

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17417

研究課題名（和文）細胞外ヌクレオチド受容体に着目したモデル動物を用いたアレルギー新規治療法の検討

研究課題名（英文）Investigation of allergy treatment by inhibition of extracellular nucleotide receptor signaling in mice

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：P2Y6受容体アンタゴニストがアレルギー反応を抑制するか確認した。P2Y6受容体アンタゴニストがヒト好塩基球の活性化を抑制することを研究代表者は報告している。本研究課題で、P2Y6受容体アンタゴニストがマウス好塩基球の活性化を抑制すること、アレルギー反応を軽減できることを明らかにした。また、IgE産生誘導時にP2Y6受容体アンタゴニストを投与することで、Th2系サイトカイン産生とIgE産生が低下した。P2Y6受容体アンタゴニストは、アレルギー反応誘発抑制だけでなくIgE産生を減弱できるため、アレルギー疾患の根本的治療に有用である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの日本国民は、何らかの型アレルギー疾患に罹患している。現時点で唯一の型アレルギー疾患の根本的治療法としてアレルギー免疫療法があるが、使用できるアレルギーが限定されているなど課題が残されている。型アレルギー疾患は、患者のQOLを低下させており、根本的治療法の確立は急務の課題である。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、好塩基球の活性化制御はアレルギー反応の抑制につながると考えられる。本研究課題の成果は、アレルギー疾患の新規治療法の開発につながると考える。

研究成果の概要（英文）：We confirmed whether P2Y6 receptor antagonists suppress allergic reactions in mice. P2Y6 receptor antagonist inhibited IgE-dependent activation of mouse basophils. P2Y6 receptor antagonists attenuated the decrease in rectal temperature caused by systemic allergic reaction in allergy model mice. P2Y6 receptor antagonists reduced IgE production and Th2 cytokine production. P2Y6 receptor antagonists are thought to attenuate allergic reactions by suppressing IgE-dependent activation of basophils and decreasing IgE production.

研究分野：免疫学

キーワード：細胞外ヌクレオチド受容体 アレルギー反応

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。型アレルギー疾患では、浮腫や発赤等の局所症状、全身性症状のアナフィラキシー反応などが誘発され症状、発症部位や重症度などが極めて複雑である。また、免疫系の過剰反応により誘発される型アレルギー反応では、好塩基球、肥満細胞、B細胞やTh2細胞など多くの免疫細胞が関与することもあり、根本的な治療法が確立されていない(が確立されていない要因の一つである)。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疾患の治療に繋がると考え、細胞外ヌクレオチドとその受容体に着目しアレルギー疾患治療法を検討している。

2. 研究の目的

本研究では、P2Y6受容体のアンタゴニストであるMRS2578による好塩基球活性化抑制が生体内でも効果を示すか確認することを目的とした。これまでに研究代表者は、MRS2578が好塩基球のIgE依存的活性化を抑制することをin vitroで明らかにした。活性化好塩基球は、ヒスタミンなどを放出しアレルギー反応を誘発する。また、Th2系サイトカインを放出しIgE産生に関与する。本研究期間内に、アレルギーモデルマウスにMRS2578を投与することでアレルギー反応やIgE産生が抑制されるか確認した。

3. 研究の方法

(1) マウス好塩基球のP2Y6受容体発現の確認

BALB/cマウスの好塩基球におけるP2Y6受容体の発現と活性化への影響は不明である。マウス末梢血好塩基球(CD200R+, CD49b+, IgE+細胞)のP2Y6受容体の発現をフローサイトメトリー法で確認した。BALB/cマウスの末梢血中のCD200R+, CD49b+, IgE+細胞の抗P2Y6受容体抗体とアイソタイプコントロール抗体に標識されている蛍光色素の平均蛍光強度(MFI)をフローサイトメトリー法で測定した。

