

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06577

研究課題名（和文）マスト細胞機能における小胞体ストレスの役割解明と新規アレルギー治療標的の探索

研究課題名（英文）The role of ER stress proteins for mast cell functions

研究代表者

小澤 孝一郎 (Koichiro, Ozawa)

広島大学・医系科学研究科（薬）・教授

研究者番号：10211822

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）：即時型アレルギーを罹患する患者は、国内外で増加傾向である。しかしながら、即時型アレルギーの治療に用いられる薬物は、マスト細胞から放出されるヒスタミン等のアレルギー誘発物質が各々の受容体に結合する段階をブロックする物質が大部分を占めており、それらだけでは効果が不十分な場合が多い。小胞体はマスト細胞・好塩基球の活性化に重要であるが、小胞体ストレスセンサタンパクとマスト細胞・好塩基球の機能との関係については不明な点が多い。そこで本研究では、マスト細胞・好塩基球の活性化における小胞体ストレスタンパクの関係を明らかにし、マスト細胞・好塩基球の活性化を抑制する新規アレルギー治療薬の開発につなげる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

即時型アレルギーを罹患する患者は国内外で増加傾向であるが、既存の治療薬では不十分であることが多いため、新しい抗アレルギー薬の開発が求められている。本研究ではマスト細胞・好塩基球における小胞体ストレスセンサタンパクの役割を解明することで、従来と異なる物質を標的とする新しいアレルギー治療薬の開発に貢献する。

研究成果の概要（英文）：The number of patients suffering from immediate-type allergies is increasing in the world. However, the effects of conventional drugs of immediate-type allergies, such as H1 anti-histamine, are insufficient. The endoplasmic reticulum is an important intracellular organ for the activation of mast cells and basophils. However, the relationship between endoplasmic reticulum stress sensor proteins and the functions of mast cells and basophils has been unclear. Therefore, we here investigated the role of between endoplasmic reticulum stress proteins in the activation of mast cells and basophils.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：小胞体ストレス アレルギー マスト細胞

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蕁麻疹、花粉症、喘息や食物アレルギーに代表される即時型アレルギーを罹患する患者は、国内外で増加傾向にあり、重大な社会問題となっている。しかしながら、即時型アレルギーの治療に用いられる薬物は、マスト細胞から放出されるヒスタミン等のアレルギー誘発物質が各々の受容体に結合する段階をブロックする物質(H₁ブロッカー等)が大部分を占めており、それらだけでは効果が不十分な場合が多い。近年、マスト細胞の活性化を抑制する薬物として、血液中のIgE抗体量を減らすことを目的とした抗IgE抗体(オマリズマブ)が開発され、重度の慢性蕁麻疹や喘息治療に用いられるようになってきた。

しかしながら、オマリズマブは抗体製剤であるため非常に高額であり、また、使用を停止するとアレルギー症状が再発する等の問題がある。そのため、より安価で、効果の高い抗アレルギー薬の開発が求められている。マスト細胞は高親和性IgE受容体(FcR)が発現しており、血液中のIgE抗体が結合した状態でアレルゲンを待ち構えている。IgE抗体にアレルゲン(抗原)が結合すると、IgE受容体が架橋され、細胞内に活性化シグナルが伝達される(抗原-IgE抗体刺激)。その結果、複数の細胞内シグナル伝達カスケードが駆動される。その一部である細胞内Ca²⁺の上昇は、小胞体からのカルシウムイオン(Ca²⁺)放出と、それに次ぐ細胞外からのCa²⁺流入(CRACの働き)により行われ、カルシウム依存性Protein kinase C (cPKC)やカルモジュリン等の活性化を介して、ヒスタミンを含む細胞内顆粒の放出(脱顆粒)や脂質メディエータ・炎症性サイトカインの産生・放出が誘導され、アレルギー症状が惹起される(図1)。小胞体ストレスは、細胞内外からの様々なストレスにより小胞体内腔に高次構造の異常(折りたたみ不全)なタンパク質が蓄積することを示す。このような状態を、小胞体膜に発現するIRE1、PERK、ATF6等の小胞体ストレスセンサータンパクが感知すると、小胞体ストレス応答が作動し、ストレスからの回避をはかろうとするが、ストレスが重度かつ持続的であればアポトーシスが誘発される(図2)。近年、小胞体ストレスとアルツハイマー病や糖尿病を含む様々な疾患との関連性について多くの研究成果が報告されているが、アレルギー疾患と小胞体ストレスの関係についての知見は少ない。

