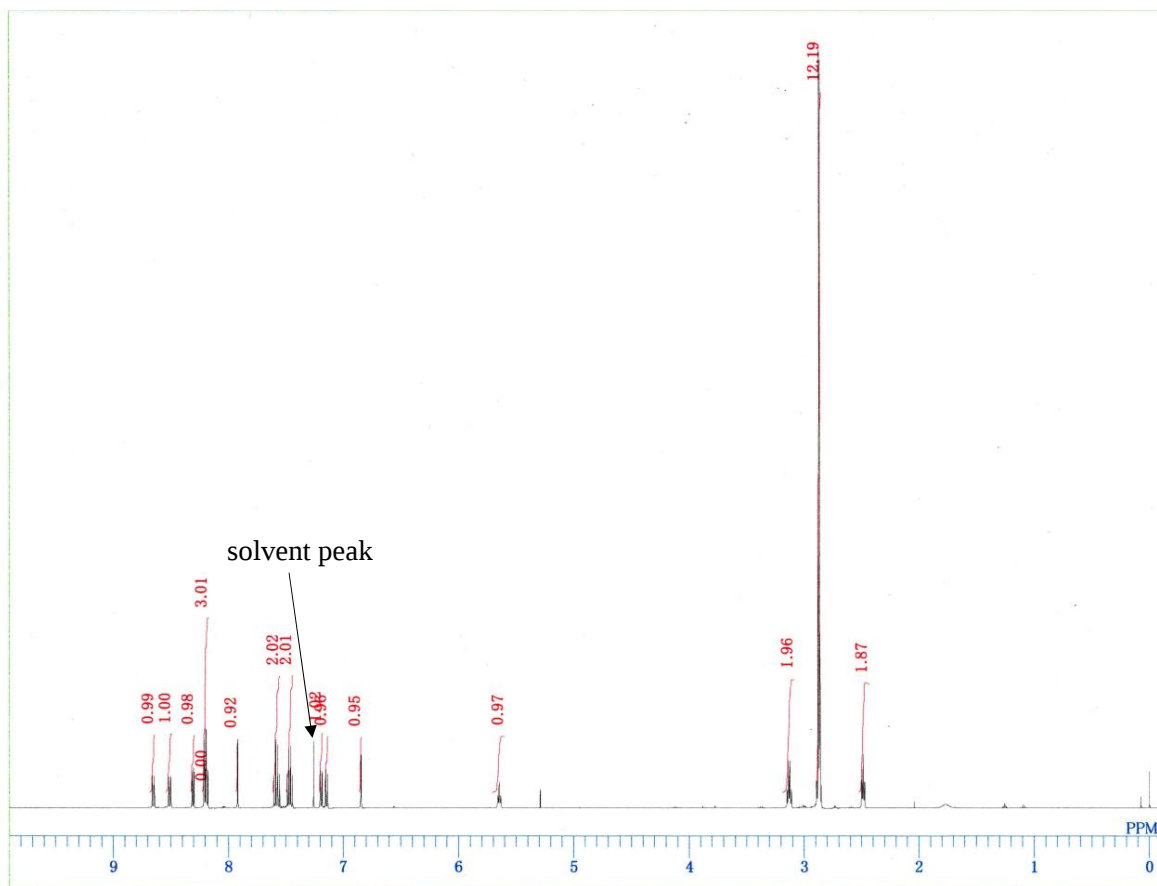


Figure 2 合成した DDH の ^1H -NMR スペクトル

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) スペクトルは $\delta = 2.49$ (t, 2H), 2.86 (s, 6H), 2.87 (s, 6H), 3.13 (q, 2H), 5.65 (t, 1H), 6.85 (s, 1H), 7.15 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.46 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.48 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.57 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 8.32 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.51 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.65 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H) ppm のピークを示した。

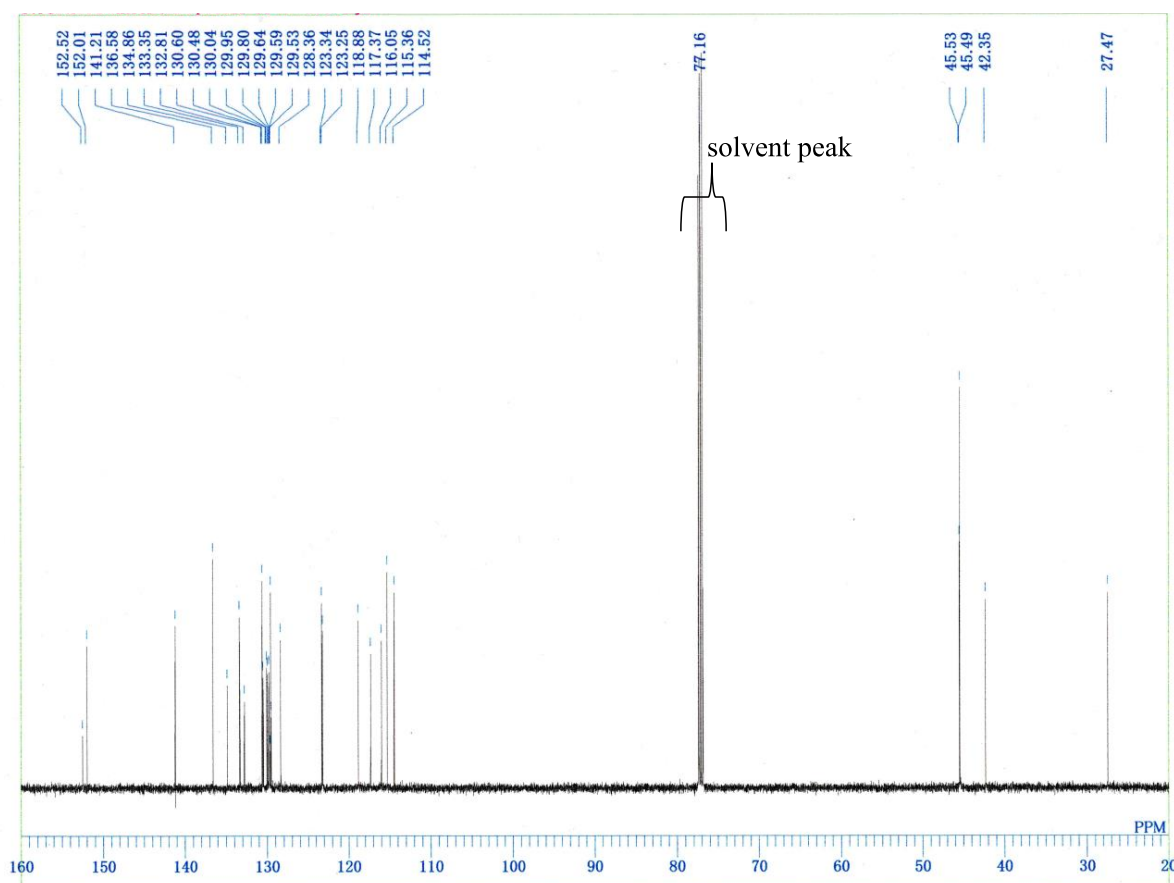


Figure 3 合成した DDH の ^{13}C -NMR スペクトル

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) スペクトルは $\delta = 27.47, 42.35, 45.49, 49.53, 114.52, 115.36, 116.05, 117.37, 118.88, 123.25, 123.34, 128.36, 129.53, 129.59, 129.64, 129.80, 129.95, 130.04, 130.48, 130.60, 132.81, 133.35, 134.86, 136.58, 141.21, 152.01, 152.52$ ppm のピークを示した。

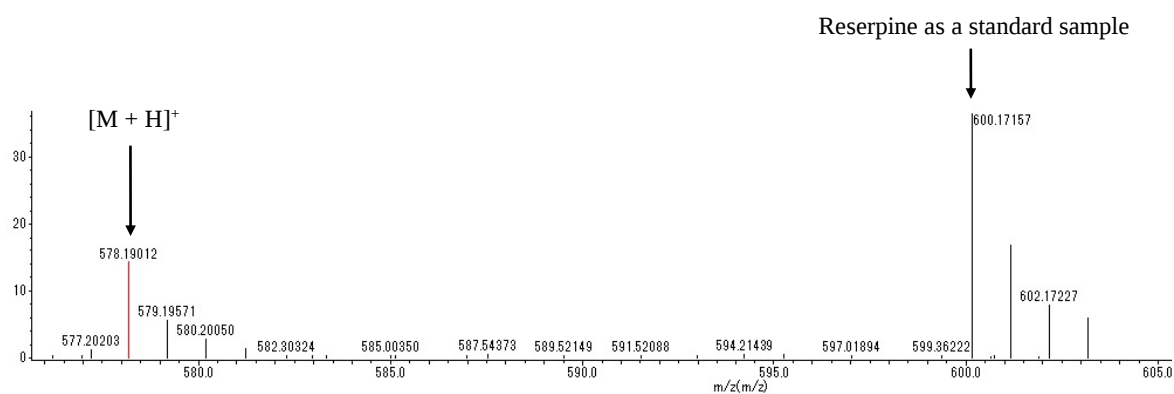


Figure 4 合成した DDH の ESI-MS スペクトル

ESI-MS で測定し、実測値である $[\text{M} + \text{H}]^+ = 578.19012$ から、 $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$ の組成式が計算された。計算された組成式の分子量は $[\text{M} + \text{H}]^+ = 578.18957$ を示した。

2-2 クロマトグラフィーによる DDH の分離および検出

バイナリーポンプ (LC-20AD)、オートサンプラー (SIL-20AD)、カラムオーブン (CTO-20AC)、蛍光検出器 (FD) (RF-10AXL) を備える HPLC システム (Shimadzu, Kyoto, Japan)、粒子径 5 μm 、 $4.6 \times 150 \text{ mm}$ の TSKgel ODS-100V HPLC カラム (TOSOH, Tokyo, Japan) を用い、カラム温度 45 $^{\circ}\text{C}$ 、流速 0.7 mL/min の条件で DDH を分離した。溶媒は移動相 A を H_2O 、移動相 B を acetonitrile (CH_3CN) (Sigma) とした。初期条件は溶媒の移動相 A を 50%、移動相 B を 50% とし、25 分かけて溶媒の移動相 B の割合を 50% から 95% まで増加する直線グラジエントを行い、25 分から 30 分にかけて系を初期条件に戻した。検出は FD を用いて、 $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ で行った。

3 結果および考察

合成した DDH を HPLC-FD で検出したところ、18.5 分に高い蛍光強度を示すピークが確認された (Figure 5)。

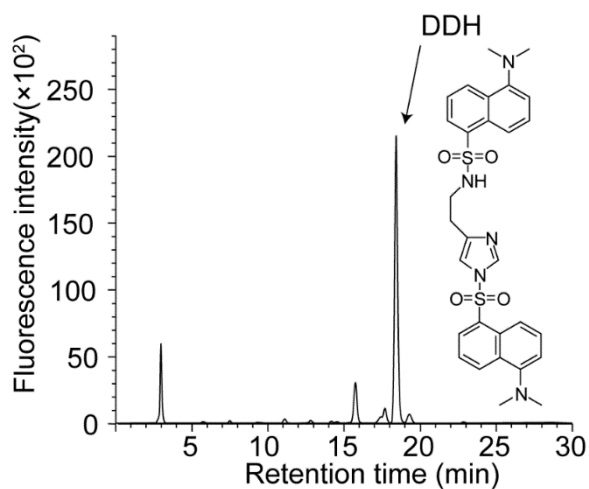


Figure 5 合成した DDH のクロマトグラム

1 ng/ μL の合成した DDH の代表的な HPLC-FD でのクロマトグラムと DDH の構造を示す。DDH の保持時間は 18.5 分であった。

したがって、第一章 第二節「2-2 クロマトグラフィーによる DDH の分離および検出」の測定条件を用いて既知の濃度の DDH を測定し、18.5 分に検出されるピークの蛍光強度と DDH 濃度の関係から検量線を作成することで、未知の DDH 濃度を算出することが可能であると考えられた。

第三節 培養液中のヒスタミンのダンシル誘導体化法の検討

1 目的

第一章 第二節で DDH の測定条件を決定したため、次に培養液中のヒスタミンを DDH に誘導体化する方法を決定する必要がある。Bolygo ら (2000) は、食品中のヒスタミンを検出するためのダンシル誘導体化法を報告している。そこで、第一章 第三節では、Bolygo (2000) らの報告を基に、培養液中のヒスタミンを DDH に誘導体化し、合成された DDH を抽出する方法を決定することを目的とした。

2 実験方法

2-1 ヒスタミンのダンシル誘導体化法と DDH の抽出方法

ヒスタミン (Fujifilm-Wako) を含む RPMI1640 (Fujifilm-Wako) に、無水炭酸ナトリウム (Fujifilm-Wako) を 0.2 g/mL となるように溶解し、等量の 1% dansyl chloride (Fujifilm-Wako) acetone solution (Fujifilm-Wako) を加えて、45 °C で 60 分間インキュベートし、ヒスタミンをダンシル誘導体化した。反応液の 1/4 倍の量の 10% プロリン (Fujifilm-Wako) を加えてダンシル誘導体化反応を停止させた。培養液中の合成された DDH は、diethyl ether (Et₂O) (Fujifilm-Wako) にて抽出し、乾固した。乾固した残渣を H₂O : CH₃CN (Sigma) = 1 : 1 に溶解し、第一章 第二節「2-2 クロマトグラフィーによる DDH の分離および検出」で記載した方法にて分析した。

2-2 ヒスチジン共存下ヒスタミンのダンシル誘導体化

ヒスタミン (Fujifilm-Wako) を含む RPMI1640 (Fujifilm-Wako) に、ヒスタミンの 10 倍量のヒスチジン (Fujifilm-Wako) を加え、第一章 第三節「2-1 ヒスタミンのダンシル誘導体化法と DDH の抽出方法」と同様の方法で DDH を合成し抽出した。抽出した DDH を第一章 第二節「2-2 クロマトグラフィーによる DDH の分離および検出」で記載した方法にて分析した。

2-3 統計処理

データはそれぞれ 3 回の独立した実験の平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。SPSS Statistics version 24 software (IBM, Chicago, IL, USA) を用いて、3 群間以上の比較を ANOVA 検定にて比較し、Student-Newman-Keuls 検定で $p < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

3 結果

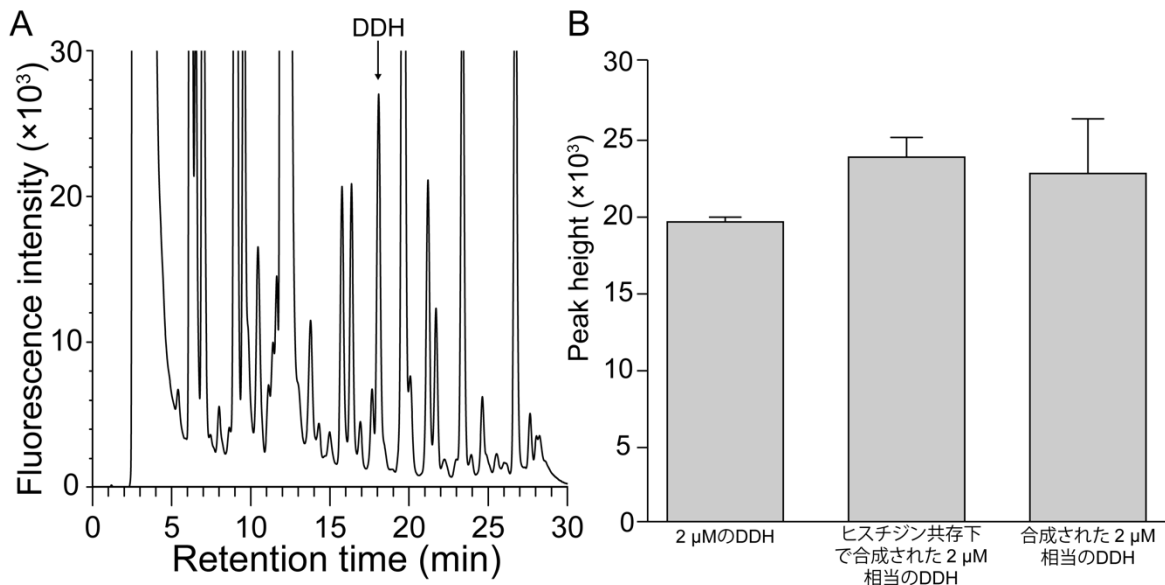


Figure 6 培養液中のヒスタミンをダンシル誘導体化して合成される DDH の検出

ヒスタミン含有培養液をダンシル誘導体化した際の HPLC-FD による代表的なクロマトグラムを示す。DDH 標品と同様に、18.5 分にピークを確認した (A)。この実験に用いたヒスタミンが完全に DDH となり、さらに完全に Et₂O で抽出された場合、2 μ M DDH と推定される。A のクロマトグラムを代表とする独立した 3 例の実験において、18.5 分に検出されたピーク高さは 2 μ M の DDH 標品のピーク高さと同程度であった。また、ヒスチジンが共存する条件下でヒスタミン含有培養液をダンシル誘導体化した場合も、18.5 分におけるピーク高さは 2 μ M DDH 標品のピーク高さと同程度であった (B) (n = 3)。

培養液中に溶解したヒスタミンをダンシル誘導体化し、HPLC-FD で検出したところ、合成した DDH 標品と同じ保持時間である 18.5 分付近にピークが確認された (Figure 6A)。Figure 6A を代表とする実験において、培養液中のすべてのヒスタミンが DDH となり、完全に抽出された場合、DDH の濃度は 2 μ M と推定される。2 μ M の DDH 標品のピーク高さは 19862.7 ± 347.4 であり、Figure 6A を代表とするクロマトグラムの 18.5 分のピーク

ク高さは、 23071.7 ± 3622.1 であった。また、ヒスタミンの 10 倍量のヒスチジンが共存する培養液中のヒスタミンを同様にダンシル誘導体化した場合、ピーク高さは 24152 ± 1358.5 であった。いずれのピーク高さも同程度であった (Figure 6B)。

4 考察

Figure 6 の結果から、ヒスタミンの 10 倍量のヒスチジンを含む培養液中であっても、本節で検討したダンシル誘導体化法はヒスタミンを DDH に合成できることが明らかとなった。ダンシル誘導体化法で生成された DDH は水相から有機相に移動する一方で、ダンシル誘導体化ヒスチジンが水相で合成されたとしても、有機相に移動しない (Sharma *et al.*, 2017)。したがって、本節で検討したダンシル誘導体化法は、ヒスチジンの共存にかかわらず培養液中のヒスタミンを DDH として検出できると考えられた。さらに、培養液中の DDH は一般的な octadecylsilyl (ODS) カラムで検出できることも明らかとなった。したがって、第一章 第二節および第三節で検討したダンシル誘導体化法および DDH の検出法は、前処理なく、一般的な ODS カラムを用いて、ヒスタミンの定量が可能であることが示された。

第四節 DDH を用いた BMMC から遊離するヒスタミンの定量

1 目的

第一章 第三節において、培養液中のヒスタミンをダンシル誘導体化し、それにより合成された DDH を HPLC-FD で検出するヒスタミン定量法 (DDH 法) が決定した。BMMCs は、抗原抗体反応によって細胞内の顆粒に貯蔵されているヒスタミンを遊離することが知られている (Caughey *et al.*, 2000; Fukuishi *et al.*, 2013; Kataoka *et al.*, 2015)。そこで、第一章 第四節では抗原抗体反応によって BMMCs から培養液中に遊離するヒスタミンを DDH 法で定量可能かどうか評価することを目的とした。

2 実験方法

2-1 実験動物

金城学院大学動物実験委員会から承認を受けた (承認番号 173) 後、雄性の C57BL/6 マウスを日本 SLC (Tokyo, Japan) から購入した。金城学院大学実験動物教育研究施設にて 1 週間順化させた後、これらマウスの大腿骨および下腿骨から骨髓細胞を採取した。実験動物は室温 23 ± 1 °C、湿度 $50 \pm 5\%$ 、換気 34 回/1 時間、午前 8 時から 12 時間毎に明所/暗所を繰り返し、食餌と飲水を自由に行える環境で飼育した。

2-2 BMMCs の培養方法

第一章 第四節「2-1 実験動物」に記載の方法で採取した骨髓細胞を報告されている方法で BMMCs を作製した (Mekori *et al.*, 1993; Razin *et al.*, 1984)。すなわち、1 mM pyruvate (Fujifilm-Wako)、1 mM penicillin-streptomycin (Fujifilm-Wako)、1 mM non-essential amino acids (Fujifilm-Wako)、10% FBS (Equitech Bio Inc., Kerrville, TX, USA)、100 μ g/mL 2-mercaptoethanol (Kanto Chemical Co. Inc.)、5 ng/mL IL-3 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 含有 RPMI 1640 (Fujifilm-Wako) を培養培地とし、骨髓細胞を培地中で少なくとも 28 日間培養した。28 日後の培養細胞の 95% 以上が BMMCs であることを Flow cytometry 法で確認した。

2-3 BMMCs 内のヒスタミンのダンシル誘導体化と DDH の検出によるヒスタミン定量

BMMCs を $800 \times g$ 、5 分間、4 °C で遠心分離後、上清と沈渣を分取した。沈渣に 1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) を添加後、凍結融解を繰り返し、細胞を溶解させた。細胞溶解液中のヒスタミンを第一章 第三節「2-1 ヒスタミンのダンシル誘導体化法と DDH の抽出方法」に記載の方法でダンシル誘導体化・抽出の後、第一章 第二節「2-2 クロマトグラフィーによる DDH の分離および検出」に記載の方法で合成された DDH を検出し、ヒスタミン量を算出した。

2-4 抗原抗体反応による BMMCs のヒスタミン遊離率および脱顆粒率の算出

250 ng/mL anti-2,4-dinitrophenyl (DNP) IgE (Sigma) とともに BMMCs を 37 °C、5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベートし、IgE 感作 BMMCs を作成した。作成した IgE 感作 BMMCs を RPMI1640 (Fujifilm-Wako) または 100 μ M epinastine (Epn) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) とともに 37 °C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベートした後洗浄し、RPMI1640 (Fujifilm-Wako) に懸濁した。BMMCs に 10 ng/mL DNP-human serum albumin (HSA) (Sigma) を添加し、BMMCs を活性化した (Kataoka *et al.*, 2015)。

DNP-HSA 添加 30 分後に氷冷によって反応を停止し、 $800 \times g$ 、5 分間、4 °C で遠心分離後、上清と沈渣を分取した。沈渣に 1% Triton X-100 (Sigma) を添加後、凍結融解を繰り返し、細胞を溶解させた。上清および沈渣のヒスタミン量は第一章 第四節「2-3 BMMCs 中のヒスタミンのダンシル誘導体化と DDH の検出によるヒスタミン定量」に記載した方法で定量した。また、上清および沈渣の β -hexosaminidase 活性は 100 μ M *p*-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (Fujifilm-Wako) と上清または沈渣を 37 °C、30 分インキュベートし、上清または沈渣中の β -hexosaminidase 活性により切断された *p*-nitrophenyl の 405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で測定することで、解析した (Fukuishi *et al.*, 2014; Kataoka *et al.*, 2015)。

脱顆粒率は、全 β -hexosaminidase 活性に対する上清中の β -hexosaminidase 活性の割合で算出した。

2-5 統計処理

「2-3 BMMCs 中のヒスタミンのダンシル誘導体化と DDH の検出によるヒスタミン定量」および「2-4 抗原抗体反応による BMMCs のヒスタミン遊離率および脱顆粒率の算出」のデータの統計処理はそれぞれ第一章 第三節「2-3 統計処理」に記載した方法によって実施した。

3 結果

3-1 BMMCs 内のヒスタミンのダンシル誘導体化

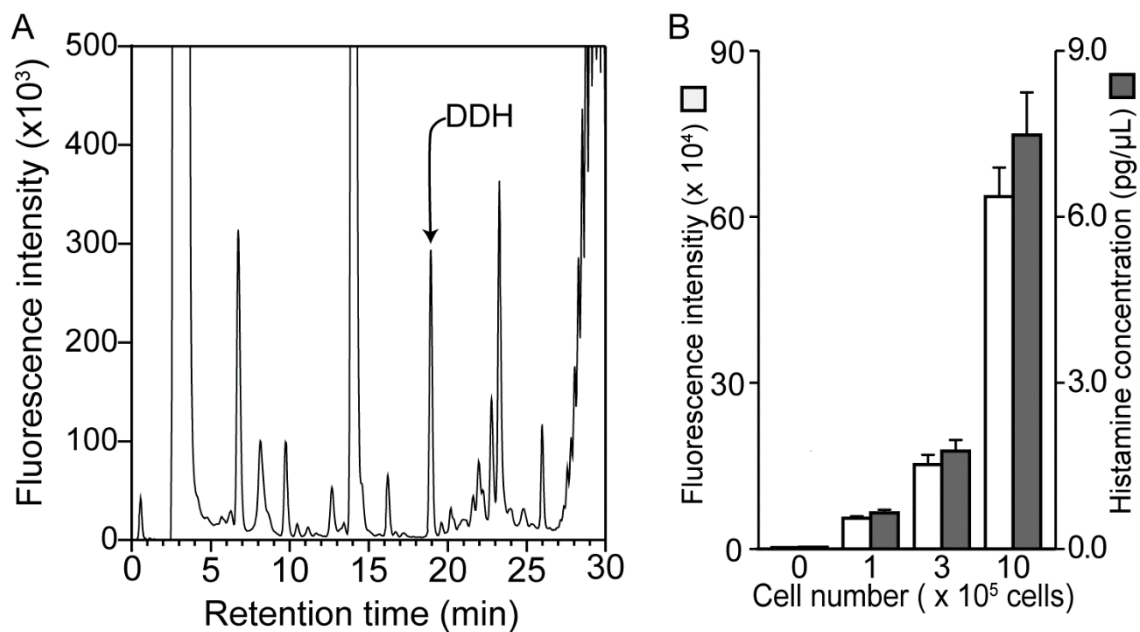


Figure 7 BMMCs 内のヒスタミンのダンシル誘導体化

BMMCs 内のヒスタミン量を DDH 法で測定した。1% Triton X-100 溶液で BMMCs を溶解し、BMMCs 溶解液中のヒスタミン濃度を didansyl 法で測定したところ、蛍光強度から計算されたヒスタミン濃度は BMMCs の細胞数に依存して増加した (B) ($n=3-4$)。3 $\times 10^5$ cells の BMMCs 内のヒスタミン濃度を DDH 法で測定した際の代表的な HPLC-FD のクロマトグラムを示す (A)。