本課題の動物実験は、弘前大学動物実験委員会の承認を得て、弘前大学動物実験規定を巡視し行った。

(2) マウス好塩基球のIgE依存的活性化に対するMRS2578の影響の確認

MRS2578を投与したマウスの好塩基球で好塩基球活性化試験を行い、好塩基球活性化に対するMRS2578の影響を確認した。対照としてDMSOを投与したマウスの好塩基球を用いた。マウス末梢血好塩基球(CD49b+, IgE+細胞)をIgE依存的に活性化させ、好塩基球の細胞表面活性化マーカーであるCD200Rの発現量をフローサイトメトリー法で測定した。MRS2578およびDMSO投与群の好塩基球を活性化刺激した後、抗CD200R抗体で染色し、抗体に標識された蛍光色素のMFIを測定した。

(3) MRS2578によるアレルギー反応抑制の確認

BALB/cマウスにTNP特異的IgE抗体を投与したアレルギーモデルマウスを用いて、MRS2578がアレルギー反応を抑制するか確認した。アレルギーモデルマウスにMRS2578を尾静脈から投与し、2日後TNP-OVAを尾静脈から投与することでアレルギー反応を誘発させた。全身性アレルギー反応により体温が低下するため、直腸温度を測定することでMRS2578投与によるアレルギー反応への影響を確認した。対照としてMRS2578の代わりにDMSOを投与し、MRS2578投与時と同様の実験を行った。

(4) In vitroでのMRS2578によるIgE産生抑制の確認

テープストリッピングによりOVAを経皮感作しIgE産生を誘導したBALB/cマウスを用いた。脾細胞によるIgE産生に対し、MRS2578が影響をおよぼすか確認した。OVAを経皮感作したBALB/cマウスの脾細胞をMRS2578存在下で培養し、培養上清中のIgEを測定した。併せてMRS2578存在下で培養している脾細胞を抗CD3/CD28抗体で刺激し、培養上清中のTh2系サイトカイン(IL-4, IL-13)を測定した。培養上清中のIgEおよびTh2系サイトカインはELISA法で測定した。対照として脾細胞をDMSO存在下で培養し、MRS2578添加時と同様の実験を行った。

(5) In vivoでのMRS2578によるIgE産生抑制の確認

MRS2578投与によるIgE産生への影響を、OVAを経皮感作したBALB/cマウスを用いて確認した。経皮感作期間にMRS2578を尾静脈投与したBALB/cマウスの血液中のIgEを測定した。併せて脾細胞を抗CD3/CD28抗体と培養し、培養上清中のTh2系サイトカイン(IL-4, IL-13)を測定

した。培養上清中の IgE および Th2 系サイトカインは ELISA 法で測定した。対照として MRS2578 の代わりに DMSO を投与し、MRS2578 投与時と同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) マウス好塩基球の P2Y6 受容体発現

BALB/c マウスの末梢血好塩基球 (CD200R+, CD49b+, IgE+細胞) における P2Y6 受容体の発現を確認した。抗 P2Y6 受容体抗体またはアイソタイプコントロール抗体で CD200R+, CD49b+, IgE+細胞を染色し、平均蛍光強度 (MFI) をフローサイトメトリー法で測定した。

CD200R+, CD49b+, IgE+細胞の抗 P2Y6 受容体抗体の MFI (18.9 ± 1.9) は、アイソタイプコントロール抗体の MFI (7.8 ± 1.4) に対し有意に高く、BALB/c マウスの CD200R+, CD49b+, IgE+細胞で P2Y6 受容体が発現していることが示唆された。

(2) MRS2578 によるマウス好塩基球の活性化抑制

MRS2578 投与マウスと DMSO 投与マウスの末梢血を用いて好塩基球活性化試験を行い、好塩基球 (CD49b+, IgE+細胞) の活性化に対する MRS2578 の影響を確認した。

DMSO 投与マウスおよび MRS2578 投与マウスの CD49b+, IgE+細胞の抗 CD200R 抗体の MFI は、無刺激時に対し TNP-OVA 刺激時に有意な上昇が確認された。

TNP-OVA 刺激後の抗 CD200R 抗体の MFI は、DMSO 投与マウスの CD49b+, IgE+細胞と比較し、MRS2578 投与マウスの CD49b+, IgE+細胞で有意に低下した (図 1)。

