

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09558

研究課題名(和文)ヒトマスト細胞に発現するMrgX2を標的としたアレルギー免疫疾患の治療戦略

研究課題名(英文) Treatment strategy of allergy and immunological diseases against MrgX2 expressed on human mast cells as a target molecule for the treatment

研究代表者

岡山 吉道 (OKAYAMA, Yoshimichi)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：80292605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、重症の慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞にGタンパク質共役型受容体に属するMas related gene X2 (MrgX2) の発現が健常者と比較して有意に増強していることを報告した。ストレスで神経細胞から分泌されるsubstance PによりMrgX2を介して皮膚マスト細胞は、ヒスタミンを遊離した。すなわちストレスによる慢性蕁麻疹の増悪の機序と考えられる。一方、MrgX2が関節滑膜マスト細胞においても発現しており、関節リウマチにおいてもsubstance Pが病態に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We reported that expression of Mas-related gene X2 (MrgX2), a G-protein coupled receptor, on mast cells was upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria compared with healthy controls. Histamine was released from skin mast cells via MrgX2 in response to substance P, which was released from neuron in response to stress. These results might explain the mechanism of exacerbation of chronic urticaria by stress. MrgX2 is expressed on human synovial mast cells and MrgX2 might be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

研究分野：アレルギー・免疫学

キーワード：慢性蕁麻疹 皮膚マスト細胞 substance P MrgX2 hemokinin-1 関節リウマチ 滑膜マスト細胞 chymase

1. 研究開始当初の背景

Mrg 受容体は、脊髄後根神経節や感覚神経に発現し、痛覚に関与する G タンパク質共役型受容体に属する受容体ファミリーである。げっ歯類では 50 以上の遺伝子からなる 4 つの Mrg 受容体 subfamily が存在し、ヒトでは、MrgX1-X7 の 7 つの受容体が同定されている¹⁻³。MrgX1 と MrgX2 は、感覚神経細胞のみならず、臍帯血由来培養マスト細胞とマスト細胞腫のセルライン LAD2 にも発現している^{4,5}。substance P、compound 48/80、cortistatin、somatostatin、pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide、dynorphin、vasoactive intestinal peptide (VIP)、抗菌ペプチド LL-37 が MrgX2 のリガンドである^{4,5}。MrgX1 のリガンドは、bovine adrenal medulla peptide である³。

慢性蕁麻疹は、繰り返す膨疹が少なくとも 4 週間続く疾患と定義されている。皮膚マスト細胞の活性化がその病態の中心であるが、マスト細胞の活性化を起こす原因となるアレルゲンが同定されることは少なく、自己反応性 IgG やストレスや温度によるマスト細胞の活性化機構が想定されているが詳細は不明である。

関節リウマチ (RA) は、進行性の関節破壊により日常生活の活動制限を引き起こす全身性の慢性炎症性疾患であり、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-1 や IL-6 が重要な役割を果たしている⁶。実験的関節炎ラットモデルの滑膜では substance P 濃度の有意な増加を認め⁷、substance P の関節投与で炎症が増悪する⁸。NK-1R 拮抗薬を用いると、炎症と痛みが減弱する^{9,10}。また、RA 患者の関節滑液中の substance P 濃度は変形性関節症 (OA) 患者と比較して有意に高い¹¹。substance P の分泌細胞としては、神経細胞¹²、線維芽細胞¹³および単球・マクロファージ¹⁴が報告されているが、マスト細胞に関しての報告はない。RA における substance P による神経性炎症の役割についてはよく分かっていない。

2. 研究の目的

私達は、最近重症の慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞に G タンパク質共役型受容体に属する Mas related gene X2 (MrgX2) の発現が健常者と比較して有意に増強していることを報告した¹⁵。substance P 刺激により MrgX2 を介して皮膚マスト細胞は、ヒスタミンを遊離した。今回 重症の慢性蕁麻疹患者のマスト細胞における MrgX2 の発現の増強の機序を解明し、MrgX2 の関節滑膜マスト細胞における発現とその役割を検討し、新規治療薬の開発に資する研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

