

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14925

研究課題名（和文）イオンチャネル型受容体によるnRTKsの活性化調節機構の解明

研究課題名（英文）The regulation mechanism of nRTKs activation by ionotropic receptor

研究代表者

吉田 一貴 (Yoshida, Kazuki)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：70803154

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：IgEを介した抗原依存的なマスト細胞の活性化は様々な生体内物質によって調節されている。我々は細胞外ATPがP2X4受容体を介してIgE依存的マスト細胞活性化を増強することを見出した。そこで、その増強メカニズムと生体内のアナフィラキシーに対するP2X4受容体の作用を検討した。P2X4受容体はFcRIによるSykのリン酸化を促進することで脱顆粒を増強していた。この反応はイオンチャネル活性とは独立していると考えられた。さらに、P2X4受容体欠損マウスではアナフィラキシー症状が軽減していた。以上のことから、P2X4受容体は Ⅰ型アレルギー反応を増悪させていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マスト細胞に発現しているP2X4受容体の活性化は抗原依存的なマスト細胞の活性化を促進しており、ヒスタミンや炎症性サイトカインの放出を増加させることが示され、P2X4受容体を欠損したり阻害するとアナフィラキシー症状が緩和することが明らかとなった。即ち、P2X4受容体はマスト細胞による Ⅰ型アレルギー反応を増悪させる受容体であることが明らかとなった。さらに、P2X4受容体はPGE2による抗原非依存的マスト細胞の活性化も促進したことから、炎症時におけるマスト細胞の活性化も促進していると考えられた。これらの結果から、P2X4受容体はアレルギー性疾患における新規治療ターゲットとなりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：IgE/Ag dependent mast cell activation is regulated by various receptors. We found that extracellular ATP enhances IgE-dependent mast cell activation via P2X4 receptors. Therefore, we investigated the mechanism of its enhancement and the role of P2X4 receptor on anaphylaxis in vivo. The P2X4 receptor enhanced degranulation by promoting the phosphorylation of Syk by Fc RI. This reaction was considered to be independent of ion channel activity. Furthermore, anaphylactic symptoms were alleviated in P2X4 receptor-deficient mice. These results suggested that P2X4 receptor exacerbates the type I allergic reaction.

研究分野：薬理学

キーワード：P2受容体 マスト細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Src family kinases (SFKs) はキナーゼ活性を持たない Fc RI や Fc R の様な受容体と会合しており、受容体の活性化に伴ってキナーゼ活性を発露する。Fc RI や Fc R などは細胞内に免疫受容体活性化モチーフ (ITAM) を有しており、リガンドが結合すると SFKs によって ITAM がリン酸化される。その後、種々の非受容体型チロシンキナーゼ (nRTKs) がリン酸化 ITAM に結合し、活性化されることで細胞応答を引き起こす。Fc RI は SFKs や Syk、PLC を介してマスト細胞の活性化を惹起する。Fc RI によるマスト細胞の活性化は Gi と共役した G タンパク質共役型受容体 (GPCR) によって促進することが知られている。当研究室では細胞外 ATP を認識する P2 受容体のうち、イオンチャネル型受容体である P2X4 受容体が Fc RI を介したマスト細胞の活性化を促進することを見出している。しかしながら、そのメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

Fc RI の活性化は nRTKs のリン酸化を惹起し、マスト細胞の活性化を誘導する。この反応は Gi と共役した GPCR によって促進することが知られているが、イオンチャネル型受容体による制御は知られていない。本研究の目的は、リガンド開口型イオンチャネルである P2X4 受容体がどのようなメカニズムで Fc RI を介したマスト細胞の活性化を促進しているのか解明し、このメカニズムが他の細胞でも利用されているかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

マウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) や腹腔由来マスト細胞 (PMC) を ATP や抗原によって刺激し、脱顆粒率の測定やサイトカイン産生量の測定、細胞内シグナル伝達経路の解析を行う。また、P2X4 受容体によるマスト細胞の活性化が、生体内でも惹起されているか検討を行う。さらに、骨髄由来マクロファージ (BMM) を用いて Fc R を介した反応を P2X4 受容体シグナルが促進するか検討を行う。