マウス好塩基球は MRS2578 により活性化が抑制されることが示唆された。

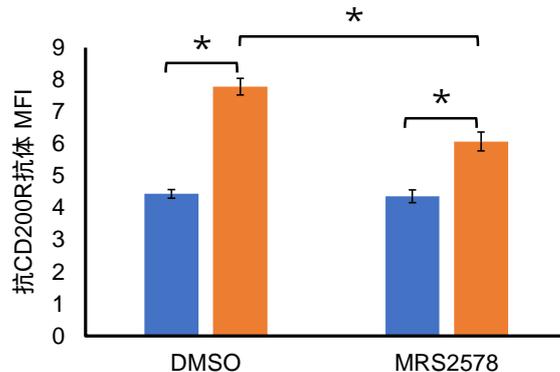


図 1. 好塩基球活性化に対する MRS2578 の影響

無刺激時のデータは青色、TNP-OVA 刺激時のデータはオレンジで示した。* $p < 0.01$

(3) MRS2578 投与によるアレルギー症状の緩和

全身性アレルギー反応で体温が低下する。アレルギー反応誘発後の直腸温度を測定し、全身性アレルギー反応誘発に対する MRS2578 の影響を確認した。

全身性アレルギー反応誘発時の直腸温度の変化は、DMSO 投与マウスで誘発後 25 分がピークで 3.06 ± 0.31 の低下が見られた。MRS2578 投与マウスでは同じく誘発後 25 分がピークで 1.88 ± 0.41 の直腸温度の低下が見られた。MRS2578 投与マウスの体温低下は DMSO 投与マウスの体温低下に対し、全身性アレルギー反応誘発 10 分後から 55 分後まで有意に軽減された。

MRS2578 は生体内で好塩基球の活性化を抑制し、アレルギー反応を減弱したと考えられる。

(4) MRS2578 による IgE 産生低下

MRS2578 の IgE 産生に対する影響を in vitro および in vivo で確認した。

In vitro では、IgE 産生を誘導したマウスの脾細胞を MRS2578 および DMSO と培養し、MRS2578 の IgE 産生に対する影響を確認した。培養上清中の IgE 濃度は DMSO 添加で 2.3 ± 0.2 ng/mL、0.01 μ M MRS2578 添加で 2.4 ± 0.3 ng/mL、0.1 μ M MRS2578 添加で 2.1 ± 0.2 ng/mL、1 μ M MRS2578 添加で 2.2 ± 0.2 ng/mL、10 μ M MRS2578 添加で 2.6 ± 0.3 ng/mL で、統計学的有意差は確認されなかった。

In vivo では、経皮感作時に MRS2578 または DMSO を投与した。血液中の IgE 濃度は DMSO 投与群で 468.4 ± 68.4 ng/mL、MRS2578 投与群で 385.6 ± 41.8 ng/mL であり、統計学的有意差はないが MRS2578 投与で IgE 産生に抑制傾向が見られた (図 2)。

MRS2578 は、B 細胞の IgE 産生に直接作用するのではなく、間接的に作用することで IgE 産生を低下させると考えられた。

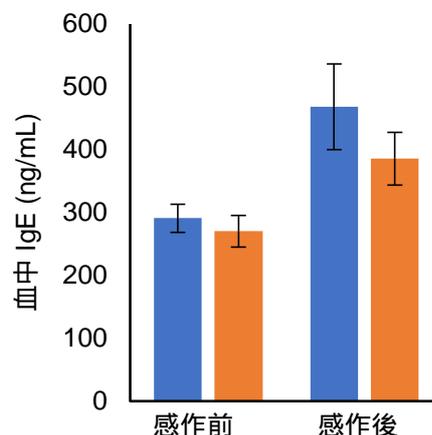


図 2. 生体内の IgE 産生に対する MRS2578 の影響

DMSO 投与群のデータを青色、MRS2578 投与群のデータをオレンジで示した。

(5) MRS2578 による Th2 サイトカイン (IL-4, IL-13) 産生低下

IgE 産生に Th2 系サイトカインは必要である。Th2 系サイトカインは Th2 細胞や好塩基球が産生しており、IgE 産生には Th2 細胞由来の Th2 サイトカインが関与していると考えられている。MRS2578 の Th2 サイトカイン産生に対する影響を *in vitro* および *in vivo* で確認した。