方法 1) 重症の慢性蕁麻疹患者のマスト細胞における MrgX2 の発現の増強の機序の解明:

私達は、マスト細胞が産生する Group III phospholipase A₂ (PLA2G3) が線維芽細胞の L-type prostaglandin D₂ 合成酵素 (L-PGDS) と結合し活性化させ PGD₂ を産生させ、この PGD₂ がマスト細胞表面の PGD₂ 受容体 (DP1) に作用することを報告した¹⁶。また、線維芽細胞の表面の発現している膜型 stem cell factor (SCF) がマスト細胞の KIT に作用し、これによってマスト細胞は成熟することを報告した¹⁶。そこで、ヒト皮膚マスト細胞が PLA2G3 を発現していることは既上記の論文¹⁶で報告しているので、皮膚マスト細胞を皮膚線維芽細胞と 4-7 日間共培養し、成熟のマーカーとして、Hdc (histidine decarboxylase, ヒスタミン合成酵素)、Ptdgs2 (hematopoietic PGD₂ synthase)、Cmal (chymase、結合織マスト細胞に発現しているプロテアーゼ)、Mrgx1 および Mrgx2 を指標に mRNA レベル (4 日間培養) と MrgX2 のタンパクレベル (7 日間培養) を共培養なしの細胞と比較した。

方法 2) MrgX2 の関節滑膜マスト細胞における発現と役割の検討:

(1) RA 患者および OA 患者滑膜組織のマスト細胞に発現している MrgX2 の発現を免疫組織化学染色法にて検討した。

(2) 滑膜組織のマスト細胞に発現している MrgX2 の機能を検証するため、滑膜マスト細胞における MrgX2 の発現を、レンチウイルスを用いた shRNA の系で発現を抑制し、substance P 刺激によるマスト細胞からのヒスタミン遊離量、PGD₂ およびサイトカイン産生量を比較検討した。

(3) 免疫組織化学染色法で RA および OA 患者の滑膜組織において substance P 発現細胞を同定した。

(4) 滑膜マスト細胞からの substance P 分泌機構を解明するため、IgE および IgG 依存性の刺激 30 分、1、2 および 24 時間後の滑膜マスト細胞の上清と細胞内 substance P 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 重症の慢性蕁麻疹患者のマスト細胞における MrgX2 の発現の増強の機序の解明:

皮膚マスト細胞を皮膚線維芽細胞と共培養し、Mrgx2 mRNA 発現レベルと MrgX2 のタンパク発現レベルを共培養なしと比較したが皮膚マスト細胞における MrgX2 の発現が元々高く有意な変化は見られなかった。ヒト肺マスト細胞を線維芽細胞と共培養すると MrgX2 が発現してくるが、これは PGD₂ 受容体の DP1 のブロックで抑えられた。

(2) MrgX2 の関節滑膜マスト細胞における発現と役割の検討:

RA と OA 患者滑膜組織の免疫組織化学染色を行ったところ両患者の滑膜組織マスト細胞は substance P を発現しておりその陽性数や発現頻度には有意差はなかったが、

substance P の染色パターンが異なり、RA では 41%の、OA では 7%のマスト細胞において substance P は細胞膜周辺に局在していた。FcεRI の架橋および凝集 IgG 刺激で刺激 2 時間以降に Tac1 mRNA が上昇したが、細胞上清中の substance P は測定感度以下であった。substance P はマスト細胞から分泌される chymase によって分解された。マスト細胞内には substance P が 700 pg/10⁶個が存在し、刺激 30 分後にその substance P 量は有意に減少した。活性化された滑膜マスト細胞は即座に substance P を分解し、これは RA において substance P を介する滑膜細胞の活性化を抑制していることが示唆された。

(3) RA および慢性蕁麻疹でのマスト細胞の MrgX2 の役割の検討：

substance P は皮膚および滑膜マスト細胞上の MrgX2 を介しマスト細胞を活性化し炎症メディエーターを遊離させ炎症を惹起させる。重症慢性蕁麻疹患者の皮膚マスト細胞では MrgX2 の発現が増強しており血中に substance P および hemokinin-1 が存在した。RA の関節滑液中にも substance P は存在し SP-MrgX2 枢軸が両疾患の炎症の病態に関与していることが示唆された。

<引用文献>

Dong X, Han S, Zylka MJ, Simon MI, Anderson DJ. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell*. 106(5):619-32, 2001.