3 $\times 10^5$ cells の BMMCs を溶解後にダンシル誘導体化し、HPLC-FD で検出したところ、DDH 標品と同じ 18.5 分にピークが確認された (Figure 7A)。この 18.5 分のピークの蛍光強度を用いてヒスタミンを定量したところ、細胞数にしたがってヒスタミン濃度は増加し、高い相関が認められた (Figure 7B)。1 $\times 10^5$ cells、3 $\times 10^5$ cells、10 $\times 10^5$ cells の BMMCs のヒスタミン濃度はそれぞれ、703.2 $\pm$ 55.7 pg/ μ L、1759.0 $\pm$ 201.5 pg/ μ L、8235.0

± 770.9 pg/μL であった。

3-2 抗原抗体反応による BMMC のヒスタミン遊離率および脱顆粒率の比較

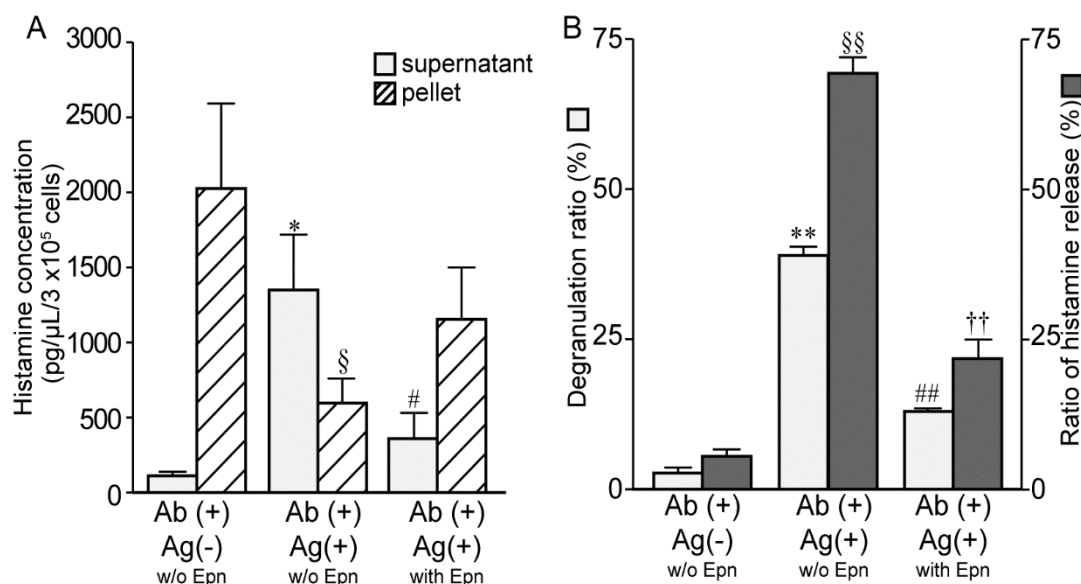


Figure 8 抗原抗体反応による BMMCs のヒスタミン遊離率および脱顆粒率の比較

IgE 感作した BMMCs に抗原を添加し、培養液中に遊離または細胞内に残留するヒスタミン濃度を測定した。抗原の添加によって培養液中のヒスタミン濃度は増加し、Epn 存在下で培養液中のヒスタミン濃度は低下した (n=3) (A)。IgE 感作した BMMC に抗原を添加し、培養液中及び細胞中のヒスタミン濃度と β-hexosaminidase 活性を測定し、ヒスタミン遊離率と脱顆粒率を算出した。抗原の添加によってヒスタミン遊離率および脱顆粒率は同様に増加し、Epn 存在下で同様に低下した (n=3) (B)。Epn は 100 μM epinastine を示す。*: $p < 0.05$ versus Ab (+) Ag (-) w/o Epn of supernatant, #: $p < 0.05$ versus Ab (+) Ag (+) w/o Epn of supernatant, §: $p < 0.05$ versus Ab (+) Ag (-) of pellet, **: $p < 0.01$ versus Ab (+) Ag (-) w/o Epn of degranulation ratio, ##: $p < 0.01$ versus Ab (+) Ag (+) w/o Epn of degranulation ratio, §§: $p < 0.01$ versus Ab (+) Ag (-) w/o Epn of ratio of histamine release, ††: $p < 0.01$ versus Ab (+) Ag (+) w/o Epn of ratio of histamine release.

IgE 感作した BMMCs に抗原を添加した場合の、上清に遊離したヒスタミンと BMMCs 内に残留するヒスタミンを定量した。抗原非添加群の上清のヒスタミン濃度は 112.1 ± 27.3 pg/μL である一方、抗原添加群の上清のヒスタミン濃度は $1,351.1 \pm 384.3$ pg/μL と有意に上昇した。また、ヒスタミン遊離を抑制することが知られる Epn で BMMCs を処理した場合、上清のヒスタミン濃度は 360.8 ± 174.6 pg/μL であり、抗原添加群と比較して有意に低下した (Figure 8A)。さらに、上清と BMMCs 内に残留するヒスタミンを示す沈

渣のヒスタミン濃度からヒスタミン遊離率を求め、同じサンプルの β -hexosaminidase 活性を測定し、脱顆粒率を求めた。ヒスタミン遊離率と脱顆粒率は抗原非添加群と比べ抗原添加群で同様に上昇した。また、抗原添加群と比べ、Epn 添加群のヒスタミン遊離率と脱顆粒率は同様に低下した (Figure 8B)。

4 考察

IL-3 存在下で培養し作成した BMMC のヒスタミン含有量は $0.06\text{--}1\text{ pg/cell}$ と報告されている (Möllerherm *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 1991)。Figure 7B の各細胞数のヒスタミン濃度から細胞あたりのヒスタミンの含有量を求めたところ、 $0.67 \pm 0.04\text{ pg}$ であり、報告されている BMMC のヒスタミン含有量の範囲内であった。したがって、DDH 法は 1×10^5 cells の BMMCs に含まれるヒスタミン量まで正確に定量可能であると考えられた。

また、自発的に BMMCs から遊離するヒスタミンの割合は約 1–5%であり、このわずかなヒスタミンの定量に高い感度が要求される (Okabe *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011)。Figure 8 の結果から、DDH 法は抗原非添加群の培養上清のヒスタミンまで定量でき、自発的な BMMCs のヒスタミン遊離率まで算出できることが明らかとなった。

したがって、DDH 法は抗原抗体反応だけでなく自発的な BMMCs のヒスタミン遊離率を正確に測定可能な方法であると考えられた。

第五節 DDH を用いたヒスタミン定量法の精度の検討

1 目的

第一章 第四節で、DDH 法は抗原抗体反応だけでなく自発的に BMMCs から遊離するヒスタミンの量を測定できた。一方で、DDH 法の精度や感度は明らかとなっていない。そこで、第一章 第五節では OPA-ヒスタミンと DDH それぞれを用いて検量線を作成し、ヒスタミン濃度と蛍光強度の相関や定量できるヒスタミン濃度の最小値を比較することで、DDH 法の精度や感度を評価することを目的とした。

2 実験方法

2-1 OPA-ヒスタミンと DDH の検出

OPA-ヒスタミンは Kurahashi ら (1969) の報告に基づき、以下の方法で合成した。すなわち、ヒスタミン二塩酸塩 (Fujifilm-Wako) を溶解した培養液に sodium hydrate (NaOH) を加えて塩基性とした後、methanol (CH₃OH) に溶解した 100 mg/mL OPA (Fujifilm-Wako) 溶液を加えて一定時間反応させ、2 M の酢酸水溶液 (Fujifilm-Wako) を添加し反応を停止させることによった。合成された OPA-ヒスタミンは分光蛍光光度計を用いて $\lambda_{\text{ex}} = 356$ nm、 $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm で検出した。

合成した DDH を第一章 第二節「2-2 クロマトグラフィーによる DDH の分離および検出」の記載した方法で検出し、ピーク保持時間 18.5 分のピーク高さによりヒスタミン濃度を定量した。

3 結果および考察

OPA-ヒスタミンの蛍光強度とヒスタミン濃度の決定係数は $R^2 = 0.9025$ であり、1000 pg/ μ L 以上のヒスタミン濃度でのみ直線性が認められた (Figure 9A)。一方、DDH の蛍光強度とヒスタミン濃度の決定係数は $R^2 = 0.9999$ であり、2 pg/ μ L 以上のヒスタミン濃度で直線性が認められた (Figure 9B)。したがって、OPA-ヒスタミンを用いたヒスタミン定量法と比較して DDH 法は 500 倍高感度な定量法であると考えられた。

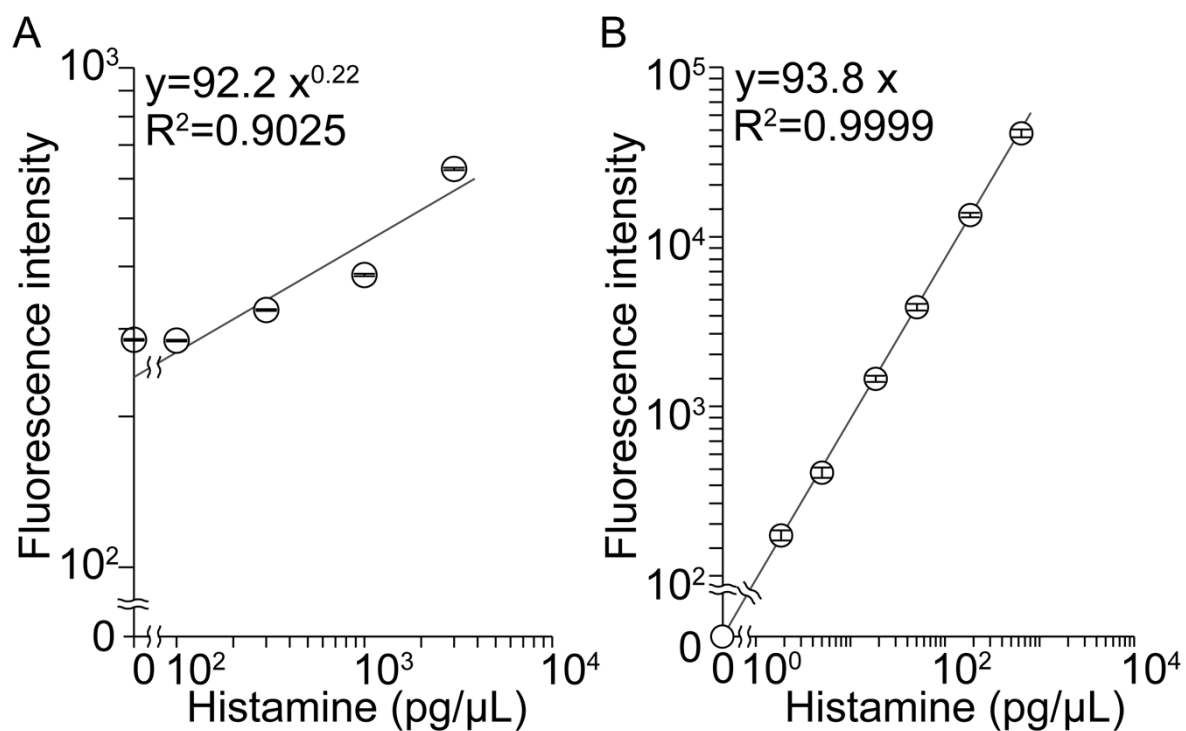


Figure 9 OPA-ヒスタミンまたは DDH を用いたヒスタミンの検量線

OPA-ヒスタミンの蛍光強度は 1000 pg/ μ L 以上のヒスタミン濃度と直線性を示した (A, $n = 3$)。また、OPA-ヒスタミンの蛍光強度は 100 pg/ μ L 以下のヒスタミン濃度との間に相関を認めなかった。一方で、DDH の蛍光強度は 2 pg/ μ L 以上のヒスタミン濃度と直線性を示した (B, $n = 4$)。

第六節 小括

本章では、ダンシル誘導体化ヒスタミンを用いた DDH 法が、BMMCs から遊離するヒスタミンを前処理なく高感度に定量できるかについて検討した。

DDH 法はヒスチジンの共存に関わらず、一般的な ODS カラムによってヒスタミンを定量できたことから、煩雑な前処理もしくは高価なカラムでヒスタミンを分離せずにマスト細胞から遊離するヒスタミンを正確に定量可能な方法であると考えられた。

また、自発的に BMMCs から遊離したヒスタミンの濃度は $37.37 \text{ pg}/\mu\text{L}/10^2 \text{ cells}$ であり、DDH 法で検出可能な最小のヒスタミン濃度の $2 \text{ pg}/\mu\text{L}$ を上回っていた。このことから、DDH 法は BMMCs から自発的に遊離するヒスタミンも十分に測定できると考えられた。

以上の結果から、DDH 法は BMMCs から遊離するヒスタミンの定量に最適な方法であり、以降の実験では DDH 法を用いて、抗原抗体反応による BMMCs からのヒスタミン遊離に対する候補化合物の影響を検討することとした。

第二章 PerD のマスト細胞での標的タンパク質とメディエーター遊離への影響

第一節 序説

日本に分布する苔類の *Radula perrottetii* (Radulaceae, Radula Dumort., *Radula perrottetii* Gottsche ex Steph.) は (Asakawa *et al.*, 1991; Yamada, 1979)、ビベンジル構造をもつ化合物を豊富に含んでいる (Asakawa *et al.*, 1978a, b; Asakawa *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 1979)。

ビベンジル化合物は、細胞内のタンパク質を阻害することで抗炎症、抗菌、抗真菌作用、癌細胞に対する細胞毒性、骨格筋弛緩作用、tyrosine kinase 阻害など多様な生物学的活性を示すことが報告されている (Asakawa *et al.*, 2020; Cretton *et al.*, 2018; Hlosrichok *et al.*, 2018; Oozeki *et al.*, 2008; Taira *et al.*, 1994)。例えば、ビベンジル化合物の Canniprene は LTs や prostaglandin (PG)s の産生に重要な 5-lipoxygenase や COX/microsomal PGE₂ synthase を阻害すると報告されている (Allegrone *et al.*, 2017)。また、ビベンジル化合物の Bletinin は好中球における SFK の活性の阻害によって、好中球の細胞遊走性を抑制し、また炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている (Kao *et al.*, 2021)。さらに、ビベンジル化合物の Erianin は Erk の活性化に必要な MEK の活性を阻害することで、Erk のリン酸化による活性化を抑制することも報告されている (Wang *et al.*, 2023)。

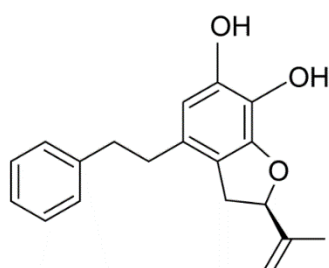


Figure 10 PerD の構造

Radura perrottetii から抽出されたビベンジル化合物の PerD の構造を示す。

そこで第二章では、*Radula perrottetii* から単離された PerD (Figure 10) が、抗原抗体反応による BMMCs の活性化に及ぼす影響を調査することで、マスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とする抗アレルギー薬の候補化合物となる可能性を検討した。

第二節 PerD のメディエーター遊離への効果

1 目的

抗原抗体反応によって活性化されたマスト細胞はヒスタミンなどのメディエーターを遊離し、種々のアレルギー症状を引き起こす (Benedé and Berin, 2018; Nakamura and MacGlashan, 1994; Simons, 2004; Thurmond *et al.*, 2008)。そこで、第二章 第二節では、抗原抗体反応による BMMC の脱顆粒に伴うヒスタミン、IL-4、LTB₄ の遊離に対する PerD の影響を検討し、PerD が抗アレルギー活性を示す可能性を明らかにすることを目的とした。

2 実験方法

2 - 1 *Radula perrottetii* からの PerD の抽出および PerD の構造決定

苔類である *Radula perrottetii* Gottsche ex Steph. の乾燥物を粉碎して粉末とし、CH₃OH で抽出した。標本は徳島文理大学に寄託した。CH₃OH 抽出物を H₂O と ethyl acetate (EtOAc) で分配した。EtOAc 残渣 (40 g) を、*n*-hexane-Et₂O または *n*-hexane-EtOAc の混合溶媒と Sephadex LH-20 (CH₂Cl₂:CH₃OH = 1:1) を用いて、シリカゲル 60 (230-400 mesh) (Merck, Darmstadt, Germany) 上で繰り返しクロマトグラフィーした (Asakawa *et al.*, 2013)。最終的に medium-pressure liquid chromatography で精製し、PerD (461.1mg, purity > 95%) を得た。PerD の ¹H- (400 MHz) NMR スペクトルは Varian Unity-600 で (Figure 11)、¹³C- (100 MHz) NMR スペクトルは JEOL Eclipse-400 で記録した (Figure 12)。いずれも溶媒は CDCl₃ を用いた。また、PerD の high-resolution electron ionization mass spectrometry (HR-EIMS) スペクトルは JEOL JMS AX-500 で記録した (Figure 13)。さらに、PerD は [α]_D = +3.5 (c = 5.7, CHCl₃) を示し、ラセミ体ではなかった。PerD は dimethyl sulfoxide (DMSO) (Fujifilm-Wako) に 100 mM まで溶解した。

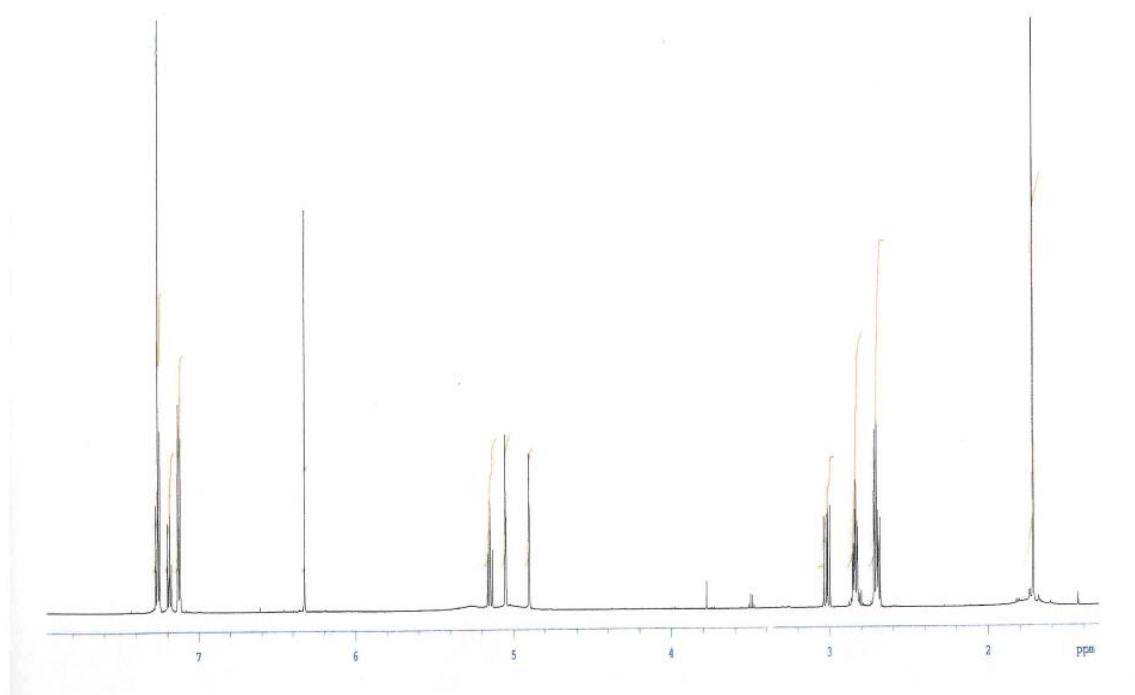


Figure 11 *Radula perrottetii* から抽出された PerD の ^1H -NMR スペクトル

PerD の ^1H -NMR スペクトルは、 $\delta = 1.72$ (3H, s, H-3'), 2.70 (3H, m, H-3, H- α), 2.84 (2H, m, H- β), 3.02 (1H, dd, $J=14.8, 9.3$ Hz, H-3), 4.90 (1H, s, H-2'), 5.01 (1H, s, H-2'), 5.15 (1H, t, $J=8.9$ Hz, H-2), 6.33 (1H, s, H-5), 7.12 (2H, d like, H-2'', H-6''), 7.19 (1H, t like, H-4''), 7.26 (2H, m, H-3'', H-5'') ppm のピークを示した。

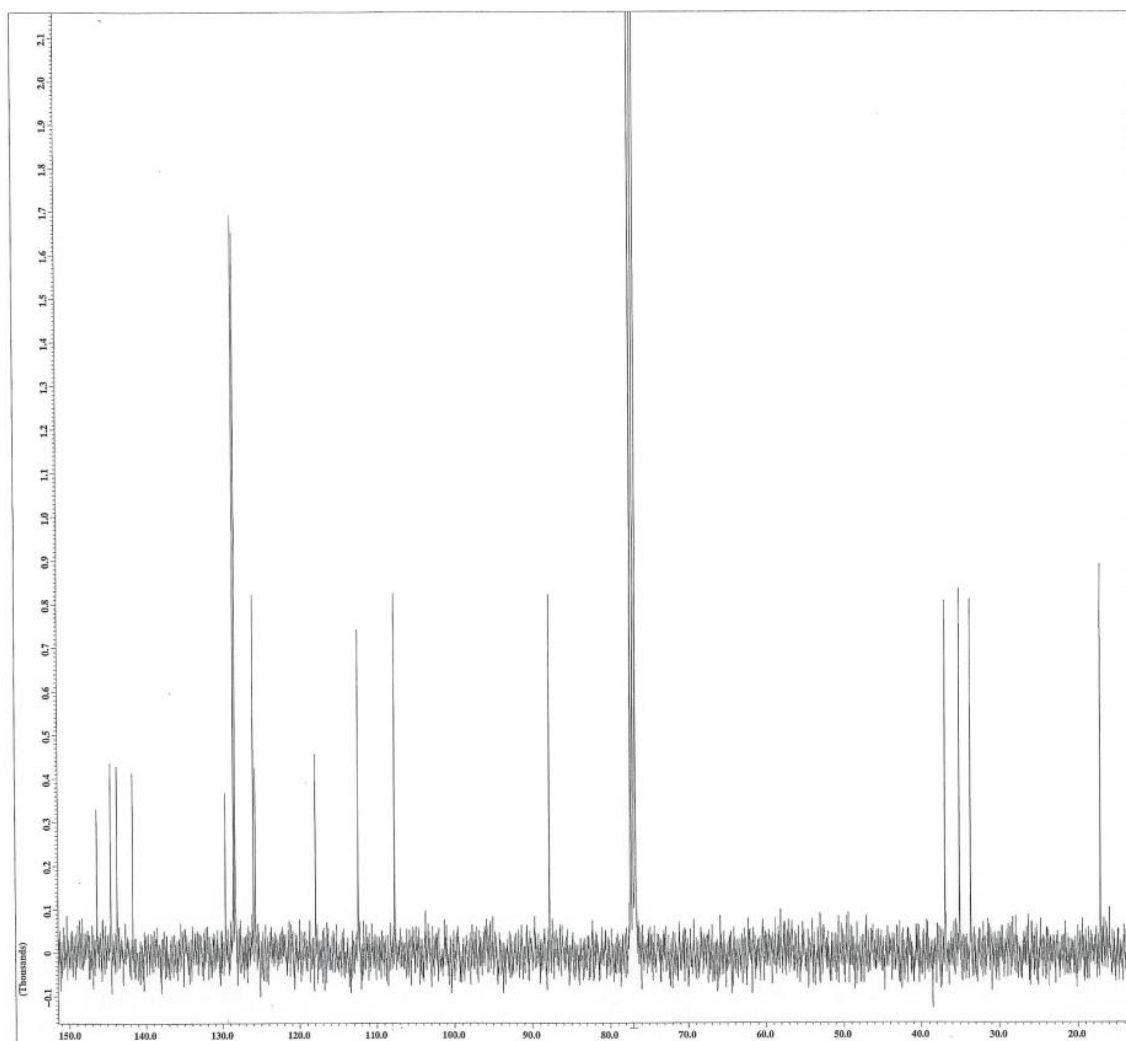


Figure 12 *Radula perrottetii* から抽出された PerD の ^{13}C -NMR スペクトル

PerD の ^{13}C -NMR スペクトルは、 $\delta = 146.4$ (C-8), 144.5 (C-1'), 143.7 (C-6), 141.7 (C-1''), 129.6 (C-4), 128.5 (C-3'', C-5''), 128.3 (C-2'', C-6''), 126.0 (C-4''), 125.7 (C-7), 117.9 (C-9), 112.4 (C-2'), 107.6 (C-5), 87.7 (C-2), 36.9 (β), 35.1 (α), 33.6 (C-3), 17.1 (C-3') ppm のピークを示した。

Note : MStation
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.47 min Scan# : 15
 BP : m/z 296 Int. : 1599.98 (16776960)
 Output m/z range : 35 to 500 Cut Level : 0.00 %

