

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07328

研究課題名(和文) マスト細胞のP2X4受容体を標的とするアレルギー疾患治療基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of therapeutic basis for allergic diseases targeting P2X4 receptor of mast cells

研究代表者

松岡 功 (Matsuoka, Isao)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：10145633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマスト細胞(MC)が媒介するアレルギー反応に及ぼすATPの作用を解析した。ATPは種類の異なる刺激によるMCの脱顆粒反応を著明に増大させ、遅発性アレルギー炎症に関与する炎症性サイトカインの産生も亢進させた。このATPの作用はイオンチャネル型P2X4受容体を欠損させると抑制された。生体内でも抗原による受動的アレルギー反応やPGE2による炎症性過敏応答がP2X4受容体の欠損により減弱した。また、P2X4受容体阻害薬は、ATPによるMCの過剰応答および生体内でのアレルギー反応を抑制した。以上の結果から、P2X4受容体はMCが媒介するアレルギー反応の新しい治療標的になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉症などマスト細胞の活性化により惹起されるアレルギー反応は、日本では2人に1人が罹患する国民病になっている。アレルギー反応は、マスト細胞の活性化に伴い、細胞内顆粒のヒスタミンなどの化学伝達物質が放出されて過分反応が惹起される。治療には抗ヒスタミン薬が用いられるが、ヒスタミン以外の顆粒成分による反応は抑制できず新しい治療戦略が求められている。今回見出したP2X4受容体を介したATPの作用は、本来は反応しない微量なアレルギー原因物質に対する応答を増大させるもので、この制御は新しいアレルギー疾患の治療薬開発に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the effect of ATP on mast cell (MC)-mediated allergic reactions. ATP markedly increased the degranulation response of MC by different types of stimuli and also increased the production of inflammatory cytokines involved in late-onset allergic inflammation. This effect of ATP was suppressed by deficiency of the ionotropic P2X4 receptor. In vivo, the passive allergic reaction caused by the antigen and the inflammatory hypersensitivity response caused by PGE2 were attenuated in the P2X4 receptor deficient mice. In addition, the P2X4 receptor antagonist suppressed the ATP-induced increased response of MC and the allergic reaction in vivo. These results suggest that the P2X4 receptor is a novel therapeutic target for MC-mediated allergic reactions.

研究分野：薬理学

キーワード：マスト細胞 プリン作動性シグナル 脱顆粒反応 炎症性サイトカイン P2X4受容体 プロスタグランジンE2 EP3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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

アレルギー反応は、マスト細胞や好塩基球に結合した IgE と抗原が会合し細胞からヒスタミンなどケミカルメディエーターが放出されて生じる。しかし、抗原刺激による経路だけでは説明できない多くのアレルギー様事象が認められている。我々は、マウス骨髄由来マスト細胞で、細胞外 ATP がマスト細胞の脱顆粒反応を増強する増強因子であることを見出し、その作用が従来知られていないイオンチャンネル型 P2X4 受容体を介する反応と考えられた。そこで本研究では P2X4 受容体欠損マウスを用いてマスト細胞の脱顆粒反応および生体内でのアレルギー反応における P2X4 受容体の役割を解明し、アレルギー性疾患の治療標的としての可能性を検討した。