Choi SS, Lahn BT. Adaptive evolution of MRG, a neuron-specific gene family implicated in nociception. *Genome Res*. 13(10):2252-9, 2003.

Lembo PM, Grazzini E, Groblewski T, O'Donnell D, Roy MO, Zhang J, et al. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron--specific GPCRs. *Nat Neurosci*. 5(3):201-9, 2002.

Tatemoto K, Nozaki Y, Tsuda R, Konno S, Tomura K, Furuno M, et al. Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 349(4):1322-8, 2006.

Subramanian H, Gupta K, Guo Q, Price R, Ali H. Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *J Biol Chem*. 286(52):44739-49, 2011.

Karmakar S, Kay J, Gravallese EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheum Dis Clin North Am*. 36(2):385-404, 2010.

Ahmed M, Bjurholm A, Schultzberg M, Theodorsson E, Kreicbergs A. Increased levels of substance P and calcitonin gene-related peptide in rat adjuvant arthritis.

A combined immunohistochemical and radioimmunoassay analysis. *Arthritis Rheum*. 38(5):699-709, 1995.

Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI. Intra-neuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science*. 226(4674):547-9, 1984.

Hong SK, Han JS, Min SS, Hwang JM, Kim YI, Na HS, et al. Local neurokinin-1 receptor in the knee joint contributes to the induction, but not maintenance, of arthritic pain in the rat. *Neurosci Lett*. 322(1):21-4, 2002.

Makino A, Sakai A, Ito H, Suzuki H. Involvement of tachykinins and NK1 receptor in the joint inflammation with collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice. *J Nippon Med Sch*. 79(2):129-38, 2012.

Westermarck T, Rantapaa-Dahlqvist S, Wallberg-Jonsson S, Kjorell U, Forsgren S. Increased content of bombesin/GRP in human synovial fluid in early arthritis: different pattern compared with substance P. *Clin Exp Rheumatol*. 19(6):715-20, 2001.

Miller LE, Justen HP, Scholmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *Faseb J*. 14(13):2097-107, 2000.

Inoue H, Shimoyama Y, Hirabayashi K, Kajigaya H, Yamamoto S, Oda H, et al. Production of neuropeptide substance P by synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Neurosci Lett*. 303(3):149-52, 2001.

Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol*. 159(11):5654-60, 1997.

Fujisawa D, Kashiwakura J, Kita H, Kikukawa Y, Fujitani Y, Sasaki-Sakamoto T, et al. Expression of Mas-related gene X2 on mast cells is upregulated in the skin of patients with severe chronic urticaria. *J Allergy Clin Immunol*. 134(3):622-33 e9, 2014.

Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, et al. Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat Immunol*. 14(6):554-63, 2013.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹におけるマスト細胞と好塩基球の活性化の機序に関して 臨床免疫・アレルギー科 69(5):463-467, 2018. (査読無し)

岡山吉道: ヒトマスト細胞と MAS-related gene X2 (MrgX2) 臨床免疫・アレルギー科 69(3):277-280, 2018. (査読無し)

岡山吉道: 慢性特発性蕁麻疹におけるマスト細胞の活性化機構 アレルギー 67(3):192-196, 2018. (査読無し)

Okamura Y, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Toyoshima S, Kuroda K, Saito S, Tokuhashi Y, Okayama Y: The dual regulation of substance P-mediated inflammation via human synovial mast cells in rheumatoid arthritis. *Allergol Int* 66S:S9-20, 2017. DOI: 10.1016/j.alit.2017.03.002. (査読有り)