(1) BMMC および PMC における脱顆粒反応およびサイトカイン産生量の測定

BMMC および PMC を IgE で感作し、抗原や PGE₂、Compound48/80 および種々のヌクレオチドで刺激した。脱顆粒は β -ヘキソサミニダーゼの活性を指標に評価した。サイトカイン産生量は ELISA を用いて測定した。

(2) BMMC における細胞内シグナル伝達経路の解析

IgE で感作した BMMC に種々の刺激を行い、ウエスタンブロット法で活性化が促進しているシグナル伝達経路の特定を行った。

(3) アナフィラキシーショックモデルマウスの解析

野生型および P2X4 受容体欠損マウスの全身に IgE を投与し感作する、passive systemic anaphylaxis (PSA) および、耳介に IgE を投与し感作する passive cutaneous anaphylaxis (PCA) モデルマウスで解析を行った。PSA モデルマウスは IgE を尾静脈から投与し、24 時間後に抗原を尾静脈から投与し、直腸体温を測定した。PCA は耳介に IgE を投与し、24 時間後に尾静脈から抗原およびエヴァンスブルーを投与し、耳介に漏出した色素量を測定した。

(4) BMM における細胞内シグナル伝達経路の解析

ラット抗 Fc R IgG 抗体に暴露した BMM に対して抗ラット IgG 抗体を作用させることで Fc R を架橋・刺激した。BMMC と同様にシグナル伝達経路の活性化をウエスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

(1) Fc RI を介した脱顆粒に対する細胞外ヌクレオチドの作用

IgE で感作した BMMC を抗原で刺激すると濃度依存的に脱顆粒が惹起された。このとき、抗原と同時に ATP を添加すると脱顆粒反応が著しく増強した。この反応は ADP や UTP、UDP など ATP 以外のヌクレオチドでは惹起されなかった。また、細胞外ヌクレオチドをリガンドとする種々の P2 受容体サブタイプに対するアンタゴニストを用いると P2X4 受容体アンタゴニストである 5-BDBD がこの反応を抑制した。さらに、P2X4 受容体を siRNA でノックダウンすると ATP による作用は抑制された。

(2) Fc RI を介した脱顆粒に対する P2X4 受容体シグナルの役割

野生型および P2X4 受容体欠損マウスから作成した BMMC を IgE で感作し、抗原及び ATP で刺激すると、野生型 BMMC では ATP によって脱顆粒が増強したが、P2X4 受容体欠損 BMMC では増強

しなかった。P2X4 受容体欠損 BMMC に P2X4 受容体を強制発現させると、ATP による脱顆粒増強反応は回復した。脱顆粒と同様に、野生型 BMMC において ATP は抗原によって惹起される TNF- α と IL-13 の分泌を促進したが、P2X4 受容体欠損 BMMC では促進しなかった。

(3) P2X4 受容体シグナルが Fc γ RI シグナルに及ぼす影響

IgE で感作した野生型及び P2X4 受容体欠損 BMMC を抗原で刺激すると Syk や PLC γ 1、Akt のリン酸化が誘導された。抗原と同時に ATP で刺激すると、野生型 BMMC では Syk および PLC γ 1 のリン酸化が増加したが、Akt のリン酸化は変化しなかった。P2X4 受容体欠損マウスでは抗原と同時に ATP で刺激してもリン酸化は増加しなかった。ATP による Syk のリン酸化増加は細胞外 Ca $^{2+}$ の除去や細胞外カリウムを高濃度にした場合でも確認できた。さらに、P2X4 受容体のイオンチャネル活性を抑制する銅イオン存在下でも ATP は抗原による脱顆粒や Syk のリン酸化を増加させた。一方で、Syk の上流に存在する Lyn や Fyn を siRNA でノックダウンしても ATP による脱顆粒増強作用は抑制されなかった。また、ATP 刺激後に Fc γ RI サブユニットを免疫沈降すると、Lyn や Syk が共沈降された。

(4) 抗原依存的アナフィラキシーショックに対する P2X4 受容体シグナルの役割

野生型及び P2X4 受容体欠損マウスにおいて PSA モデルを誘導すると、野生型と比較して P2X4 受容体欠損マウスでは直腸体温の低下が緩和されていた。さらに PCA モデルでは野生型マウスと比較して P2X4 受容体欠損マウスでは耳介の色素漏出量が減少していた。

