様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２年　５月２８日現在

機関番号：１１１０１
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：１８Ｋ１６１３５

研究課題名（和文）細胞外ヌクレオチド受容体による好塩基球機能調節メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism by extracellular nucleotide receptors for basophil activation

研究代表者
中野　学（Nakano, Manabu）

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：１０４３６０１６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　1,900,000円

研究成果の概要（和文）：好塩基球のIgE依存性活性化に対するP2Y6受容体シグナルの影響を確認した。ヒト好塩基球のP2Y6受容体は、UDP刺激によりcAMPとIP1を上昇させたが、RhoGTPを変化させなかった。Gqタンパク質阻害剤のYM-254890およびcAMP合成酵素阻害剤の2',5'-ジデオキシアデノシンで処理したヒト好塩基球では、IgE依存性活性化が低下した。
ヒト好塩基球は細胞外ヌクレオチド加水分解酵素を発現しており、UTPを加水分解しUDPを産生した。細胞外ヌクレオチド加水分解酵素阻害剤であるPOM-1で処理された好塩基球は、IgE依存性活性化が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
多くの日本国民が花粉症などのＩ型アレルギー疾患に罹患しているが、治療法の殆どは対処療法であり、根本的な治療法の確立が求められている。現時点で唯一のアレルギーの根本的治療法といえるアレルゲン免疫療法は、重篤な副作用が誘発されることや、使用できるアレルゲンが限定されているなど、課題が残されている。
好塩基球はアレルギー反応で重要な役割を果たしており、その活性化制御はアレルギー疾患の新規治療法の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：We confirmed the effect of P2Y6 receptor signal on IgE-dependent activation of human basophils. Basophils treated with UDP increased cAMP and IP1, but not RhoGTP. Increased expression of CD203c and CD63 on basophils induced by anti-IgE antibody was attenuated by YM-254890, a Gq protein inhibitor. On the other hand, 2',5'-dideoxyadenosine, a cAMP synthase inhibitor, attenuated only the increase in CD63 expression in basophils induced by anti-IgE antibody. Basophils expressed ecto-nucleotidases and were able to confirm that UTP was hydrolyzed to UDP. POM-1, an extracellular nucleotide hydrolase inhibitor, reduced IgE-dependent activation of human basophils.

研究分野：免疫学

キーワード：好塩基球　細胞外ヌクレオチド　Gタンパク質共役型受容体

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

日本におけるⅠ型アレルギー疾患の患者数は増加傾向にあり、治療法の確立が求められている。Ⅰ型アレルギーは免疫系の過剰反応により誘発され、浮腫、掻痒、発赤等の局所症状、全身性の症状であるアナフィラキシーショックを誘発し、ときに生命を脅かす。Ⅰ型アレルギー疾患の症状、発症部位、重症度などが極めて複雑であり、多くの免疫細胞が関与することから治療薬や根本的治療法が確立されていない。近年、好塩基球がアレルギー疾患に関与する免疫細胞の活性化や分化誘導することが報告され、アレルギー疾患治療の標的細胞として注目されている。研究代表者は、好塩基球機能を制御することでアレルギーを治療できるのではないかと考え、細胞外ヌクレオチドとその受容体に着目し検討している。

２．研究の目的

本研究では P2Y6 受容体による好塩基球機能調節メカニズムを解明することを目的とした。P2Y 受容体は、G タンパク質共役型受容体であり、結合する G タンパク質の種類により細胞機能への影響が異なる。細胞から放出されるヌクレオチドは、細胞外ヌクレオチド加水分解酵素により加水分解され、P2Y 受容体に作用する。しかしながら、好塩基球の P2Y6 受容体に結合する G タンパク質や、好塩基球が細胞外ヌクレオチド分解能を有するか不明である。本研究期間内に好塩基球の細胞外ヌクレオチド分解能と P2Y6 受容体に結合する G タンパク質を特定することで、P2Y6 受容体による好塩基球機能調節メカニズムを解明する。

３．研究の方法

（１）P2Y6 受容体に結合する G タンパク質の確認

GPCR に結合する G タンパク質の種類により、刺激後に誘導される細胞内セカンドメッセンジャー（cAMP, IP3, RhoGTP）は異なる。ヒト末梢血液から単離した好塩基球を UDP で刺激し、刺激前後のセカンドメッセンジャー量の変化から P2Y6 受容体に結合する G タンパク質を検討した。各種セカンドメッセンジャーは、ELISA 法で解析した。

誘導されたセカンドメッセンジャーが好塩基球の IgE 依存性活性化に関与するのか確認するため、各種阻害剤で処理した好塩基球を用いて好塩基球活性化試験を行った。

ヒト末梢血液の採血は、本学倫理委員会からの承認後、インフォームド・コンセントを得た健常人ボランティアから行った。

（２）細胞外ヌクレオチド加水分解能の確認

P2Y6 受容体のアゴニストである UDP は、UTP の加水分解産物の一つである。好塩基球が UTP を分泌することを、我々は先行研究で確認している。細胞外ヌクレオチド加水分解酵素である ENTPD および ENPP は細胞膜酵素として知られている。好塩基球における細胞外ヌクレオチド加水分解酵素の発現をフローサイトメトリー法で解析した。好塩基球による UTP 加水分解と UDP 産生を HPLC 法で確認した。

更に、細胞外ヌクレオチド加水分解酵素阻害剤で処理した好塩基球を用いて好塩基球活性化試験を行った。

ヒト末梢血液の採血は、本学倫理委員会からの承認後、インフォームド・コンセントを得た健常人ボランティアから行った。

４．研究成果

（１）UDP 刺激による GPCR セカンドメッセンジャー量の変化

好塩基球の P2Y6 受容体に結合する G タンパク質を特定するため、UDP 刺激後の細胞内セカンドメッセンジャー量の変化を測定した。セカンドメッセンジャーとして、$G_{\alpha s}$ と $G_{\alpha 12/13}$ で増加する cAMP、$G_{\alpha q}$ で増加する IP3、$G_{\alpha 12/13}$ で増加する RhoGTP が知られている。IP3 は、最終代謝産物の IP1 量を測定した。

UDP 刺激により cAMP 量と IP1 量は有意に増加したが、RhoGTP 量は変化しないことを確認した（図１）。以上のことから、好塩基球の P2Y6 受容体には $G_{\alpha s}$ と $G_{\alpha q}$ が結合していることが示唆された。

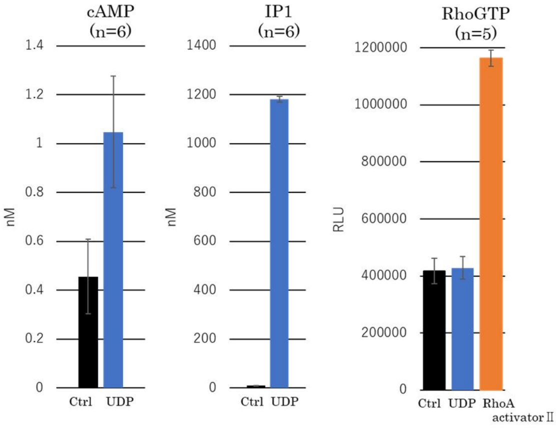

図 1. UDP 刺激による GPCR セカンドメッセンジャー量の変化

（２）YM-254890 および 2',5'-ジデオキシアデノシン処理による好塩基球 IgE 依存性活性化の抑制

$G_{\alpha q}$ および $G_{\alpha s}$ シグナルが好塩基球の IgE 依存性活性化に対する影響を確認するため、$G_{\alpha q}$ 阻害剤である YM-254890 および cAMP 合成酵素阻害剤である 2',5'-ジデオキシアデノシンで処理した好塩基球を用いて好塩基球活性化試験を行った。活性化マーカーである CD203c と脱顆粒マーカーである CD63 の発現量の変化で評価した。

YM-254890 で処理された好塩基球は、IgE 依存性活性化による CD203c と CD63 の発現量が抑制された。また、2',5'-ジデオキシアデノシンで処理された好塩基球は、IgE 依存性活性化による CD63 の発現量が抑制された（図２）。好塩基球の活性化制御に、P2Y6 受容体シグナルの抑制が有用であることが示唆された。

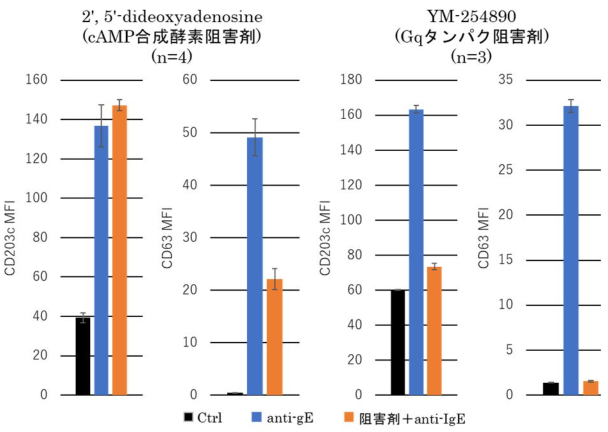

図 2. GPCR 阻害剤処理好塩基球の活性化マーカーの測定

（３）好塩基球における細胞外ヌクレオチド加水分解酵素発現と UTP の加水分解

好塩基球の細胞外ヌクレオチド加水分解酵素（ENTPD1、ENTPD2、ENTPD3、CD73）の発現をフローサイトメトリー法で解析した。好塩基球では ENTPD2、ENTPD3 タンパクを検出した。更に好塩基球の細胞外ヌクレオチド分解を HPLC 法で分析したところ、UTP を分解し、UDP および UMP を産生した。

（４）POM1 による好塩基球 IgE 依存性活性化の抑制

細胞外ヌクレオチド加水分解酵素阻害剤である POM1 で処理した好塩基球を用いて好塩基球活性化試験を行った。活性化マーカーである CD203c と脱顆粒マーカーである CD63 の発現量の変化で評価した。

POM1 で処理された好塩基球は IgE 依存性活性化による CD203c と CD63 の発現量が抑制された（図３）。以上のことより好塩基球の活性化は、ENTPD による細胞外ヌクレオチド加水分解により制御されていることが示唆された。

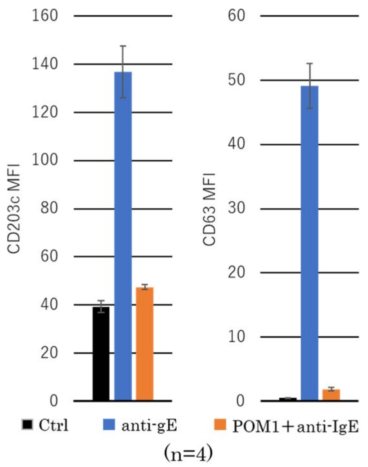

図３. POM1 処理好塩基球の活性化マーカー変化の測定

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 中野学，菊地毬菜，時田尚文，伊藤京子，高見秀樹，伊藤巧一
２．発表標題 好塩基球活性化に対するE-NTPDaseの影響
３．学会等名 第68回日本アレルギー学会学術大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 Manabu Nakano, Marina Kikuchi, Airi Yoshioka, Misaki Wahachi, Kyoko Ito, Hideki Takami, Koichi Ito
２．発表標題 Effect of extracellular nucleotide hydrolysis on IgE-dependent activation of basophils
３．学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
４．発表年 2019年

１．発表者名 Manabu Nakano, Marina Kikuchi, Syun Aburakawa, Naofumi Tokita, Kyoko Ito, Hideki Takami, Koichi Ito
２．発表標題 Effect of MRS2578, a P2Y6 receptor inhibitor, on IgE-dependent activation of human basophils
３．学会等名 International GPCR symposium（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