

## 目次

表題	1
目次	2
本論文で用いた略語一覧	4
要旨	5
序論	6
第1章 正常モルモットを用いた LTC <sub>4</sub> 吸入による気道閉塞モデルの構築, 及び CysLT <sub>2</sub> 受容体の 機能的役割について	8
緒言	8
第1節 覚醒下モルモットを用いた LTC <sub>4</sub> 吸入による気道閉塞モデルの構築	9
1 実験目的	9
2 実験材料及び実験方法	9
3 実験結果	11
4 考察	13
第2節 LTC <sub>4</sub> 吸入による気道閉塞における CysLT <sub>2</sub> 受容体の機能的役割について	14
1 実験目的	14
2 実験材料及び実験方法	14
3 実験結果	16
4 考察	19
小括	20
第2章 感作モルモットを用いた CysLT <sub>2</sub> 受容体の関与するアナフィラキシーモデルの構築, 及び ONO-6950 の効果について	21
緒言	21
第1節 感作モルモットを用いた CysLT <sub>2</sub> 受容体の関与するアナフィラキシーモデルの構築	22
1 実験目的	22
2 実験材料及び実験方法	22
3 実験結果	25
4 考察	30
第2節 CysLT <sub>2</sub> 受容体の関与するアナフィラキシーモデルに対する ONO-6950 の効果	31
1 実験目的	31
2 実験材料及び実験方法	31
3 実験結果	32
4 考察	36
小括	37

第3章 CysLT <sub>2</sub> 受容体のヒト気管支における発現と気管支収縮への関与について	38
緒言	38
1 実験目的	39
2 実験材料及び実験方法	39
3 実験結果	45
4 考察	51
小括	53
総括	54
謝辞	55
論文目録	55
引用文献	56

## 本論文で用いた略語一覧

BALF	bronchoalveolar lavage fluid
BayCysLT <sub>2</sub> RA	1-(5-carboxy-2-{3-[4-(3-cyclohexylpropoxy)phenyl]propoxy}benzoyl)-4-piperidinecarboxylic acid
CysLTs	cysteinyl leukotrienes
DMF	N,N-dimethylformamide
FITC-BSA	fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin
FITC-HSA	fluorescein isothiocyanate-conjugated human serum albumin
γGTP	gamma-glutamyl transpeptidase
ICS	inhaled corticosteroid
IL	interleukin
LABA	long-acting β <sub>2</sub> agonist
LAMA	long-acting anti-muscarinic antagonist
LT	leukotriene
LTRA	leukotriene receptor antagonist
MC	methylcellulose
ONO-6950	4,4'-[4-Fluoro-7-({4-[4-(3-fluoro-2-methylphenyl)butoxy]phenyl}ethynyl)-2-methyl-1 <i>H</i> -indole-1,3-diyl]dibutanoic acid
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate buffered saline
SABA	short-acting β <sub>2</sub> agonist
S-hexyl GSH	S-hexylglutathione
sRaw	specific airway resistance
Th2	T helper 2 cell
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
WS	wellsolve

## 要旨

背景：プラシルカストやモンテルカスト等の CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬は、気管支喘息の軽症から重症までの幅広い患者層に対する長期管理薬として使用されている。一方、CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の効果は、これらを服薬している患者の約半数で不十分とされており、このような患者において CysLT<sub>2</sub> 受容体が関与している可能性がある。しかしながら、CysLT<sub>2</sub> 受容体が関与する気管支喘息モデルが存在しなかったため、新規の CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の創製や本受容体の役割解析には限界があった。

目的：新規の喘息モデルを構築し、CysLT<sub>2</sub> 受容体の気道における役割を明らかにする。

方法：①CysLT<sub>2</sub> 受容体が関与するモルモット気道閉塞モデル、②CysLT<sub>2</sub> 受容体が関与するモルモットアナフィラキシーモデル、及び③ヒト気管支標本の平滑筋収縮モデルを用いて、CysLTs 受容体拮抗薬及び喘息治療薬の効果を評価した。モルモットの CysLT<sub>2</sub> 受容体は LTC<sub>4</sub> によって活性化されるが、LTC<sub>4</sub> は生体内では速やかに代謝されるため、S-hexyl GSH を用いてこれを抑制した。

結果：S-hexyl GSH を処置したモルモットに LTC<sub>4</sub> を吸入させた結果、CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるモンテルカストや気管支拡張薬に抵抗性の気道収縮及び血管透過性の亢進とこれらに伴う肺のエアトラッピングが認められた。また、S-hexyl GSH を処置した感作モルモットに抗原を曝露した場合には、モンテルカストでは抑制されない致死呼吸困難を伴うアナフィラキシー反応が誘発され、これらの反応は既存薬であるステロイドや気管支拡張薬により有意に抑制されることが確認された。このような動物モデルにおいて、CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬や CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬である ONO-6950 がモンテルカストを上回る有効性やステロイドの減量効果を示した。ヒト気道組織を用いた検討では、2 例の実際の気管支喘息患者の気道において CysLT<sub>2</sub> 受容体の存在が確認され、このうちの 1 例では、抗原刺激による感作標本の平滑筋収縮を ONO-6950 がモンテルカストよりも強く抑制した。

考察：本研究で構築した動物モデルは、CysLT<sub>2</sub> 若しくは CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬の有効性評価や CysLT<sub>2</sub> 受容体の役割解析に有用と考えられる。CysLT<sub>2</sub> 受容体は、平滑筋収縮作用や血管透過性亢進作用によって末梢気道閉塞を引き起こすことにより、モンテルカストが効果を示しにくい喘息患者の病態に関与している可能性があるが、本受容体の関与が低い患者層も存在するものと考えられる。

総括：本研究により、既存の気管支喘息治療薬である CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬に抵抗性を示す末梢気道病変や気管支平滑筋の収縮反応に CysLT<sub>2</sub> 受容体が深く関与していることが示された。また、経口投与可能な CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬である ONO-6950 が、既存の喘息治療薬では効果不十分な患者に対しても効果を示す新たな治療選択肢となる可能性が考えられた。

## 序論

成人の気管支喘息は、気道の慢性炎症、気管支平滑筋収縮や気道分泌による可逆的な気道狭窄、気道過敏性獲得によって、反復的に引き起こされる変動性を持った咳、喘鳴、呼吸困難等の臨床症状で特徴付けられる慢性閉塞性呼吸器疾患であり、気道の過敏性が高いほど喘息症状が明らかな傾向にあるとされている<sup>1)</sup>。

喘息の病態の本体は慢性気道炎症であり、マクロファージ、肥満細胞、好酸球、T細胞、B細胞、樹状細胞、気道上皮細胞、気道平滑筋、自然リンパ球、繊維芽細胞等の多岐に渡る細胞と、これら細胞から産生・遊離されるTh1、Th2若しくはTh17サイトカイン類やケミカルメディエーターが複雑に絡み合うことによって様々な病態を形成する。最も特徴的な炎症像として、IL-4、IL-5、IL-13等のTh2サイトカイン産生や喀痰中・末梢血中好酸球比率が高い好酸球性気道炎症が知られているが<sup>2,4)</sup>、一部の重症例・難治例においてはIL-8、-23等のTh17サイトカイン産生を伴う好中球優位な気道炎症も認められる<sup>5,6)</sup>。気道炎症が持続すると、気道上皮細胞の剥離や気道平滑筋の破壊と、これに対する修復過程である平滑筋肥大、粘膜下腺過形成や上皮基底膜肥厚等の気道リモデリングが生じた結果、気道閉塞が引き起こされ、気道過敏性を獲得し更なる重症化に至る。従って、喘息を安定した状態に管理する上では、気道炎症の抑制と気管支拡張による気道確保が重要である。

気管支喘息の治療薬は、病態を安定に維持するための「長期管理薬」と喘息発作に対処するための「発作治療薬」に分けられる<sup>1)</sup>。長期管理薬には、抗炎症作用、気管支拡張作用、または両者を併せ持つ薬剤が使用される。基本的には、強力な抗炎症作用を示す吸入ステロイド (Inhaled corticosteroid, ICS) が治療ステップ1~4のいずれにおいても第一選択薬とされ、ICSによるコントロールが不十分な場合に、長時間作用性 $\beta_2$ 刺激薬 (Long-acting  $\beta_2$  agonist, LABA)、ロイコトリエン拮抗薬、テオフィリンが追加され、治療ステップ3以上では長時間作用性抗コリン薬 (Long-acting anti-muscarinic antagonists, LAMA)、治療ステップ4では経口ステロイド若しくは抗IgE抗体が追加される。また、これら長期管理薬を使用しているにも関わらず急性発作が生じた際には、短時間作用性 $\beta_2$ 刺激薬 (Short-acting  $\beta_2$  agonist, SABA)、経口ステロイドやテオフィリンが発作治療薬として使用される。

システイニルロイコトリエン (CysLTs: LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) は、CysLT<sub>1</sub>受容体を介して平滑筋収縮、血管透過性亢進、粘液分泌、白血球遊走等の生理活性を示し<sup>7-11)</sup>、プラナルカストやモンテルカスト等のCysLT<sub>1</sub>受容体拮抗薬の喘息治療における一定の臨床的意義が確立されている<sup>1,12)</sup>。しかしながら、CysLT<sub>1</sub>受容体拮抗薬を処方されている患者の約半数ではその効果は不十分とされている<sup>13,14)</sup>。一方、CysLTsの受容体としては、CysLT<sub>1</sub>受容体の他にCysLT<sub>2</sub>受容体が存在する<sup>15,16)</sup>。CysLT<sub>2</sub>受容体についても、気道上皮、気道平滑筋や炎症細胞上に発現が確認されているため<sup>17,18)</sup>、CysLT<sub>1</sub>受容体拮抗薬の効果が不十分な喘息患者の病態に本受容体が関与している可能性が考えられ、CysLT<sub>2</sub>受容体拮抗薬やCysLT<sub>1/2</sub>受容体拮抗薬が新たな治療薬となる可能性がある。しかしながら、ヒトの病態に類似し、かつCysLT<sub>2</sub>受容体が明確に関与する気管支喘息モデルが存在しなかったため、これまでは新規化合物創製のためのスクリーニング、有効性評価や病態におけるCysLT<sub>2</sub>受容体の機能解析に限界があった。

そこで本研究では、CysLT<sub>2</sub>受容体が関与する気道閉塞モデル及びアナフィラキシーのモルモットモデルを構築し、選択的CysLT<sub>2</sub>受容体拮抗薬であるBayCysLT<sub>2</sub>RA<sup>19)</sup>を用いてCysLT<sub>2</sub>受容体の機能的役割を

解析した。また、新規の CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬 ONO-6950<sup>20)</sup> 及び BayCysLT<sub>2</sub>RA を用いて、気道のアレルギー反応における CysLT<sub>2</sub> 受容体の役割についても検討した。

# 第1章 正常モルモットを用いた LTC<sub>4</sub> 吸入による気道閉塞モデルの構築, 及び CysLT<sub>2</sub> 受容体の機能的役割について

## 緒言

気管支喘息の病態モデルの作製には, CysLTs に対する気道の反応性が富んでいるモルモットが広く用いられてきたが, モルモットの CysLT<sub>2</sub> 受容体はヒト CysLT<sub>2</sub> 受容体と異なり, LTC<sub>4</sub> によって活性化されることが明らかにされている<sup>16, 21)</sup> (Fig. 1). しかしながら, LTC<sub>4</sub> は, 生体内の代謝酵素である  $\gamma$  グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ GTP) によって速やかに代謝されるため<sup>22, 23)</sup>, モルモットにおいて通常認められる CysLTs による喘息反応は主に CysLT<sub>1</sub> 受容体を介する反応と考えられる. そこで, 本研究では, LTC<sub>4</sub> の代謝を抑制することによって CysLT<sub>2</sub> 受容体を活性化させるために,  $\gamma$ GTP 阻害剤として S ヘキシルグルタチオン (S-hexyl GSH) を使用した<sup>24)</sup>.

既に我々は, S-hexyl GSH を処置した条件下では, LTC<sub>4</sub> が CysLT<sub>2</sub> 受容体を介して麻酔下モルモットの気道収縮を引き起こすことを報告しているが<sup>25)</sup>, CysLT<sub>1</sub> 受容体を介する気道収縮との違いや CysLT<sub>2</sub> 受容体の気管支喘息における役割は明らかではない.

本章では, CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する気道閉塞のメカニズムを明らかにするために, 覚醒下モルモットへの CysLTs 吸入によって実際の喘息の状態に近似した気道閉塞モデルを構築し, CysLTs 受容体拮抗薬及び気管支拡張薬の効果を検討した.

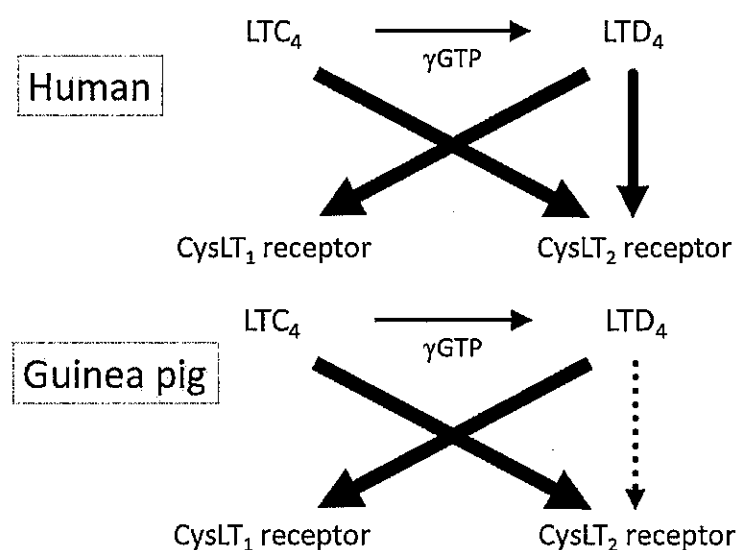


Fig. 1 Differences of CysLT-ligands binding affinity to CysLT receptors between human and guinea pig.

## 第1節 正常モルモットを用いた LTC<sub>4</sub> 吸入による気道閉塞モデルの構築

### 1. 実験目的

正常モルモットに LTC<sub>4</sub> を吸入させることにより, CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する気道閉塞モデルを構築した.

### 2. 実験材料及び実験方法

#### 2.1. 実験動物

雄性 Hartley 系モルモット (日本エスエルシー株式会社: 入荷時週齢 5 週齢, 使用開始時 6~7 週齢) を使用した. 飼育用ケージ (W: 320 mm × L: 550 mm × H: 350 mm) に 1 ケージ当り 5~6 匹収容し, 温度 24±2°C, 湿度 55±15%, 換気 100%新鮮外気にて 15±5 回/時間, 明暗サイクル 12 時間 (明期; 8:00~20:00) で飼育した. 飼育期間中は固型飼料 LRC4 (オリエンタル酵母工業株式会社) 及び上水道水 (自動給水装置) を自由摂取させた. 尚, 糞尿は自動洗浄機により処理し, 飼育ケージは 1~2 週間に 1 回以上の頻度で交換した. 体重測定時に動物を観察し, 一般状態に異常のない動物を使用した. 本研究は小野薬品工業株式会社 研究本部「動物実験等に関する規程」を遵守して実施した.

#### 2.2. 試薬

LTC<sub>4</sub> 溶液 (Cayman Chemical Company) は -80°C で保存した. 媒体であるエタノールを窒素ガスにて蒸発させた後, Phosphate Buffered Saline (PBS, Life Technologies Corporation) を用いて 10 µg/mL の濃度に溶解し, 必要に応じて PBS で希釈した. 調製後は氷上で保存した.

S-hexyl GSH (Sigma-Aldrich Corporation) は 5°C で保存し, S-hexyl GSH に等モル量の 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液及び生理食塩液を加えて 60 mg/mL の濃度にした後, 超音波処理により完全に溶解させた. 調製後は室温・遮光下で保存した.

Montelukast (モンテルカスト, Sequoia Research Products, Ltd.) は 0.5 w/v% メチルセルロース 400 cP 溶液 (0.5 w/v% MC, 滅菌済, 和光純薬工業株式会社) を加え, メノウ製の乳鉢及び乳棒を用いて 0.03 mg/mL の溶液を調製した.

BayCysLT<sub>2</sub>RA; 1-(5-carboxy-2-{3-[4-(3-cyclohexylpropoxy)phenyl]propoxy}benzoyl)-4-piperidinecarboxylic acid は, 当量の 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を添加した後, 1 vol% のウェルソルブ (1 vol% WS, 株式会社セレステ) 含有生理食塩液を加え, 超音波処理を施して 2 mg/mL 溶液を調製し, 使用まで遮光して室温保存した.

#### 2.3. 麻酔下モルモットにおける気道収縮の誘発と気道抵抗の評価

ペントバルビタールナトリウム (75 mg/kg, i.p., ソムノペンチル®, シェリング・プラウ株式会社) にて麻酔を施したモルモットを背臥位に固定し, 頸部を正中切開して気管を露出後, 気管を切開しポリエチレン細管を挿入した. ポリエチレン細管の反対側を定量式人工呼吸装置 (Model SN-480-7, 株式会社シナノ製作所) に接続し, 送気量 4 mL/回, 換気回数 70 回/分で人工換気した. ポリエチレン細管の副側路に接続した差圧管 (PNEUMOTACHOMETER, 株式会社エム・アイ・ピー・エス) を用い, 通気圧を WinPULMOS-III (Version 3.6, 株式会社エム・アイ・ピー・エス) により測定した. また, 頸静脈にカテーテ



ルを挿入して、1 vol% WS, BayCysLT<sub>2</sub>RA, S-hexyl GSH 及び LTC<sub>4</sub> の投与経路を確保した。通気圧が安定したことを確認した上で、頸静脈に挿入したカテーテルを介して 1 vol% WS あるいは BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/0.5mL/kg) を静脈内に bolus 投与し、約 1 分後に S-hexyl GSH (60 mg/mL/kg) に引き続いて LTC<sub>4</sub> (10 µg/mL/kg) を静脈内に bolus 投与した。投与後直ちに、10 単位/mL ヘパリン含有生理食塩液 (約 0.5 mL) を投与して、カテーテル内に残存する溶液を完全に投与した。通気圧を LTC<sub>4</sub> 投与後 10 分以上測定した後、気管を完全に閉塞させて最大通気圧を測定した。最大通気圧測定後は、人工呼吸を停止して動物を安楽死させた。

モンテルカスト (0.3 mg/10mL/kg) は LTC<sub>4</sub> 吸入の 24 時間前に経口投与し、BayCysLT<sub>2</sub>RA は 1 分前に静脈内投与した。

尚、モンテルカスト (0.3 mg/kg, p.o.) は、LTD<sub>4</sub> (0.3 µg/kg, i.v.) によるモルモットの気道収縮を完全に抑制することを確認している<sup>26)</sup>。BayCysLT<sub>2</sub>RA (Compound A として記載、1 mg/kg, i.v.) は、S-hexyl GSH を処置したモルモットにおいて、LTC<sub>4</sub> (15 µg/kg, i.v.) による気道収縮を有意に抑制することを確認している<sup>25)</sup>。

## 2.4. 覚醒下モルモットにおける気道収縮の誘発と気道抵抗及び肺容積の評価

覚醒下のモルモットを呼吸抵抗測定用チャンバーに固定し、LTC<sub>4</sub> 若しくは LTD<sub>4</sub> 吸入前の気道の通気圧をダブルフロー・プレチスモグラフ法 (Win-PULMOS- I, 株式会社エム・アイ・ピー・エス) により測定した。S-hexyl GSH 若しくは BayCysLT<sub>2</sub>RA を用いる試験については、CysLTs 吸入直前にモルモットの前肢静脈より投与した。その後、動物をアクリル製チャンバー内に収容し、超音波式ネブライザ (NE-U07, オムロン株式会社) で霧化した LTC<sub>4</sub> (2 µg/mL) を自発呼吸下で 1 分間吸入曝露した (風量: 最大, 薬液の容量: 3 mL)。吸入曝露後、特異的気道抵抗値 (specific airway resistance: sRaw, cmH<sub>2</sub>O/mL/sec) を測定することにより呼吸抵抗を評価した。sRaw を測定した後の動物を、過剰量のペントバルビタールナトリウム (75 mg/kg, i.p.) による麻酔下で大腿部より放血致死させ、肺を摘出後、足容積測定試験装置 (TK-101 CMP, Unicom) を用いて肺実質の容積を測定した。

## 2.5. 肺の病理組織切片の作製

肺の容積を測定した後、S-hexyl GSH 非処置・処置下で LTC<sub>4</sub> を吸入したコントロール群の個体については 10 vol% ホルマリン緩衝液中で一晩固定した。固定した肺組織をパラフィン包埋した後、厚さ 4 µm の薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

## 2.6. 統計解析

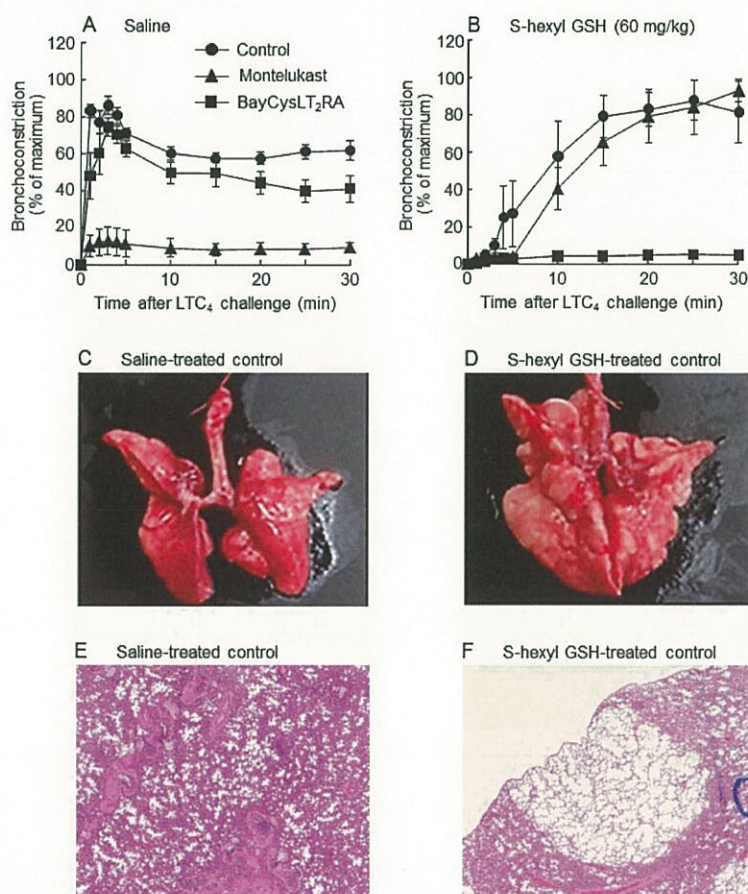
統計学的解析には、SAS 9.1.3 Service pack 4 (SAS Institute Japan) and the linked system EXSAS Version 8.1 (CAC, Exicare Co.) を用いた。

PBS 吸入群と LTC<sub>4</sub> 吸入群との比較は Dunnett の多重比較により行い、有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### 3. 実験結果

#### 3.1. 麻酔下モルモットの LTC<sub>4</sub> 静脈内投与による気道収縮に対する CysLTs 拮抗薬の効果

S-hexyl GSH 非処置下での LTC<sub>4</sub> による気道収縮は CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるモンテルカストによってほぼ完全に抑制された (Fig. 2A) . これに対して, S-hexyl GSH (60 mg/kg) を処置した場合の LTC<sub>4</sub> による気道収縮はモンテルカストでは抑制されず, CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である BayCysLT<sub>2</sub>RA によって完全に抑制された (Fig. 2B) . 本反応は, LTC<sub>4</sub> 単独処置による気道収縮と比べて持続的であり, 反応惹起 30 分以内の緩解は認められなかった (Fig. 2A 及び 2B) . また, S-hexyl GSH 処置下の control 群の肺は非処置下の肺と比べて膨張しており (Fig. 2C 及び 2D) , 病理組織像では細気管支から肺泡領域において空気の貯留が確認された (Fig. 2E 及び 2F) .



**Fig. 2** Effects of montelukast and BayCysLT<sub>2</sub>RA on i.v. LTC<sub>4</sub>-induced bronchoconstriction in anesthetized artificially ventilated guinea pigs treated, or non-treated, with S-hexyl GSH.

(A and B) Effects of montelukast, a CysLT<sub>1</sub> receptor antagonist, and BayCysLT<sub>2</sub>RA, a CysLT<sub>2</sub> receptor antagonist, on i.v. LTC<sub>4</sub>-induced bronchoconstriction in anesthetized artificially ventilated guinea pigs treated with S-hexyl GSH. S-hexyl GSH was i.v. administered at 0 (A) or 60 (B) mg/kg 10 s before i.v. injection of LTC<sub>4</sub> (10 µg/kg). Montelukast (0.3 mg/kg, p.o.) and BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/kg, i.v.) were administered 24 h and 1 min, respectively before LTC<sub>4</sub> administration. Each point represents the mean±S.E. of 6 animals. (C, D, E and F) i.v. LTC<sub>4</sub>-induced lung air-trapping in the lungs of a guinea pig treated with S-hexyl GSH. Air trapping was assessed macroscopically (C and D) and histologically (E and F). S-hexyl GSH was i.v. administered at 0 (C and E) or 60 (D and F) mg/kg 10 s before injection of LTC<sub>4</sub> (10 µg/kg).

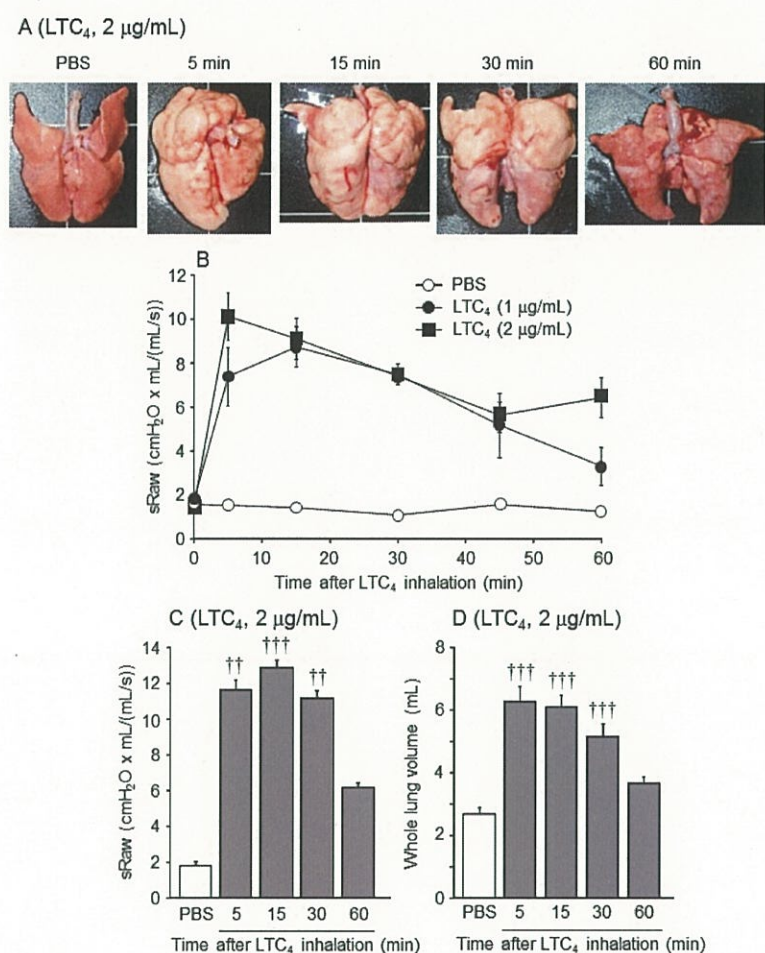


### 3.2. 覚醒下モルモットにおける LTC<sub>4</sub> 吸入後の気道抵抗及び肺容積の経時的変動

3.1.において、麻酔下モルモットに S-hexyl GSH を処置して LTC<sub>4</sub> を静脈内投与することによって、エアートラッピングを伴う気道閉塞が惹起されることを示した。しかしながら、本条件下では、気道収縮惹起 30 分後の実験終了時点ではほぼ全例の動物が心停止状態であり、人工換気による何らかの物理的な肺障害が生じている可能性が否定出来ないと考えられた。

そこで、致死的是ではない範囲の濃度で LTC<sub>4</sub> を自発呼吸させた際にも同様にエアートラッピングが生じるか否かを検討した。

S-hexyl GSH (60 mg/kg, i.v.) を処置した覚醒下のモルモットに、1 若しくは 2 µg/mL の LTC<sub>4</sub> を 1 分間吸入曝露することにより、吸入 5~15 分後をピークとする気道抵抗 (sRaw) の上昇がみられ (Fig. 3B), LTC<sub>4</sub> (2 µg/mL) 吸入群では、sRaw 上昇に伴う明らかなエアートラッピング及び肺の容積の増大が確認された (Fig. 3A 及び 3D)。



**Fig. 3** Inhaled LTC<sub>4</sub>-induced bronchoconstriction and air-trapping in S-hexyl GSH-treated conscious guinea pigs.

Time-course changes in inhaled LTC<sub>4</sub>-induced lung air-trapping (A and D) and increase in specific airway resistance (sRaw, B and C) in guinea pigs treated, or non-treated, with S-hexyl GSH. S-hexyl GSH was i.v. administered at 60 mg/kg 10 s before inhalation of LTC<sub>4</sub> (A, C and D: 2 µg/mL; B: 1 or 2 µg/mL, 1 min). Each point or column represents the mean±S.E. of 4-6 animals. †† and †††: statistical significance as compared to the PBS-treated group was set at  $p < 0.01$  and  $0.001$ , respectively.

引用) Sekioka T. et al., *Er. J. Pharmacol.*, 2017, 794, 147-53.

#### 4. 考察

本節では、S-hexyl GSH を処置した覚醒下モルモットに LTC<sub>4</sub> を吸入させることにより、CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する気道閉塞モデルを構築した。

S-hexyl GSH を処置した麻酔下モルモットに LTC<sub>4</sub> を静脈内投与した場合には、S-hexyl GSH 非処置の動物では認められないエアートラッピングを伴う気道閉塞が確認された。しかしながら、気道収縮惹起 30 分後時点ではほぼ全例の動物が心停止状態であり、LTC<sub>4</sub> による強力な気道平滑筋収縮に人工換気が加わったことによる物理的な肺障害が生じている可能性が否定出来なかった。また、本実験条件下で捉えている気道閉塞は自発呼吸下での呼気性呼吸困難ではなく、人工換気装置による圧変化を反映している可能性が示唆されている<sup>27, 28)</sup>。

そこで、S-hexyl GSH を処置した覚醒下モルモットに致死的でない濃度の LTC<sub>4</sub> を吸入させて自発呼吸を測定したところ、明らかな気道抵抗の上昇とエアートラッピングが再現された。従って、麻酔下の検討では、CysLT<sub>2</sub> 受容体が、CysLT<sub>1</sub> 受容体を介する気道収縮よりも持続的な気道収縮及びエアートラッピングを誘発して換気障害を起こした結果、心停止に至った可能性が高いと考えられた。

エアートラッピングは小気道における平滑筋収縮、炎症等の病変に関与しており<sup>29)</sup>、重症患者では明らかなエアートラッピングが認められるのに対して、非重症患者では認められないことが報告されている<sup>30)</sup>。また、重症喘息患者や喘息死亡例の肺では、末梢気道における炎症やリモデリングが生じているとされている<sup>31-33)</sup>。従って、CysLT<sub>2</sub> 受容体は、気管支喘息における末梢気道病変に関与しており、重症例の病態形成において重要な役割を担っている可能性があると考えられる。

## 第2節 LTC<sub>4</sub>吸入による気道閉塞における CysLT<sub>2</sub>受容体の機能的役割について

### 1. 実験目的

第1節では、S-hexyl GSH を処置した覚醒下のモルモットにおいて、LTC<sub>4</sub> の吸入によってエアートラッピングを伴う気道収縮反応が引き起こされることが確認された。しかしながら、本反応に関与する CysLTs 受容体の種類や LTC<sub>4</sub> の活性代謝物である LTD<sub>4</sub> による気道収縮反応との違いは不明であるため、CysLTs 受容体拮抗薬や気管支拡張薬を用いて LTC<sub>4</sub> による気道閉塞における CysLT<sub>2</sub> 受容体の機能的役割について検討した。

### 2. 実験材料及び実験方法

#### 2.1. 実験動物

第1節 2.1 と同様。

#### 2.2. 試薬

LTC<sub>4</sub> 及び LTD<sub>4</sub> 溶液（いずれも Cayman Chemical Company）は -80℃ で保存した。媒体であるエタノールを窒素ガスにて蒸発させた後、PBS を用いてそれぞれ 10 及び 30 µg/mL の濃度に溶解し、必要に応じて PBS で希釈した。調製後は氷上で保存した。

S-hexyl GSH、モンテルカスト及び BayCysLT<sub>2</sub>RA の保存及び調製は、第1節 2.2 に従い、モンテルカストについては 0.01 及び 0.03 mg/mL の溶液を調製した。

Salmeterol Xinafoate（サルメテロール、Sigma-Aldrich Corporation）は室温で保存した。サルメテロールは N, N-dimethylformamide（DMF）を加えて溶解し、5 mg/mL 溶液を調製後、生理食塩液を用いて 0.1 mg/mL に希釈した。これを更に 2 vol% DMF 含有生理食塩液（2 vol% DMF）を用いて 30 µg/mL に希釈した。調製後は室温で保存した。

FITC-BSA（Fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin）及び FITC-HSA（Fluorescein isothiocyanate-conjugated human serum albumin）（いずれも Sigma-Aldrich Corporation）は生理食塩液にて 4 mg/mL に調製し、氷冷下で遮光保存して使用した。調製した FITC-BSA 及び FITC-HSA の一部については、正常動物より採取した気管支肺胞洗浄液（BALF, bronchoalveolar lavage fluid）の遠心上清を用いて段階希釈し検量線用サンプルを調製した。

#### 2.3. 覚醒下モルモットにおける気道収縮の誘発と気道抵抗及び肺容積の評価

覚醒下のモルモットを呼吸抵抗測定用チャンバーに固定し、LTC<sub>4</sub> 若しくは LTD<sub>4</sub> 吸入前の気道の通気圧をダブルフロー・プレチスモグラフ法（Win-PULMOS-I, 株式会社エム・アイ・ピー・エス）により測定した。S-hexyl GSH 若しくは BayCysLT<sub>2</sub>RA を用いる試験については、CysLTs 吸入直前にモルモットの前肢静脈より投与した。その後、動物をアクリル製チャンバー内に収容し、超音波式ネブライザ（NE-U07, オムロン株式会社）で霧化した LTC<sub>4</sub>（2 µg/mL）若しくは LTD<sub>4</sub>（30 µg/mL）を自発呼吸下で1分間吸入曝露した（風量：最大、薬液の容量：3 mL）。吸入曝露後、ダブルフロー・プレチスモグラフ法によって sRaw を測定することにより呼吸抵抗を評価した。sRaw を測定した後の動物を、過剰量のペント

バルビタールナトリウム (75 mg/kg, i.p.) による麻酔下で大腿部より放血致死させ、肺を摘出後、足容積測定試験装置 (TK-101 CMP, Unicom) を用いて肺実質の容積を測定した。

モンテルカスト及び BayCysLT<sub>2</sub>RA の投与方法は、第 1 節 2.4 に従った。

サルメテロール (30 µg/kg) は、LTC<sub>4</sub> 若しくは LTD<sub>4</sub> 吸入曝露の 1 分前に静脈内投与した。

尚、モンテルカスト (0.3 mg/kg, p.o.) は、LTD<sub>4</sub> (0.3 µg/kg, i.v.) によるモルモットの気道収縮を完全に抑制することを確認している<sup>26)</sup>。BayCysLT<sub>2</sub>RA (Compound A として記載, 1 mg/kg, i.v.) は、S-hexyl GSH を処置したモルモットにおいて、LTC<sub>4</sub> (15 µg/kg, i.v.) による気道収縮を有意に抑制することを確認している<sup>25)</sup>。

## 2.4. 気道の血管透過性の評価

覚醒下の正常モルモットに、モンテルカスト (0.1 mg/kg) 若しくは媒体である 0.5 w/v% MC (10 mL/kg) を経口投与し、約 24 時間後に動物の右前肢静脈より FITC-BSA 若しくは FITC-HSA (いずれも 2 mg/0.5 mL/kg) 及び BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/0.5 mL/kg) 若しくは媒体である 1 vol% WS (0.5 mL/kg) を投与した。直ちに左前肢静脈より S-hexyl GSH (60 mg/2 mL/kg) 及び LTC<sub>4</sub> (2 µg/mL/kg) 若しくは媒体である 0.1 vol% EtOH (1 mL/kg) を投与することにより気道の血管透過性を亢進させた。LTC<sub>4</sub> 投与 15 分後に、ペントバルビタールナトリウム (64.8 mg/mL 原液を 0.3 mL/animal) を静脈内投与し、大腿動静脈より放血致死させて開胸した。速やかに気管上部を切開してカニューレを挿入後、氷冷した 3.8 mg/mL クエン酸三ナトリウム二水和物含有生理食塩液 10 mL を注入・回収する操作を計 5 回行い、BALF として回収した。BALF は遠心分離 (4°C, 3,000 rpm, 5 min, HITACHI HIMAC CENTRIFUGE, ローター RPRS3-3-439) するまで氷冷下で遮光保存した。遠心分離後の上清を遮光した測定用プレート (Assay Plate, 96 Well Black, Flat Bottom, Non-treated, No Lid, Non-Sterile, Polystyrene, Corning Incorporated) に 200 µL ずつ移し、各検体及び検量線用サンプルの蛍光強度 (Ex: 485 nm / Em: 538 nm) を Fmax マイクロプレートリーダー及びその起動ソフトウェアである SOFTmax PRO version 1.3.1f (日本モレキュラーデバイス株式会社) にて測定した。FITC-BSA 若しくは FITC-HSA の検量線を用いて、各個体の気道内に漏出した FITC-BSA 若しくは FITC-HSA 濃度を算出した。

## 2.5. 統計解析

統計学的解析には、SAS 9.1.3 Service pack 4 (SAS Institute Japan) およびその連動システム EXSAS Version 8.1 (CAC, Exicare Co.) を用いた。

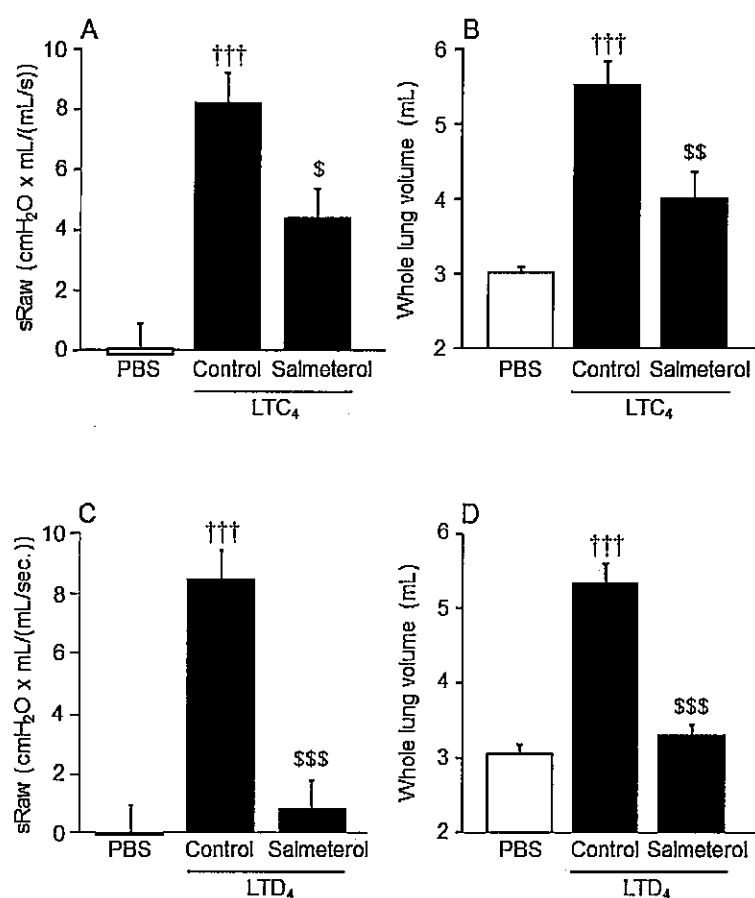
FITC-BSA 及び FITC-HSA の検量線の線形回帰分析には、マイクロプレートリーダー (F max, 日本モレキュラーデバイス株式会社) を用いた。

PBS 群若しくは normal 群と control 群、control 群と salmeterol 群、control 群と各化合物投与群、各化合物投与群間での比較は Dunnett の多重比較により行い、有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### 3. 実験結果

#### 3.1. LTC<sub>4</sub>及びLTD<sub>4</sub>吸入投与による覚醒下モルモットの気道収縮及びエアートラッピングに対する気管支拡張薬の効果

サルメテロール (30 µg/kg, i.v.) は, S-hexyl GSH 処置下の覚醒下モルモットに LTC<sub>4</sub> を吸入して引き起こされる気道収縮と肺の過膨張を部分的に抑制した (Fig. 4A 及び 4B) . これに対して, LTD<sub>4</sub> 吸入による気道収縮と肺の過膨張は, サルメテロール (30 µg/kg, i.v.) によってほぼ完全に抑制された (Fig. 4C 及び 4D) .



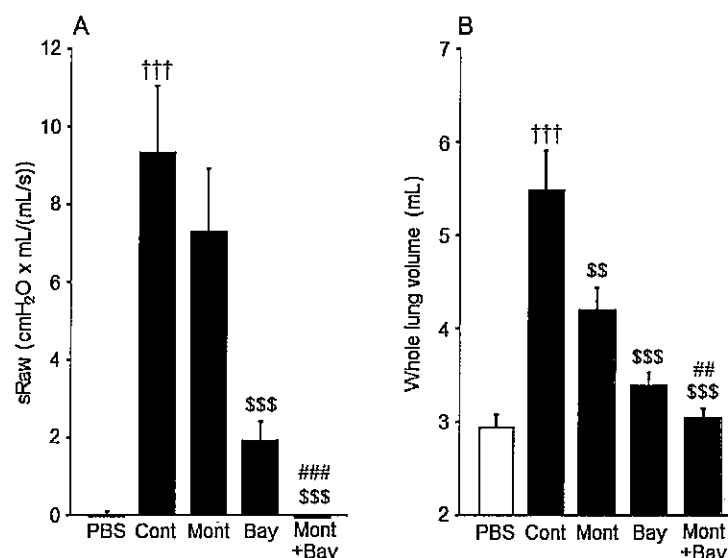
**Fig. 4** Effects of salmeterol on bronchoconstriction and air-trapping in S-hexyl GSH-treated conscious guinea pigs.

Effects of the bronchodilator adrenergic  $\beta_2$  receptor agonist salmeterol on inhaled LTC<sub>4</sub> (A and B)- or inhaled LTD<sub>4</sub> (C and D)-induced increase in specific airway resistance (sRaw, A and C) and whole lung volume (B and D) in guinea pigs treated, or non-treated with S-hexyl GSH. S-hexyl GSH was i.v. administered at 60 mg/kg 10 s before inhalation of LTC<sub>4</sub> (2 µg/mL, 1 min) or LTD<sub>4</sub> (30 µg/mL, 1 min). Salmeterol (30 µg/kg, i.v.) was administered 1 min before inhalation of LTC<sub>4</sub> or LTD<sub>4</sub>. Each column represents the mean±S.E.M. of 6 animals. †††: Statistical significance as compared to the PBS-treated group was set at  $P < 0.001$ . \$, \$\$ and \$\$\$: Statistical significance as compared to the control group was set at  $P < 0.05$ , 0.01 and 0.001, respectively.

引用) Sekioka T. et al., *Er. J. Pharmacol.*, 2017, 794, 147-53.

### 3.2. S-hexyl GSH 処置下の覚醒下モルモットにおける LTC<sub>4</sub> 吸入による気道収縮及びエアートラッピングに対するロイコトリエン拮抗薬の効果

BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/kg, i.v.) は, S-hexyl GSH を処置した覚醒下モルモットに LTC<sub>4</sub> を吸入させて引き起こされる気道収縮と肺の過膨張を約 80%有意に抑制し, 更にモンテルカストとの併用群はこの反応をほぼ完全に抑制した (Fig. 5A 及び 5B). 一方, モンテルカスト (0.3 mg/kg, p.o.) は, LTC<sub>4</sub> による肺の過膨張を約 50%有意に抑制したが (Fig. 5B), 気道収縮に対しては抑制傾向のみを示した (Fig. 5A).



**Fig. 5** Effects of CysLTs receptor antagonists on inhaled LTC<sub>4</sub>-induced bronchoconstriction and air-trapping in S-hexyl GSH-treated guinea pigs.

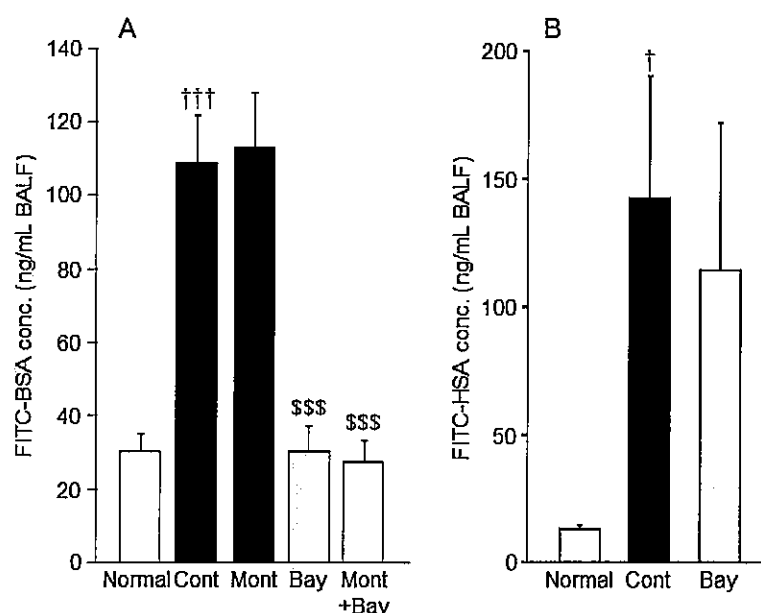
Effects of montelukast (Mont), a CysLT<sub>1</sub> receptor antagonist, BayCysLT<sub>2</sub>RA (Bay), a CysLT<sub>2</sub> receptor antagonist, and combination of these two agents on inhaled LTC<sub>4</sub>-induced increase in specific airway resistance (sRaw, A) and whole lung volume (B) in guinea pigs treated with S-hexyl GSH. S-hexyl GSH was i.v. administered at 60 mg/kg 10 s before inhalation of LTC<sub>4</sub> (2 µg/ml, 1 min). Montelukast (0.3 mg/kg, p.o.) and BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/kg, i.v.) were administered 24 h and 1 min, respectively, before LTC<sub>4</sub> inhalation. Each column represents the mean±S.E.M. of 9 animals. †††: Statistical significance as compared to the PBS-treated group was set at P < 0.001. \$\$ and \$\$\$: Statistical significance as compared to the control (Cont) group was set at P < 0.01 and 0.001, respectively. ## and ###: Statistical significance as compared to the montelukast (Mont)-treated group was set at P < 0.01 and 0.001, respectively.