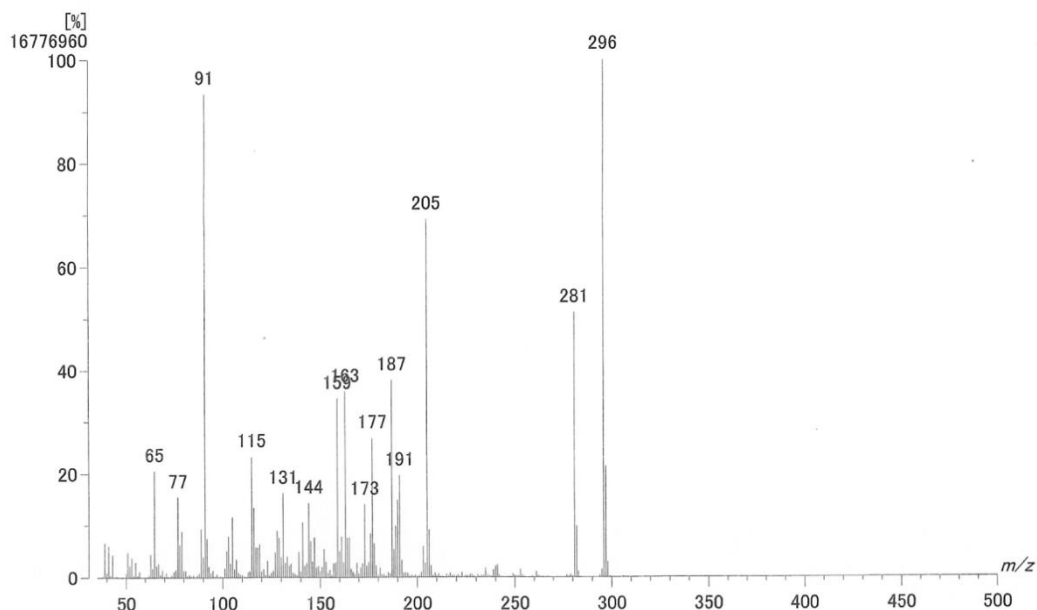


Figure 13 *Radula perrottetii* から抽出された PerD の HR-EIMS スペクトル

HR-EIMS で測定した実測値である 296.1419 の数値から、 $C_{19}H_{20}O_3$ の組成式が計算され、計算された組成式の分子量は 296.1412 を示した。EIMS m/z (int.): 296 $[M]^+$ (100), 281 (51), 205 (69), 191 (20), 187 (38), 177 (27), 173 (14), 163 (36), 159 (35), 144 (14), 131 (16), 115 (23), 91 (93), 77 (15), 65 (21) を示した。

2-2 実験動物

金城学院大学動物実験委員会から承認を受けた（承認番号 173）後、雄性の C57BL/6 マウスを日本 SLC (Tokyo, Japan) から購入した。金城学院大学実験動物教育研究施設にて 1 週間順化させた後、これらマウスの大腿骨および下腿骨から骨髓細胞を採取した。使用した実験動物の飼育方法は第一章 第四節「2-1 実験動物」と同様に行った。

2-3 BMMCs の培養方法

使用した BMMCs は第一章 第四節「2-2 BMMCs の培養方法」と同様の方法を用いて作製した。

2-4 PI 染色を用いた Flow cytometry 法および TB 染色を用いた計数法による BMMCs に対する PerD の毒性の評価

BMMCs に対する PerD の毒性を、Flow cytometry 法および計数法を用いて評価した。まず、10、30 μ M PerD とともに BMMCs を 37 °C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベートした。Flow cytometry 法では、各濃度の PerD または薬物添加なしでインキュベートした BMMCs を 0.5 μ g/mL propidium iodide (PI) (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) で染色した。生細胞率は、FACS Verse Flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて PI の蛍光強度を測定し、低蛍光領域の細胞を生細胞として、全細胞中の割合で算出した。計数法では、各濃度の PerD または薬物添加なしでインキュベートした BMMCs を 0.4% trypan blue (TB) solution (Fujifilm-Wako) で染色した。生細胞率は、染色された細胞と染色されていない細胞の数を血球計数盤で計測し、非染色細胞を生細胞として、全細胞中の割合で算出した。

2-5 BMMCs への PerD の暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化

250 ng/mL anti-DNP IgE (Sigma) とともに BMMCs を 37 °C、5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベートし、IgE 感作 BMMCs を作成した。作成した IgE 感作 BMMCs を 10 μ M PerD とともに 37 °C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベートした後、洗浄し、RPMI1640 (Fujifilm-Wako) に懸濁した。その後、BMMCs を 10 ng/mL DNP-HSA (Sigma) で活性化した (Fukuishi *et al.*, 2013, Kataoka *et al.*, 2015)。Epn を暴露したマスト細胞では脱顆粒率およびヒスタミン遊離率の低下が報告されていたため (Galatowicz *et al.*, 2007)、対照群として用いた。すなわち、IgE 感作 BMMCs を 50 μ M Epn (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) と 37 °C で 1 時間インキュベートした後、10 ng/mL DNP-HSA (Sigma) で BMMCs を活性化した。Dexamethasone (Dex) を暴露した BMMCs では IL-4 の遊離量の低下が報告されていたため (Kim *et al.*, 2017)、対照群として用いた。すなわち、IgE 感作 BMMCs を 1 μ M Dex (Fujifilm-Wako) と 37 °C で 24 時間インキュベートした後、10 ng/mL DNP-HSA (Sigma) で BMMCs を活性化した。MK886 (MK) を暴露したマスト細胞では LTB₄ の遊離量の低下が報告されていたため (Takasugi *et al.*, 2018)、対照群として用いた。すなわち、IgE 感作 BMMCs を 30 μ M MK (Fujifilm-Wako) と 37 °C で 1 時間インキュベ

トした後、10 ng/mL DNP-HSA (Sigma) で BMMCs を活性化した。

2 - 6 β -hexosaminidase 活性を用いた脱顆粒率の評価

第二章 第二節「2 - 5 PerD の BMMCs への暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」で活性化した 1×10^5 cells の BMMCs を $800 \times g$ 、5 分間、4 °C で遠心分離し、上清と沈渣をそれぞれ分取した。沈渣に 1% Triton X-100 (Sigma) を添加後、凍結融解を繰り返し、細胞を溶解させた。上清および沈渣の β -hexosaminidase 活性は第一章 第四節「2 - 4 抗原抗体反応による BMMCs のヒスタミン遊離率および脱顆粒率の算出」に記載した方法にて解析した。脱顆粒率は、全 β -hexosaminidase 活性に対する上清中の β -hexosaminidase 活性の割合で算出した。

2 - 7 pre-column HPLC 法を用いたヒスタミン遊離率の評価

第二章 第二節「2 - 5 PerD の BMMCs への暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」で活性化した 5×10^5 cells の BMMCs を $800 \times g$ 、5 分間、4 °C で遠心分離後、上清と沈渣をそれぞれ分取した。沈渣に 1% Triton X-100 (Sigma) を添加後、凍結融解を繰り返し、細胞を溶解させた。上清および沈渣のヒスタミン量は以前に報告されている pre-column HPLC 法を用いて測定した (Akagi *et al.*, 1987)。デガッサー、バイナリーポンプ、低圧グラジエント装置、オートサンプラー、カラムオーブン、OPA リアクター、FD を備える HPLC システム (JASCO International Co., Tokyo, Japan)、カラム温度を 60 °C に設定した内径 6.0×50 mm のヒスタミンパックカラム (JASCO International Co.) を用いて上清および沈渣のヒスタミンを分離した。移動相 A は 1.2 N citrate buffer (pH10.0)、移動相 B は 0.2 N NaOH を用いた。初期条件は溶媒の移動相 A を 100%、移動相 B を 0% とし、初期条件で 15 分間測定後、5 分かけて溶媒の移動相 A を 0%、移動相 B を 100% に変えて洗浄し、その後 20 分間かけて系を初期条件に戻した。分離したヒスタミンを OPA リアクターで OPA 誘導体化し、OPA-ヒスタミンを FD によって $\lambda_{ex} = 345$ nm、 $\lambda_{em} = 455$ nm で測定し、ヒスタミンを定量した。ヒスタミン遊離率は、全ヒスタミン量に対する上清中のヒスタミン量の割合で算出した。

2-8 ELISA 法を用いた IL-4 の遊離量の測定

第二章 第二節「2-5 PerD の BMMCs への暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」で活性化した 1.25×10^5 cells の BMMCs を $800 \times g$ 、5 分間、4 °C で遠心分離後、上清を分取した。上清の IL-4 の濃度は、ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。capture Abs をコーティングした 96 ウェルプレートに上清を加え、室温で 2 時間インキュベートした。その後、96 ウェルプレートを洗浄し、detection Abs を加えてさらに室温で 2 時間インキュベートした。再び 96 ウェルプレート洗浄し、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated detection Abs とともに室温で 30 分間インキュベートした。反応液の 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定し、IL-4 の濃度を求め、細胞あたりの IL-4 の遊離量を算出した。

2-9 ELISA 法を用いた LTB₄ の遊離量の測定

第二章 第二節「2-5 PerD の BMMCs への暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」で活性化した 1.25×10^5 cells の BMMCs を $800 \times g$ 、5 分間、4 °C で遠心分離後、上清を分取した。上清の LTB₄ の濃度は、ELISA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を用いて測定した。上清と acetylcholinesterase (AChE) -conjugated LTB₄ を混合し、anti-LTB₄ Abs をコーティングした 96 ウェルプレートに加えて一晩インキュベートした。96 ウェルプレートを洗浄後、エルマン試薬を加えて 2 時間インキュベートし、反応液の 412 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定し、AChE 活性を用いて LTB₄ の濃度を求め、細胞あたりの LTB₄ の遊離量を算出した。

2-10 統計処理

「2-4 PI 染色を用いた Flow cytometry 法および TB 染色を用いた計数法による PerD の BMMCs への毒性の検討」、「2-6 β -hexosaminidase 活性を用いた脱顆粒率の評価」、「2-7 pre-column HPLC 法を用いたヒスタミン遊離率の評価」、「2-8 ELISA 法を用いた IL-4 の遊離量の測定」および「2-9 ELISA 法を用いた LTB₄ の遊離量の測定」のデータの統計処理はそれぞれ第一章 第三節「2-3 統計処理」に記載した方法によって実施した。

3 結果および考察

3 - 1 BMMCs に対する PerD の毒性の評価

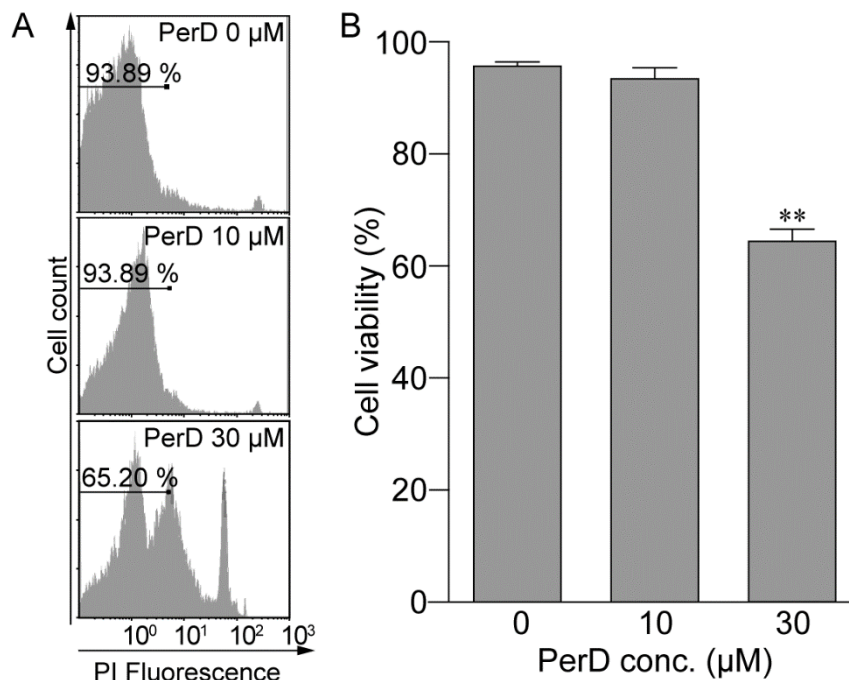


Figure 14 PI 染色を用いた Flow cytometry 法による BMMCs に対する PerD の毒性の評価

Flow cytometry 法の独立した 3-6 例の実験のうち、代表的なヒストグラムを示す (A)。10 μM PerD 添加群の生細胞率は薬物非添加群と比較して有意な差はなかったが、30 μM PerD 添加群の生細胞率は薬物非添加群と比較して有意に低下した (B)。n = 3-6, **: $p < 0.01$ vs. 0 μM PerD.

抗原抗体反応による BMMCs からのメディエーターの遊離に対する PerD の影響を検討すべく、まず BMMCs に対する PerD の毒性について検討した。

Flow cytometry 法では、薬物非添加群、10 μM PerD 添加群と比較して、30 μM PerD 添加群の生細胞を示す低蛍光領域の細胞の割合は 65.2%と低かった (Figure 14A)。また、Figure 14A を代表とするヒストグラムからもとめた各群の生細胞率は、薬物非添加群で $95.2 \pm 0.67\%$ 、10 μM PerD 添加群で $92.9 \pm 1.98\%$ 、30 μM PerD 添加群で $64.0 \pm 0.93\%$ であった。薬物非添加群、10 μM PerD 添加群と比較して、30 μM PerD 添加群の生細胞率は有意に低下した (Figure 14B)。

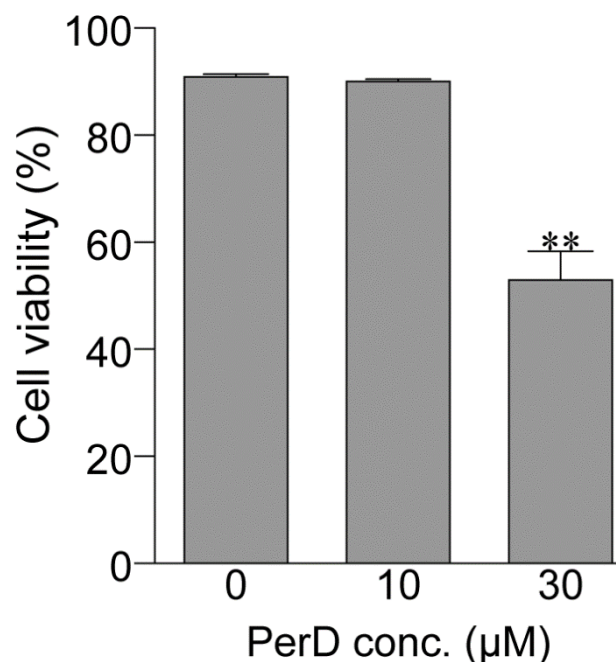


Figure 15 TB 染色を用いた計数法による BMMCs に対する PerD の毒性の評価

10 μM PerD 添加群の生細胞率は薬物非添加群と比較して有意な差はなかったが、30 μM PerD 添加群の生細胞率は薬物非添加群と比較して有意に低下した。n = 3–6, **: $p < 0.01$ vs. 0 μM PerD

計数法でも薬物非添加群の生細胞率である $90.9 \pm 2.4\%$ と比べ、30 μM PerD 添加群の生細胞率は $52.9 \pm 5.42\%$ と有意に低下した (Figure 15)。したがって、10 μM より低濃度の PerD は BMMCs に毒性を示さないことが明らかとなった。

3-2 抗原抗体反応による BMMCs の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離に対する PerD の影響

次に、抗原抗体反応による BMMCs の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離に対する PerD の影響を検討した。

抗原を添加した薬物非添加群の脱顆粒率は $33.70 \pm 3.26\%$ であり、抗原を添加していない群と比べ有意に上昇した。3 μM PerD 添加群の脱顆粒率は薬物非添加群と同程度である一方、10 μM PerD 添加群の脱顆粒率は $12.9 \pm 2.52\%$ と有意に低下した。なお、脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離を抑制することが知られる Epn で BMMCs を処理した場合、脱顆粒率は $5.20 \pm 1.24\%$ と薬物非添加群と比較し有意に低下していた (Figure 16A)。

また、抗原を添加した薬物非添加群のヒスタミン遊離率は $50.81 \pm 7.03\%$ と抗原を添加

していない群と比べ有意に上昇した。3 μ M PerD 添加群のヒスタミン遊離率は薬物非添加群と変わらない (data not shown) 一方、10 μ M PerD 添加群のヒスタミン遊離率は $31.87 \pm 3.43\%$ であり、抑制傾向を示した。なお、Epn 添加群のヒスタミン遊離率は $20.14 \pm 5.58\%$ と有意に低下していた (Figure 16B)。

したがって、PerD は抗原抗体反応によって活性化した BMMCs の脱顆粒を抑制し、ヒスタミンの遊離を抑制する傾向を示すことが明らかとなった。

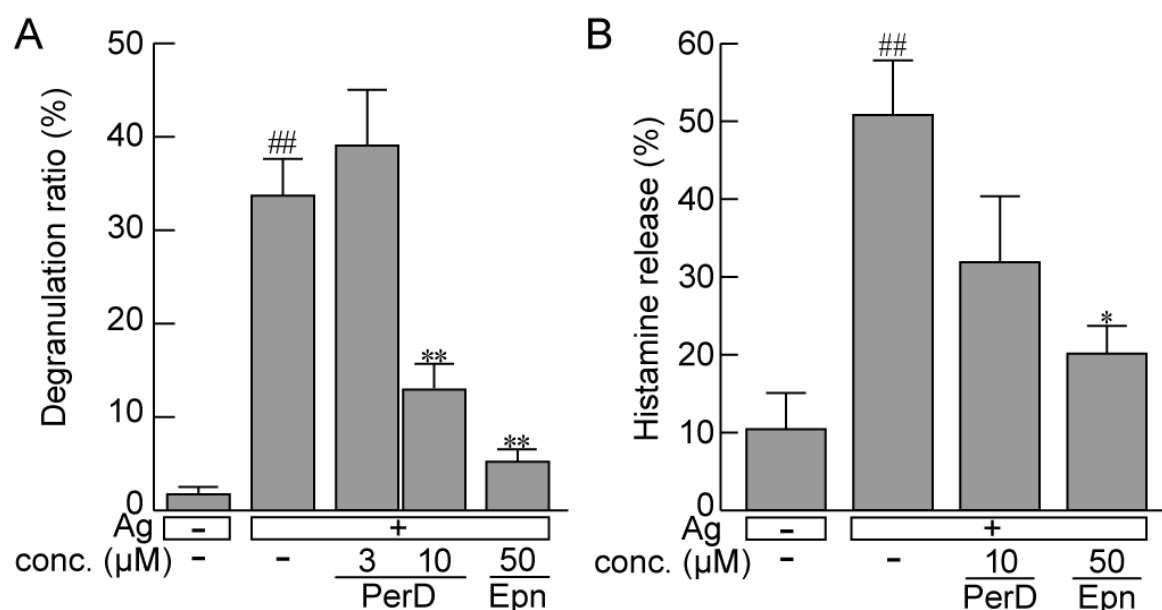


Figure 16 抗原抗体反応による BMMCs の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離に対する PerD の影響

IgE 感作した BMMCs に PerD または Epn を 1 時間暴露した後、細胞を洗浄し、抗原を添加した (A, B)。脱顆粒率は培地中及び細胞中の β -hexosaminidase 活性にて評価した (A)。ヒスタミン遊離率は抗原添加後の培地中及び細胞中のヒスタミン量を HPLC で測定し、評価した (B)。Epn は epinastine を示す。n = 3–12. ##: $p < 0.01$ vs. without antigen challenge and without compound treatment. *: $p < 0.05$ vs. antigen challenge, **: $p < 0.01$ vs. antigen challenge.

3-3 抗原抗体反応による BMMCs からの IL-4 の遊離に対する PerD の影響

次に、抗原抗体反応による BMMCs からの IL-4 の遊離に対する PerD の影響を検討した。抗原を添加した薬物非添加群の IL-4 の遊離量は 7.25 ± 2.27 ng/ 10^5 cells であり、抗原を添加していない群と比べ有意に上昇した。また、10 μ M PerD 添加群の IL-4 の遊離量は 6.55 ± 3.26 ng/ 10^5 cells と薬物非添加群と同程度であった。なお、IL-4 の遊離を抑制す

ることが知られる Dex で処理した BMMCs の場合、IL-4 の遊離量は検出限界以下であり、抗原の添加による BMMCs からの IL-4 の遊離を完全に抑制した (Figure 17)。

したがって、PerD は抗原抗体反応によって活性化した BMMCs からの IL-4 の遊離に影響しないことが明らかとなった。

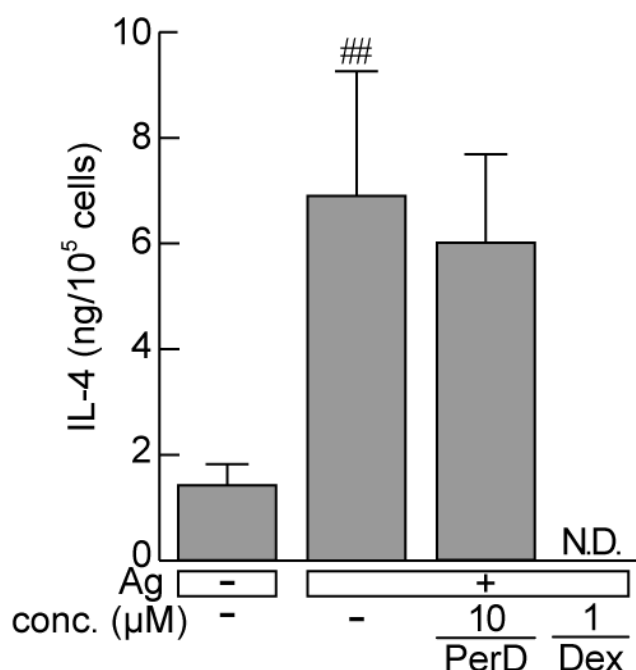


Figure 17 抗原抗体反応による BMMCs からの IL-4 の遊離に対する PerD の影響

IgE 感作した BMMCs に PerD を 1 時間、Dex を 24 時間暴露した後、細胞を洗浄し、抗原を添加した。IL-4 の遊離量は培地中の IL-4 濃度を ELISA kit (eBioscience) を用いて測定し、評価した。Dex は dexamethasone を示す。n=3. ##: $p < 0.01$ vs. without antigen challenge and without compound treatment.

3-4 抗原抗体反応による BMMCs からの LTB₄ の遊離に対する PerD の影響

次に、抗原抗体反応による BMMCs からの LTB₄ の遊離に対する PerD の影響を検討した。抗原を添加した薬物非添加群の LTB₄ の遊離量は 241.07 ± 10.94 pg/10⁵ cells であり、抗原を添加していない群と比べ有意に上昇した。また、10 μM PerD 添加群の LTB₄ の遊離量は 262.71 ± 11.21 pg/10⁵ cells であり、薬物非添加群と同程度であった。なお、LTB₄ の遊離を抑制することが知られる MK で処理した BMMCs の場合、LTB₄ の遊離量は 6.80 ± 0.59 pg/10⁵ cells であり、薬物非添加群と比べ有意に低下していた (Figure 18)。

したがって、PerD は抗原抗体反応によって活性化した BMMCs からの LTB₄ の遊離に影響しないことが明らかとなった。

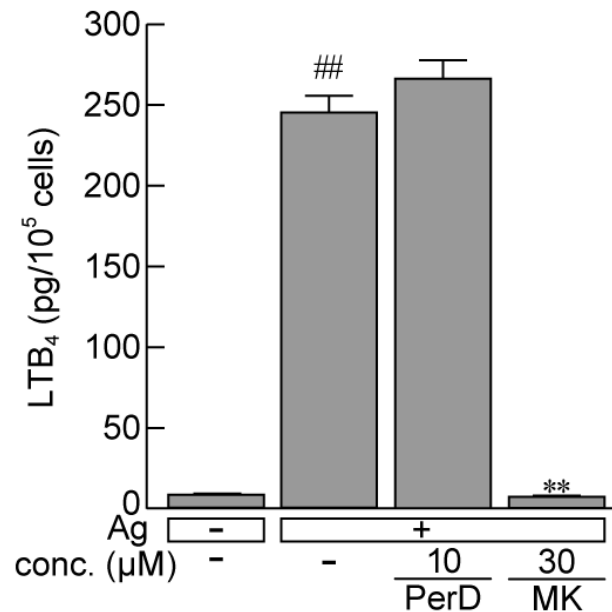


Figure 18 抗原抗体反応による BMMCs からの LTB₄ 遊離への PerD の影響

IgE 感作した BMMCs に PerD または MK を 1 時間暴露した後、細胞を洗浄し、抗原を添加した。LTB₄ の遊離量は培地中の LTB₄ 濃度を ELISA kit (Cayman Chemical) を用いて測定し、評価した。MK は MK886 を示す。n = 3. ##: $p < 0.01$ vs. without antigen challenge and without compound treatment, **: $p < 0.01$ vs. antigen challenge.