Nunomura S, Ra C, Terui T, Okayama Y: Disulfide-linked dimerization of the FcR γ chain is required for positive and negative regulation of mast cell activation via Fc ϵ RI. *Allergol Int* 66S:S41-3, 2017. DOI: 10.1016/j.alit.2017.04.010. (査読有り)

Shimanaka Y, Kono Y, Taketomi Y, Arita M, Okayama Y, Tanaka Y, Nishito Y, Mochizuki T, Kusuhara H, Adibekian A, Cravatt BF, Murakami M, Arai H: ω 3 fatty acid epoxides are autocrine mediators that ensure full activation of mast cells. *Nature Med* 23:1287-97, 2017. DOI: 10.1038/nm.4417. (査読有り)

岡山吉道: IgE 非依存性マスト細胞活性化による自然免疫と炎症の制御 アレルギーの臨床 37(3):22-26, 2017. (査読無し)

Kan J-I, Mishima S, Kashiwakura J-I, Sasaki-Sakamoto T, Seki M, Saito S, Ra C, Tokuhashi Y, Okayama Y: Interleukin-17A expression in human synovial mast cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Allergol Int* 65(Suppl):S11-16, 2016. DOI: 10.1016/j.alit.2016.04.007. (査読有り)

Metcalf DD, Pawankar R, Ackerman SJ, Akin C, Clayton F, Falcone FH, Gleich GJ, Irani AM, Johansson MW, Klion AD, Leiferman KM, Levi-Schaffer F, Nilsson G, Okayama Y, Prussin C, Schroeder JT, Schwartz LB, Simon HU, Walls AF, Triggiani M: Biomarkers of the involvement of mast cells, basophils and eosinophils in asthma and allergic diseases *World Allergy Organ J* 11:9:7, 2016. DOI: 10.1186/s40413-016-0094-3. (査読無し)

岡山吉道: IgE と疾患 (アレルギー疾患と自己免疫疾患) について アレルギー・免疫 23(12):1670-1675, 2016. (査読無し)

岡山吉道, 藤澤大輔, 葉山惟大, 照井正: 重症慢性蕁麻疹患者においては Mas-related gene X2 を発現している皮膚

マスト細胞数が増加している 小児科診療 79(10):1355-1359, 2016. (査読無し)

〔学会発表〕(計 13 件)

Okayama Y, Toyoshima S, Izaki S, Nunomura S, Kashiwakura J, Terui T, Ra C: Autoantibodies (AABs) against the Fc ϵ RI α -chain and IgE in patients with chronic spontaneous urticarial (CSU) induced statistically higher abilities of Fc ϵ RI aggregation compared with non-atopic control (NC) subjects. Workshop 39 Aystemic autoimmune disease (3) 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会, 仙台, 2017.12.14.

遠藤嵩大, 豊島翔太, 伊崎聡志, 西盛信幸, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 照井正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹患者と健常人の好塩基球における抗 Fc ϵ RI α 鎖抗体(CRA1)と抗 IgE 抗体刺激による反応性の比較, 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.17.

岡山吉道, 豊島翔太, 伊崎聡志, 藤澤大輔, 鐘ヶ江佳寿子, 坂本朋美, 小野芳啓, 中村亮介, 西盛信幸, 遠藤嵩大, 照井正, 羅智靖: 慢性特発性蕁麻疹 (CSU) におけるマスト細胞の活性化機構, 教育講演 4, 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.16.

三嶋信太郎, 柏倉淳一, 松本健治, 豊島翔太, 坂本朋美, 齋藤修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ患者滑膜組織マスト細胞における miR-199a-3p と PTGS2 は、有意な負の相関を示す(ミニシンポジウム 20), 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.16.

伊崎聡志, 豊島翔太, 西盛信幸, 柏倉淳一, 布村聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 照井正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹(CSU)患者における抗 IgE 自己抗体および抗 Fc ϵ RI α 鎖(α 鎖)自己抗体の臨床的意義(第 1 報)(ミニシンポジウム 50), 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.16.

