

鼻粘膜過敏性亢進抑制作用を指標とした
第2世代抗ヒスタミン薬の再評価

広島大学 原爆放射線医科学研究所
疾患モデル解析研究分野 教授

かみぬま おさむ
神沼 修

鼻粘膜過敏性亢進抑制作用を指標とした 第2世代抗ヒスタミン薬の再評価

広島大学原爆放射線医科学研究所 神沼 修

【要旨】

花粉症等アレルギー性鼻炎治療を目的として、多くの第2世代抗ヒスタミン薬がスイッチ OTC 化されているが、その有効性の優劣は明らかではない。昨年度実施した貴財団助成研究によって、ロラタジン (Loratadine, LRT) だけが、他の抗ヒスタミン薬と異なり、感作マウスにおける抗原誘発鼻粘膜過敏性亢進(NHR) の発症を抑制する可能性を見いだした。そこで本年度は、LRT の作用点を絞り込むため、*in vitro* および *in vivo* での検討を行った。LRT およびその活性代謝産物であるデスロラタジン (Desloratadine, DES) は、Th2 細胞において活性化刺激に伴い誘導される *IL4*、*IL5* および *IL13* 遺伝子発現を、 $10\mu\text{M}$ 以上の濃度で同程度抑制した。Th2 細胞依存性の NHR 発症モデルを用いて検討したところ、LRT は抗原誘発 NHR および鼻粘膜炎症細胞浸潤に影響を与えなかった。LRT および DES は、高濃度で Th2 サイトカイン発現抑制作用を示すものの、その効果を介して臨床的に NHR の発症を抑制する可能性は低いことが明らかになった。

1、調査・研究目的

加速度的に患者数が増加している花粉症等のアレルギー性鼻炎領域では、セルフメディケーションが重点的に推進されており、近年、多くの第2世代抗ヒスタミン薬について、スイッチ OTC 化が実現している。一方、即効性や持続性、眠気等の副作用の点で若干の相違がみられるものの、各製品間の決定的な相違に関する情報が乏しいことから、各患者が自らの判断で製品を選択することが困難な状況となっている。結果として、多くの患者が今なお医療機関を受診し続けており、それがセルフメディケーション推進の妨げとなっている。

エピナスチン、エバスチン、セチリジン、ベポタスチン、フェキソフェナジン、ロラタジン (Loratadine, LRT) 等に代表されるスイッチ OTC 第2世代抗ヒスタミン薬類の殆どが、各々臨床試験時には、比較対照とされた既存の抗ヒスタミン薬より優れた有効性を示したことから、医療用医薬品として上市に至った経緯がある。しかしながらその優位性の要因を、主たる薬効メカニズムの抗ヒスタミン作用だけで説明することは難しい。一部の薬剤には、マスト細胞の脱顆粒抑制効果や、ロイコトリエン・インターロイキン産生抑制効果がみられることも報告されているが、それが臨床効

果にどれだけ寄与するかも不明である。

アレルギー性鼻炎の罹患および重症度は、一般的にくしゃみ、鼻漏および鼻閉等の臨床症状を指標に評価されるが、申請者は最近、そのマウスモデルを解析する中で、種々の症状悪化に繋がる本質的な病態と、その発症機構の存在を明らかにした。感作マウスに抗原を反復点鼻チャレンジすると、徐々にくしゃみ反応を呈する。しかしこれは、単純に IgE を介して抗原特異的に脱顆粒したマスト細胞から放出されたヒスタミンに対するくしゃみ応答ではなく、非特異的刺激に対するくしゃみ応答の増強、すなわち鼻粘膜過敏性亢進 (Nasa hyperresponsiveness : NHR) を反映した反応であることを見いだした [1]。さらにこの抗原誘発 NHR に、IgE /マスト細胞や好酸球は殆ど関与しない一方、抗原特異的 T 細胞の存在が、その発症の必要十分条件となることや、アレルギー性鼻炎に対するステロイド剤の強い有効性の少なくとも一部分は、NHR 抑制作用に基づくことも解明した [2]。

この新たに見いだした病態メカニズムに対して、各種第2世代抗ヒスタミン薬が効果を示すか、これまで明らかにされていない。しかし申請者は、昨年度実施した貴財団助成研究において、感作マウスに抗原チャレンジすることによって誘発される NHR の発症を、他の抗ヒスタミン薬と異なり、LRT だけが抑制する可能性を見いだした [3]。そこで本年度は、LRT の作用点を絞り込むため、LRT の活性代謝産物であるデスロラタジン (Desloratadine、DES) も含め、Th2 細胞機能に与える影響や、独自に開発した Th2 細胞依存性の NHR 発症モデルに対する効果を明らかにすることを目的として実施した。

2、調査・研究方法

2-1 動物

6-8 週齢の雌性 BALB/c マウス (広島実験動物、広島) および卵白アルブミン (ovalbumin、OVA) 特異的 T 細胞受容体を発現する DO11.10/RAG2^{-/-} マウス [1, 2] を用いた。本実験計画について、事前に広島大学動物実験委員会の承認 (承認番号: A21-32) を得て研究を実施した。

2-2 T 細胞サイトカインの解析

DO11.10/RAG2^{-/-} マウスから脾細胞を調整し、EasySep Mouse CD4⁺ T Cell Isolation Kit (Veritas) を用いてナイーブ CD4 陽性 T 細胞を分取した。それを X 線照射した脾細胞、OVA323-339 ペプチド、IL-2、IL-4 および抗 IFN- γ 抗体と 7 日間共培養し、抗原特異的 Th2 細胞を分化誘導した。生細胞を回収後、LRT (東京化成工業) または DES (東京化成工業) 存在 / 非存在下で、抗 CD3/CD28 抗体ビーズ (Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific) による刺激培養を 6 時間行った。RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出後、SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) で逆転写反応を行った。*I14*、*I15* および *I113* 遺伝子遺伝子の発現を、

TaqMan gene expression probes (Thermo Fisher Scientific) を用いたリアルタイム PCR システム (ABI StepOnePlus Real-Time PCR System、Thermo Fisher Scientific) で検出した。

2-3 Th2 細胞依存性鼻炎モデル

分化誘導した抗原特異的 Th2 細胞を、尾静脈から BALB/c マウスに移入した (2×10^7 cells/head)。Th2 細胞移入 6 時間後から、OVA ($600 \mu\text{g}$) を 1 日 1 回、5 日間連続で点鼻チャレンジ (i.n.) した。陰性コントロール群の動物には PBS のみをチャレンジした。最終日を除く OVA チャレンジの 30 分前に、LRT を 0.5% メチルセルロース溶液に懸濁して経口投与 (10 mg/kg , p.o.) した。陽性コントロール群の動物にはメチルセルロース溶液のみを投与した (図 1)。

2-4 鼻炎病態の解析

最終抗原チャレンジの 6 時間後に、 $10 \mu\text{l}$ のヒスタミン溶液 (100 mM ; ナカライテスク、京都) を投与して誘発されるくしゃみ反応の回数を 5 分間計数することにより、NHR を評価した。NHR 解析後、マウスを過麻酔により安楽死させ、鼻腔洗浄を行って炎症細胞を回収した。鼻腔洗浄液 (nasal lavage fluid: NALF) 中の細胞数を計数した後、サイトスピン 4 (Epredia) で細胞の単層塗抹標本を作製した。Differential Quik Stain Kit (Dade Behring) で染色後、形態学的評価により細胞分類を行った (図 1)。

2-5 統計解析

実験結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した。統計解析として、Student の t 検定を行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意差有りと判定した。

3、調査・研究成果

3-1 Th2 サイトカイン発現に対する作用

DO11.10/RAG2^{-/-} マウスのナイーブ CD4 陽性 T 細胞から分化誘導した Th2 細胞を抗 CD3/CD28 抗体ビーズで刺激したところ、*I14*、*I15* および *I113* 遺伝子の発現が著しく増強された (図 2A)。これらの反応は、LRT および DES の添加により、 $10 \mu\text{M}$ 以上で濃度依存的に抑制された (図 2B)。Th2 サイトカイン発現抑制効果において、LRT および DES は同程度の活性を示した。

3-2 NHR および鼻粘膜好酸球浸潤に対する作用

Th2 細胞移入マウスに反復抗原チャレンジすることにより、PBS をチャレンジした陰性コントロール群に対し、ヒスタミンによって誘発されるくしゃみ反応の有意な増加、すなわち NHR の発症と (図 3A)、鼻粘膜好酸球浸潤 (図 3B) が観察された。これらの反応は、LRT 投与

により影響を受けなかった。

4、考察

LRT は、Th2 細胞におけるサイトカイン発現を *in vitro* で抑制するが、*in vivo* では、Th2 細胞依存性に発症する NHR および鼻粘膜好酸球浸潤に影響を与えないことが明らかになった。LRT の代謝産物である DES は、転写因子 signal transducer and activator of transcription (STAT) ファミリーの DNA 結合活性を阻害することで、T 細胞機能を抑制することが報告されている [3]。LRT は、肝臓の cytochrome P450 によって DES に代謝されることから [4]、*in vitro* の実験条件下で LRT が DES に代謝された可能性は考えにくい。従って、DES だけでなく LRT も、T 細胞に直接作用することにより、サイトカイン発現抑制効果を示したと考えられる。

昨年度実施した貴財団助成研究で作用検討したエピナスチン、フェキソフェナジン、ベボタスチン等は、今回検討した DES と共に、いずれも Th2 細胞におけるサイトカイン産生抑制効果を示すことが報告されている [5-7]。しかしながら昨年度の検討において、感作マウスにおける抗原誘発 NHR 発症モデルに対し、LRT 以外の薬剤は明らかな影響を与えなかった。そこで今回、より Th2 細胞の関与が明確な実験モデルで検討を行ったところ、LRT はいずれのパラメーターに対しても明らかな影響を与えなかった。この結果は、LRT によって Th2 サイトカイン発現抑制効果がみられた *in vitro* の実験結果や、DES 投与により T 細胞依存性のアレルギー性炎症抑制効果がみられたとする先行研究報告 [7] 等と相反する。その原因は明らかではないが、成人に対する臨床投与量 (10 mg) の経口摂取によって、LRT の血中濃度は 10 nM 程度まで上昇する。本研究において、臨床投与量の約 60 倍相当量をマウスに投与したことを考慮しても、その血中濃度が 10 μ M に到達する可能性は低い。従って、LRT および DES でみられた Th2 細胞サイトカイン発現抑制効果が、臨床的に発揮される可能性は低いと考えられた。

感作マウスにおける抗原誘発 NHR を抑制した LRT が、Th2 細胞依存性の NHR に無効であった原因は不明である。両モデルにおける明確な相違点として、感作モデルでは抗原チャレンジ毎にマスト細胞の脱顆粒が起こり、種々のケミカルメディエーターが放出されていることが想定される点が上げられる。特にこの一連の研究で、NHR の評価に用いたヒスタミン誘発くしゃみ反応に関わるヒスタミン H1 受容体は、ヒスタミンの作用により発現亢進することが報告されている [8]。感作マウスモデルにおいて、マスト細胞から放出されるヒスタミンに LRT が拮抗することにより、結果としてヒスタミン H1 受容体の発現レベルが低下し、NHR の抑制に結びついた可能性が考えられた。また、第2世代抗ヒスタミン薬の一部は、ヒスタミン H1 受容体の定常的な活性化状態に影響を与える inverse agonist 活性を示すことが報告されている [9]。これらの特性を介した第2世代抗ヒスタミン薬の作用を詳細に検討してゆくことで、これまで知られていなかった有効性発現機構の解明に結びつくと共に、未知の NHR 発現誘導因子を標的としたアレルギー疾患治療法開発への新たな道が開ける可能性が示唆された。

5、まとめ

LRT は、少なくともその臨床投与量において、Th2 細胞活性や Th2 細胞依存性に発症する NHR に対する抑制効果は期待できない可能性が示された。ヒスタミン H1 受容体の発現に対する影響や inverse agonist 活性を介し、NHR を含めたアレルギー性鼻炎病態に与える第2世代抗ヒスタミン薬の効果について、今後さらに検討を加える必要性が考えられた。

6、調査・研究発表（口頭又は誌上発表）

- 1) マウス抗原誘発鼻粘膜過敏性亢進モデルに対する第2世代抗ヒスタミン薬の効果. 尾形 佐和子、宇田 直人、山崎 憲政、三浦 健人、森 晶夫、後藤 穰、神沼 修. 第71回日本アレルギー学会学術大会（東京）、2022.10.7-9.
- 2) Uda N, Ogata S, Yamasaki N, Miura S, Hosomi N, Mori A, Gotoh M, Kaminuma O. Re-evaluation of over-the-counter histamine H1-receptor antagonists based on their effects on murine models of allergen-induced nasal hyperresponsiveness. J Pharmacol Sci, 150:275-278, 2022.

7、引用文献

1. Nishimura, T.; Kaminuma, O.; Saeki, M.; Kitamura, N.; Matsuoka, K.; Yonekawa, H.; Mori, A.; Hiroi, T., Essential contribution of CD4+ T cells to antigen-induced nasal hyperresponsiveness in experimental allergic rhinitis. PLoS One **2016**, 11, e0146686.
2. Nishimura, T.; Kaminuma, O.; Saeki, M.; Kitamura, N.; Gotoh, M.; Mori, A.; Hiroi, T., Effects of anti-allergic drugs on T cell-mediated nasal hyperresponsiveness in a murine model of allergic rhinitis. Allergol. Int. **2018**, 67 Suppl 1, 25-31.
3. Döbbeling, U.; Waeckerle-Men, Y.; Zabel, F.; Graf, N.; Kündig, T. M.; Johansen, P., The antihistamines clemastine and desloratadine inhibit STAT3 and c-Myc activities and induce apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines. Exp Dermatol **2013**, 22, 119-24.
4. Yumibe, N.; Huie, K.; Chen, K. J.; Snow, M.; Clement, R. P.; Cayen, M. N., Identification of human liver cytochrome P450 enzymes that metabolize the nonsedating antihistamine loratadine. Formation of descarboethoxyloratadine by CYP3A4 and CYP2D6. Biochem Pharmacol **1996**, 51, 165-72.
5. Kanai, K.; Asano, K.; Watanabe, S.; Kyo, Y.; Suzaki, H., Epinastine hydrochloride

- antagonism against interleukin-4-mediated T cell cytokine imbalance in vitro. Int. Arch. Allergy Immunol. **2006**, 140, 43-52.
6. Gelfand, E. W.; Cui, Z. H.; Takeda, K.; Kanehiro, A.; Joetham, A., Fexofenadine modulates T-cell function, preventing allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. J Allergy Clin Immunol **2002**, 110, 85-95.
 7. Bryce, P. J.; Geha, R.; Oettgen, H. C., Desloratadine inhibits allergen-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness and alters T-cell responses in murine models of asthma. J Allergy Clin Immunol **2003**, 112, 149-58.
 8. Das, A. K.; Yoshimura, S.; Mishima, R.; Fujimoto, K.; Mizuguchi, H.; Dev, S.; Wakayama, Y.; Kitamura, Y.; Horio, S.; Takeda, N.; Fukui, H., Stimulation of histamine H1 receptor up-regulates histamine H1 receptor itself through activation of receptor gene transcription. Journal of pharmacological sciences **2007**, 103, 374-82.
 9. Mizuguchi, H.; Ono, S.; Hattori, M.; Sasaki, Y.; Fukui, H., Usefulness of HeLa cells to evaluate inverse agonistic activity of antihistamines. Int Immunopharmacol **2013**, 15, 539-43.
 10. Garcia, G.; Taille, C.; Laveneziana, P.; Bourdin, A.; Chanez, P.; Humbert, M., Anti-interleukin-5 therapy in severe asthma. Eur. Respir. Rev. **2013**, 22, 251-7.
 11. Bryce, P. J.; Geha, R.; Oettgen, H. C., Desloratadine inhibits allergen-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness and alters T-cell responses in murine models of asthma. J. Allergy Clin. Immunol. **2003**, 112, 149-58.
 12. Okubo, K.; Kurono, Y.; Ichimura, K.; Enomoto, T.; Okamoto, Y.; Kawauchi, H.; Suzaki, H.; Fujieda, S.; Masuyama, K., Japanese guidelines for allergic rhinitis 2020. Allergol. Int. **2020**, 69, 331-345.

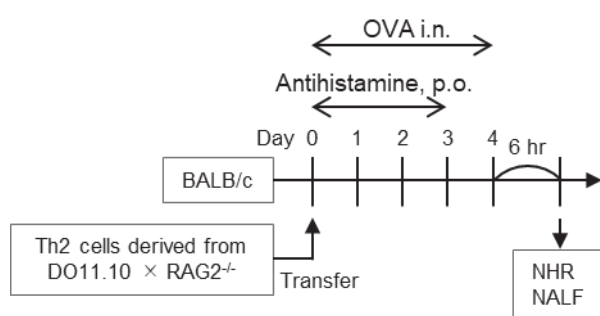


図1. Th2 移入マウスモデルの実験方法とタイムスケジュール.

DO11.10/RAG2^{-/-} マウスのナイーブ CD4 陽性 T 細胞から *in vitro* で分化誘導した抗原特異的 Th2 細胞を、BALB/c マウスに移入した (2 x 10⁷ cells/head)。Th2 細胞移入 6 時間後から、OVA を 1 日 1 回、5 日間連続で点鼻チャレンジ (i.n.) した。最終日を除く OVA チャレンジの 30 分前に、LRT を経口投与 (10 mg/kg, p.o.) した。最終チャレンジの 6 時間後に NHR および NALF 中の好酸球数を解析した。

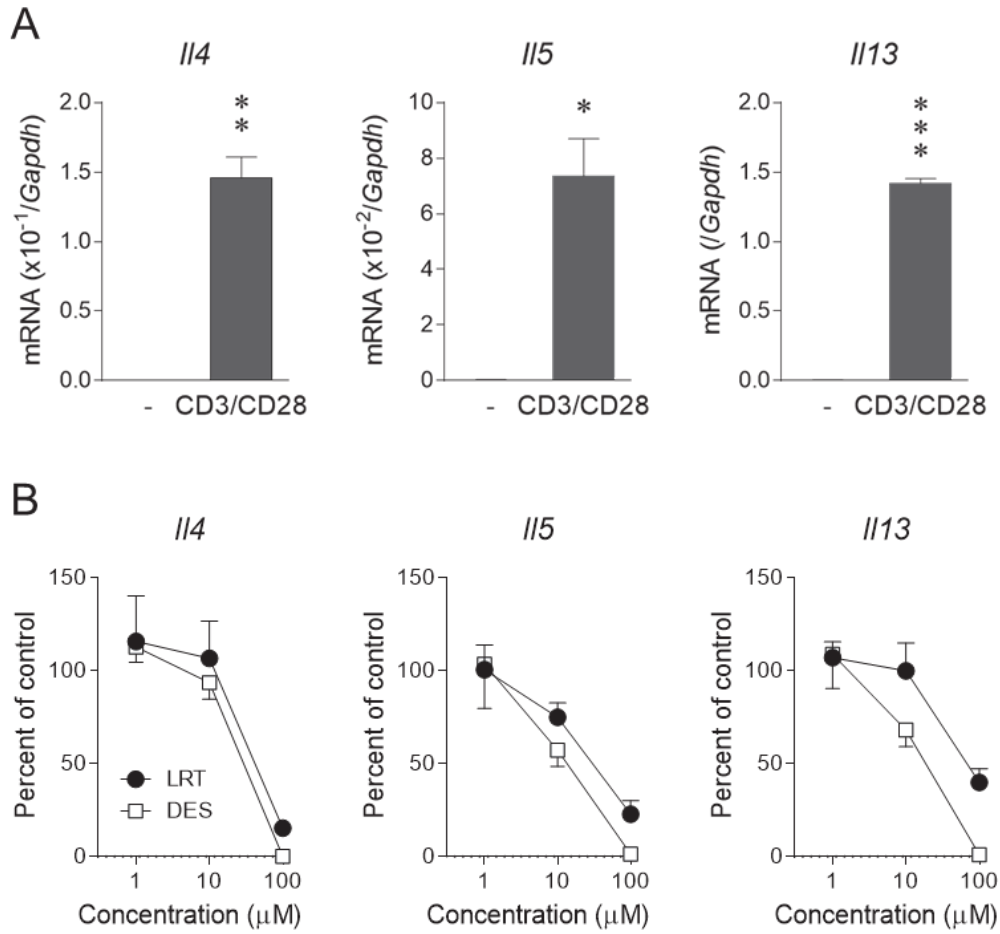


図2. Th2細胞のサイトカイン発現に対するLRTの効果.

DO11.10/RAG2^{-/-}マウスのナイーブCD4陽性T細胞から*in vitro*で分化誘導した抗原特異的Th2細胞を、LRTまたはDES存在／非存在下で、抗CD3/CD28抗体ビーズによる刺激培養を6時間行った。RNAを抽出して逆転写反応を行い、*IL4*、*IL5*および*IL13*遺伝子の発現をリアルタイムPCRシステムで検出した。(A)無刺激(-)／刺激(CD3/CD28)間の発現比較。(B)薬剤非存在下で刺激した際の発現レベルを100%として算出した薬剤の効果。 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, 無刺激コントロール群との比較 (N = 4)。

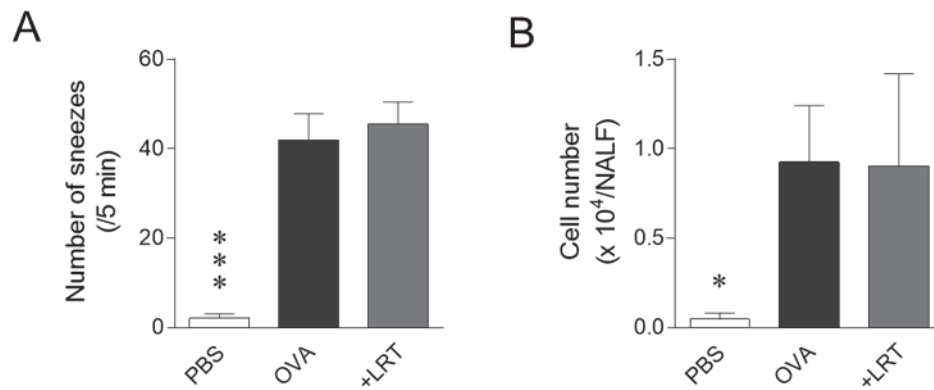


図 3. Th2 細胞移入マウスの抗原誘発 NHR および鼻粘膜好酸球浸潤に対する LRT の作用.

Th2 細胞を移入したマウスに LRT(10 mg/kg) 投与下で連日 OVA チャレンジした。最終チャレンジの 6 時間後に NHR (A) を解析し、鼻腔洗浄を行って NALF 中の好酸球 (B) 数を計数した。 $*p < 0.05$, $***p < 0.001$, OVA チャレンジしたコントロール群との比較 (N = 4-7)。

Title: Reevaluation of second-generation anti-histamines through the effect on nasal hyperresponsiveness

Name: Osamu Kaminuma

Name of Affiliation: Research Institute of Radiation Biology and Medicine

Address: 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8553, Japan

Tel: +81-82-257-5819

Abstract:

Although many second-generation antihistamines have been switch-OTC to the treatment of allergic rhinitis, differences in their efficacy are not clear. Last year, we found that loratadine (LRT), unlike other antihistamines, may inhibit the development of antigen-induced nasal hyperresponsiveness (NHR) in immunized mice. Herein, we investigated the in vitro and in vivo effects of LRT to narrow down its point of action. LRT and its active metabolite desloratadine (DES) inhibited the stimulation-induced $IL4$, $IL5$, and $IL13$ expression in Th2 cells. LRT displayed no effect on antigen-induced NHR or eosinophil infiltration into the nasal mucosa in Th2 cell-transferred mice. Although LRT and DES inhibit Th2 cytokine expression at high concentrations, they are unlikely to inhibit the development of NHR clinically via their effects.