第三節 PerD の細胞内情報伝達系への効果

1 目的

抗原抗体反応による BMMCs の脱顆粒は、BMMCs 表面に発現する FcεRI に結合した IgE と抗原の結合をきっかけに、細胞内情報伝達を担うタンパク質の活性化を経て惹起されることが知られている (Barbu *et al.*, 2010; Burd *et al.* 1989; Nishizumi and Yamamoto, 1997; Schwartz *et al.* 2017; Velez *et al.*, 2018)。第二章 第二節において、PerD は抗原抗体反応による BMMCs の脱顆粒を抑制し、ヒスタミンの遊離を抑制する傾向を示すことが明らかとなった。このメカニズムを解明すべく、第二章 第三節では、抗原抗体反応による細胞内情報伝達を担うタンパク質のリン酸化および FcεRI と IgE の結合に対する PerD の影響を検討した。

2 実験方法

2 - 1 Western blot 法を用いた細胞内情報伝達関連タンパク質のリン酸化の検出

第二章 第二節「2 - 5 PerD の BMMCs への暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」と同じ方法で活性化した BMMCs を NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、10% 2-mercaptoethanol、200 μM benzamidine hydrochloride (Sigma)、200 μM sodium orthovanadate (Sigma)、1 mM sodium phosphate (Fujifilm-Wako)、10 mM sodium fluoride (Sigma) を含む lysis buffer で溶解して反応を停止させた。5 分間煮沸した後、lysate を Laemmli の記載に従って、5% (w/v) stacking gel および 10% (w/v) separating gel を用いた polyacrylamide gel で電気泳動を行い、分離したタンパク質を nitrocellulose membrane に転写した。5% skim milk 含有 TBS-T とともに nitrocellulose membrane を 2 時間、室温で blocking した。その後、一次抗体として rabbit anti-Syk Ab (×1000) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、rabbit anti-phospho Syk Ab (×1000) (Cell Signaling)、rabbit anti-Gab2 Ab (×1000) (Cell Signaling)、rabbit anti-phospho Gab2 Ab (×1000) (Cell Signaling)、rabbit anti-p38 Ab (×1000) (Cell Signaling)、rabbit anti-phospho p38 Ab (×1000) (Cell Signaling)、rabbit anti-Erk IgG (×1000) (Cell Signaling)、rabbit anti-phospho Erk Ab (×1000) (Cell Signaling) を用いて、各一次抗体とともに nitrocellulose membrane を 1 時間、室温でインキュベ-

トした。さらに、二次抗体として HRP-conjugated anti-rabbit IgG ($\times 10000$) (GE healthcare, Chicago, IL, USA) を用いて、二次抗体とともに nitrocellulose membrane を 1 時間、室温でインキュベートした。インキュベートした nitrocellulose membrane に結合している二次抗体の HRP を ImmunoStar LD 検出試薬 (Fujifilm-Wako) で化学発光させた。Amersham Imager 680 imaging system (GE Healthcare) を用いて免疫反応性バンドを可視化した。

2-2 Flow cytometry 法を用いた BMMC の表面発現 Fc ϵ RI 結合 IgE 量の解析

250 ng/mL anti-DNP IgE (Sigma) とともに 24 時間インキュベートをすることで作成した IgE 感作 BMMCs を 10 μ M PerD とともに 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、IgE 感作 BMMCs を 800 $\times g$ 、5 分間、室温で遠心分離後、1% FBS (Equitech Bio Inc) 含有 RPMI1640 (Fujifilm-Wako) 培地で洗浄し、receptor for fragment crystallizable region blocking reagent (Miltenyi Biotec) で、暗所、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、FITC 標識 anti-IgE Abs (eBioscience) を 1 μ g 添加して暗所、氷上で 30 分間染色し、FACS Verse Flow cytometer (BD Biosciences) を用いて解析した。

2-3 統計処理

「2-1 Western blot 法を用いた細胞内情報伝達関連タンパク質リン酸化の検出」のデータの統計処理はそれぞれ第一章 第三節「2-3 統計処理」に記載した方法によって実施した。

3 結果

3-1 抗原抗体反応によって惹起される BMMCs のタンパク質のリン酸化に対する PerD の影響

マスト細胞内のタンパク質のうち、Syk、Gab2、p38、Erk のリン酸化は抗原抗体反応によって惹起されることが知られている (Barbu *et al.*, 2010; Barker *et al.*, 1999; Frossi *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2015; Nam *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2016; Okabe *et al.*, 2006; Uozumi *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000)。そこで抗原抗体反応による BMMCs の Syk、Gab2、

p38、Erk のリン酸化に対する PerD の影響を検討した。

薬物非添加群において Syk のリン酸化は抗原添加 30 秒後で強く検出され、180 秒後まで続いていた。一方、10 μ M PerD 添加群での Syk のリン酸化は 30 秒後でわずかに検出され、180 秒後には検出されなかった。薬物非添加群において Gab2、p38、Erk のリン酸化は抗原添加 30 秒後で検出され始め、180 秒後にはさらに強く検出された。10 μ M PerD 添加群でも薬物非添加群と同じように Gab2、p38、Erk のリン酸化は検出された (Figure 19)。

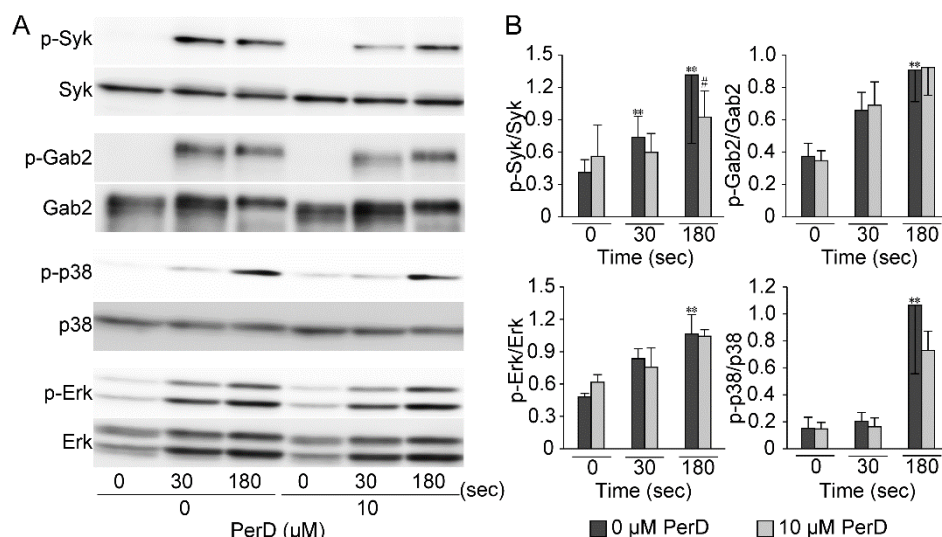


Figure 19 抗原抗体反応によって惹起される BMMCs のタンパク質のリン酸化に対する PerD の影響

IgE 感作した BMMCs に PerD を 1 時間暴露した後、細胞を洗浄し、抗原添加 30 または 180 秒後に反応を停止させ、Syk、Gab2、p38、Erk のリン酸化の経時的変化を Western blot 法にて検討した。Western blot 法での独立した 3-5 例の実験のうち、代表的なデータを示す (A)。各タンパク質のリン酸化の割合はデンストメトリーで測定した (B)。n = 3-5. **: $p < 0.01$ vs. 0 s. 0 μ M PerD group, #: $p < 0.01$ vs. 180 s. 0 μ M PerD group.

3 - 2 BMMCs の表面に発現する Fc ϵ RI と IgE の結合に対する PerD の影響

次に、BMMCs の表面に発現する Fc ϵ RI と IgE の結合に対する PerD の影響を検討すべく、BMMCs を IgE で感作し、BMMCs の表面に発現している Fc ϵ RI に結合している IgE 量を FITC 標識 anti-IgE Abs で染色し検出した。

IgE 感作 BMMCs を FITC 標識 anti-IgE Abs で染色した control 群の蛍光強度は、FITC

標識 anti-IgE Abs で染色していない negative control 群と比較して 10 倍以上上昇した。この結果は、IgE 感作によって BMMC の FcεRI に IgE が結合したことを示している。また、PerD 添加群も、control 群と同様の蛍光強度を示した。この結果は、control 群と PerD 群の両方で FcεRI に同程度の IgE が結合していることを示している。したがって、PerD は FcεRI と IgE の結合に影響しないことが明らかとなった。

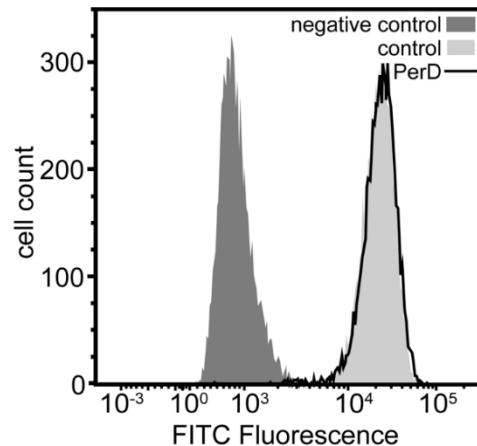


Figure 20 BMMCs の表面に発現する FcεRI と IgE の結合に対する PerD の影響

IgE 感作した BMMCs に PerD を 1 時間暴露した後、細胞を洗浄し、FITC 標識抗 IgE 抗体で染色した。Flow cytometry 法にて蛍光強度を検出し、BMMCs に結合している IgE 量を比較検討した。Flow cytometry 法のヒストグラムは独立した 5 例の実験のうち、代表的なデータを示す。

4 考察

PerD は FcεRI と IgE の結合に影響することなく (Figure 20)、また、抗原抗体反応による BMMCs の Gab2、p38、Erk のリン酸化に影響せずに、Syk のリン酸化を減少させた (Figure 19)。Wang ら (2018) は、Syk 阻害剤がマスト細胞の IgE 依存性脱顆粒を阻害することを報告した。また、Zhang ら (1996) は、Syk 陰性変異体のラット好塩基性白血球細胞において、FcεRI の架橋による脱顆粒が抑制されるが、遺伝子導入による Syk 再構成により回復することを示した。さらに、Nam ら (2017) は、Syk のリン酸化の阻害が IgE 依存性マスト細胞の脱顆粒を無効にすること報告した。したがって、PerD は抗原抗体反応による BMMCs の Gab2、p38、Erk のリン酸化ではなく、Syk のリン酸化を抑制することで、BMMCs の脱顆粒を抑制し、ヒスタミンの遊離を抑制する傾向を示すと考えられた。

第四節 PerD の標的タンパク質の検討

1 目的

第二章 第三節の検討によって、PerD は FcεRI と IgE の結合に影響することなく、抗原抗体反応によるマスト細胞の Syk のリン酸化を抑制することが明らかとなり、Syk のリン酸化につながる細胞内情報伝達を担うタンパク質を標的とする可能性が示された。Syk のリン酸化は SFK の Fyn や Hck、Lyn が重要な役割を果たしている。Fyn や Hck を欠損させたマスト細胞において、抗原抗体反応による Syk のリン酸化が減少し、脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離が抑制されることが報告されている (Barbu *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2007; Parravicini *et al.*, 2002)。一方で、Lyn を欠損させたマスト細胞において、抗原抗体反応による Syk のリン酸化は減少するが、脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離は増加すると報告されている (Xiao *et al.*, 2005)。この報告は PerD が抗原抗体反応による BMDCs の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離を抑制する傾向を示した結果と異なる。そこで、第二章 第四節では PerD が Fyn や Hck を阻害する可能性を検討し、PerD の標的を予想することを目的とした。

2 実験方法

2-1 ドッキングシミュレーションでの Fyn および Hck と PerD の結合の可能性の検討

GOLD 5.6 software (The Cambridge Crystallographic Data Centre) のデフォルト設定で Fyn または Hck と PerD のドッキングシミュレーションを行った (Jones *et al.*, 1997)。Protein Data Bank (PDB) にヒト Fyn 構造やヒト Hck 構造は報告されているが、マウス Fyn 構造およびマウス Hck 構造は報告されていない。ヒト Fyn とマウス Fyn の報告されているアミノ酸残基の違いは1つだけであり、ヒト Fyn の asparagine (Asn) 346 はマウス Fyn の serine (Ser) 残基に置換されている。ヒト Fyn の Asn346 と同じようにマウス Fyn の Ser 残基は親水性であり、溶媒にさらされるため、Fyn の立体構造に影響を与えないと予想された。ヒト Hck とマウス Hck は、そのため、報告されているヒト Fyn キナーゼドメインの結晶構造 (PDB ID: 2DQ7)、ヒト Hck キナーゼドメインの結晶構造 (PDB ID: 5H09)

をもとに、SWISSMODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) の相同性モデリングによってマウス Fyn およびマウス Hck の立体構造を構築した。構築したマウス Fyn 立体構造には Fyn 阻害剤の Staurosporin を、マウス Hck 立体構造には Hck 阻害剤の RK-21058 を含んでいるため、PerD と Fyn または Hck のドッキングシミュレーション前に各阻害剤構造を除去し、水素原子は Hermes (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/>) を用いて計算により追加した。2DQ7 または 5H09 におけるリガンドの中心をリガンド結合部位の中心と定義し、10.0 Å とした。リガンド構造は Gaussian 16 を用いて B3LYP/6-31+G(d,p) (Frisch *et al.*, 2016) で最適化した。

3 結果

3-1 PerD の Fyn 阻害の可能性

PerD が Fyn を阻害する可能性について検討すべく、Fyn のキナーゼ活性を阻害することが報告されている staurosporine および PerD それぞれとマウス Fyn モデルとの複合体構造を比較した。

マウス Fyn と staurosporine の複合体構造では、Fyn のキナーゼドメイン内で staurosporine は安定化した。Fyn のキナーゼドメイン内の methionine (Met) 345 のアミド結合を形成する主鎖の NH、glutamic acid (Glu) 343 の側鎖の酸素原子と staurosporine のラクタム環に加え、alanine (Ala) 394 のアミド結合の酸素原子との間に水素結合を形成した (Table 2)。

Table 2 Fyn と staurosporine および PerD の水素結合

Fyn と各化合物との水素結合					
ligand 化合物	ドナー アミノ酸 ・化合物	原子	アクセプター アミノ酸 ・化合物	原子	ドナーとアクセプターの距離 (Å)
staurosporine	ligand	N	Glu343	O	2.9
	Met345	N	ligand	O	3.0
	ligand	N	Ala394	O	2.9
PerD	Met345	N	ligand	O	2.6
	ligand	O	Met345	O	3.1

さらに、Fyn のキナーゼドメインを構成するアミノ酸の leucine (Leu) 277、valine (Val)

285、Ala297、lysine (Lys) 299、Val327、Leu397 の炭素鎖は staurosporine と疎水性相互作用を示す向きに計算された (Figure 21A)。

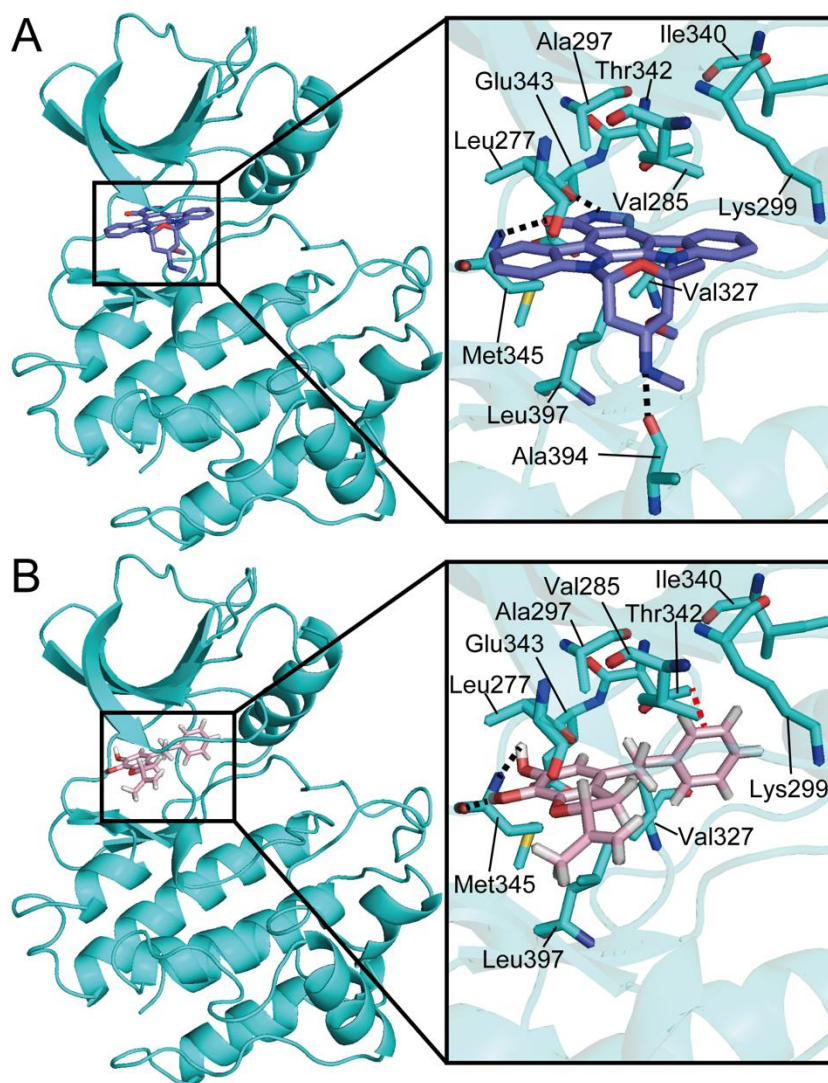


Figure 21 Fyn と Fyn 阻害剤 staurosporine または PerD とのドッキング構造

Fyn キナーゼドメインと Fyn 阻害剤 staurosporine および PerD の立体異性体構造との計算されたドッキング構造を示す。Fyn 阻害剤 staurosporine (A)、PerD (B) と Fyn のドッキング構造において相互作用するアミノ酸残基における酸素、窒素、硫黄原子は赤、青、黄色で示し、スタッキング、水素結合はそれぞれ赤、黒の点線で示している。また、化合物の水素原子は白色で示している。

また、マウス Fyn モデルと PerD の構造において、PerD も Fyn のキナーゼドメイン内に安定に結合すると考えられた (Figure 21B)。PerD も staurosporine と同様に Met345 との間に水素結合を形成したが、PerD は主鎖の NH に加え、酸素原子とも水素結合を形成した (Table 4)。また、Leu277、Val285、Ala297、Lys299、Val327、Leu397 の炭素鎖に加

え、isoleucine (Ile) 340、threonine (Thr) 342 の炭素鎖も PerD と疎水性相互作用していた (Figure 21B)。さらに、staurosporine とは異なり、PerD のベンゼン環と Fyn の Thr342 の炭素鎖は CH- π スタッキングを形成すると計算された (Table 3)。一方、staurosporine では水素結合を形成した Glu343、Ala394 と PerD は水素結合を形成しなかった。これらの相互作用によって PerD は Fyn キナーゼドメインの staurosporine と同様な位置に安定化すると考えられた。

Table 3 Fyn と PerD のスタッキング

Fyn と各化合物とのスタッキング		
ligand 化合物	スタッキングの種類	相互作用するアミノ酸
PerD	CH- π	Thr342

3 - 2 PerD の Hck 阻害の可能性

PerD が Hck を阻害する可能性について検討すべく、Hck 阻害剤の RK-21058 および PerD それぞれとマウス Hck モデルとの複合体構造を比較した。

Table 4 Hck と RK-21058 および PerD との水素結合

Hck と各化合物との水素結合					
ligand 化合物	ドナー アミノ酸 ・化合物	原子	アクセプター アミノ酸 ・化合物	原子	ドナーとアクセ プターの距離 (Å)
RK-21058	Ala268	N	ligand	O	3.4
	ligand	N	Thr331	O	3.1
	ligand	N	Glu332	O	3.0
	ligand	N	Met334	N	3.0
	ligand	N	Asp341	O	3.0
PerD	Met334	N	ligand	O	2.5
	ligand	O	Met334	O	2.8

マウス Hck モデルと RK-21058 の複合体構造では、Hck のキナーゼドメイン内で RK-21058 は安定化した。Hck のキナーゼドメイン内の Met334 のアミド結合を形成する主鎖の NH、Glu332 および Thr331 の側鎖の酸素原子と RK-21058 の pyrrolo-pyrimidine 環およびアミノ基の 2 つの窒素原子との間に 3 つの水素結合を形成した。また、シクロヘキサンに結合する Leu 主鎖の NH および酸素原子と Ala268 および aspartic acid (Asp) 341 の間にも水素結合を形成した (Table 4)。さらに、Hck のキナーゼドメインを構成するアミ

ノ酸である Leu266、Val274、Lys288、Val316、Leu318、Ile329、Thr331、Leu386、Asp397 の炭素鎖は RK-21058 と疎水性相互作用していた (Figure 22A)。

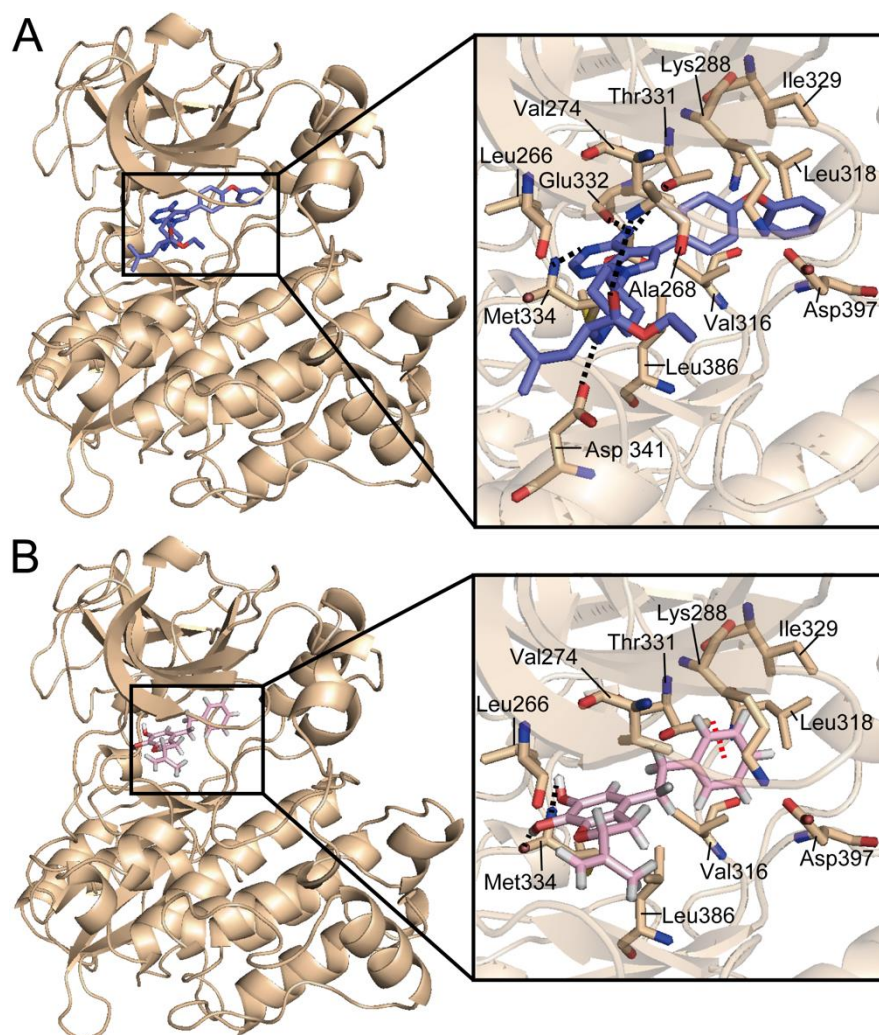


Figure 22 Hck と Hck 阻害剤 RK-21058 または PerD とのドッキング構造

Hck キナーゼドメインと RK-21058 および PerD の立体異性体構造との計算されたドッキング構造を示す。RK-21058 (A)、PerD (B) と Hck のドッキング構造において相互作用するアミノ酸残基における酸素、窒素、硫黄原子は赤、青、黄色で示し、スタッキング、水素結合はそれぞれ赤、黒の点線で示している。また、化合物の水素原子は白色で示している。

また、マウス Hck モデルと PerD の複合体構造において、Hck のキナーゼドメイン内で安定化すると考えられた。PerD の 2 つの水酸基と Hck の Met334 の主鎖の NH と酸素原子との間に水素結合を、PerD のベンゼン環と Hck の Thr331 の炭素鎖との間に CH- π スタッキングを形成すると計算された (Table 4, 5)。一方で、RK-21058 と Hck の Ala268、Glu332、Asp341 との間の水素結合は PerD では形成されなかった。また、RK-21058 と同じ Leu266、Val274、Lys288、Val316、Leu318、Ile329、Thr331、Leu386、Asp397 の炭素

鎖とも疎水性相互作用していた (Figure 22B)。これらの相互作用によって PerD は Hck のキナーゼドメイン内に安定化するが、RK-21058 と比較してキナーゼドメイン奥まで入り込んでいなかった。

Table 5 Hck と PerD とのスタッキング

Hck と各化合物とのスタッキング		
ligand 化合物	スタッキングの種類	相互作用するアミノ酸
PerD	CH- π	Thr331

4 考察

Fyn 阻害剤 staurosporine は、Fyn キナーゼドメインの溝を構成する Glu343 と Met345 との間に水素結合を形成し、Leu277、Val285、Ala297、Gly348、Leu391 との疎水性相互作用によって結合することが報告されている (Kinoshita *et al.*, 2006)。これらの水素結合と疎水性残基は、staurosporine が Fyn のキナーゼ活性を阻害するために重要である。また、検討したマウス Fyn キナーゼドメインのモデルと PerD では Met345 の主鎖の酸素原子および NH と水素結合を形成した。加えて、PerD は staurosporine と共通の Leu277、Val285、Ala297、Leu397 を含む疎水性残基に挟まれていた。さらに、PerD は Thr 342 と CH- π スタッキングを形成していた。これらの相互作用によって、PerD は staurosporine と同様のキナーゼドメインの溝に入り込んでいた。以上の結果から、PerD は Fyn を阻害する可能性が示された。

一方、Hck 阻害剤 RK-21058 は Hck キナーゼドメインの溝を構成する Ala275、Met341、Glu339 との水素結合と Asp348 とのイオン結合によって結合することが報告されている (Yuki *et al.*, 2017)。これらの水素結合は RK-21058 が Hck のキナーゼ活性を阻害するために重要である。また、検討したマウス Hck キナーゼドメインのモデルと PerD では Met334 の主鎖の酸素原子および NH と水素結合を形成した。加えて、Thr331 との CH- π スタッキングを形成した。しかし、PerD は Hck キナーゼドメイン内での位置は、RK-21058 と比べ入り込んでおらず、PerD は Hck を阻害する可能性は低いと考えられた。

第五節 小括

本章では、ビベンジル化合物である PerD がマスト細胞の細胞内情報伝達を担うタンパク質を標的とし、抗原抗体反応によって活性化したマスト細胞からのメディエーターの遊離を抑制する抗アレルギー薬の候補化合物になるかを検討した。