2. 研究の目的

マスト細胞 (MC) は、主に外部と接触する組織に広く分布しており、IgE に対する高親和性受容体 FcεR1 を発現し、外来抗原 (Ag) を認識してアレルギー反応を惹起する。マスト細胞が元々無害な Ag に対する反応性を獲得すると、結果として生じる複数の化学メディエーターの放出によりアレルギー性炎症が惹起される。したがって、Ag が誘導するシグナル伝達経路を調節する因子は、アレルギー性疾患の潜在的な治療標的として研究されてきた。例えば、Ag 誘発性 MC 活性化が、G 蛋白質共役型受容体により調節されることが知られている (1)。我々はこれらの要因に加えて、細胞外 ATP が G タンパク質共役型受容体と異なるシステムを介して MC の機能を増強することを報告した (2)。つまり、骨髄由来のマウス肥満細胞 (BMMC) は、イオンチャンネル型 P2X1、4、7、G 蛋白質共役型 P2Y₁、2、13、14 受容体など、多くの種類の機能的 P2 受容体を発現しているが、MC の脱顆粒反応に関与するのは 2 つのイオンチャンネル型 P2X 受容体で、1 つは P2X7 受容体を介した高濃度の ATP (> 1 mM) によって誘発された直接脱顆粒であり、もう 1 つは低濃度の ATP (<100 μM) による IgE 誘発性脱顆粒の相乗的増強で、薬理的解析から P2X4 受容体を介することが示唆された。P2X7 受容体を介した MC の活性化は *in vivo* と *in vitro* の研究で報告されている。しかし、MC 機能への P2X4 受容体の関与については全く知られていなかった。そこで、この研究では、P2X4 受容体遺伝子欠損 (*P2rx4^{-/-}*) マウスを使用して MC 機能発現に及ぼす P2X4 受容体の役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス

実験には C57BL/6 マウスおよび C57BL/6 を背景とする *P2rx4^{-/-}* マウスを使用した。マウスを用いる実験計画は高崎健康福祉大学の動物実験委員会において承認され、施設の規定に基づいて行った。

(2) 細胞培養

BMMC は 6 - 12 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨から採取した骨髄細胞より調製した。細胞は IL-3 (10 ng/mL) を含んだ RPMI1640 培地に懸濁し培養、2 週目以降は IL-3 (10 ng/mL) 及び SCF (10 ng/mL) を加えた RPMI1640 培地で培養した。30 ~ 40 日間培養し、フローサイトメトリーによって BMMC のマーカーである FcεR1 と c-Kit が両陽性の細胞が 95 % 以上で有ることを確認して実験に用いた。

(3) 生化学的実験

BMMC の反応液としては krebs-ringer-HEPES 緩衝液 (KRH; 130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 4.0 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 11.5 mM Glucose, 1.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, pH 7.4) に牛血清アルブミン (BSA) を 0.1% 添加したものを使用した。細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) は Fura 2-AM を用いた蛍光法で、遺伝子発現の解析は、細胞の total RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法で、蛋白質のリン酸化はウェスタンブロットで解析した。また、サイトカイン産生は細胞の反応上清を用いて ELISA 法で測定した。

(4) 脱顆粒反応

MC からの脱顆粒は抗ジニトロフェノール (DNP)-IgE 抗体で感作した細胞からの α -hexosaminidase (α -Hex) の放出を測定し評価した。KRH-0.1%BSA に再懸濁した細胞を種々の条件で刺激し、反応液を氷上に 1 分間静置し、遠心分離することで反応を止め、上清を回収し、沈殿した細胞を 1 % TritonX-100 で溶解した。上清または細胞溶解液を α -Hex の基質である 1 mM p-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide を基質として 37 °C、30 分間反応させ、Na₂CO₃/NaHCO₃ バッファー (pH 10.4) を加えて、405/655 nm の吸光度を測定した。

(5) 受動的アナフィラキシー反応

マウスに抗 DNP-IgE 抗体を静脈内 (全身性) または耳介 (局所) に投与し、24 時間後に除脈内に抗原 (DNP 標識ヒト血清アルブミン、DNP-HSA) を投与し、アナフィラキシー反応を誘発させた。全身性アナフィラキシー反応は直腸体温の低下で、局所アナフィラキシー反応は抗原と同時に投与したエバンスブルーの血管外漏出を測定して評価した。

4. 研究成果

(1) 抗原による脱顆粒反応に及ぼす ATP の作用 (3)

マスト細胞の抗原による脱顆粒反応には、ATP 存在下では著明に増大した(図 1 A)。抗原と ATP の共刺激は明らかな $[Ca^{2+}]_i$ の増大が起こらず、これは、EP₃ や A₃R など Gi 共役型受容体刺激が、ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ (PI3K) 依存的に抗原刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を相乗的に増大させるのと対照的であった。一方、抗原による IgE-FcεRI の刺激は細胞内チロシンリン酸化酵素の活性化が反応のトリガーになるが、P2X4 受容体刺激は抗原による非受容体型チロシンキナーゼである Syk のリン酸化を亢進させた。興味深いことに、ATP による Syk のリン酸化亢進は細胞外 Ca²⁺ を除去した状態でも認められ、イオンチャネル開口による Ca²⁺ 流入には依存しない反応と考えられた(図 1B)。また、P2rx4^{-/-} マウスから調整した BMMC では ATP による脱顆粒増強反応も Syk のリン酸化亢進が認められなかった(図 1A,B)。実際に受動的抗体感作による全身アナフィラキシー反応や皮下の局所アナフィラキシー反応は P2rx4^{-/-} マウスでは軽減していたことから、生体内の抗原によるアレルギー反応にも P2X4 受容体シグナルが重要な役割を果たしていると考えられた(図 1C,D)。

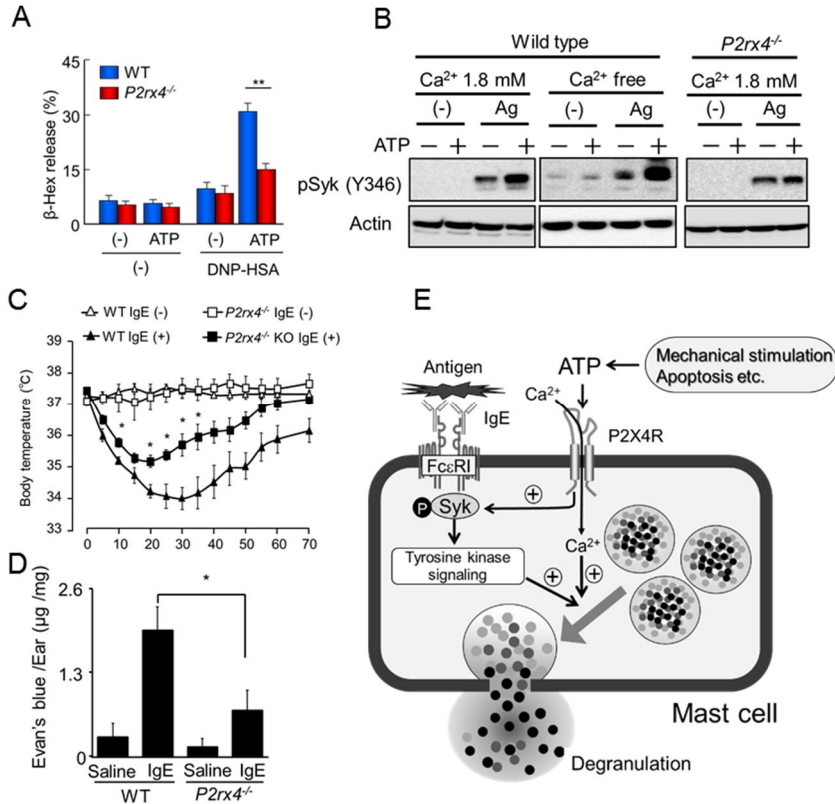


図1 野生型 (WT) および P2rx4^{-/-} マウスから調整した BMMC における抗原刺激による脱顆粒反応 (A) および Syk リン酸化 (B) に及ぼす ATP の作用。WT および P2rx4^{-/-} マウスにおける全身 (C) および局所 (D) 受動的アナフィラキシー反応。E, 抗原と ATP による P2X4 受容体刺激による脱顆粒亢進作用のメカニズム (文献 3 より抜粋)。

(2) 抗原非依存的マスト細胞活性化に対する P2X4R シグナルの役割 (4)

ATP は抗原だけでなく、PGE₂ やアデノシンなど Gi 共役型 R に作用するリガンドとの共刺激でも著明な脱顆粒反応を引き起こした。この ATP の作用も P2rx4^{-/-} マウス由来の BMMC では認められず P2X4 受容体を介する反応と考えられた(図 2A)。さらに、マウスの皮下に PGE₂ を投与し生じるマスト細胞に依存した血管透過性反応は P2rx4^{-/-} マウスでは減弱していたことから、P2X4R シグナルは生体内での抗原非依存的なマスト細胞の活性化にも関与すると考えられた(図 2B)。一方、その機序は抗原に対する作用と異なり、Gi 共役型受容体による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を有意に増大させた。さらに、この相乗作用は、抗原との共刺激反応を完全に阻害するチロシンリン酸化酵素阻害剤では全く影響されず、PI3K 阻害薬で抑制された。P2X4R 受容体は PI3K で産生する細胞膜のホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸により機能が亢進する。また、マスト細胞の Gi 共役型 R の活性化は Gβγ サブユニットを介して G 蛋白質共役内向き整流性 K⁺ チャネルを開口させる。この反応は膜電位を深くし P2X4 受容体チャネルの駆動力を亢進させて Ca²⁺ 流入が促進する可能性が考えられた (5)。このように P2X4 受容体シグナルは抗原依存的な反応とは異なる機序で、抗原非依存的なマスト細胞の活性化を起こすと考えられた(図 2C)。

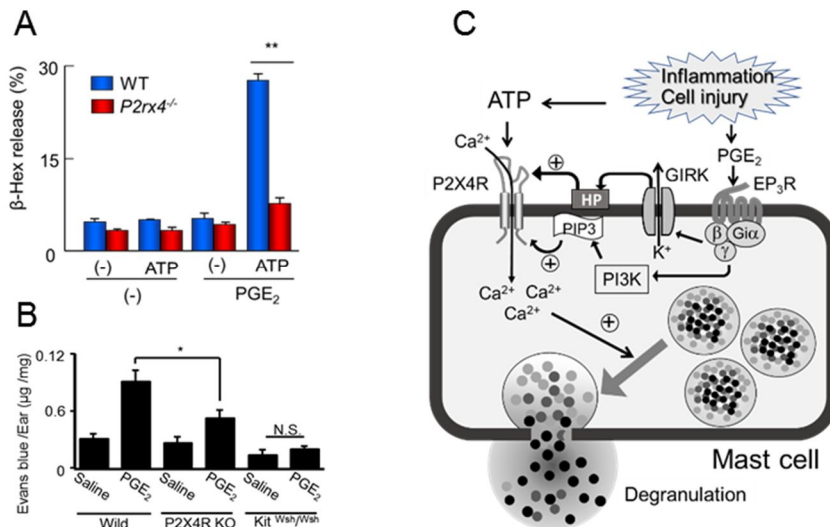


図 2 A, 野生型 (WT) および *P2rx4*^{-/-} マウスから調整した BMMC における ATP と PGE₂ の共刺激による脱顆粒反応。B, WT および *P2rx4*^{-/-} およびマスト細胞を欠乏する *Kit*^{wish/wish} マウスにおける PGE₂ による耳血管透過性反応。C, PGE₂ と ATP による P2X4 受容体刺激による脱顆粒亢進作用のメカニズム (文献 4 より抜粋)。

(3) マスト細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす P2X4 受容体シグナルの役割 (6)

マスト細胞は、細胞内顆粒の放出による急性アレルギー反応を惹起した後、種々の炎症性サイトカインを産生し慢性アレルギー炎症反応の進展にも関与する。そこで、ATP と抗原または PGE₂ の共刺激による炎症性サイトカイン産生を測定した。ATP は単独で炎症性サイトカイン遺伝子発現およびサイトカイン放出を起こさなかったが、PGE₂ および抗原との共刺激により顕著な TNF- α 、IL-6 および IL-13 などの炎症性サイトカイン遺伝子発現を惹起し、その産物のサイトカイン放出も亢進させた (図 3A)。この併用作用は、抗原より PGE₂ との組み合わせのほうが顕著であった。そこで、ATP と PGE₂ の共刺激によるサイトカイン産生亢進の機序を検討した。それぞれの刺激薬は脱顆粒反応の場合と同様に ATP は P2X4 受容体、PGE₂ は EP₃ 受容体を介して作用することが判明した。また、ATP と PGE₂ は単独では炎症性蛋白質の転写因子である NF- κ B の活性化は生じなかったが、併用により著しい NF- κ B の活性化が認められた (図 3B)。この反応は、百日咳毒素処理および細胞内 Ca²⁺キレート薬の BAPTA で抑制され、シグナルとしては G 蛋白質の β サブユニットで活性化される PI3K の阻害薬およびカルシニューリン阻害薬で抑制された。以上の結果から、ATP による P2X4 受容体刺激は PI3K による PIP₃ の蓄積によりチャネル活性が亢進し、Ca²⁺を流入が増大し、カルシニューリンの活性増大を生じ、同時に PI3K の下流で AKT による NF- κ B 経路の刺激を増大させていると考えられた (図 3C)。

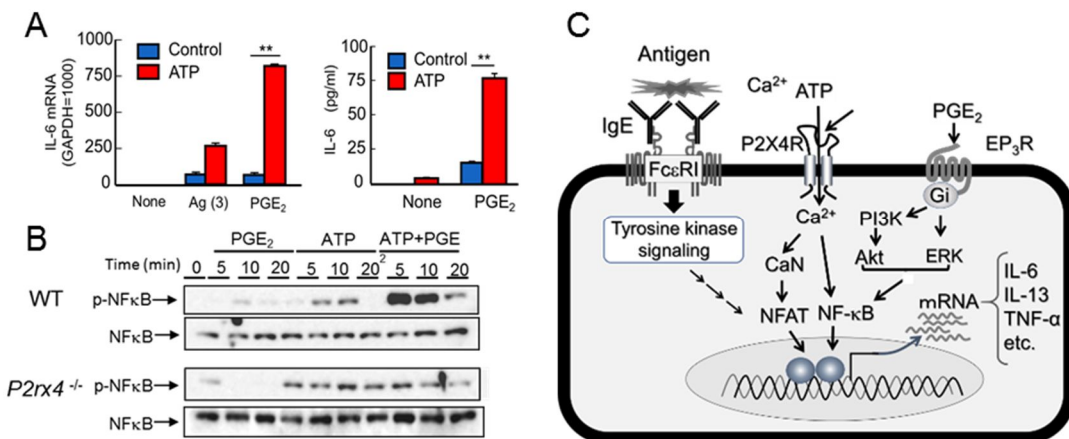


図 3 A, 野生型 (WT) および *P2rx4*^{-/-} マウスから調整した BMMC における抗原および PGE₂ による IL-6 遺伝子発現と分泌に及ぼす ATP の作用。B, WT および *P2rx4*^{-/-} マウスにおける NF- κ B リン酸化に及ぼす PGE₂、ATP およびその共刺激の作用。C, PGE₂ と ATP による P2X4 受容体刺激によるサイトカイン産生亢進のメカニズム (文献 6 より抜粋)。

(4) iPS 細胞および CD34+造血幹細胞からのヒト MC の調製

既報に従い(7)、ヒト iPS 細胞から CD34+造血幹細胞を作成し、さらにマスト細胞へと分化させ、研究資源としてのヒト MC を使用してマウスで認められた P2X4 受容体の機能解析に取り組んだが、文献通りには iPS 細胞から CD34+造血幹細胞を作成が進まなかったため、CD34+造血幹細胞を購入し分化を試みたが、本研究期間中に機能的な MC を得ることができず、この取り組みは今後の課題として残った。

<引用文献>

1. Kuehn HS, Gilfillan AM. G protein-coupled receptors and the modification of Fc RI-mediated mast cell activation. *Immunol Lett* 2007;113:59-69. doi: 10.1016/j.imlet.2007.08.007.
2. Yoshida K, Ito M, Matsuoka I. Divergent regulatory roles of extracellular ATP in the degranulation response of mouse bone marrow-derived mast cells. *Int Immunopharmacol* 2017;43:99-107. doi: 10.1016/j.intimp.2016.12.014.
3. Yoshida K, Ito M, Sato N, Obayashi K, Yamamoto K, Koizumi S, Tanaka S, Furuta K, Matsuoka I. Extracellular ATP augments antigen-induced murine mast cell degranulation and allergic responses via P2X4 receptor activation. *J Immunol* 2020;204:3077-85. doi: 10.4049/jimmunol.1900954.
4. Yoshida K, Tajima M, Nagano T, Obayashi K, Ito M, Yamamoto K, Matsuoka I. Co-stimulation of purinergic P2X4 and prostanoid EP₃ receptors triggers synergistic degranulation in murine mast cells. *Int J Mol Sci* 2019;19: 5157. doi: 10.3390/ijms20205157.
5. Bernier L-P, Ase AR, Chevallier S, Blais D, Zhao Q, Boué-Grabot E, Logothetis D, Séguéla P. Phosphoinositides regulate P2X4 ATP-gated channels through direct interactions. *J Neurosci* 2008; 28: 12938-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3038-08.2008
6. Obayashi K, Yoshida K, Ito M, Mori T, Yamamoto K, Imai T, Matsuoka I. Synergistic cytokine production by ATP and PGE₂ via P2X4 and EP₃ receptors in mouse bone-marrow-derived mast cells. *Cells* 2022;11: 616. doi: 10.3390/cells11040616
7. Igarashi A, Ebihara Y, Kumagai T, Hirai H, Nagata K, Tsuji K. Mast cells derived from human induced pluripotent stem cells are useful for allergen tests. *Allergol Int.* 2018;67:234-242. doi: 10.1016/j.alit.2017.08.008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

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 松岡 功、吉田一貴、伊藤正明	4. 巻 41
2. 論文標題 マスト細胞のP2X4受容体を介したアレルギー反応の増強	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 176 ~ 180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 松岡 功、吉田一貴、伊藤正明	4. 巻 75
2. 論文標題 ATP/P2X4受容体軸によるIgE依存性マスト細胞脱顆粒の増強反応	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 369 ~ 376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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, 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 -

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 -
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 j-
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Masa-aki Ito, Chinatsu Machida, Kazuki Yoshida, Isao Matsuoka
2. 発表標題 Regulation by purinergic signal of glucose-induced insulin secretion from iGL insulinoma 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 Kazuki Yoshida, Yuu Ishida, Masaaki Ito, Isao Matsuoka
2. 発表標題 IL-33 affects the expression of purinergic receptors in 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 伊藤 政明, 中山 睦子, 吉田 一貴, 松岡 功
2. 発表標題 マウス胸部大動脈器官培養による生理活性物質の血管機能に及ぼす影響の解析,
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 大林昂右, 吉田 一貴, 伊藤 政明, 松岡 功,
2. 発表標題 マスト細胞のサイトカイン産出に及ぼす細胞外ATPの作用
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 伊藤 政明, 新井 祥太, 吉田 一貴, 松岡 功
2. 発表標題 P2Y1受容体を介するIL-8産生に対するスタチンの抑制作用
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 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 花岡 美美, 宮本 美希, 福田 康進, 小峯 美香, 丹羽 綾音, 山際 教之, 吉田 一貴, 伊藤 政明, 松岡 功
2. 発表標題 オキサトミド誘導体のヒトP2X7受容体阻害作用
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 小峯美香、花岡芙美、松岡 功、山際教之
2. 発表標題 P2X7受容体阻害作用を有する新規インドール置換型オキサトミド誘導体の設計と合成
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 堤麻香、伊藤政明、松岡功、峯野知子
2. 発表標題 クロメン（ベンゾピラン）骨格を有するP2Y6受容体阻害作用化合物の合成研究
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 BMDC
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 Ito M, Hayashi T, Koyama T, Yoshida K, Matsuoka I
2. 発表標題 Changes of thoracic and mesenteric arterial vascular function in angiotensin II-induced hypertensive mice
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48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究分担者	伊藤 政明 (Ito Masa-aki) (30438759)	高崎健康福祉大学・薬学部・講師 (32305)	
研究分担者	吉田 一貴 (Yoshida Kazuki) (70803154)	高崎健康福祉大学・薬学部・助教 (32305)	

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
---------	---------