引用) Sekioka T. et al., *Er. J. Pharmacol.*, 2017, 794, 147-53.



### 3.3. 覚醒下モルモットにおける LTC<sub>4</sub> 静脈内投与による気道の血管透過性亢進に対するロイコトリエン拮抗薬の効果

S-hexyl GSH 処置下で LTC<sub>4</sub> を静脈内投与した場合のモルモットの気道の血管透過性亢進に対して、モンテルカストは無作用であったが、BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/kg, i.v.) 及び BayCysLT<sub>2</sub>RA とモンテルカスト (0.1 mg/kg, p.o.) の併用群はほぼ完全な抑制を示した (Fig. 6A) . これに対して、S-hexyl GSH 非処置下での LTC<sub>4</sub> 静脈内投与による気道の血管透過性亢進には、BayCysLT<sub>2</sub>RA は有意な抑制を示さなかった (Fig. 6B) .



**Fig. 6 Effects of montelukast and BayCysLT<sub>2</sub>RA on i.v. LTC<sub>4</sub>-induced airway vascular hyperpermeability in conscious guinea pigs treated or non-treated with S-hexyl GSH.**

(A) Effects of montelukast (Mont), a CysLT<sub>1</sub> receptor antagonist, BayCysLT<sub>2</sub>RA (Bay), a CysLT<sub>2</sub> receptor antagonist, and combination treatment of these two agents on LTC<sub>4</sub>-induced airway vascular hyperpermeability in S-hexyl GSH-treated guinea pigs. Immediately after FITC-BSA (2 mg/kg) intravenous administration, S-hexyl GSH (60 mg/kg) and LTC<sub>4</sub> (2 µg/kg) were intravenously administered. Each column represents the mean±S.E.M. of 15 animals. (B) Effect of BayCysLT<sub>2</sub>RA (Bay) on LTC<sub>4</sub>-induced airway vascular hyperpermeability in S-hexyl GSH-non-treated guinea pigs. Immediately after FITC-HSA (2 mg/kg) intravenous administration, physiological saline and LTC<sub>4</sub> (2 µg/kg) were intravenously administered. Each column represents the mean±S.E.M. of 10 animals. In any experiments, BALF was collected 15 min after the LTC<sub>4</sub> administration for determination of amounts of FITC-BSA or FITC-HSA in BALF supernatant. Montelukast (0.1 mg/kg, p.o.) and BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/kg, i.v.) were administered 24 h and 1 min, respectively, before the LTC<sub>4</sub> administration. † and †††: Statistical significance as compared to normal group was set at  $P < 0.05$  and  $0.001$ , respectively. \$\$\$: Statistical significance as compared to control (Cont) group was set at  $P < 0.001$ .

引用) Sekioka T. et al., *Er. J. Pharmacol.*, 2017, 794, 147-53.

#### 4. 考察

本節では LTC<sub>4</sub> 吸入による覚醒下モルモットの気道閉塞における CysLT<sub>2</sub> 受容体の機能的役割について検討した。

S-hexyl GSH を処置したモルモットに LTC<sub>4</sub> を吸入して認められる気道閉塞の本体は、基本的に気道収縮によるものと考えられるが、LTD<sub>4</sub> による気道閉塞との間に何らかの違いがあるか否かを確認するため、LTC<sub>4</sub> による気道閉塞とほぼ同程度の気道閉塞を LTD<sub>4</sub> 吸入によって誘発し、両反応に対する気管支拡張薬の効果を比較した。

その結果、LTD<sub>4</sub> による気道閉塞とは異なり、LTC<sub>4</sub> による気道抵抗上昇とこれに伴うエアートラッピングはサルメテロール (30 µg/kg, i.v.) では完全に抑制されず、部分的に気管支拡張薬に抵抗性であった。これらの結果は、本実験条件下での LTD<sub>4</sub> による気道閉塞は気道の平滑筋収縮によるものであるのに対して、LTC<sub>4</sub> による気道閉塞には平滑筋収縮以外の何らかの反応が含まれていることを示している。LT 吸入によって、数十分以内に生じる平滑筋収縮以外の気道の急性反応としては血管透過性の亢進が考えられるが、実際に LTC<sub>4</sub> や LTD<sub>4</sub> はモルモットの気道やマウスの耳介の血管透過性を亢進させることが知られている<sup>34-36)</sup>。LTC<sub>4</sub> による気道の血管透過性亢進に対する LT 受容体拮抗薬の効果を確認したところ、S-hexyl GSH (60 mg/kg, i.v.) 処置下での LTC<sub>4</sub> による気道内へのアルブミン漏出のみが BayCysLT<sub>2</sub>RA によってほぼ完全に抑制され、本反応は CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する血管透過性の亢進であると考えられた。

ヒト CysLT<sub>2</sub> 受容体のトランスジェニックマウスに LTC<sub>4</sub> を処置した際の耳介の血管透過性は、野生型マウスのそれに比して有意に増強されること<sup>37)</sup> 等も報告されていることから、CysLT<sub>2</sub> 受容体の刺激は、気道平滑筋の収縮だけでなく、血管透過性の亢進も引き起こすものと考えられる。

各 LT 受容体拮抗薬を用いた検討結果も考え併せると、S-hexyl GSH 処置下での LTC<sub>4</sub> による気道閉塞には、一部 CysLT<sub>1</sub> 受容体を介する気道収縮も関与するが、大部分は CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する気道収縮とこれに伴うエアートラッピングによる反応であり、更には、気管支拡張薬に抵抗性の CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する血管透過性の亢進も部分的に関与していると考えられた。

CysLT<sub>2</sub> 受容体が末梢気道病変に関与する可能性を示唆した報告はこれが初めてである。末梢気道におけるエアートラッピングは重症喘息<sup>38)</sup> や急性増悪<sup>39)</sup> に関与している。基本的に喘息患者は、ICS 若しくは ICS と LABA の併用により管理されるが、大きな粒子の薬剤については末梢気道まで到達しないため、その効果は限定的である<sup>40-42)</sup>。これに対して、プランルカストやモンテルカストのような経口剤は血液循環を介して末梢気道へ分布することにより、実際に気管支喘息のエアートラッピングや末梢気道の炎症に効果的である<sup>43,44)</sup>。しかしながら、CysLT<sub>1</sub> 拮抗薬を使用している患者の約半数は効果が不十分とされており<sup>13,14)</sup>、このような患者に対しては経口投与可能な CysLT<sub>2</sub> 若しくは CysLT<sub>1/2</sub> 拮抗薬が有用な治療薬となる可能性が考えられる。

本研究で構築した LTC<sub>4</sub> による気道閉塞モデルは、重症喘息や急性増悪に対する治療薬としての CysLT<sub>2</sub> 若しくは CysLT<sub>1/2</sub> 拮抗薬の創製や喘息における CysLT<sub>2</sub> 受容体の役割に関する研究に有用であると考えられる。

## 第1章 小括

1. S-hexyl GSH を処置した覚醒下のモルモットに LTC<sub>4</sub> を吸入させることによって, CysLT<sub>2</sub> 受容体を介すると考えられる気道抵抗の上昇とエアートラッピングを呈する気道閉塞モデルが構築され, 本モデルは CysLT<sub>2</sub> 受容体の機能解析や CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬若しくは CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬の評価に有用と考えられる.
2. S-hexyl GSH を処置した覚醒下モルモットへの LTC<sub>4</sub> 吸入による気道閉塞には, 一部 CysLT<sub>1</sub> 受容体を介する気道収縮も関与するが, 大部分は CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する気道収縮とこれに伴うエアートラッピングによる反応であり, 気管支拡張薬や CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬に抵抗性の CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する血管透過性の亢進も関与している可能性が高いと考えられた.

以上の結果より, 気道における CysLT<sub>2</sub> 受容体は, 気管支の平滑筋収縮や血管透過性を亢進させることによって, 既存薬に一部抵抗性を示す気管支喘息の末梢気道病変に関与している可能性が考えられた.

## 第2章 感作モルモットを用いた CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与するアナフィラキシーモデルの構築, 及び ONO-6950 の効果について

### 緒言

第1章では, CysLT<sub>2</sub> 受容体が関与する気道閉塞モデルを構築し, 本受容体が気道のエアートラッピングや気道の血管透過性の亢進を引き起こすことが確認された. また, 我々は, S-hexyl GSH を処置した感作動物に抗原を投与して引き起こされる気道抵抗の上昇が, BayCysLT<sub>2</sub>RA によって有意に抑制されることを確認しており, 気管支喘息の病態モデルで認められる気道収縮においても CysLT<sub>2</sub> 受容体が関与している可能性を見い出している<sup>26)</sup>. これらの結果は, 強力な気道平滑筋収縮や急激な気道内への血漿タンパク漏出を伴う, 気管支喘息の急性増悪期において CysLT<sub>2</sub> 受容体が重要な役割を果たしている可能性を想像させる成績である. しかしながら, これらは正常動物に対して外因的に LTC<sub>4</sub> を処置した場合の結果や麻酔下の動物における気道抵抗の評価結果であり, CysLT<sub>2</sub> 受容体を活性化させた際の急性増悪反応や, 急性増悪に対する CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬若しくは CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬の効果は不明である.

本章では, 抗原で感作したモルモットを用いて, CysLT<sub>1</sub> 受容体だけでなく CysLT<sub>2</sub> 受容体も関与するアナフィラキシーモデルを構築し, CysLT<sub>1/2</sub> 拮抗薬である ONO-6950 の効果を検討した.

## 第1節 感作モルモットを用いた CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与するアナフィラキシーモデルの構築

### 1. 実験目的

本節では、抗原による感作モルモットを用いて、CysLT<sub>1</sub> 受容体だけでなく CysLT<sub>2</sub> 受容体も関与するアナフィラキシーモデルを構築した。

### 2. 実験材料及び実験方法

#### 2.1. 実験動物

第1章, 第1節 2.1 と同様。

#### 2.2. 試薬

抗原に用いた卵白アルブミン (OVA, Albumin from chicken egg white, Grade V, Sigma-Aldrich Corporation) 及び百日咳死菌懸濁液 (株式会社エル・エス・エル, 蛋白質量 5 mg, 約  $5 \times 10^{10}$  bacteria eq./mg protein/mL) は 5°C (許容範囲: 1~9°C) で保存した。OVA は生理食塩液に溶解して種々濃度に調製した。動物を感作する場合は, 2.5 mg/mL の OVA 溶液を用いて百日咳死菌懸濁液を 5 倍希釈して 2 mg/mL の OVA 及び約  $1 \times 10^{10}$  bacteria eq./mL の百日咳死菌を含む生理食塩液 (2 mg OVA/約  $1 \times 10^{10}$  bacteria eq./mL 液) を調製した。動物の感作状態の確認時には 3 w/v% の OVA 溶液を用いた。喘息発作反応を惹起するための OVA 溶液は使用日の午前と午後に分けて調製し, 使用するまでの時間を午前と午後でほぼ均一にした。使用するまで氷中で保存した。

(Indomethacin (インドメタシン, Sigma-Aldrich Corporation) 及び Pyrillamine maleate salt (ピリラミン, Sigma-Aldrich Corporation) はいずれも室温で保存した。インドメタシンは 7 w/v% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (メイロン® 静注 7%, 株式会社大塚製薬工場) にて 20 mg/mL に調製し, 超音波処理あるいは加熱処理により溶解させた。ピリラミンは生理食塩液に溶解して 5.6 mg/mL (ピリラミンとして 4 mg/mL) に調製した。これらの溶液を等容量混合し, 2 mg/mL ピリラミンを含む 10 mg/mL インドメタシン溶液を調製した。いずれの試薬及び惹起剤も調製日にのみ使用し, 残余液は廃棄した。

S-hexyl GSH の保存及び溶解は, 第1章, 第1節 2.2 に従い, 60 mg/mL の溶液を生理食塩液にて 5, 15 及び 30 mg/mL の濃度に希釈後, 使用まで室温・遮光下で保存した。

Dexamethasone 21-phosphate disodium salt, Minimum 98% (デキサメタゾン, Dexamethasone, Sigma-Aldrich Corporation) は 5°C (許容範囲: 1~9°C) で保存した。蒸留水に溶解させて 1.32 mg/mL (活性本体として 1 mg/mL) に調製した。

モンテルカスト及び BayCysLT<sub>2</sub>RA の調製は第1章, 第1節 2.2 に従い, モンテルカストについては 0.01 mg/mL の溶液を調製した。

サルメテロールの保存及び調製は, 第1章, 第2節 2.2 に従った。

### 2.3. 感作モルモットを用いた OVA 静脈内投与によるアナフィラキシーモデルにおける生存率評価

モルモットに、OVA (1 mg) と百日咳死菌 (約  $5 \times 10^9$  個) を含む生理食塩液 0.5 mL を腹腔内投与することにより能動的に感作し、感作 14~20 日後に実験に供した。全ての個体は実験日前日までに、3 w/v% OVA 生理食塩液溶液を 20  $\mu$ L ずつ点眼することによって感作の成立・不成立を確認した。

感作が成立しているモルモットに、投与媒体若しくはモンテルカストを経口投与 (10 mL/kg) し、約 24 (23~25) 時間後に 1 vol% WS 含有生理食塩液若しくは BayCyaLT<sub>2</sub>RA を前肢より静脈内投与 (0.5 mL/kg) した。直後に生理食塩液若しくは S-hexyl GSH を静脈内投与 (2 mL/kg) し、次いで種々用量の OVA を静脈内投与 (1 mL/kg) することにより喘息発作様反応を惹起した。ピリラミン (1 mg/kg) 及びインドメタシン (5 mg/kg) の当容量混合液は、OVA 投与約 15 (10~20) 分前に静脈内投与 (0.5 mL/kg) した。尚、OVA 投与 2~5 分後の、ヒスタミンが原因と考えられる特に重篤な呼吸困難によって死に至る可能性が高いと判断した個体については、胸腔を軽くマッサージすることにより呼吸を回復させて窒息死を回避させた。症状観察は OVA 投与 2 時間後まで行った。デキサメタゾンについては OVA 投与約 24 及び 2 時間前に経口投与した。サルメテロールについては OVA 投与直前に静脈内投与した。

各個体の死亡時点若しくは OVA 投与 1 時間後における肺組織中の CysLTs, thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) 及び Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) 量はいずれも Cayman 社の ELISA Kit を用いて定量した。

### 2.4. 感作モルモットにおける OVA 静脈内投与後の血液中及び肺組織中 CysLT 代謝に及ぼす S-hexyl GSH の影響

2.3.の方法に従い、種々用量の S-hexyl GSH を処置した感作モルモットに OVA を静脈内投与した。OVA 投与 1, 2, 3, 5, 7, 10 及び 20 分後に、ペントバルビタールナトリウム (75 mg/kg, i.p.) 麻酔下で大腿静脈よりヘパリン加採血後、放血致死させ、肺を摘出した。採取後は血液は、直ちにその 200  $\mu$ L を氷冷した 99.5 v/v%エタノール 4 mL と混和 (エタノール処置血) し、肺組織については各葉の湿重量 (mg) を測定後に氷冷した 99.5 v/v%エタノール 4 mL 中でホモジナイズ (肺ホモジネート) し、いずれも CysLTs の定量まで -80°C で保存した。

CysLTs 定量のための検量線用検体には、正常動物よりペントバルビタールナトリウム (75 mg/kg, i.p.) 麻酔下で採取した血液及び肺組織を使用し、各検体 1 mL に対して 0.6~600 ng/mL の LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> 及び LTE<sub>4</sub> を 50  $\mu$ L を添加・攪拌した (検量線用標準溶液)。

内部標準用混合液調製用の LTC<sub>4</sub>-d5, LTD<sub>4</sub>-d5 及び LTE<sub>4</sub>-d5 (Cayman Chemical Company) は -80°C で保存した。蒸留水/99.5 v/v%エタノール混合液 (1:1) を用いて、いずれも終濃度が 50 ng/mL となるように希釈した。調製後の検量線用標準溶液及び内部標準用混合調製液は使用まで -80°C で保存した。

検量線用検体を含めたエタノール処置血及び肺ホモジネートの遠心 (3,000 rpm, 10 分間, 4°C) 分離後の上清を遠心エバポレーターにて減圧乾固させた後、蒸留水 2 mL で再溶解させた。これを、予めメタノール 2 mL 及び蒸留水 2 mL でコンディショニングした固相抽出カラム (Oasis MAX SPE cartridge, Waters Corporation) に添加した後、蒸留水, 1 v/v%アンモニア水及びメタノール (いずれも 2 mL) で洗浄した。引き続き、2 v/v%ギ酸含有メタノール 2 mL にて CysLTs を溶出させた後、遠心エバポレーターにて減圧乾固させた。残留物に再溶解液 150  $\mu$ L (移動相 A: 移動相 B/75:25) を添加して再溶解させた後、API5000 LC/MS/MS システム (Applied Biosystems) により CysLTs を定量した。

#### 2.4.1. タンパク定量

肺組織のタンパク濃度は、BCA™ protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) によって、検量線用の検体を遠心分離後の沈殿を用いて測定した。検量線の作製には assay kit 付属の BSA standard solution (濃度範囲：0.125～2 mg/mL) を用いた。

#### 2.4.2. 評価項目及び評価方法

##### 2.4.2.1. 評価項目

感作モルモットへの OVA 静脈内投与 1, 2, 3, 5, 7, 10 及び 20 分後の血液中 (ng/mL) 及び肺組織中 (ng/mg protein) の LTC<sub>4</sub> 及び LTD<sub>4</sub> 濃度を測定し、LTD<sub>4</sub> に対する LTC<sub>4</sub> の存在比率 (モル比) を求めた。尚、LTC<sub>4</sub> 及び LTD<sub>4</sub> の分子量は、それぞれ 625.8 及び 496.7 として計算した。

##### 2.4.2.2. 評価方法

S-hexyl GSH 非処置群の血液中及び肺組織中の LTC<sub>4</sub>/LTD<sub>4</sub> の平均値変動に及ぼす種々用量の S-hexyl GSH の影響を検討した。

#### 2.5. 統計解析

統計学的解析には、SAS 9.1.3 Service pack 4 (SAS Institute Japan) 及びその連動システム EXSAS Version 7.5.2 (CAC, Exicare Co.)を用いた。Saline 群と各 OVA 投与群との比較は Dunnett の多重比較により行い、control 群と各薬剤群、control 群と各化合物群との比較は log-rank 検定により行い、有意水準はいずれも  $p < 0.05$  とした。

### 3. 実験結果

#### 3.1. 感作モルモットへの抗原曝露によるアナフィラキシー反応の惹起

OVA によって能動感作したモルモットに OVA (0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg) を静脈内投与することによって、チアノーゼや呼吸困難症状を伴う OVA 濃度依存的なアナフィラキシー反応が誘発され、1 mg/kg 以上の OVA 投与群では全例が 60 分以内に死に至った (Fig. 7) .

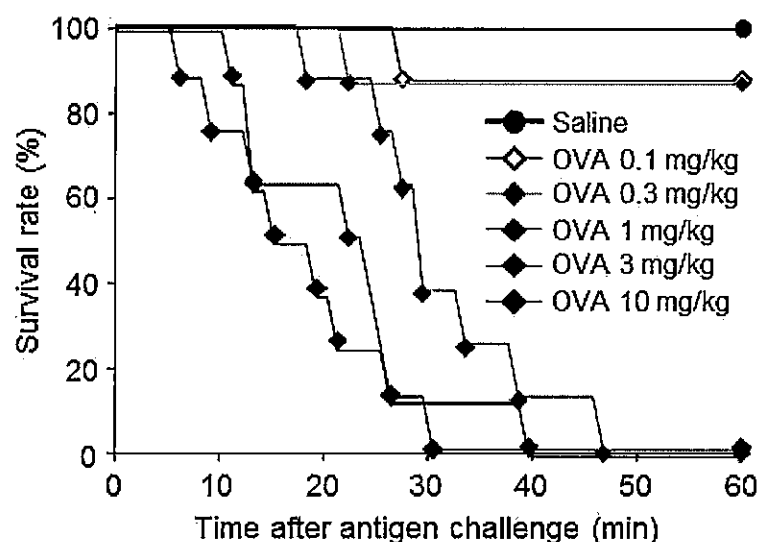


Fig. 7 OVA-induced fatal anaphylaxis in guinea pigs sensitized with OVA.

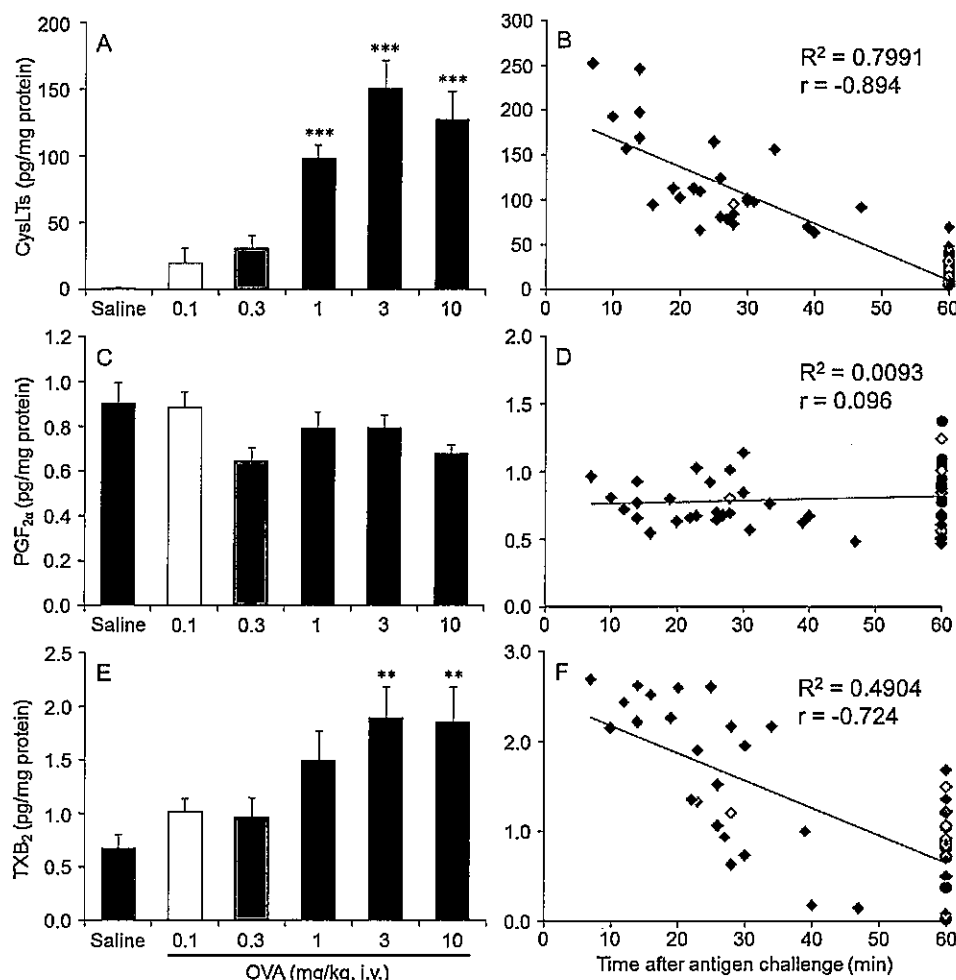
On Day 0, animals were actively sensitized by intraperitoneal injection of saline containing 1 mg OVA and approximately  $5 \times 10^9$  dead *Bordetella pertussis*. On Day 13 or 16, the animals were intravenously treated with a mixture of pyrilamine (1 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg). Fifteen min later, the animals were intravenously treated with saline as vehicle of S-hexyl GSH, and then challenged by intravenous administration of various doses of OVA. The time until death of each animal was recorded up to 60 min after antigen challenge. The number of animals per group was 8 animals.

#### 3.2. 感作モルモットにおける抗原曝露後の内因性アラキドン酸代謝物の産生、及びアナフィラキシー反応との相関性について

OVA (0.1, 0.3, 1, 3 及び 10 mg/kg) を静脈内投与し、60 分後若しくは死亡直後の肺組織中の CysLTs,  $\text{PGF}_2\alpha$ , 及び  $\text{TXB}_2$  産生量を測定した。CysLTs 及び  $\text{TXB}_2$  の産生量は OVA の投与用量に応じて上昇し、saline 投与群と比較して、それぞれ 1 及び 3 mg/kg 以上の OVA 投与群で有意に高値であった (Fig. 8A 及び 8E) . また、CysLTs 及び  $\text{TXB}_2$  の肺組織中での産生量は、いずれもアナフィラキシー反応惹起後の各個体の生存時間と負の相関性を示した (Fig. 8B 及び 8F) .

一方、OVA 投与後の肺組織中  $\text{PGF}_2\alpha$  産生量は saline 投与群と有意な差は無く、各個体の生存時間との間の相関性も認められなかった (Fig. 8C 及び 8D) .





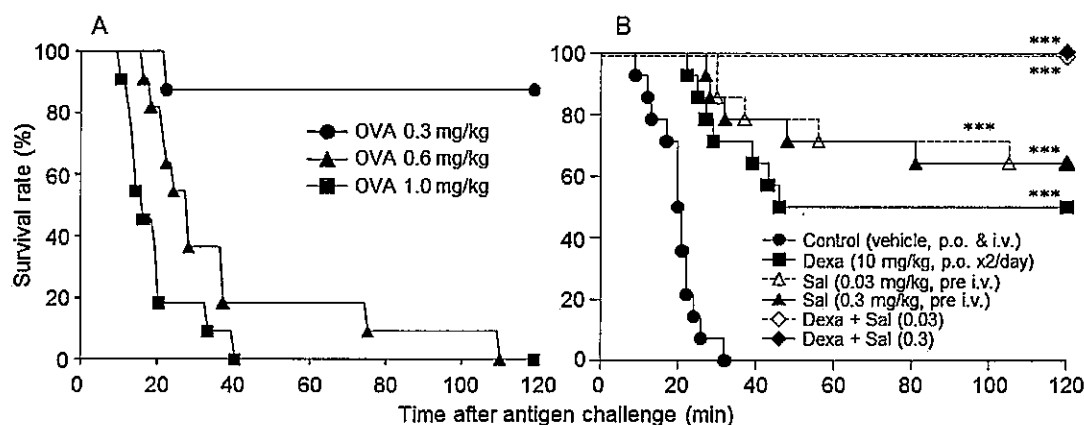
**Fig. 8 OVA-induced endogenous arachidonic acid metabolites production in the lung in guinea pigs sensitized with OVA (A, C and E) and correlation with individual survival time after antigen challenge (B, D and F).**

On Day 0, animals were actively sensitized by intraperitoneal injection of saline containing 1 mg OVA and approximately  $5 \times 10^9$  dead *Bordetella pertussis*. On Day 13 or 16, the animals were intravenously treated with a mixture of pyrilamine (1 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg). Fifteen min later, the animals were intravenously treated with saline as vehicle of S-hexyl GSH, and then challenged by intravenous administration of OVA. The lungs were isolated at each animal death or 60 min after OVA challenge, and homogenized in ice-cold 99.5 (v/v)% ethanol, and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until quantification of cysteinyl leukotrienes (CysLTs), prostagrandin  $\text{F}_{2\alpha}$  (PGF<sub>2α</sub>), or thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) by each ELISA assay. The number of animals per group was 8 animals. \*\* and \*\*\* :  $p < 0.05$  and  $0.001$  vs. saline group, respectively.

### 3.3. 感作モルモットにおける抗原曝露によるアナフィラキシー反応，及び本反応に対する気管支拡張薬並びにステロイドの効果

OVA によって能動感作したモルモットに OVA (0.3, 0.6 及び 1.0 mg/kg) を静脈内投与することによって，チアノーゼや呼吸困難症状を伴う OVA 濃度依存的なアナフィラキシー反応が誘発され，0.6 mg/kg 以上の用量の OVA 投与群では全例が 120 分以内に死に至った (Fig. 9A)．このようなアナフィラキシー反

応に対して、OVA 曝露 24 及び 2 時間前に経口投与したデキサメタゾン (10 mg/kg/day) , 及び OVA 曝露直前に静脈内投与したサルメテロール (0.03 及び 0.3 mg/kg) は有意な生存時間の延長と死亡率の低下を示し、更に両者の併用では完全な抑制を示した (Fig. 9B) .



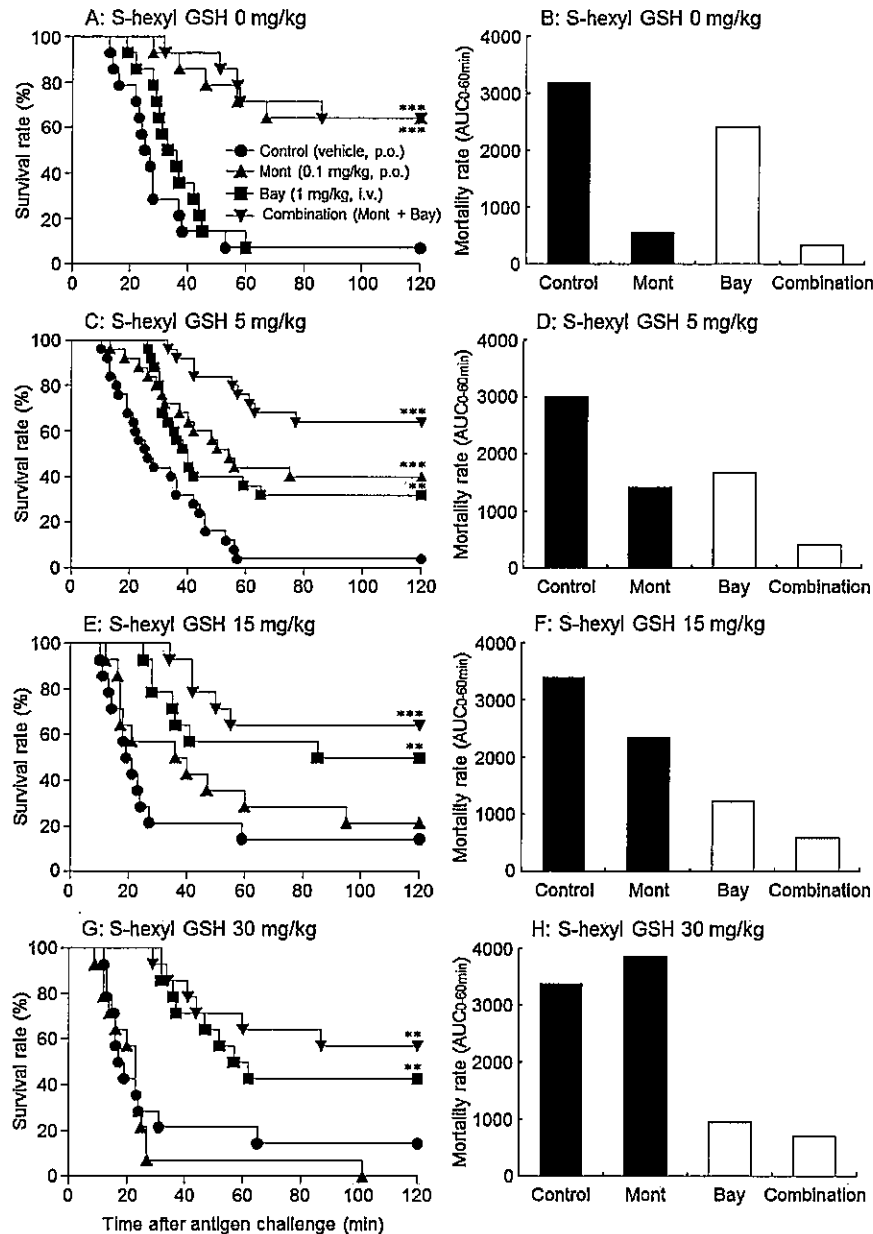
**Fig. 9 OVA-induced fatal anaphylaxis (A) and the effects of dexamethasone (Dexa) and salmeterol (Sal) on this response (B) in guinea pigs sensitized with OVA.**

On Day 0, animals were actively sensitized by intraperitoneal injection of saline containing 1 mg OVA and approximately  $5 \times 10^9$  dead *Bordetella pertussis*. On Day 13 or 16, the animals were intravenously treated with a mixture of pyrilamine (1 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg). Fifteen min later, the animals were intravenously treated with saline as vehicle of S-hexyl GSH, and then challenged by intravenous administration of OVA. Dexamethasone (10 mg/kg x2/day) was orally administered twice at 24 and 2 h before OVA (1 mg/kg) challenge. Salmeterol (0.03 and 0.3 mg/kg) was intravenously administered approximately 1 min before OVA challenge. The time until death of each animal was recorded up to 120 min after antigen challenge. The number of animals per group was 8 to 11 animals (A) and 14 animals (B). \*\*\* :  $p < 0.001$  vs. control (Log-rank test).

引用) Sekioka T. et al., Prostaglandins Leukot. Ess. Fat. Acids, 2017, 119, 18-24.

### 3.4. 感作モルモットにおける抗原曝露によるアナフィラキシー反応に対するロイコトリエン拮抗剤の効果に及ぼす S-hexyl GSH の影響

S-hexyl GSH 非処置下では、抗原曝露によって誘発された感作モルモットのアナフィラキシー反応は、モンテルカスト (0.1 mg/kg) の経口投与によって強力に抑制されたが、BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/kg) ではほとんど抑制されなかった (Fig. 10A 及び 10B) . モンテルカストと BayCysLT<sub>2</sub>RA の併用群は、モンテルカスト群とほぼ同等の効果を示した (Fig. 10A 及び 10B) . 一方、S-hexyl GSH を処置した場合には、アナフィラキシー反応に対するモンテルカストの抑制効果は、S-hexyl GSH の用量に依存して減弱し、30 mg/kg の S-hexyl GSH 処置群では効果を示さなかった (Fig. 10C, 10D, 10E, 10F, 10G 及び 10H) . これに対して、BayCysLT<sub>2</sub>RA の効果は S-hexyl GSH の用量に応じて増強された (Fig. 10C, 10D, 10E, 10F, 10G 及び 10H) . モンテルカストと BayCysLT<sub>2</sub>RA の併用群は、S-hexyl GSH の用量に関係無く、本アナフィラキシー反応を強力、かつ有意に抑制した (Fig. 10C, 10D, 10E, 10F, 10G 及び 10H) .



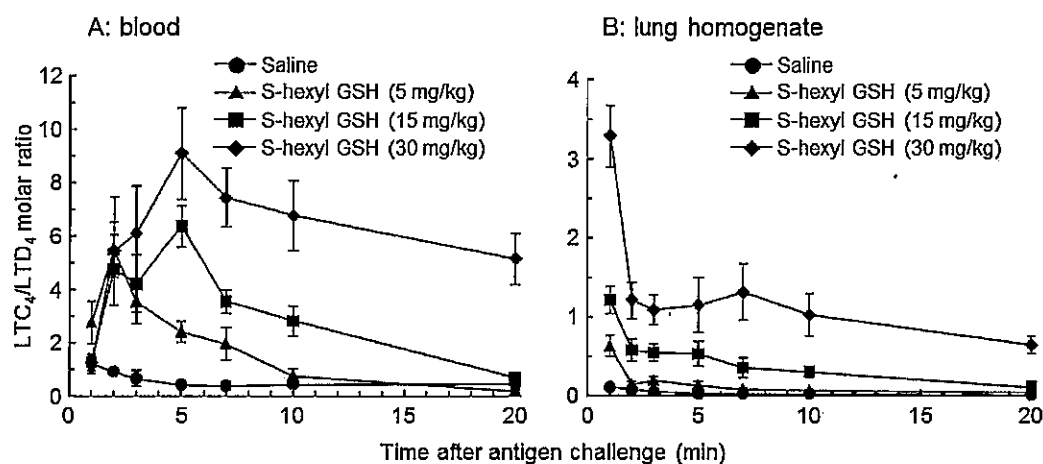
**Fig. 10** Effects of montelukast and BayCysLT<sub>2</sub>RA on antigen-induced fetal anaphylaxis in guinea pigs treated or non-treated with S-hexyl GSH.

On Day 0, animals were actively sensitized by intraperitoneal injection of saline containing 1 mg OVA and approximately  $5 \times 10^9$  dead *Bordetella pertussis*. On Day 13 or 16, the animals were intravenously treated with a mixture of pyrilamine (1 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg). Fifteen min later, the animals were intravenously treated with saline or S-hexyl GSH (5, 15 or 30 mg/kg), and then challenged by intravenous administration of OVA (0.6 mg/kg). (A, C, E, G) Survival rate curve within 120 min after OVA challenge. (B, D, F, H) Area under survival rate curve within 60 min after OVA challenge. Montelukast (0.1 mg/kg) or vehicle was orally administered 24 h before OVA challenge. BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/kg) or vehicle was intravenously administered approximately 1 min before OVA challenge. The number of animals per treatment group was 14 animals, except for S-hexyl GSH (5 mg/kg)-treated group (25 animals). \*\* and \*\*\* :  $p < 0.01$  and  $0.001$  vs. control, respectively (Log-rank test).

引用) Sekioka T. et al., Prostaglandins Leukot. Ess. Fat. Acids, 2017, 119, 18-24.

### 3.5. 内因性 LTC<sub>4</sub> の代謝に及ぼす S-hexyl GSH の影響

感作モルモットに抗原を曝露した際に血液及び肺組織中で検出される LTC<sub>4</sub>/LTD<sub>4</sub> のモル比率は、予め処置した S-hexyl GSH (5, 15 及び 30 mg/kg) の用量に依存して増加した (Fig. 11A 及び 11B)。



**Fig. 11** Effects of S-hexyl GSH (5, 15 and 30 mg/kg) on LTC<sub>4</sub> metabolism in the blood (A) and lung (B) after OVA challenge in sensitized guinea pigs.

On Day 0, animals were actively sensitized by intraperitoneal injection of saline containing 1 mg OVA and approximately  $5 \times 10^9$  dead *Bordetella pertussis*. On Day 13 or 16, the animals were intravenously treated with a mixture of pyrilamine (1 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg). Fifteen min later, the animals were intravenously treated with saline or S-hexyl GSH (5, 15 or 30 mg/kg), and then challenged by intravenous administration of OVA (0.6 mg/kg). LTC<sub>4</sub> to LTD<sub>4</sub> molar ratio in blood samples and lung homogenates was determined as index of LTC<sub>4</sub> metabolism within 20 min after OVA challenge. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 6 animals.

引用) Sekioka T. et al., Prostaglandins Leukot. Ess. Fat. Acids, 2017, 119, 18-24.

#### 4. 考察

本節では、抗原による感作モデルを用いて、CysLT<sub>1</sub>受容体だけでなく CysLT<sub>2</sub>受容体も関与するアナフィラキシーモデルを構築した。

本検討では、抗原抗体反応によるアラキドン酸代謝を 5-リポキシゲナーゼ経路に傾けることにより CysLTs の病態への関与を高めるため、インドメタシンを使用した。実際の肺組織中 CysLTs の産生量は各個体の生存時間と負の相関性を示しており、CysLTs の依存度の高い病態モデルが構築されたと考えられる。

気管支喘息の急性発作に対しては、吸入気管支拡張薬や経口ステロイドによる対応・治療がなされているが<sup>1)</sup>、上記モデルで認められる抗原曝露後の呼吸困難症状やアナフィラキシー反応は、サルメテロール若しくはデキサメタゾンの各単独及び併用処置によって有意に抑制され、ヒトにおける気管支喘息の急性発作反応をよく反映していると考えられた。

各ロイコトリエン受容体拮抗薬を用いた結果は、S-hexyl GSH 非処置下での本モデルでみられるアナフィラキシー反応が主に CysLT<sub>1</sub> 受容体に依存していることを示しているが、S-hexyl GSH (5, 15 及び 30 mg/kg, i.v.) 処置下ではその処置用量に応じてモンテルカストの効果が減弱すると共に BayCysLT<sub>2</sub>RA の効果が増強された。実際に、抗原曝露後のコントロール群の肺及び血液中では、S-hexyl GSH の用量に応じて、モデルの CysLT<sub>2</sub> 受容体に特異性の高い LTC<sub>4</sub><sup>21)</sup> の存在比率が上昇しており、S-hexyl GSH 処置下では、CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与が高まったアナフィラキシー反応が生じていると考えられる。また、本モデルのコントロール群の肺では、第 1 章の検討結果と同様に明らかな肺の過膨張が確認され、CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与する急激な気管支平滑筋収縮や気道の血管透過性の亢進によるエアートラッピングが生じていると考えられた。第 1 章では、外因的に投与した LTC<sub>4</sub> による気道閉塞が確認されたが、本章での検討結果は、抗原抗体反応によって内因的に産生された LTC<sub>4</sub> が CysLT<sub>2</sub> 受容体を活性化させた結果であると考えられる。

ヒトの喘息反応に対しては、プランルカストやモンテルカスト等の CysLT<sub>1</sub> 拮抗薬が効果を示すため、CysLT<sub>2</sub> 受容体の依存度が高い、若しくは CysLT<sub>2</sub> 受容体のみに依存した病態モデルはヒトの喘息反応を反映したモデルとは言えない。従って、これら両受容体が関与すると予想される 5 mg/kg の S-hexyl GSH を処置した条件下での本病態モデルが喘息治療薬の薬効評価やアナフィラキシー反応の解析に有用であると考えられる。

## 第2節 CysLT<sub>2</sub>受容体が関与するアナフィラキシーモデルに対するONO-6950の効果

### 1. 実験目的

第1節で構築した CysLT<sub>1</sub> 受容体及び CysLT<sub>2</sub> 受容体が共に関与するモルモットのアナフィラキシーモデルに対する CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬 ONO-6950 及び喘息治療薬の効果を検討した。

### 2. 実験材料と実験方法

#### 2.1. 実験動物

第1章, 第1節 2.1 と同様。

#### 2.2. 試薬

OVA, インドメタシン及びピリラミンの保存及び調製は, 第2章, 第1節 2.2 に従った。

S-hexyl GSH の保存及び溶解は, 第1章, 第1節 2.2 に従い, 60 mg/mL の溶液を生理食塩液にて 5 mg/mL の濃度に希釈後, 使用まで室温・遮光下で保存した。

デキサメタゾンの保存及び調製は, 第2章, 第1節 2.2 に従い, 必要に応じて蒸留水で 0.1 及び 0.01 mg/mL の濃度に希釈して使用した。

サルメテロールは室温で保存し, DMF にて 15 mg/mL に溶解させた後, 生理食塩液で 300 µg/mL に希釈した。これを更に 2 vol%DMF を用いて 30 µg/mL に希釈した。調製後は室温で保存した。

ONO-6950 (4,4'-[4-Fluoro-7-({4-[4-(3-fluoro-2-methylphenyl)butoxy]phenyl}ethynyl)-2-methyl-1*H*-indole-1,3-diyl]dibutanoic acid, 小野薬品工業株式会社) (Fig. 12) は 0.5 w/v%メチルセルロース 400 cP 溶液 (0.5 w/v%MC, 滅菌済, 和光純薬工業株式会社) にて 0.3 mg/mL の懸濁液を調製し, 更に 0.5 w/v% MC で 0.03 及び 0.003 mg/mL に希釈して使用した。

モンテルカスト及び BayCysLT<sub>2</sub>RA の調製は第2章, 第1節 2.2 に従った。

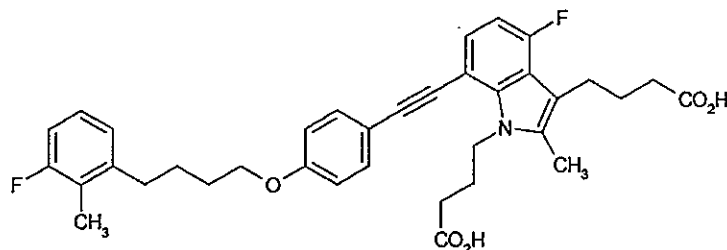


Fig. 12 Structural Formula of ONO-6950.

#### 2.3. 感作モルモットを用いた OVA 静脈内投与によるアナフィラキシーモデルにおける生存率評価

第2章, 第1節 2.3 に従い, OVA の惹起用量は 1 mg/kg とした。

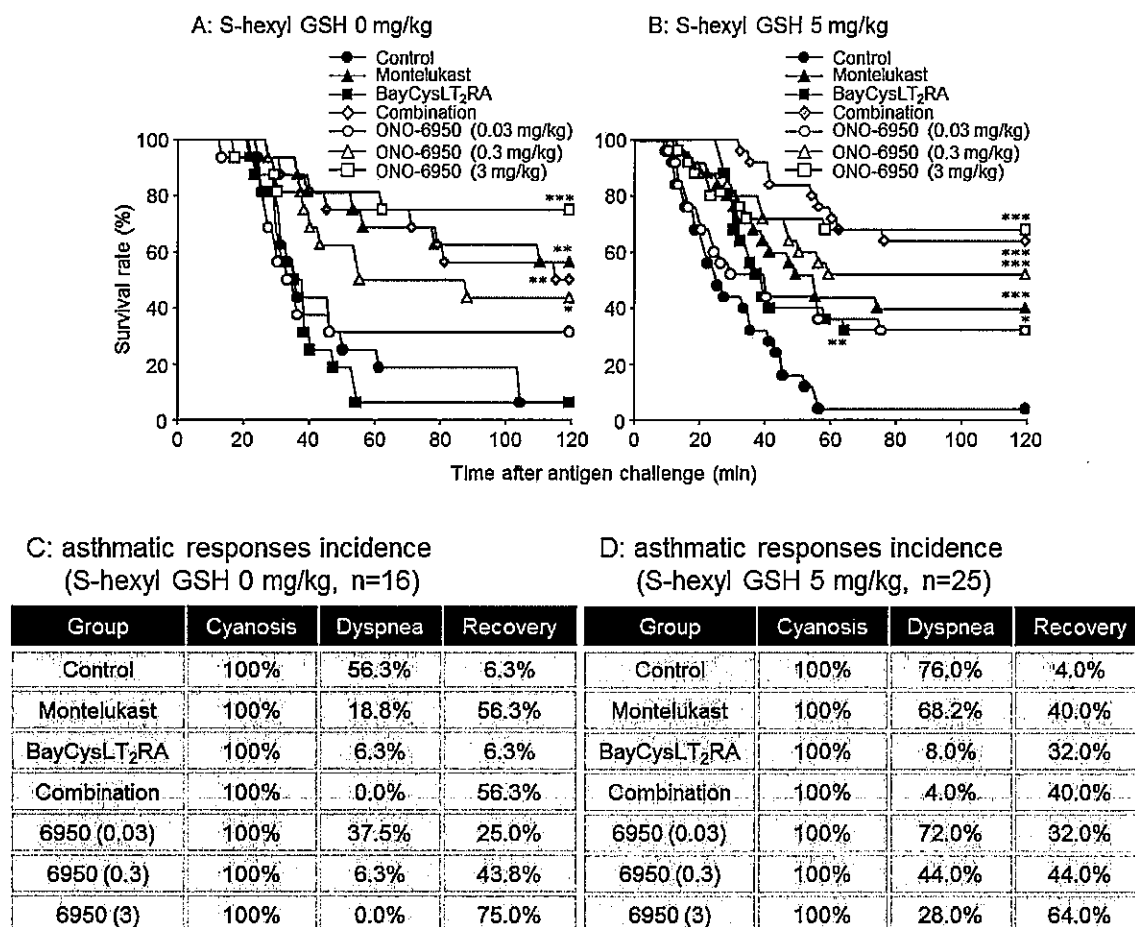
#### 2.4. 統計解析

統計学的解析には, SAS 9.1.3 Service pack 4 (SAS Institute Japan) 及びその連動システム EXSAS Version 7.5.2 (CAC, Exicare Co.)を用いた。Control 群と各薬剤群, control 群と各化合物群との比較は log-rank 検定により行い, 有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### 3. 実験結果

#### 3.1. 感作モルモットを用いた CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与するアナフィラキシーモデルに対する新規ロイコトリエン拮抗薬 ONO-6950 の効果

ONO-6950 (0.03, 0.3 及び 3 mg/kg) は, S-hexyl GSH の処置・非処置に関わらず, 感作モルモットへの抗原曝露による呼吸困難症状の発症率を用量依存的に抑制し, 致死性のアナフィラキシー反応についても有意かつ用量依存的に抑制した (Fig. 13A, 13B, 13C 及び 13D) . また, アナフィラキシー症状からの回復率についても用量依存性が認められ, ONO-6950 の 3 mg/kg 投与群の効果は, モンテルカスト及び BayCysLT<sub>2</sub>RA の併用群とほぼ同程度であった (Fig. 13A, 13B, 13C 及び 13D) .



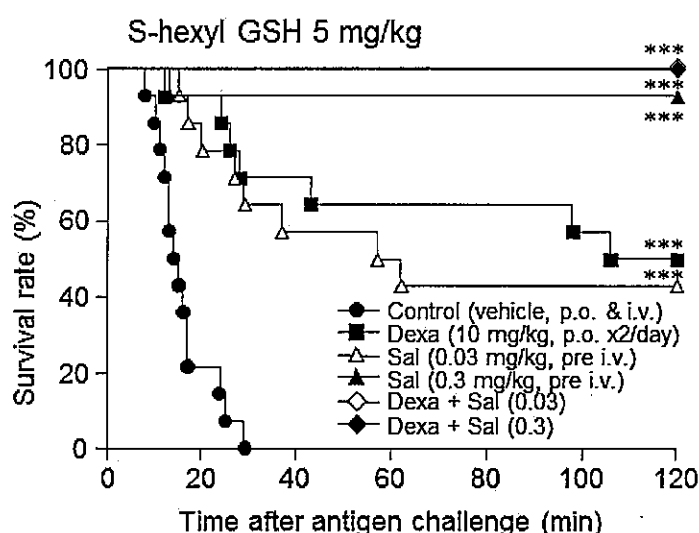
**Fig. 13** Effects of the dual CysLT<sub>1/2</sub> receptor antagonist ONO-6950 on antigen-induced fatal anaphylaxis in S-hexyl GSH-treated (B and D) or non-treated (A and C) guinea pigs.

On Day 0, animals were actively sensitized by intraperitoneal injection of saline containing 1 mg OVA and approximately  $5 \times 10^9$  dead *Bordetella pertussis*. On Day 13 or 16, the animals were intravenously treated with a mixture of pyrilamine (1 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg). Fifteen min later, the animals were intravenously treated with saline or S-hexyl GSH (5 mg/kg), and then challenged by intravenous administration of OVA (1.0 mg/kg). ONO-6950 (0.03, 0.3 and 3 mg/kg), montelukast (0.1 mg/kg) or vehicle was orally administered 24 h before OVA challenge. BayCysLT<sub>2</sub>RA (1 mg/kg) or vehicle was intravenously administered approximately 1 min before OVA challenge. The numbers of animals per treatment group were 25 and 16 animals in S-hexyl GSH-treated and non-treated groups, respectively. \*, \*\* and \*\*\* :  $p < 0.05$ , 0.01 and 0.001 vs. control, respectively (Log-rank test).

引用) Sekioka T. et al., Prostaglandins Leukot. Ess. Fat. Acids, 2017, 119, 18-24.

### 3.2. 感作モルモットを用いた CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与するアナフィラキシーモデルに対する気管支拡張薬及びステロイドの効果

デキサメタゾン (10 mg/kg x2/day) の経口投与群は, S-hexyl GSH 処置下のモルモットにおける抗原曝露後のアナフィラキシー反応を有意に抑制した (Fig. 14) . サルメテロール (0.03 及び 0.3 mg/kg) の静脈内投与群では, 用量依存的, かつ control 群と比べて有意な抑制を示し, デキサメタゾンと併用した場合にはいずれの用量においても完全な抑制を示した (Fig. 14) . これら併用群のアナフィラキシー反応に対する効果は, S-hexyl GSH 非処置下で引き起こされるアナフィラキシー反応に対する効果と同様であった.



**Fig. 14** Effects of dexamethasone (Dexa) and salmeterol (Sal) on antigen-induced fatal anaphylaxis in S-hexyl GSH-treated guinea pigs sensitized with OVA.

On Day 0, animals were actively sensitized by intraperitoneal injection of saline containing 1 mg OVA and approximately  $5 \times 10^9$  dead *Bordetella pertussis*. On Day 13 or 16, the animals were intravenously treated with a mixture of pyrilamine (1 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg). Fifteen min later, the animals were intravenously treated with saline or S-hexyl GSH (5 mg/kg), and then challenged by intravenous administration of OVA (1.0 mg/kg). Dexamethasone (10 mg/kg x2/day) was orally administered twice at 24 and 2 h before OVA challenge. Salmeterol (0.03 and 0.3 mg/kg) was intravenously administered approximately 1 min before OVA challenge. The number of animals per group was 14 animals. \*\*\* :  $p < 0.001$  vs. control (Log-rank test).

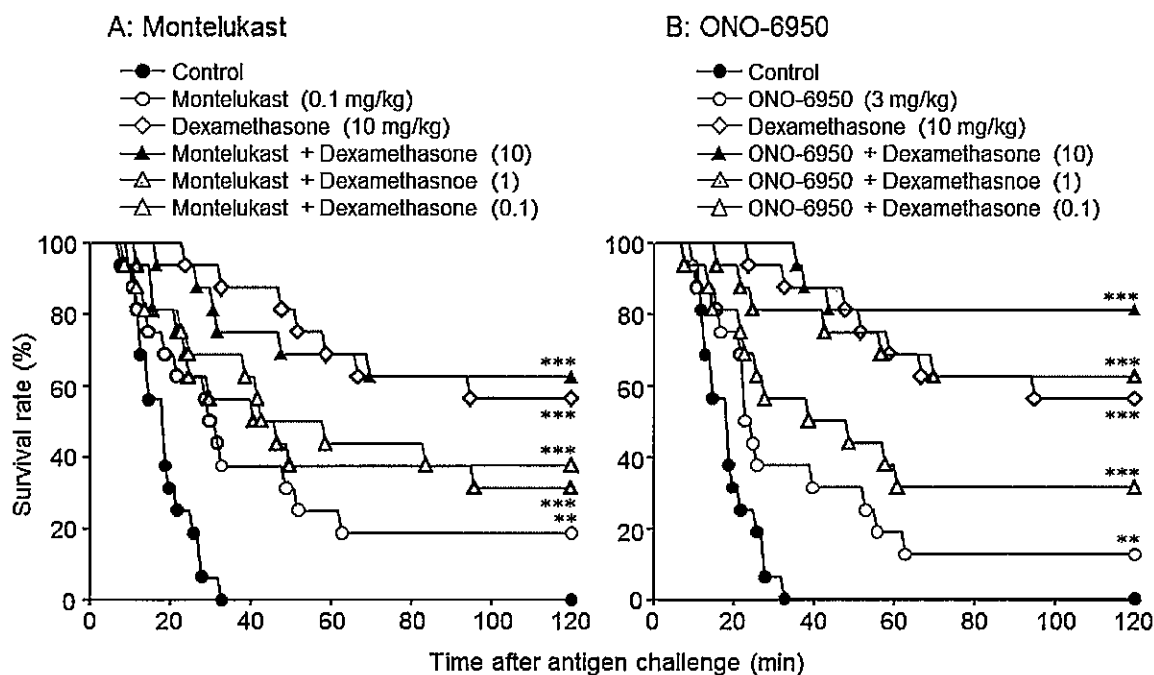
引用) Sekioka T. et al., Prostaglandins Leukot. Ess. Fat. Acids , 2017, 119, 18-24.



### 3.3. 感作モルモットを用いた CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与するアナフィラキシーモデルにおけるロイコトリエン拮抗薬によるステロイドの減量効果

S-hexyl GSH 処置下の感作モルモットに抗原を曝露して引き起こされる CysLT<sub>2</sub> 受容体が関与するアナフィラキシー反応に対して、ONO-6950 (3 mg/kg)、モンテルカスト (0.1 mg/kg) 及びデキサメタゾン (10 mg/kg x2/day) はいずれも有意な抑制を示した (Fig. 15A 及び 15B)。

デキサメタゾンの用量を 0.1 mg/kg x2/day 若しくは 1 mg/kg x2/day に減量してモンテルカストと併用投与した場合のアナフィラキシー反応に対する効果はデキサメタゾン (10 mg/kg x2/day) 単独群のそれよりも弱く、呼吸困難症状の発症率はデキサメタゾン単独群と同等であったが、回復率は低かった (Fig. 15A 及び 15C)。また、デキサメタゾン (10 mg/kg x2/day) 群と併用した場合でも、更なる生存時間の延長や死亡率低下等の上乗せ様の効果は認められなかった (Fig. 15A 及び 15C)。一方、ONO-6950 をデキサメタゾンに併用した場合には、いずれの併用群においても呼吸困難の発症率がデキサメタゾン単独群よりも低かった (Fig. 15C)。ONO-6950 を 10 mg/kg x2/day のデキサメタゾンに併用した場合には、デキサメタゾン単独群と比べて 20%以上死亡率を低下させ (Fig. 15B 及び 15C)。更に、デキサメタゾンを 10 mg/kg x2/day から 1 mg/kg x2/day に減量して ONO-6950 と併用した場合においても、抗原曝露によるアナフィラキシー反応を有意、かつデキサメタゾン (10 mg/kg x2/day) 単独群とほぼ同等の効果を維持した (Fig. 15B 及び Fig. 15C)。



C: asthmatic responses incidence  
(S-hexyl GSH 5 mg/kg, n=16)

Group	Cyanosis	Dyspnea	Recovery
Control	100%	100.0%	0.0%
Montelukast	100%	87.5%	12.5%
ONO-6950	100%	87.5%	6.3%
Dexamethasone (10)	100%	68.8%	50.0%
Monte. + Dexta. (10)	100%	43.8%	56.3%
Monte. + Dexta. (1)	100%	68.8%	31.3%
Monte. + Dexta. (0.1)	100%	56.3%	37.5%
ONO-6950 + Dexta. (10)	100%	25.0%	81.3%
ONO-6950 + Dexta. (1)	100%	25.0%	56.3%
ONO-6950 + Dexta. (0.1)	100%	37.5%	18.8%

**Fig. 15** Dose reduction of corticosteroid by concomitant administration of CysLTs receptor antagonists in antigen-induced fatal anaphylaxis model in S-hexyl GSH-treated guinea pigs.

On Day 0, animals were actively sensitized by intraperitoneal injection of saline containing 1 mg OVA and approximately  $5 \times 10^9$  dead *Bordetella pertussis*. On Day 13 or 16, the animals were intravenously treated with a mixture of pyrilamine (1 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg). Fifteen min later, the animals were intravenously treated with S-hexyl GSH (5 mg/kg), and then challenged by intravenous administration of OVA (1.0 mg/kg). Dexamethasone (10 mg/kg x2/day) was orally administered twice at 24 and 2 h before OVA challenge. ONO-6950 (3 mg/kg), montelukast (0.1 mg/kg) or vehicle was orally administered 24 h before OVA challenge. The number of animals per group was 16 animals. \*\* and \*\*\* :  $p < 0.01$  and  $0.001$  vs. control, respectively (Log-rank test).

引用) Sekioka T. et al., Prostaglandins Leukot. Ess. Fat. Acids, 2017, 119, 18-24.

#### 4. 考察

本節では、CysLT<sub>1</sub> 受容体及び CysLT<sub>2</sub> 受容体が共に関与する新規のアナフィラキシーモデルに対する CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬 ONO-6950 及び喘息治療薬の効果を検討した。

新規ロイコトリエン拮抗薬である ONO-6950 は CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬が有効である喘息反応だけでなく、CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬では効果不十分と考えられる CysLT<sub>2</sub> 受容体も関与する喘息反応に対しても有効であった。また、CysLT<sub>2</sub> 受容体が関与するアナフィラキシー反応に対して喘息治療の第一選択薬であるステロイドや気管支拡張薬が明確な効果を示したことから、本モデルはヒトの喘息発作をある程度反映するモデルであると考えられる。

選択的 5-リポキシゲナーゼ阻害剤であるザイリユートンは、中等症までの気管支喘息患者を対象とした 12 週間投与による臨床試験において、CysLT<sub>1</sub> 拮抗薬を上回る効果を発揮している<sup>45)</sup>。また、ザイリユートンの第Ⅲ相臨床試験の層別解析結果では、安静時呼気 1 秒率 (FEV<sub>1</sub>) が 50%未満の比較的重症に近い中等症患者において、全例平均時の成績と比較して、朝の起床時の FEV<sub>1</sub>、喘息症状、気管支拡張薬若しくは経口ステロイドの頓服使用頻度を改善している<sup>46)</sup>。その一方で、ザイリユートンの 1 日投薬量は 2400 mg/person と非常に高用量である上、肝機能異常等の肝障害が問題である<sup>47-49)</sup>。ヒトの CysLT<sub>2</sub> 受容体はモルモットの CysLT<sub>2</sub> 受容体と異なり、LTC<sub>4</sub> 及びその代謝物である LTD<sub>4</sub> のいずれによっても活性化される<sup>16)</sup> が、ザイリユートンの薬理作用は内因性 CysLTs の産生阻害であるため、CysLT<sub>1</sub> 及び CysLT<sub>2</sub> 受容体はいずれも活性化されない。従って、ONO-6950 はザイリユートンと同様、中等症以上の患者層に有効である可能性があり、特記すべき毒性の懸念が無い場合、ザイリユートンに替わる喘息治療薬となり得るかもしれない。軽症の喘息患者を対象とした抗原曝露試験<sup>50)</sup> では、ONO-6950 の効果はモンテルカストと同等に留まっていることも考え併せると、CysLT<sub>2</sub> 受容体は軽症よりもむしろ重症よりの病態に関与している可能性が考えられる。

喘息治療における第一選択薬であるステロイドは強力な抗炎症作用により優れた薬効を発揮する一方で、大量若しくは長期使用による各種感染症、副腎不全、脂質代謝異常、小児における成長阻害等様々な副作用が発現する場合があるが、ONO-6950 によるステロイドの減量効果はモンテルカストのそれを上回る可能性が示された。

CysLT<sub>1</sub> 拮抗薬については、喘息の病態管理におけるステロイドの使用量を一定の条件下で減量させる可能性が示唆されているが<sup>51-53)</sup>、CysLT<sub>2</sub> 受容体が関与する患者においては、経口投与可能な ONO-6950 がより強く末梢気道病変を改善する可能性を含めて使用する意義はより大きいと期待される。また、ONO-6950 の長期投与は、重篤な喘息発作の発症を予防したり、発作が発症した場合でもその程度を軽減出来る可能性が考えられ、喘息治療の新たな選択肢として期待される。

## 第2章 小括

1. S-hexyl GSH を処置した感作モルモットに抗原を静脈内投与することによって, CysLT<sub>1</sub> 受容体だけでなく CysLT<sub>2</sub> 受容体も関与するアナフィラキシーモデルが構築され, 既存薬であるステロイドや気管支拡張薬も効果を示す病態モデルであることが示された.
2. ONO-6950 は, CysLT<sub>1</sub> 受容体だけでなく CysLT<sub>2</sub> 受容体も関与するアナフィラキシー反応をモンテルカストよりも強く抑制した. また, 喘息治療の第一選択薬であるステロイドの使用量についても, ONO-6950 はモンテルカストを上回る減量効果を示した.

以上の結果より, CysLT<sub>2</sub> 受容体は, CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬では抑えられない気管支喘息のアナフィラキシー反応に関与している可能性が示唆された. また, 経口投与可能な ONO-6950 は CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬を上回る新たな喘息治療薬となる可能性が示された.

### 第3章 CysLT<sub>2</sub>受容体のヒト気管支における発現と気管支収縮への関与について

#### 緒言

第2章では、実験動物を用いた検討により、気管支喘息のアナフィラキシー反応における CysLT<sub>2</sub>受容体の関与の可能性と CysLT<sub>1/2</sub>受容体拮抗薬である ONO-6950 が喘息治療薬として新たな選択肢となる可能性が示された。一方、ヒトでは、気道平滑筋や肺胞マクロファージにおける CysLT<sub>2</sub>受容体 mRNA の存在や<sup>16)</sup>、慢性副鼻腔炎あるいはアレルギー性鼻炎患者の鼻粘膜、鼻腔粘膜上皮、鼻腔血管平滑筋における CysLT<sub>2</sub>受容体の発現が確認されている<sup>17,18)</sup>。また、喘息患者においても、末梢血好酸球、気道上皮、気道平滑筋における CysLT<sub>2</sub>受容体の発現が確認されている<sup>54,55)</sup>。しかしながら、ヒトの CysLT<sub>2</sub>受容体に関する生理的機能についてはこれまでに検討されていない。

本章では、喘息及び非喘息患者の気道組織における CysLTs 受容体発現を確認し、CysLT<sub>1</sub>及び CysLT<sub>2</sub>受容体拮抗薬の気管支収縮に対する作用を検討した。

## 1. 実験目的

本章では、ヒトの気道組織における CysLTs 受容体の発現分布を検討すると共に、気管支平滑筋収縮に及ぼす CysLT<sub>1</sub> 及び CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の影響について検討した。

## 2. 実験材料及び実験方法

### 2.1. 病理組織標本

2006 年 2 月から 2012 年 4 月に大垣市民病院にて肺癌切除術を受けられた患者より、病理標本の提供に関する同意を得た上でご提供頂いた。

以下に病理標本をご提供頂いた患者の背景データを示す (Table 1)。

本実験は、大垣市民病院及び京都薬科大学の倫理審査委員会による承認を得て実施した。

**Table 1 Background of lung tissue donors**

	Non-asthma subjects	Asthma subject 1	Asthma subject 2
Age, yr	66.1±12.5	62	60
Age at asthma onset (yr)		54	52
Gender	18 male/3 female	Female	Female
ICS/LABA (Fluticasone/salmeterol, Adoair®)		Yes (medium dose)	Yes (low dose)
FEV <sub>1</sub> (% predicted)		90.3	87.4
Peripheral blood leukocytes (cells/μl)		8440	3920
Neutrophils (%)		39.7	49.7
Eosinophils (%)		6.8	1.0
Basophils (%)		1.2	1.3
Monocytes (%)		5.1	4.1
Lymphocytes (%)		47.2	43.9
Platelets (cells/μl)		319000	201000
Total serum IgE (IU/ml)		838	Not detected
Smoker		No	Yes

In asthma subject 1, Adoair® therapy (250 μg, twice a day) had been continued until the lung cancer surgery, and the lung function and hematological data were collected approximately 6 months before and 1 week after the surgery, respectively. In asthma subject 2, Adoair® therapy (250 μg, once a day) had been continued until 2 years after the surgery when the lung function and hematological data were collected.

引用) Sekioka T. et al., Allergy International, 2015, 64, 351-358.

## 2.2. ヒトの CysLT<sub>1</sub> 及び CysLT<sub>2</sub> 受容体安定発現細胞

CysLT<sub>1</sub> 受容体及び CysLT<sub>2</sub> 受容体安定発現細胞は、宿主細胞に CHO-K1 細胞を用いて作製した。予備検討の結果では、CysLT<sub>1</sub> 受容体発現細胞において 1 ヲ所のサイレント変異（アミノ酸は既報と一致）が認められた以外の遺伝子配列は、既報の遺伝子配列と一致していた。また、各受容体発現細胞では、宿主細胞である CHO-K1 細胞では認められない CysLTs による細胞内カルシウムシグナル応答が認められ、LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub> 及び LTE<sub>4</sub> の反応性は、CysLT<sub>1</sub> 受容体発現細胞では LTD<sub>4</sub> > LTC<sub>4</sub> ≒ LTE<sub>4</sub>、CysLT<sub>2</sub> 受容体発現細胞では LTC<sub>4</sub> ≒ LTD<sub>4</sub> >> LTE<sub>4</sub> であった。

## 2.3. 試薬

### 2.3.1. CysLT<sub>1</sub> 及び CysLT<sub>2</sub> 受容体タンパクの免疫組織染色用試薬

1 次抗体には、ウサギポリクローナル抗ヒト CysLT<sub>1</sub> 受容体抗体（LS-A1317, LifeSpan Biosciences）及びウサギポリクローナル抗ヒト CysLT<sub>2</sub> 受容体抗体（120560, Cayman Chemical Company）を使用した。いずれも -80℃ で保存し、Tris 塩酸緩衝液（pH 7.4）を用いて、それぞれ 600 倍及び 300 倍に希釈して使用した。

その他の試薬として、ウシ血清アルブミン（BSA, MP Biomedicals）、ビオチン標識ヤギポリクローナル抗ウサギ IgG 抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（DAKO）、トリスアミノメタン、塩化ナトリウム、塩酸、過酸化水素水、カリヨウバン、クエン酸（和光純薬工業株式会社）、ヘマトキシリン（MERCK）、抱水クロラル（東京化成工業株式会社）、病理用染色溶剤エタノール（武藤化学株式会社）を使用した。

### 2.3.2. ヘマトキシリンエオジン（HE）染色及びアルシアンブルー（AB/PAS）染色用試薬

ヘマトキシリン（MERCK）、ヨウ素酸ナトリウム、抱水クロラル結晶クエン酸（東京化成工業株式会社）、エオジン（MERCK）、アルシアンブルー、酢酸、オルト過ヨウ素酸、シッフ試薬、亜硫酸水、キシレンを使用した。

### 2.3.3. LTD<sub>4</sub> によるカルシウムシグナル応答評価用の試薬及び培養培地

ロイコトリエン D<sub>4</sub>（LTD<sub>4</sub>, 濃度：100 µg/mL, 分子量：496.7, Cayman Chemical Company）は -80℃ で保存し、使用時はエタノールにて希釈して終濃度の 6 倍高濃度を調製し、氷上で保存した。Assay buffer には、終濃度 20 mmol/L の HEPES を含む Hanks' Balanced Salt Solution（HBSS, Invitrogen Corporation）を使用し、loading buffer には、終濃度 2.5 mmol/L のプロベネシド、20 mmol/L の HEPES 及び 5 µmol/L の Fura 2-AM を含むよう調製して用いた。

培養培地としては、Ham's F-12 培地（Invitrogen Corporation）に非働化剤 Fetal Bovine Serum（Invitrogen Corporation）を終濃度 10 vol% で添加し、次いで Geneticin（Invitrogen Corporation）を終濃度 0.5 mg/mL で添加して調製した。

#### 2.3.4. 気管支平滑筋収縮実験用試薬

アセチルコリン (Ach) , ヒスタミン (Hist) , インドメタシン, メピラミン, モルモット血清アルブミン (GPSA, Sigma-Aldrich Corporation) を使用した.

LTD<sub>4</sub> は-80℃で保存し, 使用時はエタノールにて希釈して終濃度の 100 倍高濃度を調製し, 氷上で保存した.

抗原としてコナヒョウヒダニ (*Dermatofagoides farinae*) の抽出物を用い, 生理食塩液にて 300 µg/mL に調製した. 気管支標本の受動的感作には抗ダニヒトアトピー血清 (ダニに対する RAST 値 $\geq$ 4, 国立病院機構相模原病院, 柳原行義博士より供与) を用い, Ca<sup>2+</sup> free Tyrode 液にて 5 倍に希釈して使用した.

ONO-6950, モンテルカスト及び BayCysLT<sub>2</sub>RA は, いずれもジメチルスルホキシド (DMSO) にて使用濃度に調製後, 使用まで遮光して室温保存した.

#### 2.4. 病理組織切片を用いた評価

##### 2.4.1 薄切切片の作製

平滑筋収縮実験に用いる気管支を採取した残りの病理組織をホルマリン固定し, パラフィンプロックを作製した後, ミクロトームにて 4 µm の薄切切片を作製した.

##### 2.4.2 CysLT<sub>1</sub> 及び CysLT<sub>2</sub> 受容体タンパクの免疫組織染色方法

2.4.1 で作製した薄切切片をキシレンに 5 分間ずつ 3 回浸漬した後, 無水エタノールに 5 分間ずつ 3 回浸漬することにより脱パラフィンした後, 流水にて洗浄した. 抗原の賦活化処理のため, 切片を抗原賦活液に浸漬して 125℃で 5 分間オートクレーブ処理をした. 切片を流水にて 5 分間洗浄後, 3%過酸化水素水に浸漬し, 室温で 5 分間反応させることによって内因性ペルオキシダーゼを不活化させた. 流水で 5 分間洗浄後, Tris 塩酸緩衝液による 5 分間の洗浄を 3 回行った. 余分な水分を除去した後, 1%BSA を滴下して室温にて 10 分間反応させることにより非特異的反応に対するブロッキングを行った. BSA を除去後, 1 次抗体を滴下して 4℃で 1 晩反応させた後, Tris 塩酸緩衝液による 5 分間の洗浄を 3 回行った. 切片の余分な水分を除去後, 2 次抗体としてビオチン標識ヤギポリクローナル抗ウサギ IgG 抗体を滴下し, 室温にて 30 分間反応させた後, Tris 塩酸緩衝液による 5 分間の洗浄を 3 回行った. 余分な水分を除去後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを滴下し, 室温にて 30 分間反応させた後, Tris 塩酸緩衝液による 5 分間の洗浄を 3 回行った. 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 反応液中で 10 分間反応させた後, 流水にて洗浄し, ヘマトキシリンで 5 分間染色した. 染色した切片を流水にて洗浄後, 無水エタノールによる 3 分間の脱水を 3 回行った. 引き続き, キシレンによる 3 分間の透徹を 3 回実施後, マリノール封入した.

##### 2.4.3. HE 染色方法

2.4.1 で作製した薄切切片をキシレンに 5 分間ずつ 3 回浸漬後, 無水エタノールに 5 分間ずつ 3 回浸漬することにより脱パラフィンした後, 流水にて洗浄した. これをヘマトキシリン染色液に 15 分間浸漬後, 流水にて洗浄し, 熱湯で 10 分間脱色した後, エオジン液に 2 分間浸漬した. 切片を流水にて洗浄後, 無水エタノールによる 3 分間の脱水を 3 回行った. 引き続き, キシレンによる 3 分間の透徹を 3 回実施後, マリノール封入した.



#### 2.4.4. AB/PAS 染色方法

2.4.1 で作製した薄切切片をキシレンに 5 分間ずつ 3 回浸漬後、無水エタノールに 5 分間ずつ 3 回浸漬することにより脱パラフィンした後、流水にて洗浄した。切片を 3%酢酸水に 3 分間浸漬後、1%アルシアンブルー酢酸水溶液に 1 時間浸漬した後、再度 3%酢酸水に 3 分間浸漬した。切片を蒸留水にて洗浄した後、0.5%オルト過ヨウ素酸に 10 分間浸漬した。蒸留水にて洗浄した切片をシッフ試薬に 15 分間浸漬させた後、亜硫酸水による 3 分間の洗浄を 3 回行った。流水にて 5 分間洗浄後、ヘマトキシリンにて 5 分間染色した。無水エタノールによる 3 分間の脱水を 3 回行った。引き続き、キシレンによる 3 分間の透徹を 3 回実施後、マリノール封入した。

#### 2.5. LTD<sub>4</sub>によるカルシウムシグナル応答の評価

##### 2.5.1. CysLT<sub>1</sub>受容体及びCysLT<sub>2</sub>受容体安定発現細胞の継代培養

培養フラスコから培養培地を除去し、PBS(-)で 1 回洗浄した。トリプシン-EDTA (0.25%トリプシン, 1 mmol/L EDTA・4Na) 溶液 (Invitrogen Corporation) を培養フラスコに加え、培養フラスコからの細胞の剥離を顕微鏡下で観察できるまでインキュベーションした。剥離した細胞に培養培地を加えて懸濁し、細胞懸濁液の一部を培養フラスコに播種した。細胞は CO<sub>2</sub> インキュベーター (NAPCO, Precision Scientific Inc.) 内で 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%Air の条件下で静置培養した。

##### 2.5.2. 細胞播種

2.5.1 で調製した細胞懸濁液の一部を、等容量の 0.4%Trypan blue solution (Sigma-Aldrich Corporation) と混合し、生細胞数を計測した。生細胞密度が  $3 \times 10^5$  cells/mL となるように培養培地にて希釈した後、培養プレート (96 Well Special Optics Flat Clear Bottom Black Polystyrene TC-Treated Microplates, Corning Incorporated) に 100  $\mu$ L/well ( $3 \times 10^4$  cells/well) ずつ播種した。これを CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95%Air) にて 24 時間以上培養し、播種の翌日中に以下の実験に用いた。

##### 2.5.3. LTD<sub>4</sub>による細胞内カルシウムシグナル応答の惹起

Blank 及び control 群は triplicate (3 well), 被験物質及び対照物質群は duplicate (2 well) で実施した。

2.5.2.の培養プレートから培養培地を除去後、予め加温した Loading buffer を 100  $\mu$ L/well 加えて 37°C で約 1 時間培養し、Fura2-AM を細胞内に取り込ませた。Loading buffer を除去し、200  $\mu$ L/well の Assay buffer で 1 回洗浄後、Assay buffer を 100  $\mu$ L/well 加えて遮光下、室温で静置した。約 30 分後、終濃度の 6 倍高濃度の ONO-6950, モンテルカスト若しくは 0.6%DMSO を含む Assay buffer を 25  $\mu$ L/well 添加し、遮光下、室温で静置した。約 30 分後、Fluorescence drug screening system (FDSS-3000, 浜松ホトニクス株式会社) を使用して、各 well に 340 nm 及び 380 nm の励起波長を交互に照射した際の 500 nm における蛍光強度比 (f<sub>340</sub>/f<sub>380</sub>) を 3 秒間隔で約 30 秒間測定した。次いで、終濃度 (CysLT<sub>1</sub> 受容体発現細胞では 100 nmol/L, CysLT<sub>2</sub> 受容体発現細胞では 0.3 nmol/L) の 6 倍高濃度の LTD<sub>4</sub> 若しくは EtOH 含有 Assay buffer を 25  $\mu$ L/well 加え、約 4 分 30 秒間の蛍光強度比を 3 秒間隔で測定した。尚、培養プレートを FDSS-3000 にセットした後の一連の実験操作及び蛍光強度比の測定は FDSS-3000 のプログラム中で室温で実施した。

#### 2.5.4. 評価項目及び評価方法

評価項目は、LTD<sub>4</sub>による細胞内カルシウムシグナル応答を50%抑制する濃度（IC<sub>50</sub>値）とし、以下の方法により評価した。

LTD<sub>4</sub>を添加する直前約30秒間に得られた蛍光強度比の平均値を各wellのpre値とした。LTD<sub>4</sub>添加から測定終了までの間に得られた蛍光強度比の最大値からpre値を差し引いた値を各wellの変化量（ $\Delta$ Ratio）とした。

Blank群及びcontrol群では、実験セット毎に3well（triplicate）の $\Delta$ Ratio値の平均値を算出し、それぞれblank値及びcontrol値とした。被験物質群及び対照物質群では、実験毎に2well（duplicate）の $\Delta$ Ratio値の平均値を算出し、各濃度のサンプル値とした。

被験物質あるいは対照物質の各濃度における抑制率（%）を以下の式から算出した。

$$\text{抑制率（\%）} = (\text{control 値} - \text{各濃度のサンプル値}) / (\text{control 値} - \text{blank 値}) \times 100$$

被験物質及び対照物質の対数濃度を独立変数、対応する濃度における全実験セットでの抑制率を従属変数として、式1の2-parameter logistic model<sup>56)</sup>による非線形回帰分析を行い、被験物質及び対照物質のIC<sub>50</sub>値及び95%信頼区間を推定した。尚、非線形回帰分析における初期値及び収束条件は、解析ソフトの初期設定に従った。

$$Y = 100 / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) \times \text{HillSlope})}) \quad \dots \dots \text{(式 1)}$$

X：被験物質又は対照物質の対数濃度，log (mol/L)

Y：抑制率，%

Hill slope：阻害曲線の傾き

#### 2.6. 気管支平滑筋収縮反応の評価方法

##### 2.6.1 気管支標本の作製及び受動的感作

肺癌切除術によって得られた病理標本より肺実質及び血管を除去して得られた直径2～6 mmの気管支を、幅1～1.5 mmの螺旋状標本とした後、Ca<sup>2+</sup>非含有Tyrode液にて5倍希釈した抗ダニヒトアトピー血清中で37℃、2時間インキュベートすることにより受動的に感作した。受動感作した気管支標本を長さ約20 mmの気管支切片に分割した。

## 2.6.2 平滑筋収縮反応の惹起

2.6.1 の如く作製した気管支切片を、Tyrode 液を満たした容量 6 mL のポリプロピレン製の Magnus 槽内に懸垂（荷重 300 mg, 温度  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ）し、95% $\text{O}_2$ -5% $\text{CO}_2$  混合ガス（酸素ガス）通気下で標本の収縮及び弛緩反応を isotonic transducer（日本光電, TD-112S）及び amplifier（日本光電, AA-601H）を介して recorder（日本光電, RJG-4124）上に記録した。

5  $\mu\text{mol/L}$  のアセチルコリン（Ach, 10 分間処置, 洗浄 10 回）による平滑筋の収縮高がほぼ一定となるまで、45~60 分間隔で 4 若しくは 5 回処置した。その後、10  $\mu\text{mol/L}$  のヒスタミン（Hist, 20 分間処置, 洗浄 20 回）を 2 回処置した。標本洗浄によって平滑筋収縮が baseline まで緩解した後にマグヌス槽内への酸素ガスの供給を停止し、GPSA を終濃度が 0.01% になるように添加し、その後直ちに、目的の終濃度となるように各化合物を添加してピペッティングにより攪拌した。

抗原による平滑筋収縮を惹起する場合には、化合物添加の約 20 及び 25 分後に、インドメタシン（3  $\mu\text{mol/L}$ ）及びメピラミン（1  $\mu\text{mol/L}$ ）をそれぞれ添加してピペッティングにより攪拌し、その 5 分後に、終濃度が 3  $\mu\text{g/mL}$  となるようにダニ抗原を添加して 90 分間収縮反応を記録した。

$\text{LTD}_4$  による平滑筋収縮を惹起する場合には、気管支標本の受動的感作は実施せず、化合物添加までの操作を抗原添加系と同様にした。化合物添加 30 分後に、終濃度が 30 nmol/L となるように  $\text{LTD}_4$  を添加してピペッティングにより攪拌後、60 分間収縮反応を記録した。

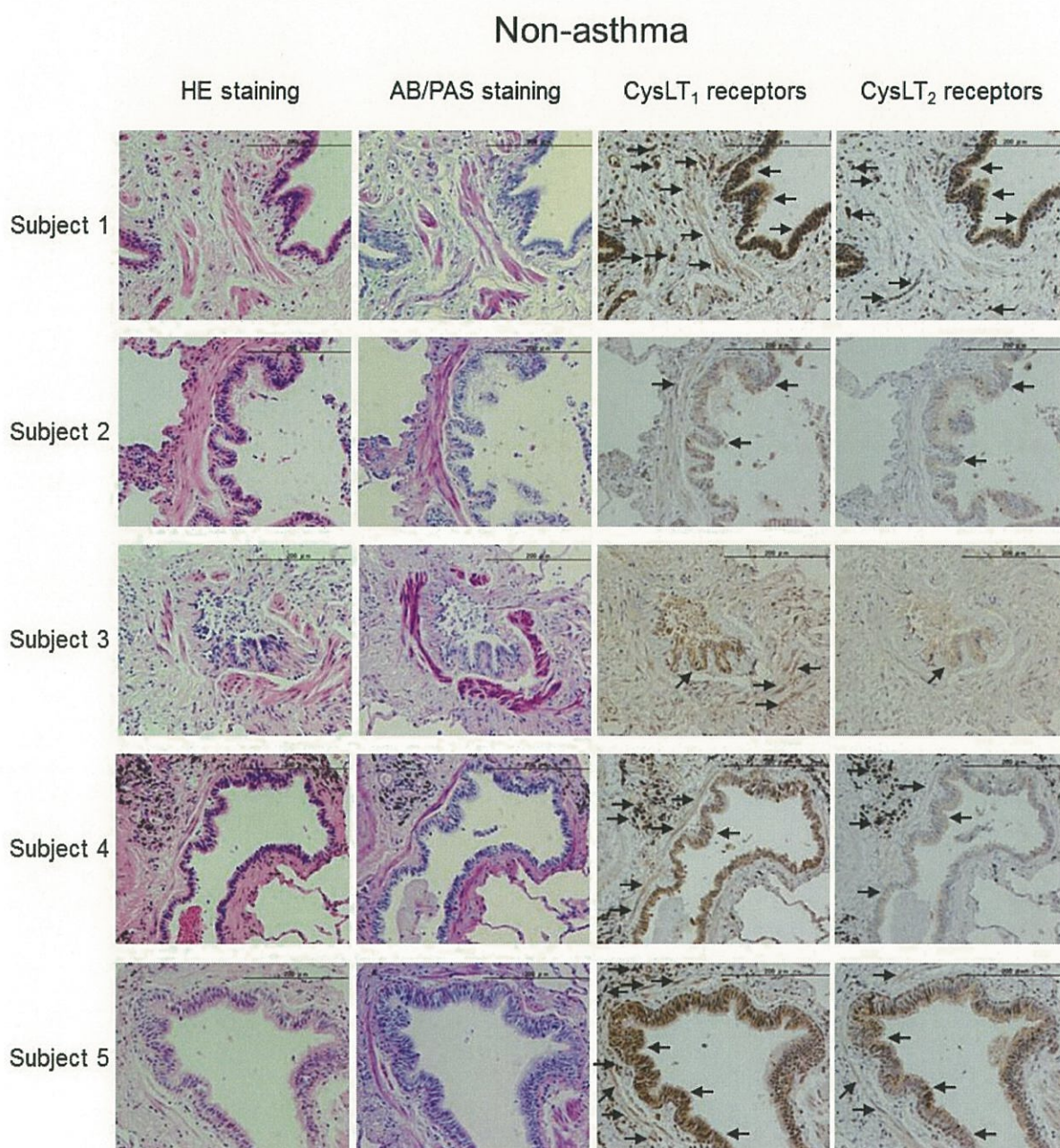
## 2.6.3 評価項目及び評価方法

抗原若しくは  $\text{LTD}_4$  添加後の平滑筋の収縮高 (mm) を測定し、同一標本のヒスタミンによる収縮高 (mm) に対する百分率として表示した。

### 3. 実験結果

#### 3.1. 非喘息患者の肺組織における CysLT<sub>1</sub> 受容体及び CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現

非喘息患者由来の肺組織では、発現の程度に個体間での差はみられるが、5例全ての気道上皮及び気道平滑筋に CysLT<sub>1</sub> 受容体の発現がみられた (Fig. 16)。これに対して、CysLT<sub>2</sub> 受容体は主に気道上皮に発現していたが subject 2, 3 及び 4 における発現の程度は弱いものであった (Fig. 16)。気管支平滑筋の CysLT<sub>2</sub> 受容体については subject 1, 4 若しくは 5 において若干の発現が認められた (Fig. 16)。



**Fig. 16 Immunohistochemical micrographs of lung tissues from the 5 non-asthma subjects.**

The tissues were cut into 4 serial sections (4- $\mu$ m thick). Two of the sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), and then with alcian blue/periodic acid-Schiff (AB/PAS). The other two sections were used in immunohistochemical determination of CysLT<sub>1</sub> and CysLT<sub>2</sub> receptors expression. Arrows show representative immunoreactive site for each receptor.

引用) Sekioka T. et al., Allergy International, 2015, 64, 351-358.

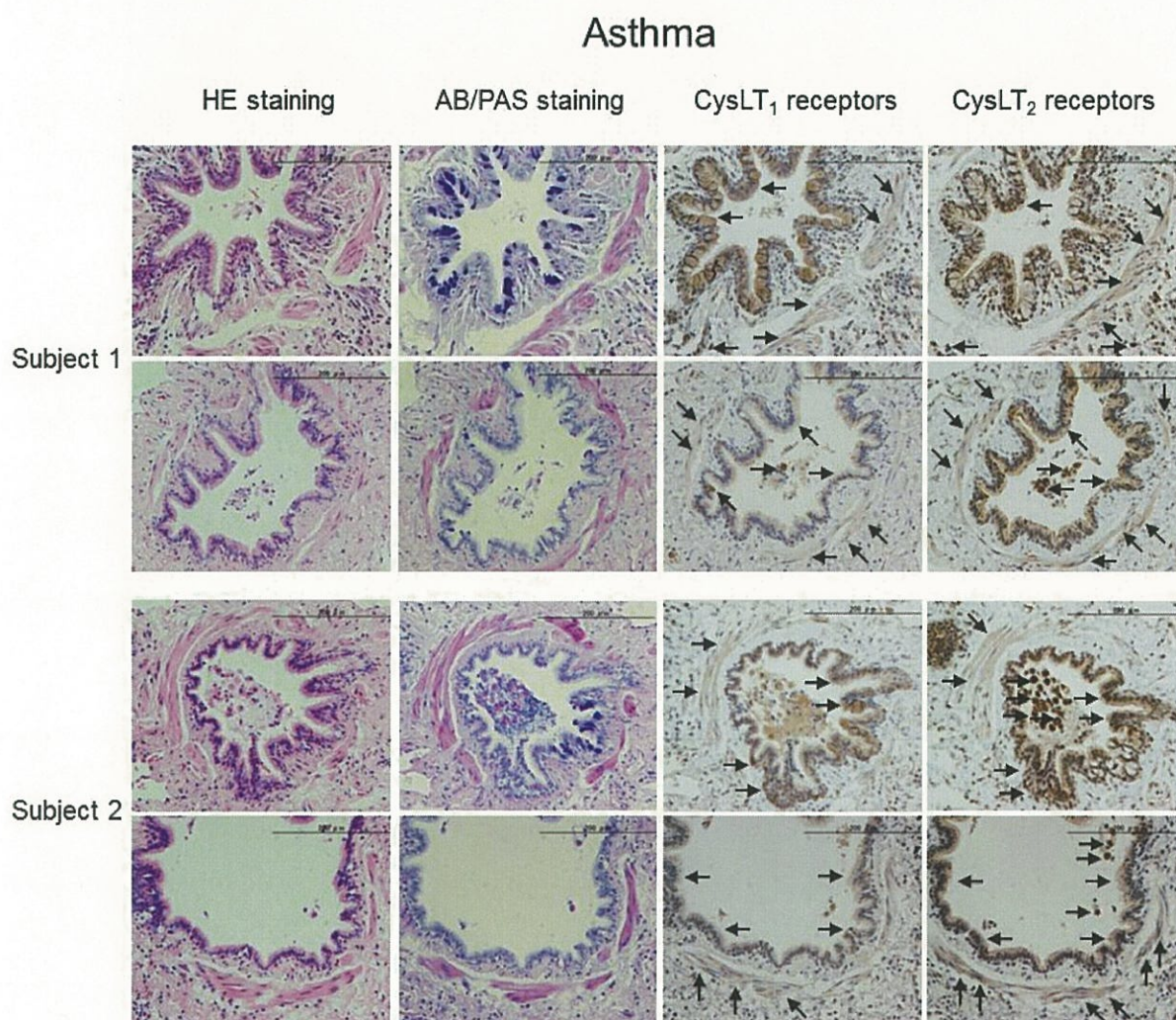


### 3.2. 喘息患者の肺組織における CysLT<sub>1</sub> 受容体及び CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現

喘息患者 2 例の肺組織では、非喘息患者の結果と同様に気道上皮及び気道平滑筋に CysLT<sub>1</sub> 受容体の発現がみられた他、組織に浸潤した白血球上でも発現がみられた (Fig. 17) .

CysLT<sub>2</sub> 受容体についても、気道平滑筋、気道上皮細胞及び組織への浸潤白血球において発現がみられた。更に、喘息患者の気道内では気道分泌による貯溜粘液中でも白血球がみられ、これらの白血球上においても CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現がみられた (Fig. 17) .

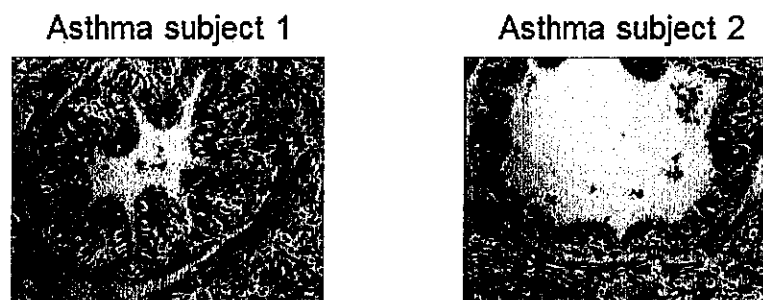
喘息患者 2 例の肺のパラフィン切片を、1 次抗体である抗 CysLT<sub>s</sub> 受容体抗体の代わりにウサギ IgG を用いて免疫組織染色を行った結果、特異的な染色像は観察されなかった (Fig. 18) .



**Fig. 17 Immunohistochemical micrographs of lung tissues from the 2 asthma subjects.**

The tissues were cut into 4 serial sections (4- $\mu$ m thick). Two of the sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), and then with alcian blue/periodic acid-Schiff (AB/PAS). The other two sections were used in immunohistochemical determination of CysLT<sub>1</sub> and CysLT<sub>2</sub> receptors expression. Arrows show representative immunoreactive site for each receptor.

引用) Sekioka T. et al., Allergy International, 2015, 64, 351-358.



**Fig. 18** Negative controls for immunohistological detection of CysLT<sub>1</sub> and CysLT<sub>2</sub> receptors.

The tissues were cut into 4 serial sections (4- $\mu$ m thick). Both anti-human CysLT<sub>1</sub> receptor and anti-human CysLT<sub>2</sub> receptor antibodies used in immunohistological staining as primary antibodies were rabbit IgG. Lung tissues of 2 asthma patients showed no positive sites when rabbit IgG was used in place of anti-CysLT<sub>1</sub> receptor or anti-CysLT<sub>2</sub> receptor antibody.

引用) Sekioka T. et al., Allergology International, 2015, 64, 351-358.

### 3.3. LTD<sub>4</sub>による細胞内カルシウムシグナル応答に対する CysLTs 受容体拮抗薬の作用

ヒトの CysLT<sub>1</sub> 受容体及び CysLT<sub>2</sub> 受容体を安定発現させた CHO-K1 細胞において, ONO-6950 は, LTD<sub>4</sub> による CysLT<sub>1</sub> 受容体及び CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する細胞内カルシウムシグナル応答を共に抑制し, IC<sub>50</sub> はそれぞれ 1.7 及び 25 nM であった (Table 2). これに対して, モンテルカストは CysLT<sub>1</sub> 受容体を介する応答を強く抑制した (IC<sub>50</sub> = 0.46 nM) が, CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する応答に対しては明確な阻害を示さなかった (IC<sub>50</sub> = 1800 nM) (Table 2).

**Table 2**

**ONO-6950 and montelukast IC<sub>50</sub> values for inhibition of LTD<sub>4</sub>-induced intracellular calcium mobilization response in human CysLT<sub>1</sub> receptor- or human CysLT<sub>2</sub> receptor-expressing cells.**

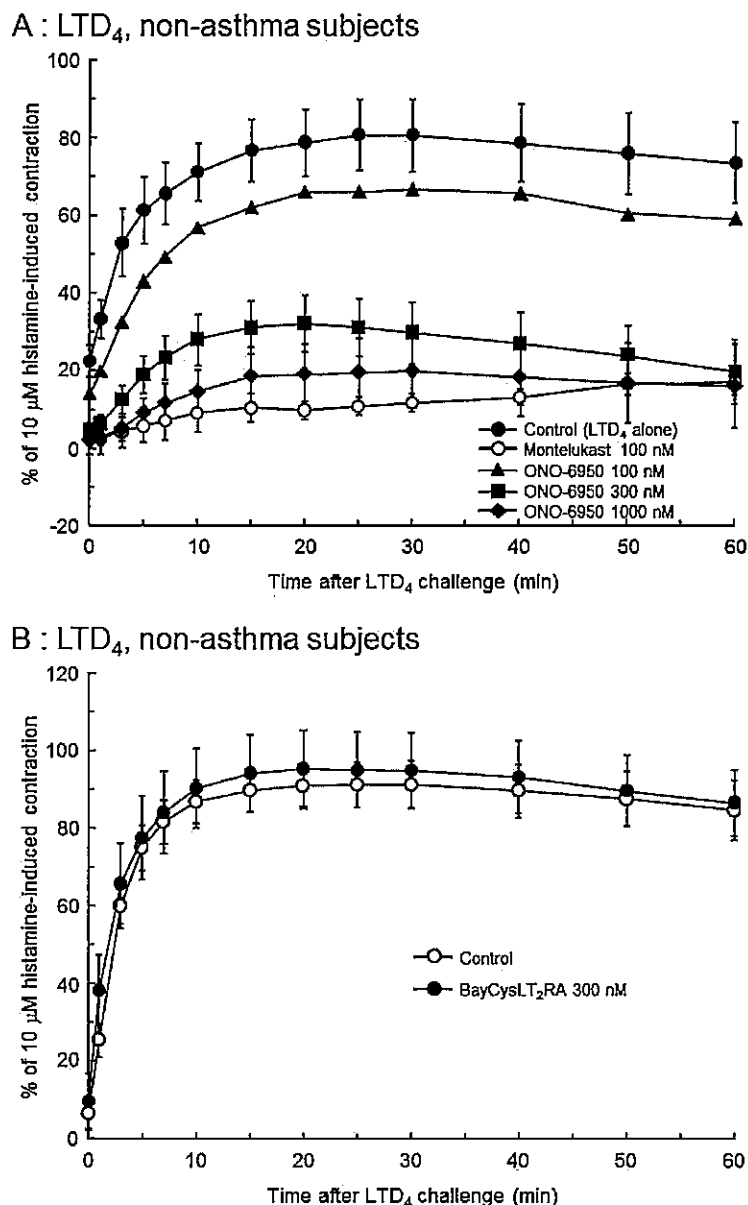
	IC <sub>50</sub> value (nM)	
	CysLT <sub>1</sub> receptor	CysLT <sub>2</sub> receptor
ONO-6950	1.7 (1.2-2.4)	25 (19-32)
Montelukast	0.46 (0.37-0.58)	1800 (1500-2100)

Fura 2-AM-loaded CHO-K1 cells expressing human CysLT<sub>1</sub> or human CysLT<sub>2</sub> receptor were stimulated with LTD<sub>4</sub> at 100 nM, for CysLT<sub>1</sub> receptors, or LTD<sub>4</sub> at 0.3 nM, for CysLT<sub>2</sub> receptors. IC<sub>50</sub> values and 95% confidence intervals shown in parentheses were estimated from a 2-parameter logistic model using the results of 5 experiments. The cells, treated with CysLT receptor antagonists, were incubated for 30 min before LTD<sub>4</sub> addition.

引用) Sekioka T. et al., Allergology International, 2015, 64, 351-358.

### 3.4. LTD<sub>4</sub>による非喘息患者の気管支平滑筋収縮に対するロイコトリエン拮抗薬の作用

LTD<sub>4</sub> (30 nM) による気管支平滑筋収縮は CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるモンテルカスト (100 nM) によりほぼ完全に抑制された。ONO-6950 (100, 300 及び 1000 nM) は, LTD<sub>4</sub> によるこの気管支平滑筋収縮を濃度依存的に抑制し, 1000 nM 処置群ではほぼ完全な抑制が認められた (Fig. 19A) . これに対して, CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である BayCysLT<sub>2</sub>RA (300 nM) は LTD<sub>4</sub> (30 nM) による気管支平滑筋収縮に全く影響を及ぼさなかった (Fig. 19B) .



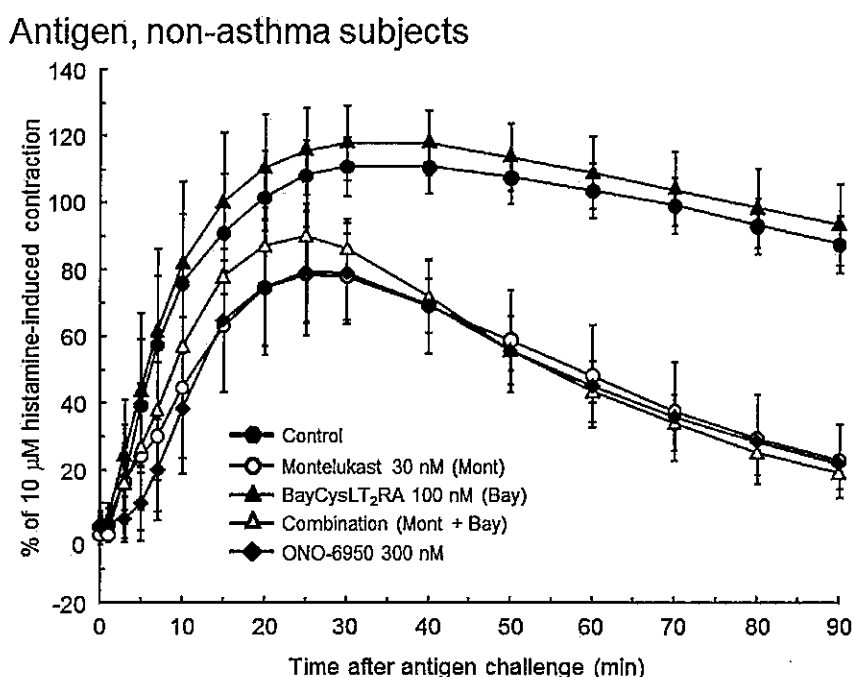
**Fig. 19 Effects of CysLT receptor antagonists on LTD<sub>4</sub>-induced smooth muscle contractions in bronchi isolated from non-asthma subjects.**

(A) Effects of ONO-6950 and montelukast on LTD<sub>4</sub>-induced contractions in bronchi isolated from non-asthma subjects. ONO-6950, montelukast or vehicle (0.1% DMSO) was added 30 min before addition of LTD<sub>4</sub> (30 nM). Each point represents the mean or mean  $\pm$  S.E. of 2-4 experiments. (B) Effect of BayCysLT<sub>2</sub>RA on LTD<sub>4</sub>-induced contractions in bronchi isolated from non-asthma subjects. BayCysLT<sub>2</sub>RA or 0.1% DMSO was added 30 min before addition of LTD<sub>4</sub> (30 nM). Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 8 experiments.

引用) Sekioka T. et al., Allergology International, 2015, 64, 351-358.

### 3.5. 受動感作した気管支標本の抗原による平滑筋収縮に対するロイコトリエン拮抗薬の作用（非喘息患者）

抗ダニヒトアトピー血清で受動感作したヒト気管支標本にダニ抗原を添加することにより、添加 20～40 分をピークとする強力な平滑筋収縮が惹起され、モンテルカスト (30 nM) と ONO-6950 (300 nM) は、これをほぼ同程度に抑制した (Fig. 20) . 一方, BayCysLT<sub>2</sub>RA (100 nM) は、このような平滑筋収縮反応に対して影響を及ぼさず、モンテルカストと併用した場合においても相加的な作用は認められなかった (Fig. 20) .



**Fig. 20 Effects of CysLT receptor antagonists on mite antigen-induced smooth muscle contractions in bronchi isolated from non-asthma subjects.**

The bronchi were passively sensitized with atopic serum before being suspended in Magnus bath. ONO-6950 (300 nM), montelukast (30 nM), BayCysLT<sub>2</sub>RA (100 nM) or vehicle (0.1% DMSO) was added 30 min before antigen challenge. A cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (3  $\mu$ M) and an anti-histamine drug, pyrilamine (1  $\mu$ M) were applied 10 and 5 min before antigen challenge, respectively, to make antigen-induced contractile response as much as possible dependent on CysLTs activity. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 4 or 5 experiments.

引用) Sekioka T. et al., Allergology International, 2015, 64, 351-358.

### 3.6. 受動感作した気管支標本の抗原による平滑筋収縮に対するロイコトリエン拮抗薬の作用（喘息患者）

喘息患者の気管支標本については、非喘息患者のそれと比べてベースラインが不安定性であり、喘息患者 1 のモンテルカスト群の他、特に喘息患者 2 の標本については薬物添加から抗原添加まで 30 分間で、10  $\mu$ M のヒスタミンによる収縮の約 20～50%に相当するベースラインの上昇がみられた。

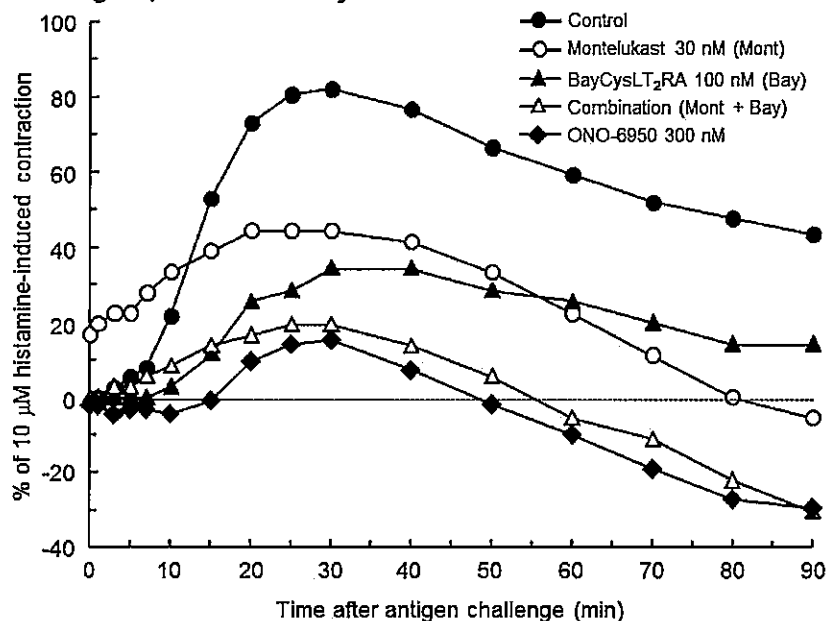
喘息患者 1 では、受動感作した気管支標本のダニ抗原による平滑筋収縮に対して、CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるモンテルカスト及び CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である BayCysLT<sub>2</sub>RA が共に部分的な抑制を示し、これらの併用群では相加的な抑制作用が認められた (Fig. 21A) . また、このような気管支平滑筋収縮に対



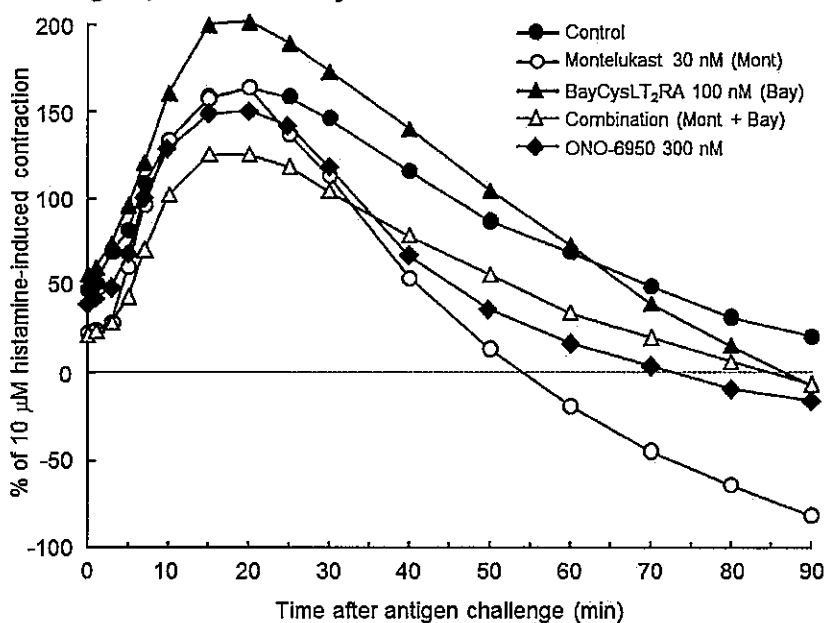
して、CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬である ONO-6950 は、モンテルカストと BayCysLT<sub>2</sub>RA の併用群と同等以上の収縮抑制作用を示した (Fig. 21A) .

これに対して、喘息患者 2 では、モンテルカスト、ONO-6950 及びこれらの併用群が主に抗原添加後の比較的后半部分の平滑筋収縮を抑制したが、BayCysLT<sub>2</sub>RA はこれを抑制しなかった (Fig. 21B) .

#### A: Antigen, asthma subject 1



#### B: Antigen, asthma subject 2



**Fig. 21** Effects of CysLT receptor antagonists on mite antigen-induced smooth muscle contractions in bronchi isolated from 2 asthma subjects.

The bronchi were passively sensitized with atopic serum before being suspended in Magnus bath. ONO-6950 (300 nM), montelukast (30 nM), BayCysLT<sub>2</sub>RA (100 nM) or vehicle (0.1% DMSO) was added 30 min before antigen challenge. A cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (3  $\mu$ M) and an anti-histamine drug, pyrilamine (1  $\mu$ M)

were applied 10 and 5 min before antigen challenge, respectively, to make antigen-induced contractile response as much as possible dependent on CysLTs activity. Each point represents the value obtained in each experiments.

引用) Sekioka T. et al., Allergy International, 2015, 64, 351-358.

#### 4. 考察

本章では、ヒトの気道組織における CysLTs 受容体発現と気道平滑筋収縮における CysLT<sub>1</sub> 受容体及び CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与について検討した。

非喘息患者では、発現の程度に個体間での差はみられるが、5 例全ての気道組織において気道平滑筋や気道上皮に CysLT<sub>1</sub> 受容体の発現がみられた。一方、CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現については個体間の差がより大きく、その発現が殆ど認められない例が確認され、非喘息の気道組織では主に CysLT<sub>1</sub> 受容体が恒常的に発現しているものと考えられる。これに対して、喘息患者においても非喘息患者同様に気道平滑筋及び気道上皮細胞に CysLT<sub>1</sub> 受容体がみられたが、CysLT<sub>2</sub> 受容体については気道平滑筋や気道上皮の他、気道内への浸潤白血球や気道分泌によると考えられる貯溜粘液においても強く発現していた。

これら 2 例の喘息患者は、軽症持続型および軽症間欠型に分類されているが、それぞれ中用量（治療ステップ 2）及び低用量（治療ステップ 1）の ICS によって管理されているため、結果的に軽症例として喘息が安定している可能性があり、中等症例や重症例ではより CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現が高い可能性が考えられる。実際に、中用量～高用量 ICS を処方されている軽症若しくは中等症患者では、急性増悪期における末梢血好酸球上の CysLT<sub>1</sub> 及び CysLT<sub>2</sub> 受容体発現が安定期のそれに比べて有意に上昇していることや interferon- $\gamma$  等の炎症性サイトカインによる CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現亢進が示されている<sup>54)</sup>。また、ヒト肥満細胞では、気管支喘息の病態形成に関与する Th2 サイトカインである IL-4 によって CysLT<sub>2</sub> 受容体蛋白の発現が亢進されることが報告されている<sup>57)</sup>。更に、ヒト単球、T 細胞及び好酸球では、IL-4 によって CysLT<sub>1</sub> 及び CysLT<sub>2</sub> 受容体蛋白発現が亢進するが、CysLT<sub>2</sub> 受容体発現だけがフルチカゾンによって抑制されることが示されている<sup>58)</sup>。これらの報告からも、今回の 2 例の喘息患者においては、喘息コントロールのために処方されている ICS によって結果的に CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現が抑えられている可能性が否定出来ず、急性増悪時やより不安定な病態を示す中等症若しくは重症例において CysLT<sub>2</sub> 受容体が重要な役割を担っている可能性が考えられる。

喘息患者については 2 例のみの限定的な成績であるが、いずれの例でも異なる 2 ヶ所の部位において明確な CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現が確認され、同様の部位における CysLT<sub>1</sub> 受容体発現や喘息の病態の一部である粘液分泌を含む病理組織像と照らし合わせて示した結果はこれが初めてであり、貴重な成績である。

モルモットの CysLT<sub>2</sub> 受容体は、気道平滑筋の収縮や気道の血管透過性の亢進に関与していることが報告されている<sup>25, 26)</sup>。これに対して、CysLT<sub>2</sub> 受容体 KO マウスでは LTC<sub>4</sub> 若しくは LTD<sub>4</sub> による耳介浮腫が増強され、CysLT<sub>2</sub> 受容体が CysLT<sub>1</sub> 受容体を介する血管透過性の亢進を負に制御している可能性が示唆されている<sup>59)</sup>。また、ダニ抗原で感作した CysLT<sub>2</sub> 受容体 KO マウスや、ダニ抗原で感作した野生型マウスに CysLT<sub>2</sub> 受容体 KO マウスの樹状細胞を移入した場合には、血中 IgE 抗体や IL-4、-5、-13 等の Th2 サイトカイン、抗原曝露による好酸球性気道炎症が有意に増強され、CysLT<sub>2</sub> 受容体がアレルギー性気道炎症においても制御的役割を担っている可能性が報告されている<sup>60)</sup>。更に、CysLT<sub>2</sub> 受容体遺伝子を欠損させたヒト臍帯血由来肥満細胞では、CysLT<sub>1</sub> 受容体蛋白の発現及び LTD<sub>4</sub> による肥満細胞の増殖が増強さ

れることが報告されている<sup>61)</sup>。しかしながら、ヒト気管支を用いた検討では、BayCysLT<sub>2</sub>RA や ONO-6950 が LTD<sub>4</sub> あるいは抗原による平滑筋収縮を増強若しくは悪化させることはなく、モルモットでの成績と同様に、ヒト CysLT<sub>2</sub> 受容体を遮断することは抗喘息作用をもたらすものと考えられ、CysLT<sub>2</sub> 受容体の抑制的な役割については種差等が存在するものと予想される。

LTD<sub>4</sub> 若しくは抗原による非喘息患者の気道平滑筋収縮には CysLT<sub>2</sub> 受容体は殆ど関与していないと考えられる結果であるが、2 例のうちの 1 例の喘息患者では BayCysLT<sub>2</sub>RA による平滑筋収縮抑制作用の他、モンテルカストとの併用群並びに ONO-6950 群による更に明確な抑制作用が確認されたことは非常に興味深い結果である。2 例の喘息患者いずれの気道においても明確な CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現があるにも関わらず、拮抗薬による作用が異なる点は不明である。しかしながら、BayCysLT<sub>2</sub>RA や ONO-6950 による収縮抑制作用が認められた喘息患者は、他方の喘息患者と異なり、アトピー性の非喫煙者であり、末梢血好酸球比率が 6.8% と高く、血小板についても正常範囲内ではあるが比較的高い値を示しており、これらの背景データが病態における CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。

気管支喘息の病態は複雑かつ不均一であり、特に重症例や難治例では、好酸球性喘息、好中球性喘息、及びこれら混合型の他、アトピー型、非アトピー型、肥満型、アスピリン増悪性呼吸器疾患 (AERD) 等<sup>62~64)</sup> 様々な観点からの分類や病態解析が試みられている。

一方、LTC<sub>4</sub> 若しくは LTD<sub>4</sub> によってヒト血小板を刺激した際の、好酸球遊走因子の一種である RANTES の産生はプラニルカストでは完全に抑えられず、残存する血小板活性化反応における CysLT<sub>2</sub> 受容体の関与の可能性が示唆されている<sup>65)</sup>。また、CysLT<sub>2</sub> 受容体 KO マウスでは野生型マウスに比べて、LTC<sub>4</sub> による P-selectin 発現誘導を伴う血小板の活性化や気道内への好酸球浸潤が有意に抑制されるが、CysLT<sub>1</sub> 受容体の KO はこれらに影響を及ぼさない<sup>66)</sup>。更に、AERD の患者では、突発性好酸球性肺炎やアスピリン耐性喘息と比して尿中 LTE<sub>4</sub> 量が高く、P-selectin や CD63 等の血小板表面マーカーの発現レベルは、好酸球に結合した活性化血小板の存在比率や尿中 LTE<sub>4</sub> 排泄量と正の相関性を示している<sup>67)</sup>。

本検討において BayCysLT<sub>2</sub>RA 及び ONO-6950 による平滑筋収縮抑制作用が認められた喘息患者の背景データや以上のような報告を併せて考えると、CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の効果が不十分で、尿中 LTE<sub>4</sub> 量が高い、好酸球性喘息や AERD の患者に対して ONO-6950 は新たな治療選択肢となる可能性が考えられる。

### 第3章 小括

1. CysLT<sub>1</sub> 受容体については、非喘息患者と喘息患者のいずれにおいても、気道上皮、気道平滑筋及び白血球上での発現が認められた。CysLT<sub>2</sub> 受容体は、非喘息患者では、主に気道上皮に発現していたが、気道平滑筋や白血球上では個体差がみられた。喘息患者においても、気道平滑筋、気道上皮細胞及び浸潤白血球における CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現が認められたが、気道内の貯溜粘液中の白血球上にも CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現がみられた。
2. 非喘息患者の気管支平滑筋収縮は CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬では抑制されなかったが、喘息患者の 1 例において、抗原による気管支平滑筋の収縮は BayCysLT<sub>2</sub>RA 及び ONO-6950 によって抑制された。

以上の結果より、CysLT<sub>2</sub> 受容体は、気管支喘息患者のある特定の集団において、少なくとも気管支平滑筋の収縮反応に関与している可能性が示された。

## 総括

本研究では以下の成果が得られた。

- ① 覚醒下正常モルモットを用いた検討では、S-hexyl GSH を用いて内因性の  $\gamma$ GTP を阻害した条件下で LTC<sub>4</sub> を吸入させることによって、CysLT<sub>2</sub> 受容体を介すると考えられるエアートラッピングとこれに伴う気道抵抗の上昇による気道閉塞モデルを構築した。

本モデルに対する CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬及び CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の効果を検討した結果、本実験条件下で誘発される気道閉塞には CysLT<sub>1</sub> 受容体を介する気道収縮が部分的に関与するが、大部分は CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する気道収縮とこれに伴うエアートラッピングによる気道閉塞であり、更に、気管支拡張薬に抵抗性の CysLT<sub>2</sub> 受容体を介する血管透過性の亢進も関与している可能性が示唆された。

- ② 感作モルモットを用いた検討では、インドメタシンを処置することによって、抗原曝露による喘息反応における内因性 CysLTs の関与が高まったアナフィラキシーモデルを構築した。更に、S-hexyl GSH を併用することにより、CysLT<sub>1</sub> 受容体だけでなく CysLT<sub>2</sub> 受容体も関与するアナフィラキシーモデルを構築し、ヒトにおける喘息発作治療薬であるステロイドや気管支拡張薬が効果を示すことを確認した。

上記の CysLT<sub>1</sub> 及び CysLT<sub>2</sub> 受容体が共に関与するアナフィラキシーモデルにおいて、CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬である ONO-6950 の効果は、CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるモンテルカストを上回り、喘息治療の第一選択薬であるステロイドの減量効果についてもモンテルカストを上回る可能性が示された。

- ③ ヒト気管支標本を用いた検討では、非喘息患者と喘息患者のいずれにおいても、気道上皮及び気道平滑筋に CysLT<sub>1</sub> 受容体の発現が認められた。非喘息患者における CysLT<sub>2</sub> 受容体発現は主に気道上皮で確認されたが、気道平滑筋では発現がほぼみられない個体も存在した。喘息患者では、気道平滑筋や気道上皮細胞の他、気道内に貯溜した粘液中の白血球上にも CysLT<sub>2</sub> 受容体の発現が確認された。

気管支標本を用いた平滑筋収縮実験では、LTD<sub>4</sub> 若しくはダニ抗原による非喘息患者の気管支平滑筋収縮に対して CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬は何ら影響を及ぼさなかった。これに対して、2 例の喘息患者のうちの 1 例では、抗原による気管支平滑筋の収縮を CysLT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である BayCysLT<sub>2</sub>RA と ONO-6950 が強く抑制した。

本研究により、既存の気管支喘息治療薬である CysLT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬に抵抗性を示す末梢気道病変や気管支平滑筋の収縮反応に CysLT<sub>2</sub> 受容体が深く関与していることが示された。また、経口投与可能な CysLT<sub>1/2</sub> 受容体拮抗薬である ONO-6950 が、既存の喘息治療薬では効果不十分な患者に対しても効果を示す新たな治療選択肢となる可能性が考えられた。

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました摂南大学・薬学部・薬効薬理学研究室 奈邊健教授に深く感謝し、心から御礼申し上げます。

本研究は、小野薬品工業株式会社・水無瀬研究所にて行われました。本研究の機会を与えて頂きました取締役常務執行役員 信頼性保証本部長 川瀬和一十博士に心から感謝申し上げます。

本研究の推進にあたり、終始多くのご意見や激励を賜りつつ薬理学的評価の実施にご協力頂きました、角出実千昭氏、小坂田範子氏、米富康雄博士、井上敦人博士、野村浩明氏、北峰哲也博士、神谷明裕氏、藤田学博士、中出眞嗣博士、並びに薬物動態学的評価を行って頂きました山浦由之博士、松村直哉氏に心から感謝申し上げます。また、ONO-6950 及びその類縁化合物を合成頂いた板谷敏博士、大元和之博士に深く感謝致します。

ヒトの肺組織を用いた研究につきましては、大垣市民病院・呼吸器内科のご協力を得て京都薬科大学・薬理学分野の研究室で行われました。極めて貴重なヒト肺組織のご提供にご尽力頂きました元大垣市民病院 呼吸器内科部長 故・堀場通明医師、現主任部長 進藤丈医師並びに呼吸器内科医長 安部崇医師に深く感謝申し上げます。また、ヒト肺組織を用いた実験結果の取得及び結果の解釈にあたり、貴重な御助言を頂きました京都薬科大学 河野茂勝名誉教授、薬理学分野 藤井正徳准教授に深く感謝申し上げますと共に、研究の実施に多大なる御協力を頂きました同研究室の皆様方に心から御礼申し上げます。

## 論文目録

本論文は以下の雑誌に掲載済みの実験結果を基に論述した。

1. Sekioka T. et al., Expression of CysLT<sub>2</sub> receptors in asthma lung, and their possible role in bronchoconstriction. Allergology International, 2015, 64, 351-358.
2. Sekioka T. et al., CysLT<sub>2</sub> receptor activation is involved in LTC<sub>4</sub>-induced lung air-trapping in guinea pigs. Eur J Pharmacol. 2017, 794, 147-153.
3. Sekioka T. et al., A new CysLT<sub>1</sub> and CysLT<sub>2</sub> receptors-mediated anaphylaxis guinea pig model. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2017, 119, 18-24.

## 引用文献

1. 一般社団法人日本アレルギー学会 喘息ガイドライン専門部会監修. 喘息予防・管理ガイドライン 2015.
2. Sulakvelidze I, Inman MD, Rerecich T, O'Byrne PM. Increases in airway eosinophils and interleukin-5 with minimal bronchoconstriction during repeated low-dose allergen challenge in atopic asthmatics. *Eur Respir J*. 1998, 11, 821-827.
3. Woolley KL, Adelroth E, Woolley MJ, Ellis R, Jordana M, O'Byrne PM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, eosinophils and eosinophil cationic protein in subjects with and without mild, stable, atopic asthma. *Eur Respir J*. 1994, 7, 1576-1584.
4. Fabbri LM, Romagnoli M, Corbetta L, Casoni G, Busljetic K, Turato G, Ligabue G, Ciaccia A, Saetta M, Papi A. Differences in airway inflammation in patients with fixed airflow obstruction due to asthma or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003, 167, 418-424.
5. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997, 156, 737-743.
6. Cundall M, Sun Y, Miranda C, Trudeau JB, Barnes S, Wenzel SE. Neutrophil-derived matrix metalloproteinase-9 is increased in severe asthma and poorly inhibited by glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol*. 2003, 112, 1064-1071.
7. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*. 1983, 220, 568-575.
8. Dahlén SE, Hedqvist P, Hammarström S, Samuelsson B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. *Nature*. 1980, 288, 484-486.
9. Borish L. The role of leukotrienes in upper and lower airway inflammation and the implications for treatment. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2002, 88, 16-22.
10. Joris I, Majno G, Corey EJ, Lewis RA. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4. Endothelial contraction. *Am J Pathol*. 1987, 126, 19-24.
11. Marom Z, Shelhamer JH, Bach MK, Morton DR, Kaliner M. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis*. 1982, 126, 449-451.
12. Choby GW, Lee S. Pharmacotherapy for the treatment of asthma: current treatment options and future directions. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2015, 5, S35-S40.
13. Lima JJ, Zhang S, Grant A, Shao L, Tantisira KG, Allayee H, Wang J, Sylvester J, Holbrook J, Wise R, Weiss ST, Barnes K. Influence of leukotriene pathway polymorphisms on response to montelukast in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006, 173, 379-385.

14. Israel E, Chervinsky PS, Friedman B, Van Bavel J, Skalky CS, Ghannam AF, Bird SR, Edelman JM. Effects of montelukast and beclomethasone on airway function and asthma control. *J Allergy Clin Immunol.* 2002, 110, 847-854.
15. Lynch KR, O'Neill GP, Liu Q, Im DS, Sawyer N, Metters KM, Coulombe N, Abramovitz M, Figueroa DJ, Zeng Z, Connolly BM, Bai C, Austin CP, Chateaufneuf A, Stocco R, Greig GM, Kargman S, Hooks SB, Hosfield E, Williams DL Jr, Ford-Hutchinson AW, Caskey CT, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature.* 1999, 399, 789-793.
16. Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, Stocco R, Bellefeuille JN, Abramovitz M, Cheng R, Williams DL Jr, Zeng Z, Liu Q, Ma L, Clements MK, Coulombe N, Liu Y, Austin CP, George SR, O'Neill GP, Metters KM, Lynch KR, Evans JF. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem.* 2000, 275, :30531-30536.
17. Corrigan C, Mallett K, Ying S, Roberts D, Parikh A, Scadding G, Lee T. Expression of the cysteinyl leukotriene receptors cysLT(1) and cysLT(2) in aspirin-sensitive and aspirin-tolerant chronic rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 115, 316-322.
18. Shirasaki H, Kanaizumi E, Seki N, Fujita M, Kikuchi M, Himi T. Localization and up-regulation of cysteinyl leukotriene-2 receptor in human allergic nasal mucosa. *Allergol Int.* 2013, 62, 223-228.
19. Härter, M., Ergüden, J., Wunder, F., Tinel, H., Köbberling, J., Becker, E.M. Munter K., Schlemmer, K.H., Kast R., Kolkhof, P., Karig G., Barfacker L., Hubsch, W., Schuhmacher, J., Zuleger, S., Conception, A., Shimizu, H., Isophthalic acid derivatives. Search International and National Patent Collections, 2004, WO/2004/052839 A1.
20. Itadani S, Yashiro K, Aratani Y, Sekiguchi T, Kinoshita A, Moriguchi H, Ohta N, Takahashi S, Ishida A, Tajima Y, Hisaichi K, Ima M, Ueda J, Egashira H, Sekioka T, Kadode M, Yonetomi Y, Nakao T, Inoue A, Nomura H, Kitamine T, Fujita M, Nabe T, Yamaura Y, Matsumura N, Imagawa A, Nakayama Y, Takeuchi J, Ohmoto K. Discovery of Gemilukast (ONO-6950), a Dual CysLT1 and CysLT2 Antagonist As a Therapeutic Agent for Asthma. *J Med Chem.* 2015, 58, 6093-6113.
21. Ito Y, Hirano M, Umemoto N, Zang L, Wang Z, Oka T, Shimada Y, Nishimura Y, Kurokawa I, Mizutani H, Tanaka T. Guinea pig cysteinyl leukotriene receptor 2 (gpCysLT2) mediates cell proliferation and intracellular calcium mobilization by LTC4 and LTD4. *BMB Rep.* 2008, 41, 139-145.
22. Orning L, Hammarström S. Inhibition of leukotriene C and leukotriene D biosynthesis. *J Biol Chem.* 1980, 255, 8023-8026.
23. Snyder DW, Aharony D, Dobson P, Tsai BS, Krell RD. Pharmacological and biochemical evidence for metabolism of peptide leukotrienes by guinea-pig airway smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984, 231, 224-229.
24. Bäck M, Kumlin M, Cotgreave IA, Dahlén SE. An alternative pathway for metabolism of leukotriene D(4): effects on contractions to cysteinyl-leukotrienes in the guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol.* 2001, 133, 1134-1144.



25. Yonetomi Y, Sekioka T, Kadode M, Kitamine T, Kamiya A, Matsumura N, Fujita M, Kawabata K. Leukotriene C4 induces bronchoconstriction and airway vascular hyperpermeability via the cysteinyl leukotriene receptor 2 in S-hexyl glutathione-treated guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 2015, 754, 98-104.
26. Yonetomi Y, Sekioka T, Kadode M, Kitamine T, Kamiya A, inoue A, Nakao T, Nomura H, Murata M, Nakao S, Nambu F, Fujita M, Nakade S, Kawabata K. Effects of ONO-6950, a novel dual cysteinyl leukotriene 1 and 2 receptors antagonist, in a guinea pig model of asthma. *Eur J Pharmacol.* 2015 Oct 15;765:242-248.
27. Konzett, H., Rössler, R. Versuchsanordnung zu Untersuchungen an der Bronchialmuskultur. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 1940, 195. 71–74.
28. DeGiorgi. A., White, M., Ventilator management: Maximizing outcomes in caring for asthma, COPD, and pulmonary edema. *Emergency Medicine Practice* 2008, 10, 1–20.
29. Contoli M, Kraft M, Hamid Q, Bousquet J, Rabe KF, Fabbri LM, Papi A. Do small airway abnormalities characterize asthma phenotypes? In search of proof. *Clin Exp Allergy.* 2012, 42, 1150-1160.
30. Sorkness RL, Bleecker ER, Busse WW, Calhoun WJ, Castro M, Chung KF, Curran-Everett D, Erzurum SC, Gaston BM, Israel E, Jarjour NN, Moore WC, Peters SP, Teague WG, Wenzel SE; National Heart, Lung, and Blood Institute Severe Asthma Research Program. Lung function in adults with stable but severe asthma: air trapping and incomplete reversal of obstruction with bronchodilation. *J Appl Physiol.* 2008, 104, 394-403.
31. Hamid Q, Song Y, Kotsimbos TC, Minshall E, Bai TR, Hegele RG, Hogg JC. Inflammation of small airways in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1997, 100, 44-51.
32. Wenzel SE, Szeffler SJ, Leung DY, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997, 156, 737-743.
33. Dolhnikoff M, da Silva LF, de Araujo BB, Gomes HA, Fernezlian S, Mulder A, Lindeman JH, Mauad T. The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009, 123, 1090-1097.
34. Bochnowicz S, Underwood DC. Dose-dependent mediation of leukotriene D4-induced airway microvascular leakage and bronchoconstriction in the guinea pig. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995, 52, 403-411.
35. Hua XY, Dahlén SE, Lundberg JM, Hammarström S, Hedqvist P. Leukotrienes C4, D4 and E4 cause widespread and extensive plasma extravasation in the guinea pig. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1985, 330, 136-141.
36. Woodward DF, Wasserman MA, Weichman BM. Investigation of leukotriene involvement in the vasopermeability response associated with guinea pig tracheal anaphylaxis: comparison with cutaneous anaphylaxis. *Eur J Pharmacol.* 1983, 93, 9-19.

37. Hui Y, Cheng Y, Smalera I, Jian W, Goldhahn L, Fitzgerald GA, Funk CD. Directed vascular expression of human cysteinyl leukotriene 2 receptor modulates endothelial permeability and systemic blood pressure. *Circulation*. 2004, 110, 3360-3366.
38. Bjermer L. The role of small airway disease in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2014, 20, 23-30.
39. Mahut B, Bokov P, Delclaux C. Abnormalities of plethysmographic lung volumes in asthmatic children. *Respir Med*. 2010, 104, 966-971.
40. Barnes N, Price D, Colice G, Chisholm A, Dorinsky P, Hillyer EV, Burden A, Lee AJ, Martin RJ, Roche N, von Ziegenweidt J, Israel E. Asthma control with extrafine-particle hydrofluoroalkane-beclometasone vs. large-particle chlorofluorocarbon-beclometasone: a real-world observational study. *Clin Exp Allergy*. 2011, 41, 1521-1532.
41. Papi A, Paggiaro P, Nicolini G, Vignola AM, Fabbri LM; ICAT SE study group. Beclomethasone/formoterol vs fluticasone/salmeterol inhaled combination in moderate to severe asthma. *Allergy*. 2007, 62, 1182-1188.
42. Price D, Thomas M, Haughney J, Lewis RA, Burden A, von Ziegenweidt J, Chisholm A, Hillyer EV, Corrigan CJ. Real-life comparison of beclometasone dipropionate as an extrafine- or larger-particle formulation for asthma. *Respir Med*. 2013, 107, 987-1000.
43. Nakaji H, Petrova G, Matsumoto H, Iwata T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Niimi A, Mishima M. Effects of 24-week add-on treatment with ciclesonide and montelukast on small airways inflammation in asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013, 110, 198-203.
44. Yasui H, Fujisawa T, Inui N, Kato M, Hashimoto D, Enomoto N, Nakamura Y, Shirai T, Suda T, Nakamura H, Chida K. Impact of add-on pranlukast in stable asthma; the additive effect on peripheral airway inflammation. *Respir Med*. 2012, 106, 508-514.
45. Kubavat AH, Khippal N, Tak S, Rijhwani P, Bhargava S, Patel T, Shah N, Kshatriya RR, Mittal R. A randomized, comparative, multicentric clinical trial to assess the efficacy and safety of zileuton extended-release tablets with montelukast sodium tablets in patients suffering from chronic persistent asthma. *Am J Ther*. 2013, 20, 154-162.
46. Berger W, De Chandt MT, Cairns CB. Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. *Int J Clin Pract*. 2007, 61, 663-676.
47. Israel E, Cohn J, Dubé L, Drazen JM. Effect of treatment with zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor, in patients with asthma. A randomized controlled trial. Zileuton Clinical Trial Group. *JAMA*. 1996, 275, 931-936.
48. Wenzel SE, Kamada AK. Zileuton: the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma. *Ann Pharmacother*. 1996, 30, 858-864.
49. Watkins PB, Dube LM, Walton-Bowen K, Cameron CM, Kasten LE. Clinical pattern of zileuton-associated liver injury: results of a 12-month study in patients with chronic asthma. *Drug Saf*. 2007, 30, 805-815.

50. Gauvreau GM, Boulet LP, FitzGerald JM, Cockcroft DW, Davis BE, Leigh R, Tanaka M, Fourre JA, Tanaka M, Nabata T, O'Byrne PM. A dual CysLT(1/2) antagonist attenuates allergen-induced airway responses in subjects with mild allergic asthma. *Allergy*. 2016, 71, 1721-1727.
51. Löfdahl CG, Reiss TF, Leff JA, Israel E, Noonan MJ, Finn AF, Seidenberg BC, Capizzi T, Kundu S, Godard P. Randomised, placebo controlled trial of effect of a leukotriene receptor antagonist, montelukast, on tapering inhaled corticosteroids in asthmatic patients. *BMJ*. 1999, 319, 87-90.
52. Kanniess F, Richter K, Janicki S, Schleiss MB, Jörres RA, Magnussen H. Dose reduction of inhaled corticosteroids under concomitant medication with montelukast in patients with asthma. *Eur Respir J*. 2002, 20, 1080-1087.
53. Tohda Y, Fujimura M, Taniguchi H, Takagi K, Igarashi T, Yasuhara H, Takahashi K, Nakajima S. Leukotriene receptor antagonist, montelukast, can reduce the need for inhaled steroid while maintaining the clinical stability of asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*. 2002, 32, 1180-1186.
54. Fujii M, Tanaka H, Abe S. Interferon-gamma up-regulates expression of cysteinyl leukotriene type 2 receptors on eosinophils in asthmatic patients. *Chest*. 2005, 128, 3148-3155.
55. Corrigan CJ, Napoli RL, Meng Q, Fang C, Wu H, Tochiki K, Reay V, Lee TH, Ying S. Reduced expression of the prostaglandin E2 receptor E-prostanoid 2 on bronchial mucosal leukocytes in patients with aspirin-sensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012, 129, 1636-1646.
56. Harvey M, Arthur C. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting. GraphPad Software Inc., SanDiego, 2003.
57. Mellor EA, Frank N, Soler D, Hodge MR, Lora JM, Austen KF, Boyce JA. Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: Functional distinction from CysLT1R. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100, 11589-11593.
58. Negri J, Early SB, Steinke JW, Borish L. Corticosteroids as inhibitors of cysteinyl leukotriene metabolic and signaling pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2008, 121, 1232-1237.
59. Maekawa A, Kanaoka Y, Xing W, Austen KF. Functional recognition of a distinct receptor preferential for leukotriene E4 in mice lacking the cysteinyl leukotriene 1 and 2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105, 16695-16700.
60. Barrett NA, Fernandez JM, Maekawa A, Xing W, Li L, Parsons MW, Austen KF, Kanaoka Y. Cysteinyl leukotriene 2 receptor on dendritic cells negatively regulates ligand-dependent allergic pulmonary inflammation. *J Immunol*. 2012, 189, 4556-4565.
61. Jiang Y, Borrelli LA, Kanaoka Y, Bacskaï BJ, Boyce JA. CysLT2 receptors interact with CysLT1 receptors and down-modulate cysteinyl leukotriene dependent mitogenic responses of mast cells. *Blood*. 2007, 110, 3263-3270.
62. Zhang XY, Simpson JL, Powell H, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, Jenkins C, Peters MJ, Lin JT, Gibson PG. Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clin Exp Allergy*. 2014, 44, 1137-1145.

63. Newby C, Heaney LG, Menzies-Gow A, Niven RM, Mansur A, Bucknall C, Chaudhuri R, Thompson J, Burton P, Brightling C; British Thoracic Society Severe Refractory Asthma Network. Statistical cluster analysis of the British Thoracic Society Severe refractory Asthma Registry: clinical outcomes and phenotype stability. *PLoS One*. 2014, 9, e102987.
64. Bochenek G, Kuschill-Dziurda J, Szafraniec K, Plutecka H, Szczeklik A, Nizankowska-Mogilnicka E. Certain subphenotypes of aspirin-exacerbated respiratory disease distinguished by latent class analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014, 133, 98-103.
65. Hasegawa S, Ichiyama T, Hashimoto K, Suzuki Y, Hirano R, Fukano R, Furukawa S. Functional expression of cysteinyl leukotriene receptors on human platelets. *Platelets*. 2010, 21, 253-259.
66. Cummings HE, Liu T, Feng C, Laidlaw TM, Conley PB, Kanaoka Y, Boyce JA. Cutting edge: Leukotriene C4 activates mouse platelets in plasma exclusively through the type 2 cysteinyl leukotriene receptor. *J Immunol*. 2013, 191, 5807-5810.
67. Mitsui C, Kajiwara K, Hayashi H, Ito J, Mita H, Ono E, Higashi N, Fukutomi Y, Sekiya K, Tsuburai T, Akiyama K, Yamamoto K, Taniguchi M. Platelet activation markers overexpressed specifically in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016, 137, 400-411.