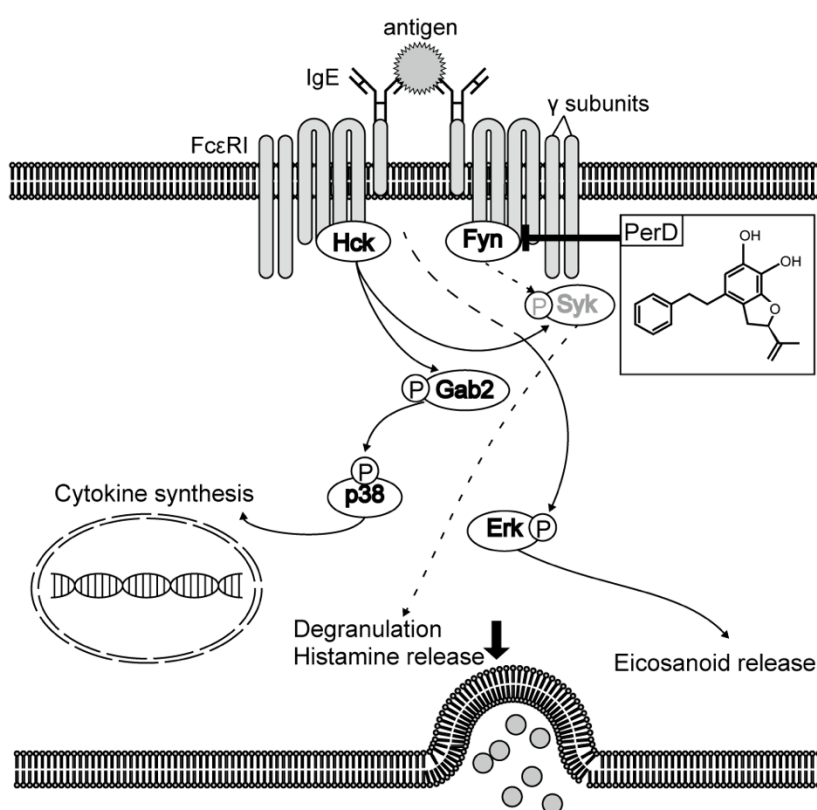


Figure 23 推定される PerD の抗原抗体反応によるマスト細胞の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離抑制のメカニズム

PerD は、抗原抗体反応による Syk のリン酸化を抑制すると同時に、BMMCs からの脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離を抑制する傾向を示した。また、PerD は Syk のリン酸化に重要な SFK の Hck ではなく Fyn を阻害すると予想された。Fyn の欠損は Syk のリン酸化を抑制することや、脱顆粒を 1/3 程度に低下させることが報告されている (Parravicini *et al.*, 2002)。したがって、PerD は Fyn を阻害することで、抗原抗体反応による Syk のリン酸化を抑制し、脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離を抑制する傾向を示すと推察された。また、少なくとも Syk のリン酸化は抗原抗体反応によるマスト細胞からの脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離を抑制するための標的となり得ると考えられた。

一方で、PerD は抗原抗体反応による Gab2、p38、Erk のリン酸化と BMMCs からの IL-4 および LTB₄ の遊離に影響しなかった。Gab2 を減少させると p38 のリン酸化が減少し (Barbu *et al.*, 2010; Frossi *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2001)、さらに p38 のリン酸化を減少させると抗原抗体反応によるマスト細胞から IL-4 の遊離が減少する (MacNeil *et al.*, 2011)。また、リン酸化 Erk を減少させると抗原抗体反応によるマスト細胞からの LTB₄ の遊離が減少する (Okabe *et al.*, 2006)。したがって、PerD は抗原抗体反応による Gab2、p38、Erk のリン酸化に影響しないため、BMMCs からの IL-4 や LTB₄ の遊離を抑制しないと考えられた。IL-4 は気管支のムチン産生増加や気道収縮の促進、慢性的な瘙痒感を引き起こし (Ryan, 1997; Wills-Karp, 1999)、LTB₄ は鼻粘膜の腫脹、気道の炎症、Th2 型免疫応答の増加を引き起こす (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980; Samuelsson *et al.*, 1987; Carion *et al.*, 2022)。そのため、アレルギーの治療において、ヒスタミンだけでなく、IL-4 や LTB₄ の誘発するアレルギー症状の抑制も重要である。しかし、PerD は IL-4 や LTB₄ の誘発するアレルギー症状を抑制しないと予想されることから、抗アレルギー薬の候補化合物ではないと考えられた。

そこで、次に第三章では、抗炎症作用や抗アレルギー作用を目的に用いられてきた薬用植物に含まれる KA が、抗原抗体反応による BMMCs の活性化に及ぼす影響を調査することで、マスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とする抗アレルギー薬の候補化合物となる可能性を検討した。

第三章 KA のマスト細胞での標的タンパク質とメディエーター遊離への影響

第一節 序説

Rabdosia excisa (Maxim.) H.Hara と *Rabdosia japonica* (Brum.) H.Hara は胃痛、発熱、関節炎、傷、腫れ、蛇や虫刺されなどの治療に中国の伝統的な民間薬や日本の生薬として、広く使用されている (Chang *et al.*, 2018; Lim *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2006; Takeda and Otsuka, 1995)。各植物の粗抽出物は、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) の阻害や抗原抗体反応によるマスト細胞からのヒスタミン遊離と TNF- α 産生抑制によって、抗炎症作用や抗アレルギー作用を示すことが報告されている (Hwang *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2015)。これらの報告は、両植物の抽出物に抗炎症活性や抗アレルギー活性を持つ化合物が含まれていることを強く示唆しており、両植物に共通する化合物として *ent*-kaurane diterpenoid の KA (Figure 24) が存在する (Sun *et al.*, 1981; Wu *et al.*, 2012)。

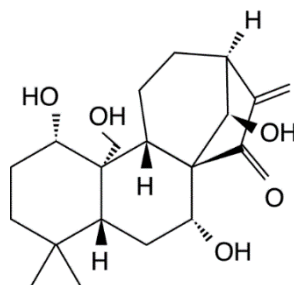


Figure 24 KA の構造

Rabdosia excisa や *Rabdosia japonica* に共通する成分である KA の構造を示す。

KA は、TGF- β 活性化キナーゼ 1 や p50 サブユニットに直接結合し、p38、c-Jun N 末端キナーゼ、I κ B、NF- κ B などのタンパク質の活性化を阻害することで、TNF- α や炎症性サイトカイン、PGE₂ 産生の減少、好中球の動員と活性化の減少を介して、抗炎症作用を示すと報告されている (Kim *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005)。

そこで第三章では、抗原抗体反応による BMBCs の活性化に対する KA の影響を調査することで、KA がマスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とする抗アレルギー薬の候補化合物となる可能性を検討した。

第二節 KA のメディエーター遊離への効果

1 目的

抗原抗体反応によって活性化されたマスト細胞はヒスタミンなどのメディエーターを遊離し、種々のアレルギー症状を引き起こす (Benedé and Berin, 2018; Nakamura and MacGlashan, 1994; Simons, 2004; Thurmond *et al.*, 2008;). そこで、第三章 第二節では、抗原抗体反応による BMMC の脱顆粒に伴うヒスタミン、IL-4、LTB₄ および Cys-LTs の遊離に対する KA の影響を検討し、KA が抗アレルギー活性を示す可能性を明らかにすることを目的とした。

2 実験方法

2-1 実験動物

金城学院大学動物実験委員会から承認を受けた (承認番号 179) 後、雄性の C57BL/6 マウスを日本 SLC (Tokyo, Japan) から購入した。金城学院大学実験動物教育研究施設にて 1 週間順化させた後、これらマウスの大腿骨および下腿骨から骨髓細胞を採取した。使用した実験動物の飼育方法は第一章 第四節「2-1 実験動物」と同様に行った。

2-2 BMMCs の培養方法

使用した BMMCs は第一章 第四節「2-2 BMMCs の培養方法」と同様の方法を用いて作製した。

2-3 PI 染色を用いた Flow cytometry 法および TB 染色を用いた計数法による KA の BMMCs への毒性の検討

Flow cytometry 法および計数法どちらも、10、30、100、300 μ M KA とともに BMMCs を 37 °C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベートした。Flow cytometry 法及び計数法は、第二章 第二節「2-4 PI 染色を用いた Flow cytometry 法および TB 染色を用いた計数法による PerD の BMMCs への毒性の検討」と同様の方法で生細胞率を算出した。

2-4 BMMCs への KA の暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化

250 ng/mL anti-DNP IgE (Sigma) と BMMCs を 37 °C、5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベートして IgE 感作 BMMCs を作成した。10、30 μM KA と IgE 感作 BMMCs を 37 °C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベートした。その後、BMMCs を 1% FBS (Equitech Bio Inc.) 含有 RPMI1640 (Fujifilm-Wako) で洗浄し、1% FBS (Equitech Bio Inc) 含有 RPMI1640 (Fujifilm-Wako) または RPMI1640 (Fujifilm-Wako) に懸濁した。その後、BMMCs を 10 ng/mL DNP-HSA (Sigma) で活性化した (Fukuishi *et al.*, 2013, Kataoka *et al.*, 2015)。Epn を暴露したマスト細胞では脱顆粒率およびヒスタミン遊離率の低下が報告されていたため (Galatowicz *et al.*, 2007)、対照群として用いた。すなわち、IgE 感作 BMMCs を 100 μM Epn (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) と 37 °C で 1 時間インキュベートした後、10 ng/mL DNP-HSA (Sigma) で BMMCs を活性化した。Dex を暴露した BMMCs では IL-4 の遊離量の低下が報告されていたため (Kim *et al.*, 2017)、対照群として用いた。すなわち、IgE 感作 BMMCs を 1 μM Dex (Fujifilm-Wako) と 37 °C で 24 時間インキュベートした後、10 ng/mL DNP-HSA (Sigma) で BMMCs を活性化した。MK886 (MK) を暴露したマスト細胞では LTB₄ 及び Cys-LTs の遊離量の低下が報告されていたため (Malaviya *et al.*, 1993; Takasugi *et al.*, 2018)、対照群として用いた。すなわち、IgE 感作 BMMCs を 30 μM MK (Fujifilm-Wako) と 37 °C で 1 時間インキュベートした後、10 ng/mL DNP-HSA (Sigma) で BMMCs を活性化した。

2-5 β-hexosaminidase 活性を用いた脱顆粒率の評価

第三章 第二節「2-4 BMMCs への KA の暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」で活性化した 1×10^5 cells の BMMCs を 800 × g、5 分間、4 °C で遠心分離して、上清と沈渣をそれぞれ分取した。沈渣に 1% Triton X-100 (Sigma) を添加後、凍結融解を繰り返して、細胞を溶解させた。上清および沈渣の β-hexosaminidase 活性は第一章 第四節「2-4 抗原抗体反応による BMMCs のヒスタミン遊離率および脱顆粒率の算出」に記載した方法にて解析した。脱顆粒率は、全 β-hexosaminidase 活性に対する上清中の β-hexosaminidase 活性の割合で算出した。

2-6 DDH を用いたヒスタミン遊離率の評価

第三章 第二節「2-4 PerD の BMMCs への暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」で活性化した 2×10^5 cells の BMMCs を $800 \times g$ 、5 分間、 4°C で遠心分離して、上清と沈渣をそれぞれ分取した。沈渣に 1% Triton X-100 (Sigma) を添加後、凍結融解を繰り返し、細胞を溶解させた。上清および沈渣のヒスタミン量は第一章 第四節「2-3 BMMCs 中のヒスタミンのダンシル誘導体化と DDH の検出によるヒスタミン定量」に記載した方法で定量した。ヒスタミン遊離率は、全ヒスタミン量に対する上清中のヒスタミン量の割合で算出した。

2-7 ELISA 法を用いた IL-4 の遊離量の測定

第三章 第二節「2-4 BMMCs への KA の暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」で活性化した 1.5×10^6 cells の BMMCs を $800 \times g$ 、5 分間、 4°C で遠心分離して、上清を分取した。上清の IL-4 は、ELISA kit (Ray Biotech) を用いて測定した。mouse anti-IL-4 Ab をコーティングされた 96 ウェルプレートのウェルに加え、室温で 2 時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファーで洗浄した後、biotinylated anti-mouse IL-4 Ab を加え、室温で 1 時間インキュベートした。洗浄後、HRP-conjugated streptavidin を加え、45 分間インキュベートした。洗浄後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution をウェルに添加し、10 分間インキュベートした後、 H_2SO_4 を添加して反応を停止させた。吸光度は、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて 450 nm で測定した。

2-8 ELISA 法を用いた LTB₄ および Cys-LTs の遊離量の測定

第三章 第二節「2-4 BMMCs への KA の暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」で活性化した 2.5×10^4 cells の BMMCs を $800 \times g$ 、5 分間、 4°C で遠心分離して、上清を分取した。上清中の LTB₄ と Cys-LTs の濃度は、ELISA kit (Cayman Chemical) を用いて測定した。上清に AChE-conjugated LTB₄ または Cys-LTs を混合し、anti-LTB₄ または anti-Cys-LTs Ab をコーティングした 96 ウェルプレートのウェルに添加し、 4°C で一晩インキュベートした。96 ウェルプレートを洗浄後、エルマン試薬を加えて 2 時間インキュベートし、反応液の 412 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で測定し、

AChE 活性を解析することで細胞あたりの LTB₄ および Cys-LTs の遊離量を算出した。

2-9 統計処理

「2-3 PI 染色を用いた Flow cytometry 法および TB 染色を用いた計数法による KA の BMMCs への毒性の検討」、「2-5 β -hexosaminidase 活性を用いた脱顆粒率の評価」、「2-6 DDH を用いたヒスタミン遊離率の評価」、「2-7 ELISA 法を用いた IL-4 の遊離量の測定」および「2-8 ELISA 法を用いた LTB₄ および Cys-LTs の遊離量の測定」のデータの統計処理はそれぞれ第一章 第三節「2-3 統計処理」に記載した方法によって実施した。

3 結果および考察

3-1 BMMCs に対する KA の毒性の評価

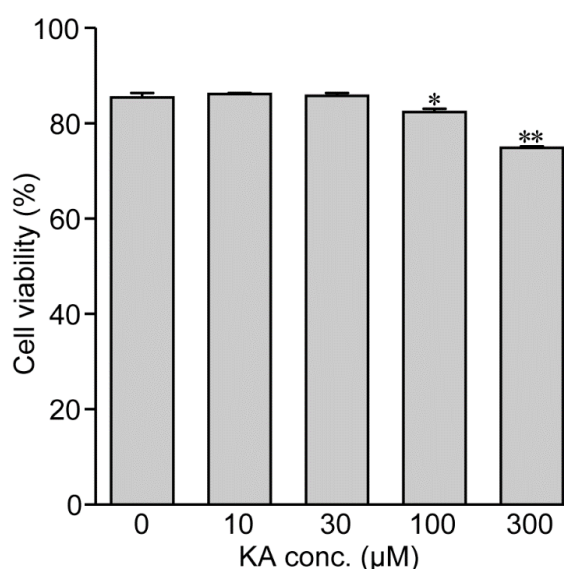


Figure 25 PI 染色を用いた Flow cytometry 法による BMMCs に対する KA の毒性の評価

100 または 300 μ M KA 添加群の生細胞率は薬物非添加群と比較して有意に低下したが、10 または 30 μ M KA 添加群の生細胞率は薬物非添加群と比較して有意な差はなかった。n = 3, *: $p < 0.05$ vs. control, **: $p < 0.01$ vs. control.

抗原抗体反応による BMMCs からのメディエーターの遊離に対する KA の影響を検討すべく、まず BMMCs に対する KA の毒性について検討した。

Flow cytometry 法では、10 または 30 μ M KA 添加群の生細胞率はそれぞれ $86.4 \pm 0.41\%$ 、

86.0 ± 0.57%であり、薬物非添加群での生細胞率の 85.7 ± 0.74%と比較して、有意な差はなかった。一方で、100 または 300 μM KA 添加群の生細胞率はそれぞれ 82.6 ± 0.69%、75.1 ± 0.32%であり、薬物非添加群と比較し有意に低下した (Figure 25)。

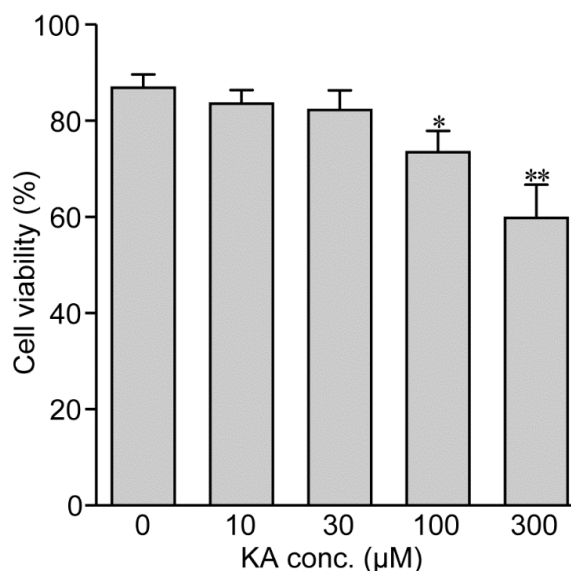


Figure 26 TB 染色を用いた計数法による BMMCs に対する KA の毒性の評価

100 または 300 μM KA 添加群の生細胞率は薬物非添加群と比較して有意に低下したが、10 または 30 μM KA 添加群の生細胞率は薬物非添加群と比較して有意な差はなかった。n = 7, *: $p < 0.05$ vs. control, **: $p < 0.01$ vs. control.

計数法でも同じように 10 または 30 μM KA 添加群の生細胞率はそれぞれ 83.5 ± 2.85%、82.2 ± 4.09%であり、薬物非添加群での生細胞率の 86.8 ± 2.76%と比較して、有意な差はなかった。一方で、100 または 300 μM KA 添加群の生細胞率はそれぞれ 73.4 ± 4.42%、59.8 ± 6.91%であり、薬物非添加群と比較し有意に低下した (Figure 26)。したがって、30 μM までの KA は BMMCs に毒性を示さないことが明らかとなった。

3-2 抗原抗体反応による BMMCs の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離に対する KA の影響

次に、抗原抗体反応による BMMCs の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離に対する KA の影響を検討した。

抗原を添加した薬物非添加群の脱顆粒率は $34.2 \pm 2.9\%$ であり、抗原を添加していない群と比べ有意に上昇した。10、30 μM KA 添加群の脱顆粒率はそれぞれ $18.3 \pm 4.6\%$ 、 $1.96 \pm 0.49\%$ であり、脱顆粒率の低下は添加した KA の濃度に依存していた (Figure 27A)。

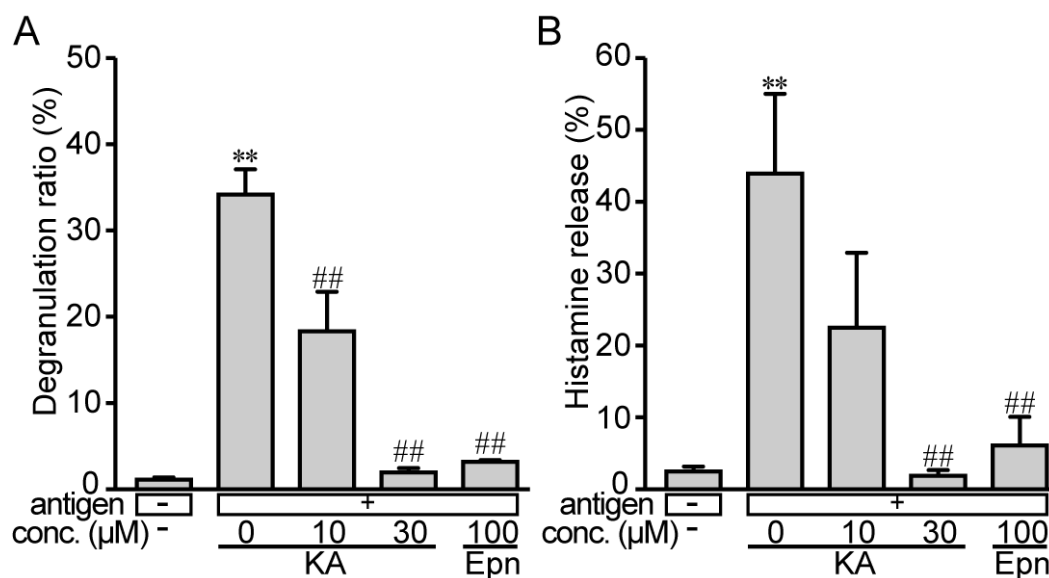


Figure 27 抗原抗体反応による BMMCs の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離に対する KA の影響

IgE 感作した BMMCs に KA または Epn を 1 時間暴露した後、細胞を洗浄し、抗原を添加した。脱顆粒率は培地中及び細胞中の β -hexosaminidase 活性を用いて評価した (A)。ヒスタミン遊離率は培地中及び細胞中のヒスタミン量を HPLC-FD で測定し評価した (B)。Epn は epinastine を示す。n = 3–9. **: $p < 0.01$ vs. without antigen challenge and without compound treatment. #: $p < 0.01$ vs. antigen challenge.

抗原を添加した薬物非添加群のヒスタミン遊離率は $43.9 \pm 11.1\%$ と抗原を添加していない群と比べ有意に上昇した。10 μM KA 添加群のヒスタミン遊離率は $22.5 \pm 10.4\%$ と低下傾向を示した。30 μM KA 添加群のヒスタミン遊離率は $1.89 \pm 0.77\%$ であり、薬物非添加群と比べ有意に低下した (Figure 27B)。なお、Epn 添加群の脱顆粒率およびヒスタミン遊離率はそれぞれ $3.18 \pm 0.19\%$ 、 $6.08 \pm 3.99\%$ と薬物非添加群と比べ有意に低下していた。したがって、KA は抗原抗体反応による BMMCs の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離を抑制することが明らかとなった。

3-3 抗原抗体反応による BMMCs からの IL-4 の遊離に対する KA の影響

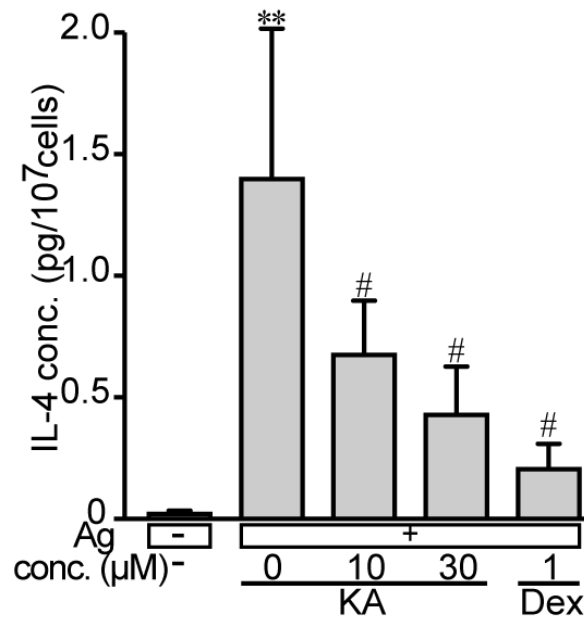


Figure 28 抗原抗体反応による BMMCs からの IL-4 の遊離に対する KA の影響

IgE 感作した BMMCs に KA を 1 時間または Dex を 24 時間暴露した後、細胞を洗浄し、抗原を添加した。IL-4 の遊離量は培地中の IL-4 の濃度を ELISA kit (Ray Biotech) を用いて測定し、評価した。Dex は dexamethasone を示す。n = 7. **: $p < 0.01$ vs. without antigen challenge and without compound treatment. #: $p < 0.05$ vs. antigen challenge.

次に、抗原抗体反応による BMMCs からの IL-4 の遊離に対する KA の影響を検討した。

抗原を添加した薬物非添加群の IL-4 の遊離量は 1.40 ± 0.62 pg/10⁷ cells であり、抗原を添加していない群と比べ有意に上昇した。また、10、30 μM KA 添加群の IL-4 の遊離量はそれぞれ 0.67 ± 0.22 pg/10⁷ cells、 0.43 ± 0.20 pg/10⁷ cells であり、薬物非添加群と比較して有意に低下した。なお、Dex 添加群での IL-4 の遊離量は 0.20 ± 0.10 pg/10⁷ cells であり、薬物非添加群と比べ有意に低下した (Figure 28)。

したがって、KA は抗原抗体反応による BMMCs からの IL-4 の遊離を抑制することが明らかとなった。

3-4 抗原抗体反応による BMMCs からの LTB₄ および Cys-LTs の遊離に対する KA の影響

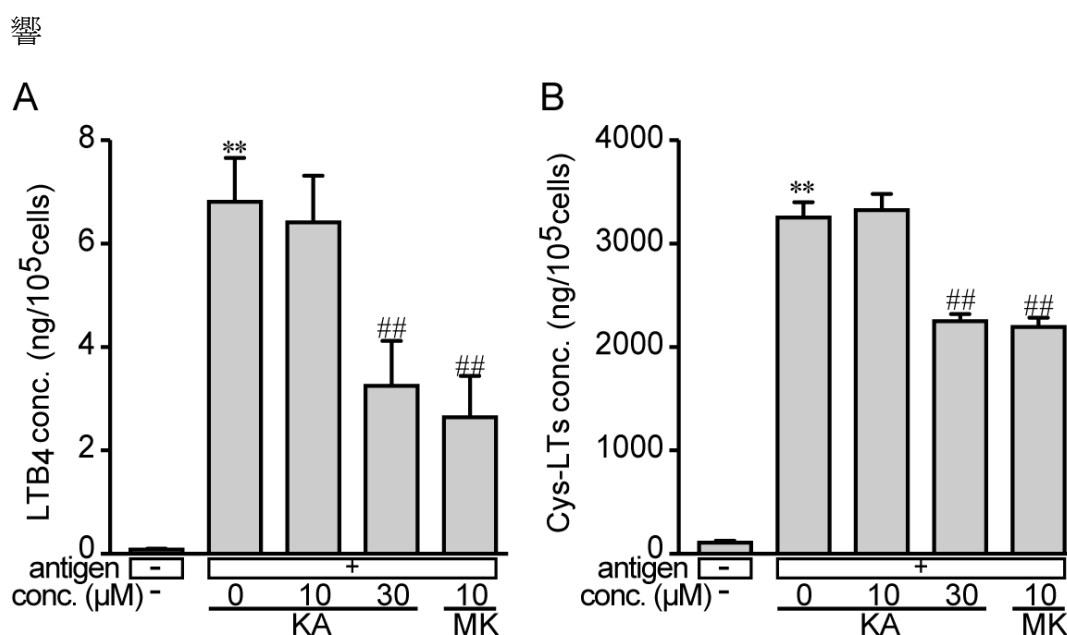


Figure 29 抗原抗体反応による BMMCs からの LTB₄ および Cys-LTs 遊離に対する KA の影響

IgE 感作した BMMCs に KA または MK を 1 時間暴露した後、細胞を洗浄し、抗原を添加した。LTB₄ (A) および Cys-LTs (B) の遊離量は培地中の LTB₄ および Cys-LTs の濃度を ELISA kit (Cayman Chemical) を用いて測定し、評価した。MK は MK886 を示す。n = 4-6. **: $p < 0.01$ vs. without antigen challenge and without compound treatment. #: $p < 0.01$ vs. antigen challenge.