(5) BMM における Fc γ R を介したシグナルに対する P2X4 受容体シグナルの作用

BMM の Fc γ R を刺激すると時間依存的、濃度依存的に Syk のリン酸化が惹起された。このとき、同時に ATP を添加すると Syk のリン酸化は増加した。

(5) 結論

P2X4 受容体は Fc γ RI を介したシグナル伝達経路を促進することで抗原によるマスト細胞の活性化を促進していると考えられた。この反応は P2X4 受容体がイオンチャネル型受容体であるにも関わらず、細胞外イオン組成に影響されなかった。さらに、P2X4 受容体イオンチャネル活性を銅イオンで阻害しても惹起されたことから、P2X4 受容体はイオンチャネル型受容体以外にも未知の機能があると考えられた。さらに、PSA および PCA モデルにおいて P2X4 受容体欠損マウスでは野生型マウスと比較して症状が緩和していた。このことから、生体内においても P2X4 受容体は抗原依存的なマスト細胞の活性化を促進していると考えられた。マスト細胞のみならず、マクロファージでも Fc γ R を介したシグナル伝達を ATP は促進していた。しかし、この反応が P2X4 受容体を介したもののなのか、ATP は Fc γ R を介した貪食やサイトカイン産生を促進するのかなど、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Obayashi Kosuke, Yoshida Kazuki, Ito Masa-aki, Mori Tetsuya, Yamamoto Kimiko, Imai Toshiyashu, Matsuoka Isao	4. 巻 11
2. 論文標題 Synergistic Cytokine Production by ATP and PGE2 via P2X4 and EP3 Receptors in Mouse Bone-Marrow-Derived Mast Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 616 ~ 616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11040616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Kazuki	4. 巻 141
2. 論文標題 Elucidation of Mast Cell Activation Mechanism Mediated by Purinergic Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1057 ~ 1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.21-00113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Kazuki, Ito Masa-aki, Sato Naoko, Obayashi Kosuke, Yamamoto Kimiko, Koizumi Schuichi, Tanaka Satoshi, Furuta Kazuyuki, Matsuoka Isao	4. 巻 204
2. 論文標題 Extracellular ATP Augments Antigen-Induced Murine Mast Cell Degranulation and Allergic Responses via P2X4 Receptor Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3077 ~ 3085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900954	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida, Tajima, Nagano, Obayashi, Ito, Yamamoto, Matsuoka	4. 巻 20
2. 論文標題 Co-Stimulation of Purinergic P2X4 and Prostanoid EP3 Receptors Triggers Synergistic Degranulation in Murine Mast Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5157 ~ 5157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20205157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 吉田一貴
2. 発表標題 プリン受容体を解するマスト細胞活性化メカニズムの解明
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuki Yoshida, Yuu Ishida, Masaaki Ito, Isao Matsuoka
2. 発表標題 Upregulation of P2X7 receptor signaling by interleukin-33 in mouse bone marrow-derived mast cells
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田一貴、伊藤政明、松岡功
2. 発表標題 P2X4受容体が結合組織型マスト細胞の脱顆粒反応に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田一貴, 石田悠, 伊藤政明, 松岡功
2. 発表標題 骨髓由来マスト細胞のプリン受容体発現に対するIL-33の効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshida K, Takao T, Ito M, Matsuoka I
2. 発表標題 Effect of compound48/80 on antigen-dependent degranulation in BMMC
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshida K
2. 発表標題 Role of purinergic P2X4 receptors in antigen-induced mast cell degranulation and allergic responses
3. 学会等名 第49回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 一貴, 伊藤 政明, 古田 和幸, 田中 智之, 松岡 功
2. 発表標題 粘膜型および組織型マスト細胞におけるP2X4 受容体を介する脱顆粒反応の調節
3. 学会等名 日本薬学会第139年会、千葉
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuoka I, Yoshida K, Hoshino Y, Ito M
2. 発表標題 Role of ionotropic P2X receptor signalling in regulation of mast cell function
3. 学会等名 World Congress on Pharmacology and Toxicology, Rome (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida K, Ito M, Tajima M, Nagano T, Matsuoka I,
2. 発表標題 Synergistic effect of ATP and prostaglandin E2 on mast cell degranulation
3. 学会等名 The 18th WCP, Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------