伊崎聡志, 豊島翔太, 西盛信幸, 柏倉淳一, 布村聡, 藤澤大輔, 畠田優子, 葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 照井正, 岡山吉道: 慢性蕁麻疹(CSU)患者における抗 Fc ϵ RI α 鎖(α 鎖)自己抗体の解析(第 2 報)(ミニシンポジウム 50), 第 66 回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 2017.6.16.

布村聡, 羅智靖, 照井正, 岡山吉道: Fc ϵ RI を介したマスト細胞活性化における FcR γ 鎖 S-S 結合の役割 アレルギー・好酸球研究会 2016, 東京, 2016.10.22.

岡村祐己, 三嶋信太郎, 菅順一郎, 柏倉淳一, 坂本朋美, 豊島翔太, 山田賢鎬, 関雅之, 齋藤修, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ(RA)における滑膜マスト細胞からのサブスタンス P(SP)産生 アレルギー

一・好酸球研究会 2016, 東京, 2016.10.22.
伊崎聡志, 布村聡, 藤澤大輔, 畠田優子,
葉山惟大, 藤田英樹, 羅智靖, 照井正,
岡山吉道: 慢性蕁麻疹(CSU)患者における
抗 FcεRIα鎖(α鎖)自己抗体の臨床的意
義(ミニシンポジウム 11 蕁麻疹・接触皮
膚炎), 第 65 回日本アレルギー学会学術
大会, 東京, 2016.6.17.

三嶋信太郎, 菅順一郎, 坂本朋美, 関雅
之, 斎藤修, 羅智靖, 徳橋泰明, 岡山吉
道: 関節リウマチ患者滑膜組織マスト細
胞における COX の高発現(ミニシンポジ
ウム 20 好酸球, マスト細胞, 好塩基球),
第 65 回日本アレルギー学会学術大会, 東
京, 2016.6.17.

菅順一郎, 三嶋信太郎, 坂本朋美, 羅智
靖, 徳橋泰明, 岡山吉道: 関節リウマチ
(RA)と変形性関節症(OA)患者滑膜組織
マスト細胞における IL-17A の発現と産
生機構(ポスター発表 14 好酸球・マスト
細胞, 好塩基球 1/組織構成細胞 1), 第 65
回日本アレルギー学会学術大会, 東京,
2016.6.17.

三嶋信太郎, 菅順一郎, 岡村祐己, 李賢
鎬, 柳澤正彦, 関雅之, 斎藤修, 徳橋泰明,
岡山吉道: 関節リウマチ(RA)と変形性関
節症(OA)患者滑膜組織マスト細胞の相違
に関する検討 第 60 回日本リウマチ学
会総会・学術集会, 横浜, 2016.4.21.

菅順一郎, 三嶋信太郎, 岡村祐己, 李賢
鎬, 柳澤正彦, 関雅之, 斎藤修, 徳橋泰明,
岡山吉道: 関節リウマチ(RA)と変形性関
節症(OA)患者滑膜組織マスト細胞におけ
る IL-17A の発現 第 60 回日本リウマチ
学会総会・学術集会, 横浜, 2016.4.21.

〔図書〕(計 3 件)

Okayama Y, Fujisawa D, Sasaki-Sakamoto T,
Nunomura S, Terui T, Ra C. Heterogeneity
of human mast cells in allergic diseases. In:
Marcus M and Behrendt H (eds). Allergies:
current challenges and solutions. pp121-123.
Pacini editore, Pisa, Italy, 2016.

岡山吉道: IgE およびその他の免疫グロブ
リン(足立満, 斎藤博久 編集)日本医師
会雑誌 第 145 巻・特別号 アレルギー
疾患のすべて pp S42-S43, 日本医師会,
東京, 2016.

岡山吉道: マスト細胞, 好塩基球(足立満,
斎藤博久 編集)日本医師会雑誌 第 145
巻・特別号 アレルギー疾患のすべて
pp S63-S64, 日本医師会, 東京, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡山 吉道 (OKAYAMA, Yoshimichi)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 80292605

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし