

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07040

研究課題名（和文）マスト細胞の脱顆粒応答抑制に関わるGPR35の機能解析

研究課題名（英文）GPR35-mediated suppression of degranulation of mast cells

研究代表者

田中 智之（Tanaka, Satoshi）

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40303846

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）：抗アレルギー薬のひとつであるクロモグリク酸ナトリウムは伝承薬由来であり、その作用機序は不明であった。本研究では、花粉症やアレルギー性喘息において重要な役割を果たすマスト細胞の表面に存在するGPR35という膜タンパク質が、その標的であることを齧歯類において見出した。GPR35を活性化する化合物は、マスト細胞のIgEを介する脱顆粒応答の抑制を介してアレルギー反応を抑制すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロモグリク酸ナトリウムは副作用の頻度の低い抗アレルギー薬として知られるが、一方で消化管吸収が悪いため投与経路が限定されている。本研究を通じて標的分子が明らかになったことにより、消化管吸収が改善された代替薬を開発することができる。また、GPR35はゲノムワイド相関解析により、炎症性腸疾患、2型糖尿病といった慢性炎症性疾患と相関が強いことが報告されており、こうした疾患の新たな治療薬開発の基礎的知見を提供するものでもある。

研究成果の概要（英文）：Sodium cromoglycate, an antiallergic drug, is derived from traditional medicine, and its mechanism of action was unknown. In this study, we found in rodents that GPR35, a membrane protein on the surface of mast cells that plays an important role in cedar pollen allergy and allergic asthma, is the target molecule of sodium cromoglycate. The compounds that could activate GPR35 might suppress allergic reactions by inhibiting the IgE-mediated degranulation of mast cells.

研究分野：薬理学

キーワード：マスト細胞 GPR35 クロモグリク酸ナトリウム 即時型アレルギー 脱顆粒

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

抗アレルギー薬であるクロモグリク酸ナトリウム(DSCG)は長らくその標的分子が不明であったが、発現系を用いたリガンドスクリーニングの過程でオーファン G タンパク質共役型受容体のひとつである GPR35 のアゴニストとしての作用を持つことが明らかとなった。しかしながら、GPR35 のマスト細胞における発現や、それを介した脱顆粒応答の抑制があるのかといった点は明らかではなかった。研究代表者は、予備的な検討により既報の GPR35 アゴニストがいずれもラット腹腔マスト細胞の IgE を介する脱顆粒応答を抑制することを見出した。

GPR35 はヒトのゲノムワイド解析において炎症性腸疾患や 2 型糖尿病との強い相関が報告されているが、薬理学的ツールの開発や受容体分子の生化学的解析が遅れているために、その生理的機能は依然として不明である。また DSCG は副作用の頻度の低い優れた抗アレルギー薬であるが、消化管吸収が悪いために投与経路が限定されている。GPR35 アゴニストの開発はより優れた抗アレルギー薬、および慢性炎症疾患の新たな治療薬の創製につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では GPR35 がマスト細胞の脱顆粒応答を抑制するメカニズム、即時型アレルギーにおける GPR35 アゴニストの治療的作用、および GPR35 分子に関する生化学的解析を実施し、GPR35 を介する抗アレルギー作用の全体像を明らかにすることを目的とする。具体的には、1) GPR35 下流のシグナル伝達機構の解明、2) マスト細胞の IgE を介する脱顆粒応答を抑制する機序の解明、3) マウスの IgE 依存性即時型アレルギーモデルにおける GPR35 アゴニストの抑制効果の評価、をそれぞれ実施する。

## 3. 研究の方法

- GPR35 の種々の三量体型 G タンパク質との共役の解析では、HEK293 細胞を用いた TGF- $\alpha$  shedding assay を用いた。
- GPR35 特異的なアゴニストの創製については、松野研司博士(工学院大学、現安田女子大学)と共同研究を実施し、化合物を得た。
- ラットマスト細胞株 RBL-2H3 には GPR35 が発現していないことから、N-末端にヘマグルチニン(HA)タグ配列を付加したラット GPR35 遺伝子を導入し、構成的発現細胞(RBL-2H3/HA-GPR35)を作出した。
- 加藤伸一博士、斉藤美知子博士(京都薬科大学)によって作出された GPR35 遺伝子欠損マウス(C57BL/6 を遺伝的背景とする)を用いて *in vivo* の評価を実施した。
- モノクローナル IgE を耳介皮膚組織に皮内注で投与し、24 時間後に特異的抗原とエバンスブルーを静脈内投与する即時型アレルギーモデル(IgE 依存性受動皮膚アナフィラキシー、PCA)を用いて 2 型アレルギーにおける GPR35 の機能を評価した。

## 4. 研究成果

TGF- $\alpha$  shedding assay を用いた解析では、ヒト、ラット、マウスの GPR35 は  $G_i$  および  $G_{12/13}$  との共役が認められ、一方で  $G_s$  との共役はほとんど認められなかった。DSCG はヒト、ラット、マウス GPR35 においてアゴニスト活性を示したが、キヌレン酸はヒトではアゴニスト活性が確認できなかった。パモ酸はヒト GPR35 のパーシャルアゴニストであるが、ラット、マウスではアゴニスト活性は確認できなかった。Zaprinast はラット、マウスにおいて高い親和性を示したが、ヒトでは 100 倍程度弱い親和性を示すアゴニストであった。共同研究により供給された新規化合物は、ヒト、ラット、マウス、いずれの GPR35 とも高い親和性で結合した。

ラット GPR35 遺伝子を構成的に発現した RBL-2H3/HA-GPR35 細胞では、対照である RBL-2H3/mock 細胞と比較して、IgE を介する抗原刺激による脱顆粒応答が低下していた。一方で、小胞体の  $Ca^{2+}$ -ATPase 阻害剤である thapsigargin による脱顆粒応答は両細胞株で同程度であった。これらは GPR35 リガンド非存在下での応答であるが、GPR35 の過剰発現によって IgE を介する抗原刺激による脱顆粒応答が抑制されている可能性が考えられた。一方、RBL-2H3/HA-GPR35 細胞では zaprinast や新規 GPR35 アゴニスト処理により IgE を介する脱顆粒応答が抑制されたが、そのレベルは小さいものであった。また、この系においてアゴニスト処理により GPR35 は速やかに内在化することが明らかとなった。

GPR35 の発現は主に組織結合型マスト細胞に分類されるマウスマスト細胞において認められた。マウス骨髓細胞を IL-3 存在下、長期培養して得られる骨髓由来培養マスト細胞ではほとんど認められず、これを stem cell factor 存在下線維芽細胞と共培養して得られる成熟型マスト細胞において発現することがわかった。

GPR35 遺伝子欠損マウスを用いて IgE を介する即時型アレルギー応答について検討したところ、応答自体は野生型マウスとほぼ同程度であった。一方、野生型マウスでは zaprinast や新規ア

ゴニストの前処理により即時型応答が抑制されるのに対して、GPR35 遺伝子欠損マウスでは GPR35 アゴニストによる抑制作用は消失していた。

以上の結果より、GPR35 は DSCG の標的分子であり、マスト細胞の IgE を介する脱顆粒応答に抑制的に機能することが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tiligada Ekaterini, Gibbs Bernhard F., Tanaka Satoshi	4. 巻 71
2. 論文標題 “ Novel insights into the roles of mast cells and basophils ” : Joint Webinar of the Japanese and the European Histamine Research Societies (JHRS/EHRS)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 991 ~ 993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00011-022-01575-1	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 該当する
1. 著者名 Tanaka Satoshi, Van Overveld Frans J.	4. 巻 14
2. 論文標題 Editorial: Novel insights into inflammatory roles of mast cells and basophils	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1186264	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 該当する
1. 著者名 Satoshi Tanaka, Kazuyuki Furuta	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of IgE and histamine in mast cell maturation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10082170	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 Nishimura Kazuhiro, Okamoto Moemi, Shibue Rina, Mizuta Toshio, Shibayama Toru, Yoshino Tetsuhiko, Murakami Teruki, Yamaguchi Masashi, Tanaka Satoshi, Toida Toshihiko, Igarashi Kazuei	4. 巻 15
2. 論文標題 KLF4 is required for suppression of histamine synthesis by polyamines during bone marrow-derived mast cell differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229744	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 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 Masaki Kento, Hiraki Yuhji, Onishi Hiroka, Satoh Yuka, Roche Paul A., Tanaka Satoshi, Furuta Kazuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Ligation of MHC Class II Induces PKC-Dependent Clathrin-Mediated Endocytosis of MHC Class II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9081810	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 該当する

1. 著者名 Tanaka Satoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Phenotypic and Functional Diversity of Mast Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113835	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中智之
2. 発表標題 GPR35を介した脱顆粒応答の抑制
3. 学会等名 第470回ビタミンB研究協議会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

薬理学分野

<https://labo.kyoto-phu.ac.jp/yakuri/index.html>

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		
ドイツ	German Cancer Research Center		