In vitro の検討では、IgE 産生を誘導したマウスの脾細胞を MRS2578 と培養し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激した。対照として脾細胞を DMSO と培養し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激した。培養上清中の IL-4 および IL-13 を ELISA 法で測定したところ、IL-4 濃度は DMSO 添加で 180.8 ± 28.3 pg/mL、MRS2578 添加で 132.9 ± 33.3 pg/mL であり、MRS2578 添加により IL-4 産生が有意に抑制された (図 3A)。培養上清中の IL-13 濃度は、DMSO および MRS2578 添加で統計学的有意差は確認されなかった (図 3B)。

In vivo の検討では、経皮感作時に MRS2578 および DMSO を投与したマウスの脾細胞を培養し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激した。培養上清中の IL-4 および IL-13 を ELISA 法で測定したところ、IL-13 濃度は DMSO 投与群で 1221.8 ± 218.9 pg/mL、MRS2578 投与群で 649.4 ± 139.6 pg/mL であり、MRS2578 添加により IL-13 産生が有意に抑制された (図 3D)。培養上清中の IL-4 濃度は、DMSO および MRS2578 添加で統計学的有意差は確認されなかった (図 3C)。

Th2 サイトカインの IL-4 は、B 細胞による産生抗体のクラスを IgG 抗体や IgM 抗体から IgE へ変更させるクラススイッチに作用する。IL-13 は、B 細胞による IgE 産生を促進する。MRS2578 は Th2 サイトカイン産生に影響することで IgE 産生に関与することが示唆された。しかしながら、MRS2578 の作用が *in vitro* と *in vivo* で異なり、作用機序など今後さらなる検討が必要である。

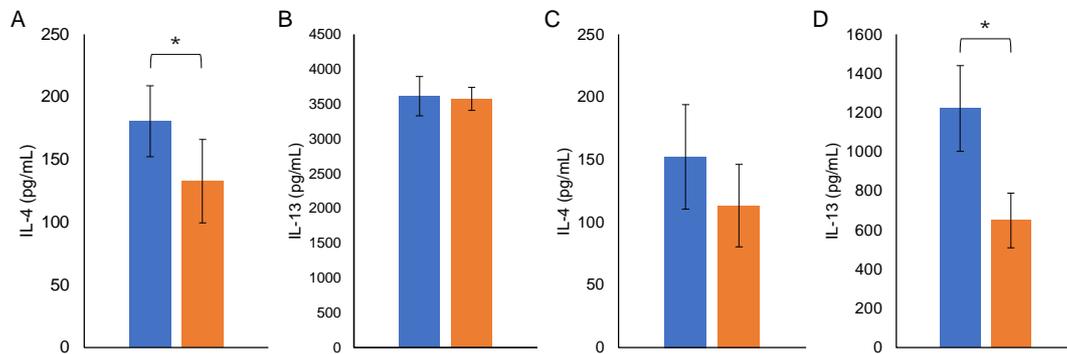


図 3. Th2 系サイトカイン産生に対する MRS2578 の影響

脾細胞を抗 CD3/CD28 で刺激し、IL-4(A, C)と IL-13(B, D)産生に対する MRS2578 の影響を *in vitro*(A, B)と *in vivo*(C, D)で確認した。DMSO 群のデータを青色、MRS2578 群のデータをオレンジで示した。* $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Manabu Nakano, Hideki Takami, Kyoko Ito, Koichi Ito
2. 発表標題 P2Y6 receptor signal by the UDP stimulation increases cAMP and IP1 in human basophils.
3. 学会等名 JSA/WAO Joint Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Manabu Nakano
2. 発表標題 Confirmation of the inhibitory effect of P2Y6 receptor antagonist on allergic reaction
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------