次に、抗原抗体反応による BMMCs からの LTB₄ および Cys-LTs の遊離に対する KA の影響を検討した。

抗原を添加した薬物非添加群の LTB₄ および Cys-LTs の遊離量はそれぞれ $6.81 \text{ ng} \pm 0.85 \text{ ng/10}^5 \text{ cells}$ 、 $3,252 \text{ ng} \pm 153 \text{ ng/10}^5 \text{ cells}$ であり、抗原を添加していない群と比べ有意に上昇した。10 μM KA 添加群の LTB₄ および Cys-LTs の遊離量はそれぞれ $6.41 \text{ ng} \pm 0.90 \text{ ng/10}^5 \text{ cells}$ 、 $3,252 \text{ ng} \pm 153 \text{ ng/10}^5 \text{ cells}$ であり薬物非添加群とそれぞれ同程度であった。一方、30 μM KA 添加群の LTB₄ および Cys-LTs の遊離量はそれぞれ $3.25 \text{ ng} \pm 0.87 \text{ ng/10}^5 \text{ cells}$ 、 $2,248 \text{ ng} \pm 69.5 \text{ ng/10}^5 \text{ cells}$ であり薬物非添加群と比べ、いずれも有意に低下した。

なお、LTB₄ だけでなく Cys-LTs の遊離も抑制することが知られる MK で処理した BMMCs の場合、LTB₄ および Cys-LTs の遊離量はそれぞれ $2.64 \pm 0.80 \text{ pg/10}^5 \text{ cells}$ 、 $2,195 \text{ ng} \pm 64.5 \text{ ng/10}^5 \text{ cells}$ であり、薬物非添加群と比べ有意に低下した (Figure 29)。

したがって、30 μ M KA は抗原抗体反応による BMMC s からの LTB₄ および Cys-LTs の遊離を抑制することが明らかとなった。

第三節 KA の細胞内情報伝達系への効果

1 目的

抗原抗体反応による BMMCs からのメディエーターの遊離は、BMMCs の表面に発現する FcεRI に結合した IgE と抗原の結合をきっかけに、細胞内情報伝達を担うタンパク質の活性化を経て惹起されることが知られている (Barbu *et al.*, 2010; Burd *et al.* 1989; Nishizumi and Yamamoto, 1997; Schwartz *et al.* 2017; Velez *et al.*, 2018)。第三章 第二節において、KA は抗原抗体反応による BMMCs からのメディエーターの遊離を抑制した。このメカニズムを解明すべく、第三章 第三節では、抗原抗体反応による細胞内情報伝達を担うタンパク質のリン酸化、FcεRI と IgE および IgE と抗原の結合に対する KA の影響を検討した。

2 実験方法

2 - 1 Western blot 法を用いた細胞内情報伝達関連タンパク質リン酸化の検出

第三章 第二節「2 - 4 BMMCs への KA の暴露と抗原抗体反応による BMMCs の活性化」と同じ方法で活性化した BMMCs を第二章 第三節「Western blot 法を用いた細胞内情報伝達関連タンパク質リン酸化の検出」で記載した方法にて、Syk、Gab2、p38、Erk の経時的なリン酸化の変化を検出した。

2 - 2 Flow cytometry 法を用いた BMMCs 表面発現 FcεRI 結合 IgE 量の解析

250 ng/mL anti-DNP IgE (Sigma) とともに 24 時間インキュベートをすることで作成した IgE 感作 BMMCs を 10 または 30 μM KA とともに 37 °C、5% CO₂ 条件下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、第二章 第三節「2 - 2 Flow cytometry 法を用いた細胞表面発現 FcεRI 結合 IgE 量の解析」に記載した同様の方法にて FcεRI 結合した IgE 量を解析した。

2 - 3 anti-DNP IgE と DNP-HSA との結合への競合作用の評価

250 ng/mL anti-DNP IgE (Sigma) とともに 24 時間インキュベートをすることで作成し

た IgE 感作 BMMCs を $800 \times g$ 、5 分間、室温で遠心後、1% FBS (Equitech Bio Inc) 含有 RPMI1640 (Fujifilm-Wako) 培地で洗浄し、10 ng/mL の DNP-HSA または $30 \mu\text{M}$ KA 共存下 DNP-HSA を添加し、30 分後に氷冷することで反応を停止させた。反応停止後に $800 \times g$ 、5 分間、 4°C で遠心分離して、上清と沈渣を分取した。沈渣に 1% Triton X-100 (Sigma) を添加後、凍結融解を繰り返し、細胞を溶解させた。上清および沈渣の β -hexosaminidase 活性を第三章 第二節「2-5 β -hexosaminidase 活性を用いた脱顆粒率の評価」の方法を用いて解析し、脱顆粒率を、全 β -hexosaminidase 活性に対する上清中の β -hexosaminidase 活性の割合で算出した。

2-4 統計処理

「2-1 Western blot 法を用いた細胞内情報伝達関連タンパク質リン酸化の検出」および「2-3 細胞表面発現 Fc ϵ RI 結合 IgE と DNP-HSA の競合作用の評価」のデータの統計処理はそれぞれ第一章 第三節「2-3 統計処理」に記載した方法によって実施した。

3 結果

3-1 抗原抗体反応によって惹起される BMMCs のタンパク質のリン酸化に対する KA の影響

第二章から、Syk のリン酸化が抗原抗体反応によるマスト細胞の脱顆粒に伴うヒスタミンの遊離に重要であることが明らかとなった。また、抗原抗体反応によって惹起される Gab2 のリン酸化は p38 をリン酸化し、IL-4 の遊離を誘導することや (Barbu *et al.*, 2010; Frossi *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2015)、Erk のリン酸化は、LTB₄ や Cys-LTs の遊離を誘導することが報告されている (Okabe *et al.*, 2006; Uozumi *et al.*, 1997)。そこで、抗原抗体反応による BMMCs の Syk、Gab2、p38、Erk のリン酸化に対する KA の影響を検討した。

薬物非添加群において Syk のリン酸化は抗原添加 30 秒後で検出され、180 秒後でより強く検出された。一方、 $10 \mu\text{M}$ KA 添加群での Syk のリン酸化は抗原添加 30 秒後では検出されず 180 秒後にわずかに検出されるのみであり、 $30 \mu\text{M}$ KA 添加群では抗原添加 30、180 秒後いずれもほとんど検出されなかった。

薬物非添加群において Gsb2 および p38 のリン酸化は抗原添加 30 秒後で検出され、180 秒後でさらに強く検出された。一方、10 または 30 μ M KA 添加群での Gab2 および p38 のリン酸化は 30 秒後にはほとんど検出されず、180 秒後のみわずかに検出されるだけであった。

薬物非添加群において Erk のリン酸化は抗原添加 30 秒後で検出され、180 秒後はさらに強く検出された。10 μ M KA 添加群でも同じように検出された。一方で、30 μ M KA 添加群では Erk のリン酸化は 30 秒後も 180 秒後もわずかに検出されるだけだった。

したがって、10 μ M KA は Syk、Gab2、p38 のリン酸化を抑制し、30 μ M KA は Syk、Gab2、p38 に加え、Erk のリン酸化も抑制することが明らかとなった (Figure 30)。

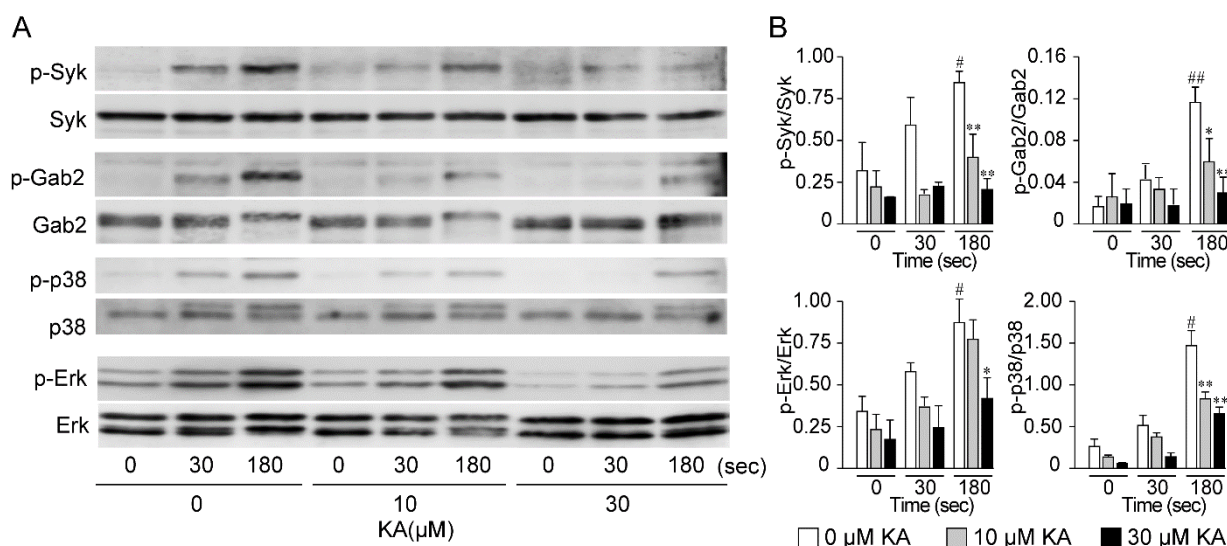


Figure 30 抗原抗体反応によって惹起される BMMCs のタンパク質のリン酸化に対する KA の影響

IgE 感作した BMMCs に KA を 1 時間暴露した後、細胞を洗浄し、抗原添加 30 または 180 秒後に反応を停止させ、Syk、Gab2、p38、Erk のリン酸化の経時的変化を Western blot 法にて検討した。Western blot 法での独立した 3 例の実験のうち、代表的なデータを示す (A)。各タンパク質のリン酸化の割合はデンストメトリーで測定した (B)。n=3. #: $p < 0.05$ vs. 0 s, 0 μ M KA group, ##: $p < 0.01$ vs. 0 s, 0 μ M KA group, *: $p < 0.05$ vs. 180 s, 0 μ M KA group, **: $p < 0.01$ vs. 180 s, 0 μ M KA group.

3-2 BMMCs の表面に発現する FcεRI と IgE の結合に対する KA の影響

次に FcεRI の架橋に必要な FcεRI と IgE の結合への KA の影響を検討すべく、BMMCs を IgE で感作し、BMMCs の表面に発現している FcεRI に結合している IgE 量を FITC 標識 anti-IgE Abs で染色することで測定した。

IgE 感作 BMMCs を FITC 標識 anti-IgE Abs で染色した control 群の蛍光強度は、FITC 標識 anti-IgE Abs で染色していない negative control 群と比較して 10 倍以上上昇し、BMMCs の FcεRI に IgE が結合していることを示している。また、10、30 μM KA を添加しても、control 群と同様の蛍光強度を示し、control 群、10、30 μM KA 添加群いずれも同程度の IgE 量を示すことが明らかとなった。したがって、KA は FcεRI と IgE の結合に影響しないことが示された。

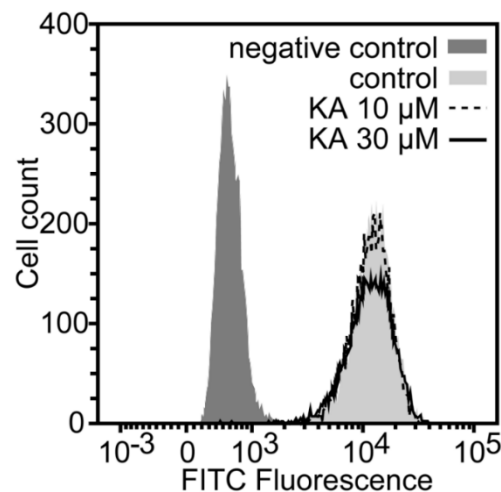


Figure 31 BMMCs の表面に発現する FcεRI と IgE の結合に対する KA の影響

IgE 感作した BMMCs に KA を 1 時間暴露した後、細胞を洗浄し、FITC 標識抗 IgE 抗体で染色し Flow cytometry 法にて蛍光強度を検出し、BMMCs に結合している IgE 量を比較した。Flow cytometry 法のヒストグラムは独立した 5 例の実験のうち、代表的なデータを示す。

3-3 IgE と抗原の結合に対する KA の拮抗作用の検討

KA が FcεRI と IgE の結合に影響しないことが明らかとなったため、次に、KA が IgE と抗原の結合に拮抗作用を示すかどうかについて検討を加えた。

IgE 感作 BMMCs に KA 非共存下抗原を添加した際の脱顆粒率は $48.31 \pm 3.97\%$ 、KA 共存下抗原を添加した際の脱顆粒率は $45.65 \pm 1.67\%$ と同程度であった。したがって、KA

は IgE と抗原の結合に影響しないことが明らかとなった (Figure 32)。

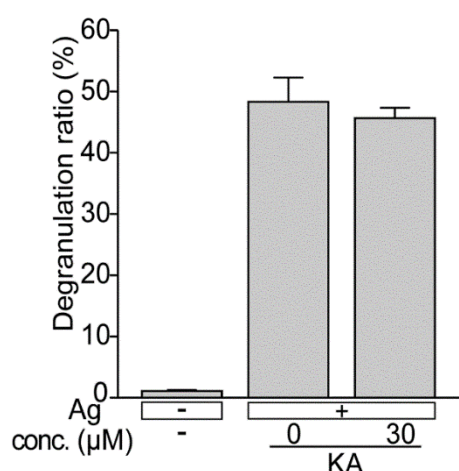


Figure 32 anti-DNP IgE と DNP-HSA の結合に対する KA の拮抗作用

IgE 感作した BMMCs に抗原として DNP-HSA または 30 μ M KA 共存下 DNP-HSA を添加し、30 分後の培地中および細胞内の β -hexosaminidase 活性を測定し、IgE と抗原の結合への KA の影響を検討した。n = 3.

4 考察

KA は Fc ϵ RI と IgE および IgE と抗原の結合に影響することなく (Figure 31, 32)、抗原抗体反応による BMMCs の Syk、Gab2、p38、Erk のリン酸化を抑制した (Figure 30)。

Fc ϵ RI の架橋によって惹起する細胞内情報伝達は SFK による Fc ϵ RI γ 鎖の ITAM モチーフのリン酸化から始まる (Nishizumi and Yamamoto, 1997)。次に SFK または Syk の自己リン酸化機構によって Syk がリン酸化された後、LAT、PI3K、PLC γ 、Erk、Gab2 などのタンパク質の活性化またはリン酸化が惹起する (Barbu *et al.*, 2010; Kanagy *et al.*, 2022; Schwartz *et al.* 2017; Velez *et al.*, 2018)。30 μ M KA は、抗原抗体反応による Syk、Gab2、p38、Erk のリン酸化を減少させると同時に (Figure 30)、マスト細胞の脱顆粒に伴うヒスタミン、IL-4、LTB $_4$ および Cys-LTs の遊離を抑制した (Figure 27, 28, 29)。Wex ら (2011a, b) および Matsubara ら (2006) は、Syk ノックアウトマウスから生成された BMMCs では、抗原抗体反応による脱顆粒、ヒスタミンの遊離、IL-4 の遊離が著しく抑制され、LTB $_4$ の遊離も抑制することを報告している。したがって、KA は Syk のリン酸化抑制によって、抗原抗体反応による BMMCs からのメディエーターの遊離を抑制すると考えられた。

第四節 KA の標的タンパク質の検討

1 目的

第三章 第三節において、KA は FcεRI と IgE の結合や IgE と抗原の結合に影響せずに、Syk、Gab2、p38、Erk のリン酸化を抑制することが明らかとなった。Syk の欠損は Gab2 や p38、Erk のリン酸化を抑制することから、KA は FcεRI の架橋から Syk のリン酸化の間のタンパク質を標的のと考えられた。抗原抗体反応によって惹起される Syk のリン酸化は SFK の活性化を経て起こる他、Syk 自身に ATP が結合することで起こることが報告されている (Sanderson *et al.*, 2010; Yamashita and Yamashita, 2021)。そこで、第三章 第四節では Syk を基質とする SFK の Lyn または Syk に KA が結合する可能性について検討し、KA の標的を予想することを目的とした。

2 実験方法

2-1 ドッキングシミュレーションでの Syk および Lyn と KA 結合の可能性の検討

GOLD 5.6 software (The Cambridge Crystallographic Data Centre)のデフォルト設定でドッキングシミュレーションを行った (Jones *et al.*, 1997)。ヒト Syk の結晶構造は PDB に報告されているが、マウス Syk 構造は報告されていない。マウスとヒトの Syk の間で異なるアミノ酸配列のほとんどは、報告されているヒト Syk の結晶構造 (PDB ID: 4FL1, 4FL2, 4FL3, 1xbb) において disorder となっている。そのため、報告されているヒト Syk キナーゼドメインの結晶構造 (PDB: 4FL2) をもとに、SWISSMODEL (Waterhouse *et al.*, 2018) の相同性モデリングによってマウス Syk の立体構造を構築した。構築したマウス Syk 立体構造には ATP アナログの adenylyl-imidodiphosphate (AMP-PNP) と Mg^{2+} を含んでいるため、KA と Syk のドッキングシミュレーション前に AMP-PNP と Mg^{2+} を除去した。また、報告されているマウス Lyn (PDB ID: 2ZV8) の結晶構造も Syk と同様に AMP-PNP、 Mg^{2+} および Imatinib 含んでいるため、KA と Lyn のドッキングシミュレーション前に AMP-PNP、 Mg^{2+} および Imatinib を除去した。除去によって欠損した水素原子は Hermes (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/>) を用いて計算により追加した。4FL2 におけるリガンドの中心をリガンド結合部位の中心と定義し、10.0 Å とした。また、2ZV8 におけるリガンド

の中心をリガンド結合部位の中心と定義し、20.0 Å とした。リガンド構造は Gaussian 16 を用いて B3LYP/6-31+G(d,p) (Frisch *et al.*, 2016) で最適化した。

3 結果

3-1 KA のマウス Lyn 阻害の可能性

KA が Lyn を阻害する可能性について検討すべく、Lyn のキナーゼ活性を ATP と拮抗することで阻害することが報告されている AMP-PNP および KA それぞれとマウス Lyn モデルとの複合体構造を比較した。

マウス Lyn と AMP-PNP の複合体構造では、Lyn のキナーゼドメイン内で AMP-PNP は安定化していた。Lyn のキナーゼドメイン内の奥に位置する Glu320 のアミド結合を形成する主鎖の酸素原子と AMP-PNP のプリン骨格のアミノ基との間に水素結合を形成した。さらに、Lyn のキナーゼドメインの Asp385 の側鎖の酸素原子と AMP-PNP の 2 つのリン酸の酸素原子との間に水素結合を形成した (Table 6)。さらに、Lyn のキナーゼドメインを構成するアミノ酸の Val261 の炭素鎖は AMP-PNP と疎水性相互作用を示す向きに計算された (Figure 33A)。

Table 6 Lyn と AMP-PNP および KA との水素結合

Lyn の ATP 結合部位と各化合物との水素結合					
ligand 化合物	ドナー アミノ酸 ・化合物	原子	アクセプター アミノ酸 ・化合物	原子	ドナーとアクセ プターの距離 (Å)
AMP-PNP	ligand	N	Glu320	O	3.3
	ligand	O	Asp385	O	2.9
	ligand	O	Asp385	O	3.5
KA	ligand	O	Lys275	N	3.0
	ligand	O	Glu290	O	2.8
	Asp385	O	ligand	O	2.8

また、マウス Lyn モデルと KA のドッキング構造において、KA は AMP-PNP と同じ Lyn のキナーゼドメイン内の Asp385 の側鎖の酸素原子と水素結合を形成し、また、Lys275 の側鎖のアミノ基および Glu290 の側鎖の酸素原子と KA との間にも水素結合は形成された (Table 6)。しかし、AMP-PNP と異なり、KA は Lyn のキナーゼドメイン内ではなく外側で安定化すると考えられた (Figure 33B)。したがって、KA は AMP-PNP の

ように Lyn のキナーゼドメイン内に入り込み、Lyn を阻害する可能性は低いと考えられた。

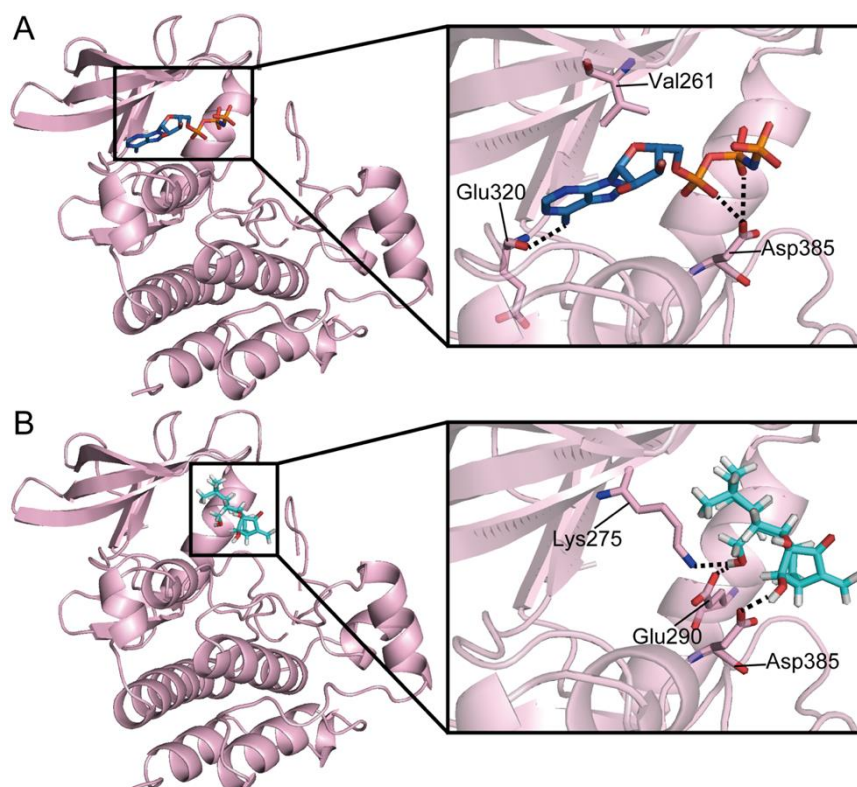


Figure 33 Lyn と Lyn 阻害剤 AMP-PNP または KA とのドッキング構造

KA または AMP-PNP と Lyn キナーゼドメインの計算されたドッキング構造を示す。AMP-PNP (A)、KA (B) と Lyn キナーゼドメインにおいて相互作用するアミノ酸残基の酸素原子、窒素原子を赤、青で示し、水素結合を黒色の点線示している。また、KA の水素原子は白色で示している。

3-2 KA の Syk 阻害の可能性

次に、KA が Syk を阻害する可能性について検討すべく、Syk のキナーゼ活性を ATP と拮抗することで阻害することが報告されている AMP-PNP および KA それぞれとマウス Syk モデルとの複合体構造を比較した。

マウス Syk と AMP-PNP の複合体構造では、Syk のキナーゼドメイン内で AMP-PNP は安定化していた (Figure 34A)。Lyn のキナーゼドメイン内の奥に位置する Glu443 の主鎖の酸素原子と AMP-PNP のプリン環 6 位のアミノ基、Ala445 の主鎖の NH と六員環の窒素原子との間に水素結合を形成した。さらに、Syk のキナーゼドメインの Lys396 の側鎖

のアミノ基 AMP-PNP のリン酸の酸素原子および Ser373 の主鎖の酸素原子と AMP-PNP のリン酸をつなぐ NH との間に水素結合を形成した (Table 7)。さらに、Syk のキナーゼドメインに ATP が結合する際に存在する Mg^{2+} に AMP-PNP のリン酸の酸素原子は配位結合を形成すると計算された (Table 8)。

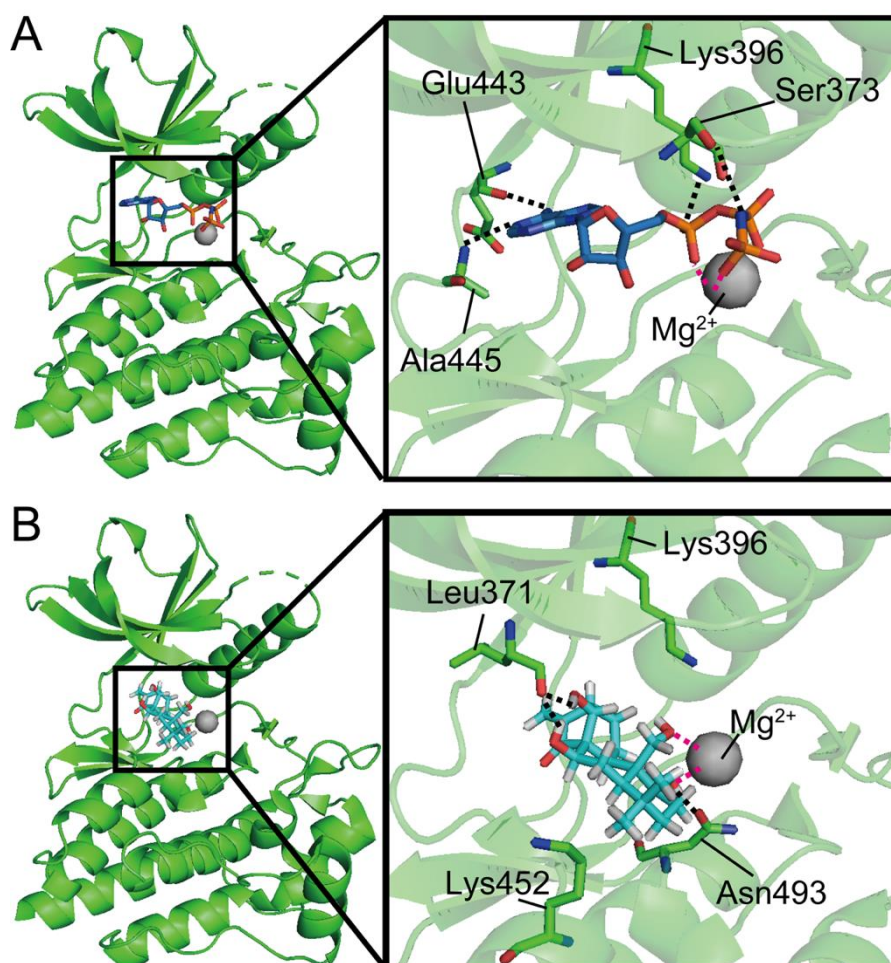


Figure 34 Syk と Syk 阻害剤 AMP-PNP または KA とのドッキング構造

KA または AMP-PNP と Syk キナーゼドメインの計算されたドッキング構造を示す。AMP-PNP (A)、KA (B) と Syk キナーゼドメインにおいて相互作用するアミノ酸残基の酸素原子、窒素原子を赤、青で示し、水素結合を黒色の点線で、配位結合を桃色の点線で、 Mg^{2+} は球体で示している。また、KA の水素原子は白色で示している。

また、マウス Syk モデルと KA のドッキング構造から、KA は Syk のキナーゼドメイン内で安定化すると考えられた (Figure 34B)。Syk のキナーゼドメイン内の Leu371 の主鎖の酸素原子と KA の水酸基との間に 2 本の水素結合が形成された。また、Syk キナー

ゼドメイン内の Asn493 の側鎖の酸素原子と KA の水酸基との間にも水素結合が形成された (Table 7)。さらに、AMP-PNP と同じように Mg^{2+} と KA の水酸基との間に配位結合が形成された (Table 8)。これらの相互作用によって、KA は AMP-PNP と同じようにキナーゼドメイン内に入り込んで安定化すると考えられた。

Table 7 Syk と AMP-PNP および KA との水素結合

Syk の ATP 結合部位と各化合物との水素結合					
ligand 化合物	ドナー アミノ酸 ・化合物	原子	アクセプター アミノ酸 ・化合物	原子	ドナーとアクセ プターの距離 (Å)
AMP-PNP	ligand	N	Ser373	O	2.8
	Lys396	N	ligand	O	3.4
	ligand	N	Glu443	O	2.9
	ligand	N	Ala445	N	3.1
KA	ligand	O	Leu371	O	2.7
	ligand	O	Leu371	O	3.1
	ligand	O	Asn493	O	3.1

Table 8 Syk と AMP-PNP および KA との配位結合

ligand 化合物	配位する原子	配位する金属原子	原子間距離 (Å)
AMP-PNP	O	Mg^{2+}	1.9
			2.0
KA	O	Mg^{2+}	2.5
			2.6

4 考察

FcεRI の架橋により活性化された Lyn は、次に FcεRI の γ 鎖にある ITAM をリン酸化する。その結果、Syk は FcεRI のリン酸化 γ 鎖に結合し、続いて Syk Y519/520 の分子内自己リン酸化が行われ、活性化する (Nishizumi and Yamamoto, 1997; Schwartz *et al.*, 2017)。

KA は Lyn キナーゼポケット内の Lyn と AMP-PNP 位置とは異なる場所で安定化すると計算された。AMP-PNP は Lyn と ATP の結合を阻害することで、Lyn のキナーゼ活性を阻害することが報告されており (Williams *et al.*, 2009)、AMP-PNP-Lyn 複合体構造での AMP-PNP の位置は ATP 結合部位であると考えられる。したがって、KA は Lyn の ATP 結合部位に入り込まず、ATP と Lyn の結合を阻害せず、Lyn のキナーゼ活性も阻害しな

いと考えられた。

AMP-PNP は Syk と ATP の結合を阻害することで、Syk のキナーゼ活性を阻害することが報告されており (Grädler *et al.*, 2013)、AMP-PNP-Syk 複合体構造での AMP-PNP の位置は ATP 結合部位であると考えられる。KA の全ての水酸基は水素結合を形成し、Syk の ATP 結合部位への結合を安定化し、Syk と ATP が結合する際に重要な Mg^{2+} との配位結合により KA-Syk 複合体構造がさらに安定化すると考えられた (Figure 34B)。以上の結果から、KA は ATP の代わりに Syk の ATP 結合部位に結合することで、Lyn-ATP 複合体の形成には影響を与えずに Syk の自己リン酸化を減少させ、その結果、Gab2、p38、Erk のリン酸化を減少させると考えられた。

第五節 KA の抗アレルギー作用

1 目的

第三章 第四節までの検討によって、KA はマスト細胞の Syk に結合し、Syk を含む細胞内情報伝達を担うタンパク質を抑制することで、抗原抗体反応によるマスト細胞からのメディエーターの遊離を抑制すると推察された。そこで、第三章 第五節では、アレルギーモデルマウスに抗原抗体反応を惹起させた際の反応に対する KA の影響を検討し、KA が抗アレルギー活性を示すかどうかについて明らかにすることを目的とした。

2 実験方法

2-1 実験動物

金城学院大学動物実験委員会から承認を受けた（承認番号 212）後、雄性の C57BL/6 マウスを日本 SLC（Tokyo, Japan）から購入した。金城学院大学実験動物教育研究施設にて 1 週間順化させた後、実験を開始した（実験開始時 4 週齢）。飼育方法は第一章 第四節「2-1 実験動物」と同様に行った。

2-2 KA の抗アレルギー活性の評価

アレルギー性マウスモデルで一般的に用いられる抗原のブタクサ花粉（RP）による受動的皮膚アナフィラキシーを、報告されている方法に従って評価した（Andoh *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 1997）。

Ambrosia trifida（Sigma）の RP を Imject™ Alum（Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL）に 1 mg/mL の濃度で懸濁した。C57BL/6 マウスに、RP 溶液（1 匹あたり 100 μ L）を週 2 回、3 週間にわたって尾背部に皮下注射し、RP 感作マウスを作成した。また、RP を含まない Imject™ Alum を投与し、RP 非感作マウスを作成した。100% エタノール（EtOH）に KA および diphenhydramine hydrochloride（DH）（Sigma）を溶解し、各化合物または EtOH 単独を 1 部位あたり 100 μ L ずつ、毛を刈り取った吻側背部皮膚に塗布した。40 分後、1% Evans blue dye solution（1 匹あたり 150 μ L）（Fujifilm-Wako）を静脈内注射した。注射 20 分後に、RP 溶液（PBS 中 50 μ L あたり 2 μ g）または PBS（50 μ L）を吻側背部皮

膚に皮内注射した。さらに 20 分後、マウスを麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、皮膚を切除した。抗原添加部位を中心とした皮膚サンプルを直径 8mm のパンチで穿孔し、0.3 mL の DMSO (Fujifilm-Wako) で皮膚サンプルに浸潤している Evans blue を溶出した。抽出された Evans blue の濃度は、Infinite® F50 (Fujifilm-Wako) を用いて 620 nm でマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) により測定した。

2-3 KA のヒスタミン H₁ 受容体遮断作用の評価

C57BL/6 マウスに、100% EtOH に溶解した KA および DH (Sigma) または EtOH 単独を 1 部位あたり 100 μ L ずつ、毛を刈り取った吻側背部皮膚に塗布した。40 分後、1% Evans blue dye solution (1 匹あたり 150 μ L) (Fujifilm-Wako) を静脈内注射した。注射 20 分後に、ヒスタミン溶液 (100 nmol/50 μ L) または saline (50 μ L) を吻側背部皮膚に皮内注射した。さらに 20 分後、マウスを麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、皮膚を切除した。ヒスタミン溶液添加部位を中心とした皮膚サンプルを直径 8 mm のパンチで穿孔し、0.3 mL の DMSO (Fujifilm-Wako) で皮膚サンプルに浸潤している Evans blue を溶出した。抽出された Evans blue の濃度は、Infinite® F50 (Fujifilm-Wako) を用いて 620 nm でマイクロプレートリーダー (Bio-Rad) により測定した。

2-4 統計処理

「2-2 KA の抗アレルギー活性の評価」、「2-3 KA のヒスタミン H₁ 受容体遮断作用の評価」のデータの統計処理はそれぞれ第一章 第三節「2-3 統計処理」に記載した方法によって実施した。

3 結果

3-1 抗原抗体反応による血管透過性の亢進に対する KA の影響

KA の抗アレルギー活性の評価はヒスタミンが引き起こす血管透過性の亢進を指標に検討した。

RP 非感作マウスに RP を投与した場合、RP 投与皮膚周辺の Evans blue 濃度は RP を添加していない場合と同程度であった。一方で、RP 感作マウスに RP を投与した場合、RP

投与皮膚周辺の Evans blue 濃度は $37.9 \pm 4.51 \mu\text{g/mL}$ であり、RP 非感作マウスのグループと比較して有意に上昇した。一方、1% KA 塗布群、5% KA 塗布群での RP 投与皮膚周辺の Evans blue 濃度はそれぞれ $18.81 \pm 3.14 \mu\text{g/mL}$ 、 $11.15 \pm 0.99 \mu\text{g/mL}$ であり、RP 感作マウス RP 投与群と比べ有意に低下した。なお、ヒスタミン H_1 受容体遮断によって抗アレルギー活性を示すことが知られる DH を塗布した場合、RP 投与皮膚周辺の Evans blue 濃度は $5.02 \pm 0.84 \mu\text{g/mL}$ であり、RP 感作マウス RP 投与群と比べ有意に低下した (Figure 35)。

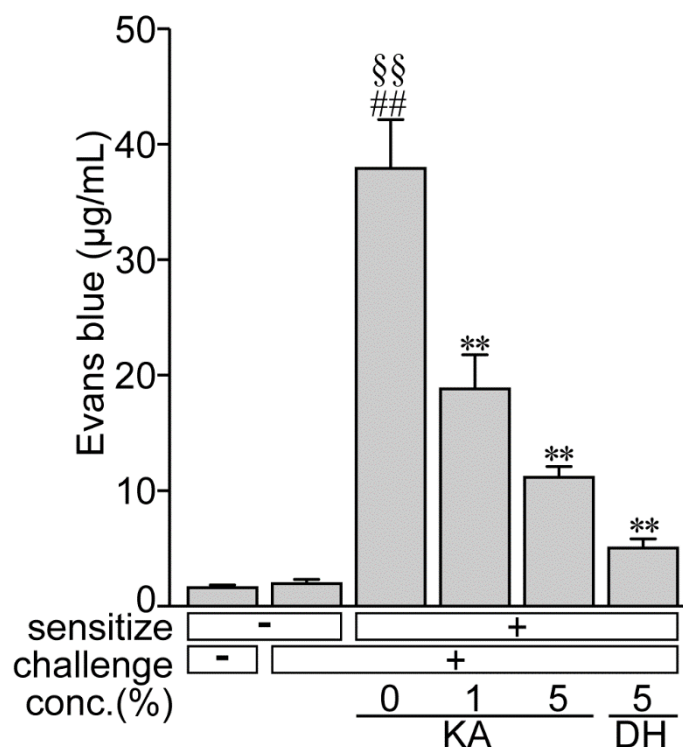


Figure 35 抗原抗体反応による血管透過性の亢進に対する KA の影響

RP 感作マウスに RP を投与する 1 時間前に KA または DH を塗布、20 分前に Evans blue を静脈内投与した。RP を投与した皮膚周辺に透過した Evans blue の濃度を測定することで血管透過性の亢進を評価した。KA の塗布は血管透過性の亢進を抑制した。また、DH は diphenhydramine を示す。n = 6, §§: $p < 0.01$ vs. non-sensitized and non-challenged group, ##: $p < 0.01$ vs. non-sensitized and challenged group, **: $p < 0.01$ vs. sensitized group challenged with 0 μM KA.

3-2 KA のヒスタミン H_1 受容体遮断作用の検討

次に、KA の抗原抗体反応の抑制はヒスタミン H_1 受容体遮断作用を含めるかについて検討を重ねた。

ヒスタミンを投与した皮膚周辺の Evans blue 濃度は $19.2 \pm 3.29 \mu\text{g/mL}$ とヒスタミン非投与群と比べ、有意に上昇した。また、1%KA 塗布群のヒスタミンを投与した皮膚周辺の Evans blue 濃度は $18.8 \pm 3.64 \mu\text{g/mL}$ であり、薬物非塗布群でのヒスタミン投与と同じようにヒスタミン非投与群と比べ有意に上昇した。一方で、ヒスタミン H_1 受容体遮断作用を示す DH を塗布した場合、ヒスタミンを投与した皮膚周辺の Evans blue 濃度は $3.79 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ であり、薬物非塗布群と比べ有意に低下した。

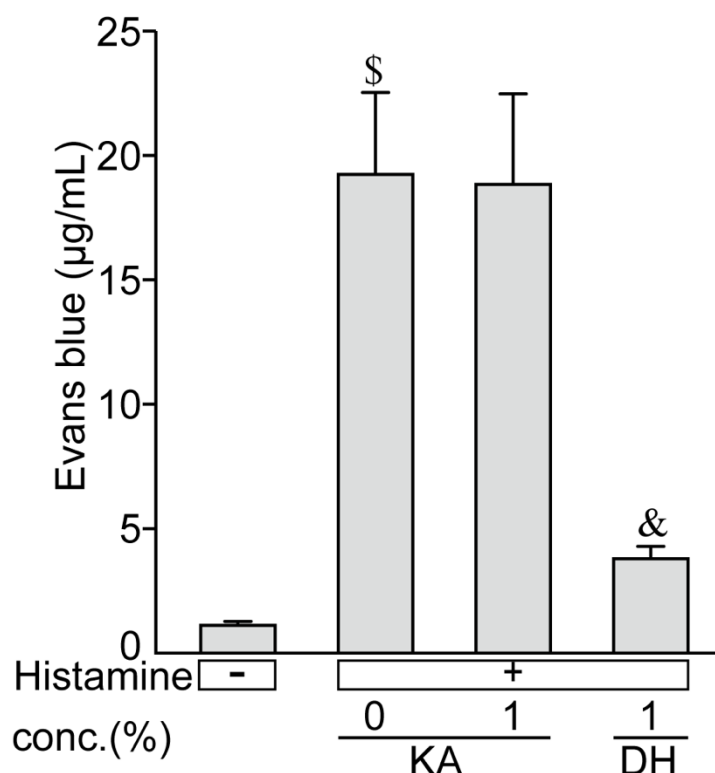


Figure 36 ヒスタミン H_1 受容体への KA の影響

マウスにKAを塗布後、Evans blueを静脈内投与し、ヒスタミンを投与した皮膚周辺に透過した Evans blue濃度を測定し、ヒスタミンによる血管透過性の亢進を評価した。KAの塗布はヒスタミン投与による血管透過性の亢進を抑制しなかった。一方、ヒスタミン投与による血管透過性の亢進は、DHによって抑制された。DHはdiphenhydramineを示す。n=5, \$: $p < 0.05$ vs. treated without histamine group, &: $p < 0.05$ vs. treated with histamine without KA group.

4 考察

アレルギーモデルマウスである RP 感作マウスに RP を投与し、抗原抗体反応を惹起させた場合、マスト細胞から遊離するヒスタミンによって、血管透過性が亢進する。あらかじめ静脈内投与した Evans blue が RP 投与によって浸潤し、その濃度を比較するこ

とで、抗原抗体反応による血管透過性の亢進への薬物の影響を検討し、抗アレルギー活性を評価することが可能である (Andoh *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 1997)。また、この血管透過性の亢進は、ヒスタミン投与によっても惹起される。

RP 感作マウスに RP 投与した場合、RP 投与部位周辺の Evans blue 濃度は上昇し、抗原抗体反応によって血管透過性が亢進しており、この血管透過性の亢進を KA は抑制した。したがって、KA は抗原抗体反応を抑制することが明らかとなった。一方で、KA はヒスタミン投与による Evans blue 濃度の上昇を変化させなかった。したがって、KA はヒスタミン投与による血管透過性の亢進には影響しないことが明らかとなり、ヒスタミン H₁ 受容体を遮断しないと考えられた。

第六節 小括

本章では、KA がマスト細胞の細胞内情報伝達を担うタンパク質を標的とし、抗原抗体反応によって活性化したマスト細胞からのメディエーターの遊離を抑制する抗アレルギー薬の候補化合物になるかを検討した。

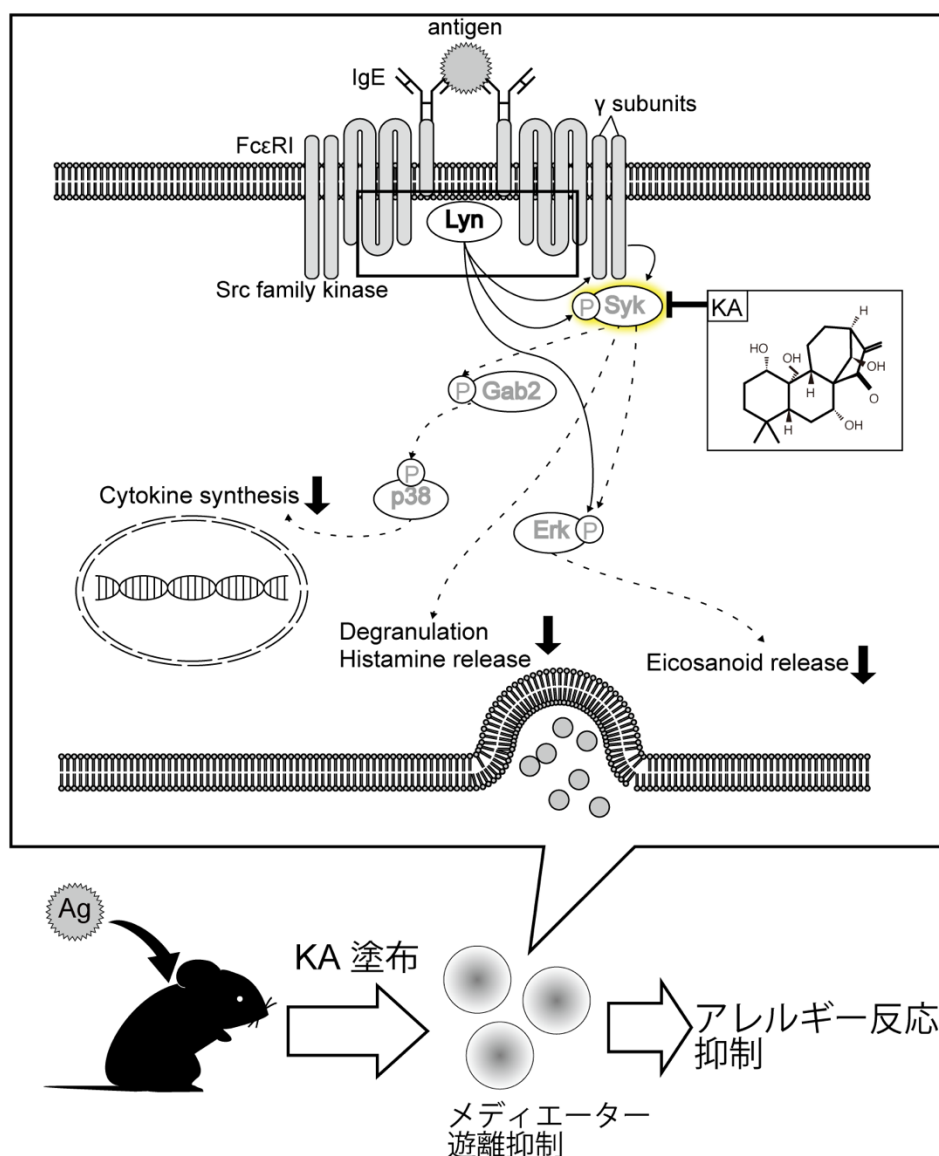


Figure 37 KA の抗アレルギー活性のメカニズム

KA は抗原抗体反応によって惹起される Syk、Gab2、p38、Erk のリン酸化と、BMMC の脱顆粒に伴うヒスタミン、IL-4、LTB₄、Cys-LTs の遊離を抑制した。また、KA は Syk に結合し、Syk の自己リン酸化やキナーゼ活性に重要な ATP と Syk の結合を阻害すると予想された。Syk のキナーゼ活性を阻害する AT9283 は LAT や p38 のリン酸化を抑制し、

マスト細胞の脱顆粒や IL-4 の遊離を抑制することが報告されている (Kim *et al.*, 2022)。また、Syk と ATP の結合を阻害する R406 は、LAT や Erk のリン酸化を抑制し、マスト細胞の脱顆粒や LTB₄ の遊離を抑制することが報告されている (Matsubara *et al.*, 2006)。したがって、KA は Syk を阻害することで、抗原抗体反応による Syk、Gab2、p38、Erk のリン酸化を抑制し、マスト細胞からのメディエーターの遊離を抑制すると推察された。さらに、KA はヒスタミン H₁ 受容体を遮断せずに抗原抗体反応を抑制することで、抗アレルギー活性を示すことも明らかとなった。したがって、KA は、ヒスタミン H₁ 受容体遮断ではなく、マスト細胞の Syk のリン酸化の抑制によって、種々のメディエーターの遊離を抑制し、抗アレルギー活性を示すと考えられた。

以上の結果から、KA はマスト細胞の細胞内情報伝達を担うタンパク質のうち、Syk を標的とする抗アレルギー薬の候補化合物となりうると考えられた。

総括

本研究の第一章では、化合物の抗アレルギー活性を検討するために必要なマスト細胞から遊離したヒスタミンを、煩雑な前処理なく高感度に定量できる DDH 法を最適化した。これにより、第二章や第三章のように抗原抗体反応によって活性化したマスト細胞からのヒスタミン遊離に対する化合物の影響を容易に検討することができ、アレルギー研究の活性化に寄与するものと考えられた。

第二章で検討した PerD は Fyn に、第三章で検討した KA は Syk に結合すると推定されたが、どちらの化合物も、Syk のリン酸化を抑制するとともに、脱顆粒に伴うヒスタミン遊離を抑制した。この結果から、少なくとも、脱顆粒に伴うヒスタミン遊離を抑制するための標的は Syk のリン酸化であることを示した。

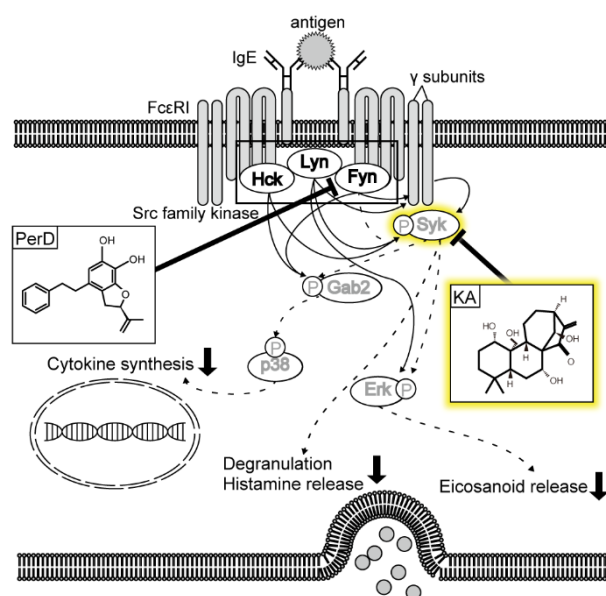


Figure 38 アレルギー治療に有効なマスト細胞の標的とその標的を阻害する化合物

また、第三章において、KA の標的として予想された Syk の阻害は Syk 自己リン酸化とその下流の細胞内情報伝達系を抑制し、メディエーター遊離の抑制を引き起こすと考えられた (Figure 38)。また、KA はヒスタミン H₁ 受容体を遮断せずに、マスト細胞からのメディエーター遊離を抑制することで抗アレルギー活性を示すことが明らかとなった。これにより、KA がマスト細胞の細胞内情報伝達系を標的とする抗アレルギー薬の有力な候補であることが示された。

参考文献

Akagi M, Mio M, Miyoshi K, Tasaka K. (1987). Antiallergic effects of terfenadine. on immediate type hypersensitivity reactions. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 9 (2–3): 257–279.

Allegrone G, Pollastro F, Magagnini G, Taglialatela-Scafati O, Seegers J, Koeberle A, Werz O, Appendino G. (2017). The bibenzyl canniprene inhibits the production of pro-inflammatory eicosanoids and selectively accumulates in some cannabis sativa strains. *J Nat Prod.*, 80 (3): 731–734.

Andoh T, Sakai K, Urashima M, Kitazawa K, Honma A, Kuraishi Y. (2012). Involvement of leukotriene B₄ in itching in a mouse model of ocular allergy. *Exp Eye Res.*, 98: 97–103.

Asakawa Y, Toyota M, Takemoto T. (1978a). Seven new bibenzyls and a dihydrochalcone from *Radula variabilis*. *Phytochemistry*, 17 (11): 2005–2010.

Asakawa Y, Kusube E, Takemoto T, Suire C. (1978b). New bibenzyls from *Radula complanata*. *Phytochemistry*, 17 (12): 2115–2117.

Asakawa Y, Hashimoto T, Takikawa K, Tori M, Ogawa S. (1991). Prenyl bibenzyls from the liverworts *Radula perrottetii* and *Radula complanata*. *Phytochemistry*, 30 (1): 235–251.

Asakawa Y, Ludwiczuk A, Nagashima F. (2013). Chemical Constituents of the Bryophytes. Bio- and Chemical Diversity, Biological Activity, and Chemosystematics. *Prog Chem Org Nat Prod.*, 95: 1–796

Asakawa Y, Nagashima F, Ludwiczuk A. (2020). Distribution of bibenzyls, bisbibenzyls, and terpenoids in liverwort genus *Radula*. *J Nat Prod.* 83 (3): 756–769.

Barbu EA, Zhang J, Siraganian RP. (2010). The limited contribution of Fyn and Gab2 to the high affinity IgE receptor signaling in mast cells. *J Biol Chem.*, 285 (21): 15761–15768.

Barker SA, Lujan D, Wilson BS. (1999). Multiple roles for PI 3-kinase in the regulation of PLCgamma activity and Ca²⁺ mobilization in antigen-stimulated mast cells. *J Leukoc Biol.*, 65 (3): 321–329.

Benedé S and Berin MC. (2018). Mast cell heterogeneity underlies different manifestations of food allergy in mice. *PLoS One*, 13 (1): e0190453.

Bolygo E, Cooper PA, Jessop KM, Moffatt F. (2000). Determination of histamine in tomatoes by liquid chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int.*, 83 (3): 543–548.

Burd PR, Rogers HW, Gordon JR, Martin CA, Jayaraman S, Wilson SD, Dvorak AM, Galli SJ, Dorf ME. (1989). Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J Exp Med.*, 170 (1): 245–57.

Caughey GH, Raymond WW, Blount JL, Hau LW, Pallaoro M, Wolters PJ, Vergheze GM. (2000). Characterization of human gamma-tryptases, novel members of the chromosome 16p mast cell tryptase and prostatic gene families. *J Immunol.*, 164 (12): 6566–6575.

Chang R, Kim D, U Z, Shen X, Chen Y, Sun H. (1992). A diterpenoid from *Rabdosia excise*. *Phytochemistry*, 31 (1): 342–343.

Cretton S, Oyarzún A, Righi D, Sahib L, Kaiser M, Christen P, Fajardo V. (2018). A new antifungal and antiprotozoal bibenzyl derivative from *Gavilea lutea*. *Nat Prod Res.*, 32 (6): 695–701.

Ertan AR, Nilüfer V, Semiramis Y, Halil YV. (2004). The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17 (1): 53–62.

Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. (1980). Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, 286 (5770): 264–265.

Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, Marenich AV, Bloino J, Janesko BG, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian HP, Ortiz JV, Izmaylov AF, Sonnenberg JL, Williams-Young D, Ding F, Lipparini F, Egidi F, Goings J, Peng B, Petrone A, Henderson T, Ranasinghe D, Zakrzewski VG, Gao J, Rega N, Zheng G, Liang W, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Throssell K, Montgomery JA jr., Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark MJ, Heyd JJ, Brothers EN, Kudin KN, Staroverov VN, Keith TA, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell AP, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Millam JW, Klene M, Adamo C, Cammi R, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Farkas O, Foresman JB, Fox DJ.(2016). Gaussian 16 Revision A.03. Wallingford, CT: Gaussian Inc.

Frossi B, Rivera J, Hirsch E, Pucillo C. (2007). Selective activation of Fyn/PI3K and p38 MAPK regulates IL-4 production in BMMC under nontoxic stress condition. *J Immunol.*, 178 (4): 2549–2555.

Fu S, Ni S, Wang D, Hong T. (2018). Coptisine suppresses mast cell degranulation and ovalbumin-induced allergic rhinitis. *Molecules*, 23 (11): 3039.

Fukuishi N, Igawa Y, Kunimi T, Hamano H, Toyota M, Takahashi H, Kenmoku H, Yagi Y, Matsui N, Akagi M. (2013). Generation of mast cells from mouse fetus: analysis of differentiation and functionality, and transcriptome profiling using next generation sequencer. *PLoS One*, 8 (4):

e60837.

Fukuishi N, Murakami S, Ohno A, Yamanaka N, Matsui N, Fukutsuji K, Yamada S, Itoh K, Akagi M. (2014). Does beta-hexosaminidase function only as a degranulation indicator in mast cells? The primary role of betahexosaminidase in mast cell granules. *J Immunol.*, 193 (4): 1886–1894.

Galatowicz G, Ajayi Y, Stern ME, Calder VL. (2007). Ocular anti-allergic compounds selectively inhibit human mast cell cytokines in vitro and conjunctival cell infiltration in vivo. *Clin Exp Allergy.*, 37 (11): 1648–1656.

Grädler U, Schwarz D, Dresing V, Musil D, Bomke J, Frech M, Greiner H, Jäkel S, Rysiok T, Müller-Pompalla D, Wegener A. (2013). Structural and biophysical characterization of the Syk activation switch. *J Mol Biol.*, 425 (2):309–333.

Gu H, Saito K, Klamann LD, Shen J, Fleming T, Wang Y, Pratt JC, Lin G, Lim B, Kinet JP, Neel BG. (2001). Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature*, 412 (6873): 186–190.

Hlosrichok A, Sumkhemthong S, Sritularak B, Chanvorachote P, Chaotham C. (2018). A bibenzyl from *Dendrobium ellipsophyllum* induces apoptosis in human lung cancer cells. *J Nat Med.*, 72 (3): 615–625.

Hong H, Kitaura J, Xiao W, Horejsi V, Ra C, Lowell CA, Kawakami Y, Kawakami T. (2007). The Src family kinase Hck regulates mast cell activation by suppressing an inhibitory Src family kinase Lyn. *Blood*, 110 (7): 2511–2519.

Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol.*, 267 (3): 727–748.

Hwang BY, Lee JH, Koo TH, Kim HS, Hong YS, Ro JS, Lee KS, Lee JJ. (2001). Kaurane diterpenes from *Isodon japonicus* inhibit nitric oxide and prostaglandin E₂ production and NF- κ B activation in LPS stimulated macrophage RAW264.7 cells. *Planta Med.*, 67 (5): 406–410.

Kanagy WK, Cleyrat C, Fazel M, Lucero SR, Bruchez MP, Lidke KA, Wilson BS, Lidke DS. (2022). Docking of Syk to Fc ϵ RI is enhanced by Lyn but limited in duration by SHIP1. *Mol Biol Cell.*, 33 (10):ar89.

Kao TI, Chen PJ, Wang YH, Tseng HH, Chang SH, Wu TS, Yang SH, Lee YT, Hwang TL. (2021). Bletinib ameliorates neutrophilic inflammation and lung injury by inhibiting Src family kinase phosphorylation and activity. *Br J Pharmacol.*, 178 (20): 4069–4084.

Kataoka TR, Kumanogoh A, Fukuishi N, Ueshima C, Hirata M, Moriyoshi K, Tsuruyama T, Haga H. (2015). CD72 negatively regulates mouse mast cell functions and down-regulates the expression of KIT and Fc ϵ RI α . *Int Immunol.*, 27 (2): 95–103.

Kim BW, Koppula S, Kim IS, Lim HW, Hong SM, Han SD, Hwang BY, Choi DK. (2011). Anti-neuroinflammatory activity of Kamebakaurin from *Isodon japonicus* via inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathway inactivated microglial cells. *J Pharmacol Sci.*, 116 (3): 296–308.

Kim JH, Kim AR, Kim HS, Kim HW, Park YH, You JS, Park YM, Her E, Kim HS, Kim YM, Choi WS. (2015). *Rhamnus davurica* leaf extract inhibits Fyn activation by antigen in mast cells for anti-allergic activity. *BMC Complement Altern Med.*, 15: 80.

Kim JY, Kim HS, Kim YJ, Lee HK, Kim JS, Kang JS, Hong JT, Kim Y, Hwang BY, Han SB. (2013). Inhibition of TAK1 by kamebakaurin in dendritic cells. *Int Immunopharmacol.*, 15 (1): 138–143.

Kim MJ, Park HR, Shin TY, Kim SH. (2017). Diospyros kaki calyx inhibits immediate-type hypersensitivity via the reduction of mast cell activation. *Pharm Biol.*, 55 (1): 1946–1953.

Kim SJ, Choi MY, Min KY, Jo MG, Kim JM, Kim HS, Kim YM. (2022). AT9283, 1-Cyclopropyl-3-(3-(5-(Morpholinomethyl)-1H-Benzo[d]Imidazole-2-yl)-1H-Pyrazol-4-yl) Urea, Inhibits Syk to Suppress Mast Cell-Mediated Allergic Response. *Biomol Ther (Seoul)*., 30 (6): 520–528.

Kinoshita T, Matsubara M, Ishiguro H, Okita K, Tada T. (2006). Structure of human Fyn kinase domain complexed with staurosporine. *Biochem Biophys Res Commun.*, 346 (3): 840–844.

Kurahashi K, Fujiwara M. (1969). Fluorometric assay of tissue histamine. *Jpn J Pharmacol.*, 19(2): 240–248.

Lang GM, Bitoh S, Becker AB, Sehon AH. (1997). Potential therapeutic efficacy of allergen monomethoxypolyethylene glycol conjugates for in vivo inactivation of sensitized mast cells responsible for common allergies and asthma. *Int Arch Allergy Immunol.*, 113 (1-3): 58–60.

Lee JH, Koo TH, Hwang BY, Lee JJ. (2002). Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF-kappa B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NFkappa B target genes. *J Biol Chem.*, 277 (21):18411–18420.

Lee JH, Choi JK, Noh MS, Hwang BY, Hong YS, Lee JJ. (2004). Anti-inflammatory effect of kamebakaurin in in vivo animal models. *Planta Med.*, 70 (6): 526–530.

Lim JY, Won TJ, Hwang BY, Kim HR, Hwang KW, Sul D, Park SY. (2010). The new diterpene isodon japonin D inhibited LPS-induced microglial activation through NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Eur J Pharmacol.*, 642 (1-3): 10–18.

MacNeil AJ, Yang YJ, Lin TJ. (2011). MAPK kinase 3 specifically regulates Fc epsilonRI-mediated IL-4 production by mast cells. *J Immunol.*, 187 (6): 3374–3382.

Malaviya R, Malaviya R, Jakschik BA. (1993). Reversible translocation of 5-lipoxygenase in mast cells upon IgE/antigen stimulation. *J Biol Chem.*, 268 (7): 4939–4944.

Matsubara S, Li G, Takeda K, Loader JE, Pine P, Masuda ES, Miyahara N, Miyahara S, Lucas JJ, Dakhama A, Gelfand EW. (2006). Inhibition of spleen tyrosine kinase prevents mast cell activation and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.*, 173(1): 56–63.

Mekori YA, Oh CK, Metcalfe DD. (1993). IL-3-dependent murine mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. Prevention of apoptosis by c-kit ligand. *J Immunol.*, 151 (7): 3775–3784.

Möllerherm H, Meier K, Schmies K, Fuhrmann H, Naim HY, von Köckritz-Blickwede M, Branitzki-Heinemann K. (2017). Differentiation and Functionality of Bone Marrow-Derived Mast Cells Depend on Varying Physiologic Oxygen Conditions. *Front Immunol.*, 8: 1665.

Moon TC, Befus AD, Kulka M. (2014). Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Front Immunol.*, 5: 569.

Méndez-Enríquez E, Hallgren J. (2019). Mast cells and their progenitors in allergic asthma. *Front Immunol.*, 10: 821.

Nakamura M and MacGlashan D Jr. (1994). Desensitization of IL-4 secretion from mouse bone marrow-derived mast cells. *Immunol Lett.*, 41(2-3): 129–133.

Nam ST, Park YH, Kim HW, Kim HS, Lee D, Lee MB, Kim YM, Choi WS. (2017). Suppression

of IgE-mediated mast cell activation and mouse anaphylaxis via inhibition of Syk activation by 8-formyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin, 4 μ 8C. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 332: 25–31.

Nishizumi H, Yamamoto T. (1997). Impaired tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ mobilization, but not degranulation, in lyn-deficient bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.*, 158 (5): 2350–2355.

Nunes de Miranda SM, Wilhelm T, Huber M, Zorn CN. (2016). Differential Lyndependence of the SHIP1-deficient mast cell phenotype. *Cell Commun Signal.*, 14 (1): 12.

Okabe T, Hide M, Hiragun T, Morita E, Koro O, Yamamoto S. (2006). Bone marrow derived mast cell acquire responsiveness to substance P with Ca²⁺ signals and release of leukotriene B₄ via mitogen-activated protein kinase. *J Neuroimmunol.*, 181 (1-2): 1–12.

Olszewski MB, Groot AJ, Dastyh J, Knol EF. (2007). TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. *J Immunol.*, 178 (9): 5701–5709.

Oozeki H, Tajima R, Nihei K. (2008). Molecular design of potent tyrosinase inhibitors having the bibenzyl skeleton. *Bioorg Med Chem Lett.*, 18 (19): 5252–5254.

Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J. (2002). Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol.*, 3 (8): 741–748.

Razin E, Ihle JN, Seldin D, Mencia-Huerta JM, Katz HR, LeBlanc PA, Hein A, Caulfield JP, Austen KF, Stevens RL. (1984). Interleukin 3: A differentiation and growth factor for the mouse mast cell that contains chondroitin sulfate E proteoglycan. *J Immunol.*, 132 (3): 1479–1486.

Ryan JJ. (1997). Interleukin-4 and its receptor: essential mediators of the allergic response. *J Allergy Clin Immunol.*, 99 (1 Pt 1): 1–5.

Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. (1987). Leukotrienes and lipoxins: Structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*, 237 (4819): 1171–1176.

Sanderson MP, Wex E, Kono T, Uto K, Schnapp A. (2010). Syk and Lyn mediate distinct Syk phosphorylation events in FcεRI-signal transduction: implications for regulation of IgE-mediated degranulation. *Mol Immunol.*, 48 (1-3): 171–178.

Schechter NM, Wang ZM, Blacher RW, Lessin SR, Lazarus GS, Rubin H. (1994). Determination of the primary structures of human skin chymase and cathepsin G from cutaneous mast cells of urticaria pigmentosa lesions. *J Immunol.*, 152 (8): 4062–4069.

Schwartz SL, Cleyrat C, Olah MJ, Relich PK, Phillips GK, Hlavacek WS, Lidke KA, Wilson BS, Lidke DS. (2017). Differential mast cell outcomes are sensitive to FcεRI-Syk binding kinetics. *Mol Biol Cell.*, 28 (23): 3397–3414.

Sharma N, Reja SI, Gupta N, Bhalla V, Kaur D, Arora S, Kumar M. (2017). A highly selective fluorescent probe for Fe³⁺ in living cells: a stress induced cell based model study. *Org Biomol Chem.*, 15 (4): 1006–1012.

Simons FE. (2004). Advances in H₁-antihistamines. *N. Engl. J. Med.*, 351 (21): 2203–2217.

Sun HD, Sun XC, Lin ZW, Xu YL, Minami Y, Marunaka T, Fujita T. (1981). EXCISANIN A AND B, NEW DITERPENOIDS FROM RABDOSIA EXCISA. *Chemistry Letters*, 10 (6): 753–756.

Sun HD, Huang SX, Han QB. (2006). Diterpenoids from *Isodon* species and their biological

activities. *Nat Prod Rep.*, 23 (5): 673–698.

Tagen M, Elorza A, Kempuraj D, Boucher W, Kepley CL, Shirihai OS, Theoharides TC. (2009). Mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits mast cell activation and reduces histamine content. *J Immunol.*, 183 (10): 6313–9.

Takeda Y and Otsuka H. (1995). Recent advances in the chemistry of diterpenoids from *Rabdosia* species, *Studies in Natural Products Chemistry (Part C)*, Volume 15 in: Atta-ur-Rahman (Ed.), Netherlands: Elsevier; 111–185.

Taira Z, Takei M, Endo K, Hashimoto T, Sakiya Y, Asakawa Y. (1994). Marchantin A trimethyl ether, its molecular structure and tubocurarine-like skeletal muscle relaxation activity. *Chem Pharm Bull.*, 42 (1): 52–56.

Takasugi M, Muta E, Yamada K, Arai H. (2018). A new method to evaluate antiallergic effect of food component by measuring leukotriene B₄ from a mouse mast cell line. *Cytotechnology*, 70 (1): 177–184.

Tang J, Sun H, Olatunji O, Chen H, Wang M. (2015). A New Diterpenoid Glucoside from Aerial Parts of *Rabdosia excisa*. *Chem Nat Compd.*, 51: 1107–1110

Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN, Galli SJ. (1991). Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 88 (14): 6382–6386.

Thurmond RL, Gelfand EW, Dunford PJ. (2008). The role of histamine H₁ and H₄ receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7 (1): 41–53.

Uozumi N, Kume K, Nagase T, Nakatani N, Ishii S, Tashiro F, Komagata Y, Maki K, Ikuta K, Ouchi Y, Miyazaki J, Shimizu T. (1997). Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. *Nature*, 390 (6660): 618–622.

Velez TE, Bryce PJ, Hulse KE. (2018). Mast Cell Interactions and Crosstalk in Regulating Allergic Inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep.*, 18 (5): 30.

Wang P, Jia X, Lu B, Huang H, Liu J, Liu X, Wu Q, Hu Y, Li P, Wei H, Liu T, Zhao D, Zhang L, Tian X, Jiang Y, Qiao Y, Nie W, Ma X, Bai R, Peng C, Dong Z, Liu K. (2023). Erianin suppresses constitutive activation of MAPK signaling pathway by inhibition of CRAF and MEK1/2. *Signal Transduct Target Ther.*, 8 (1): 96: 1–15.

Wang X, Guo J, Ning Z, Wu X. (2018). Discovery of a natural syk inhibitor from Chinese medicine through a docking-based virtual screening and biological assay study. *Molecules*, 23 (12): 3114.

Wang Z, Wu J, Wu S, Bao A. (2013). High-performance liquid chromatographic determination of histamine in biological samples: the cerebrospinal fluid challenge – a review. *Anal Chim Acta.*, 774: 1–10.

Warshawsky A, Altman J, Kahana N, Arad- Yellin R, Deshe A, Hasson H, Shoef N, Gottlieb H. (1989). Ring cleavage of N-acyl- and N-(arylsulfonyl)histamines with di-tert-butyl dicarbonate. A one-pot synthesis of 4-acylamino- and 4-Arylsulfonylamino- 1,2-diaminobutanes. *Synthesis*, 11: 825–829.

Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. (2018). SWISSMODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.*, 46: W296–W303.

Wex E, Bouyssou T, Duechs MJ, Erb KJ, Gantner F, Sanderson MP, Schnapp A, Stierstorfer BE, Wollin L. (2011a). Induced Syk deletion leads to suppressed allergic responses but has no effect on neutrophil or monocyte migration in vivo. *Eur J Immunol.*, 41 (11): 3208–3218.

Wex E. (2011b). Characterization of inducible SYK knockout mice Dissertation, German: Konstanz Univ.

Williams NK, Lucet IS, Klinken SP, Ingley E, Rossjohn J. (2009). Crystal structures of the Lyn protein tyrosine kinase domain in its Apo- and inhibitor-bound state. *J Biol Chem.*, 284 (1): 284–291.

Wills-Karp M. (1999). Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.*, 17: 255–281.

Wilson SJ, Shute JK, Holgate ST, Howarth PH, Bradding P. (2000). Localization of interleukin (IL) -4 but not IL-5 to human mast cell secretory granules by immunoelectron microscopy. *Clin Exp Allergy.*, 30 (4): 493–500.

Wu YX, Zhang W, Li JC, Liu N. (2012). Chemical constituents of flowers and fruits of *Rabdosia excisa*. *Chin J Nat Med.*, 10 (1): 43–47.

Xiao W, Nishimoto H, Hong H, Kitaura J, Nunomura S, Maeda-Yamamoto M, Kawakami Y, Lowell CA, Ra C, Kawakami T. (2005). Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcεRI. *J Immunol.*, 175 (10): 6885–6892.

Yamada K. (1979). A revision of Asian taxa of *radula*, hepaticae. *J Hattori Bot Lab*, 45: 201–322

Yamashita Y and Yamashita T. (2021). Novel phospho-specific monoclonal antibodies reveal

differential regulation of tyrosine phosphorylation within the immunoreceptor tyrosine-based activation motif of the Fc receptor γ subunit leading to fine tuning of Syk activation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 547: 89–95.

Yu M, Eckart MR, Morgan AA, Mukai K, Butte AJ, Tsai M, Galli SJ. (2011). Identification of an IFN- γ /mast cell axis in a mouse model of chronic asthma. *J Clin Invest.*, 121 (8): 3133–3143.

Yuki H, Kikuzato K, Koda Y, Mikuni J, Tomabeche Y, Kukimoto-Niino M, Tanaka A, Shirai F, Shirouzu M, Koyama H, Honma T. (2017). Activity cliff for 7-substituted pyrrolo-pyrimidine inhibitors of HCK explained in terms of predicted basicity of the amine nitrogen. *Bioorg Med Chem.*, 25 (16): 4259–4264.

Zhang J, Berenstein EH, Evans RL, Siraganian RP. (1996). Transfection of Syk protein tyrosine kinase reconstitutes high affinity IgE receptor-mediated degranulation in a Syk-negative variant of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *J Exp Med.*, 184 (1): 71–79.

Zhang J, Billingsley ML, Kincaid RL, Siraganian RP. (2000). Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J Biol Chem.*, 275 (45): 35442–35447.

Zhang J, Wu XY, Yu FS. (2005). Inflammatory responses of corneal epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Curr Eye Res.*, 30 (7): 527–534.

発表論文

- Haruka Asai, Ritsuko Yamamoto, Kotone Kuromiya, Reika Takamura, Wanchun Jin, Hiromasa Kurosaki, Nobuyuki Fukuishi. A Rapid and Sensitive Determination of Histamine in Mast Cells Using a Didansyl Derivatization Method. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2022, 183, 1050–1055.
- Haruka Asai, Koichi Kato, Moe Suzuki, Misato Takahashi, Erika Miyata, Moeka Aoi, Reika Kumazawa, Fumihito Nagashima, Hiromasa Kurosaki, Yutaka Aoyagi, Nobuyuki Fukuishi. Potential Anti-allergic Effects of Bibenzyl Derivatives from Liverworts, *Radula perrottetii*. *Planta Med.* 2022, 88, 1069–1077.
- Haruka Asai, Koichi Kato, Mayu Miyasakai, Kaho Hatsukawa, Nanami Murakami, Naoko Takeda, Junna Abe, Yutaka Aoyagi, Yuka Kohda, Ming-yu Gui, Yong-Ri Jin, Xu-Wen Li, Yukio Hitostuyanagi, Koichi Takeya, Tsugunobu Andoh, Hiromasa Kurosaki, Nobuyuki Fukuishi. Kamebakaurin suppresses antigen-induced mast cell activation by inhibition of FcεRI signaling pathway. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2024, 185, 836–847.

謝辞

本博士論文に関して、金城学院大学 薬学部の学生の頃より基礎的な実験操作から論文の構成・執筆など、終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました、金城学院大学 薬学部 教授・福石信之先生に心から御礼申し上げます。本博士論文をまとめるにあたり、お忙しい中、快く主査をお引き受けくださりました、徳島文理大学 機能形態学研究室 教授・井上正久先生に心より感謝申し上げます。そして、本博士論文を査読していただき、有益なるご助言とご指導を賜りました徳島文理大学 薬理学研究室 教授・喜多紗斗美先生ならびに生薬学研究室 教授・野路征昭先生に厚く御礼申し上げます。また、本博士論文の執筆でのご助言に加え、仕事面、精神面で多大なるご支援を賜り、本博士論文を査読いただきました金城学院大学 薬学部 准教授 坂梨まゆ子先生に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、基礎的な知識や実験操作および実験結果についてご助言とご指導頂きました、金城学院大学 薬学部 教授・黒崎博雅先生、教授・安東嗣修先生、助教・金万春先生、湘南医療大学 講師・加藤紘一先生、大阪医科薬科大学 准教授・幸田祐佳先生に感謝申し上げます。本研究での *perrottetin D* を提供して下さり、第二章におけるご助言とご指導を頂きました、第一薬科大学 教授・長島史浩先生に心より感謝申し上げます。また、本研究での *kamebakaurin* を提供して下さり、第三章におけるご助言とご指導をいただきました、金城学院大学 教授・青柳裕先生、吉林大学 教授・金永日先生、准教授・桂名玉先生、助教・李諸文先生、東京薬科大学 教授・一柳幸生先生、教授・竹谷孝一先生に心より感謝申し上げます。

実験の実施にあたり、金城学院大学 薬学部の山本律子さん、黒宮琴音さん、高村麗香さん、鈴木萌さん、高橋美怜さん、宮田恵里花さん、青井萌華さん、熊澤黎華さん、宮坂真由さん、初川香穂さん、村上名誠さん、武田尚子さん、阿部潤奈さん他、福石研究室の皆様のご協力により、本研究を進めることができました。厚く御礼申し上げます。

最後に、勤務先である金城学院大学 薬学部の諸先生方、学生時代の同期をはじめ先輩や後輩、父、母、弟、祖母、叔母、友人諸氏に温かい励ましと、多くのご支援を頂きました。深く感謝申し上げます。

2024 年 初秋