図1

小胞体ストレス関連分子を標的とした新しい抗アレルギー薬の開発

小胞体ストレス(Tm等)負荷によるマスト細胞活性化への影響を解明

マスト細胞活性化による小胞体ストレスセンサータンパク質の応答解析

小胞体ストレス応答分子によるマスト細胞機能の制御機序の解明

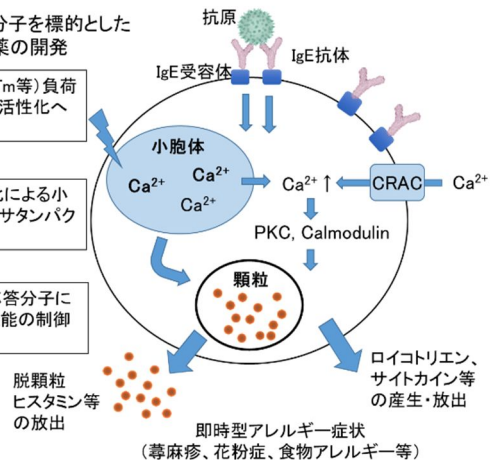
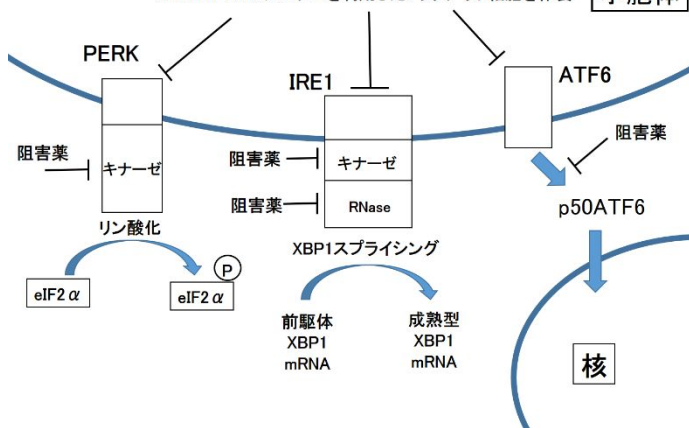


図2

小胞体ストレスセンサータンパク質

CRISPR-Cas9システムを利用したノックアウト細胞を作製



2. 研究の目的

マスト細胞からのアレルギー誘発物質の放出には、小胞体から放出されるCa²⁺が極めて重要であるため、小胞体ストレスとマスト細胞活性化の間には密接な関係があると予想されるが、その点に着目した先行研究は無い。そこで本研究では、即時型アレルギーの原因細胞であるマスト細胞の機能と小胞体ストレスの関係を明らかにすることで、より詳細なマスト細胞活性化機序を解明するとともに、小胞体ストレス関連物質を標的とした新規抗アレルギー薬の開発に繋げる。

3. 研究の方法

本研究では以下の3課題について検討を行った。

マスト細胞モデルであるRBL-2H3細胞(ラット好塩基性白血病細胞株)の脱顆粒に対するストレスセンサータンパク阻害薬の影響

RBL-2H3細胞を活性化した際のIRE1の活性化

RBL-2H3細胞の機能におけるIRE1ノックアウトの影響

マスト細胞モデルとして、RBL-2H3を使用した。IgE受容体を介したRBL-2H3マスト細胞の活

活性化は、前日に RBL-2H3 細胞に anti-DNP-IgE を感作させ、実験当日に抗原 (Ag: DNP-HSA) を加えて行った。脱顆粒は、ヒスタミンと同様の挙動を示す β -hexosaminidase の放出量から計測した。IRE1 の活性化は、XBP1 のスプライシング活性で評価した。

4. 研究成果

RBL-2H3 細胞の脱顆粒に対するストレスセンサタンパク阻害薬の影響

まず、マスト細胞モデルである RBL-2H3 細胞の IgE 受容体を介した活性化 (脱顆粒反応) に対するストレスセンサ阻害薬の影響について検討した。その結果、PERK 阻害薬と ATF 阻害薬を前処理した後に IgE 受容体を介した刺激を行っても、RBL-2H3 の脱顆粒はほとんど抑制効果が見られなかった。一方で、一部の IRE1 阻害薬 (APY29 等) は特に高濃度で IgE 受容体を介した RBL-2H3 の脱顆粒を抑制する傾向が見られた。また、IRE1 阻害薬である 4u8c がマスト細胞の脱顆粒を抑制するという報告もある。これらの薬理的検討による結果から、マスト細胞の活性化における IRE1 の役割については明確ではないが、マスト細胞の機能に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

RBL-2H3 細胞を活性化した際の IRE1 の活性化

次に、RBL-2H3 細胞を活性化した際に IRE1 の活性化が起こるかを、XBP1 スプライシング活性により検討した。その結果、IgE 受容体を介した刺激では、60 分以内に XBP1 のスプライシングが検出された。一方、小胞体内のカルシウムを枯渇させて脱顆粒反応を引き起こす thapsigargin (TG) は、数分以内に XBP1 のスプライシングが検出された。以上の結果から、マスト細胞刺激時にはストレスセンサタンパクである IRE1 の活性化が引き起こされていることが示された。

RBL-2H3 細胞の機能における IRE1 ノックアウトの影響

これまでの結果から、IRE1 とマスト細胞の活性化には何らかの関係があると考えられたが、阻害薬を用いた検討を行っていたため、その詳細は明らかでなかった。そこで、IRE1 ノックアウト RBL-2H3 細胞を作製し、以下の検討を行った。IRE1 ノックアウト細胞は Crisper-cas9 を利用して Exon2 を欠損することで作製した (KO1、KO2)。IRE1 をノックダウンしていない RBL-2H3 細胞は WT1 とした。次に IRE1 の発現が消失しているかウェスタンブロット法により検討した。その結果、IRE1 ノックアウト細胞では IRE1 の発現が認められなかった。また、IgE 受容体を介した刺激においても XBP1 スプライシングは抑制されていた。本結果から、KO1、KO2 細胞では、XBP1 スプライシングに対する代替機構が働いていないことが示された。そのため、以降の実験ではこれらの細胞を IRE1 ノックアウト細胞として使用した。まず、ノックアウト細胞と非ノックアウト細胞間で細胞増殖に違いがあるか検討した。その結果、IRE1 ノックアウトは RBL-2H3 細胞の増殖・生存には影響しないことが示された。次に IgE 受容体を介した刺激による IRE1 ノックアウトの影響について検討した。その結果、IRE1 ノックアウト細胞においても IgE 受容体を介した脱顆粒はほとんど抑制されなかった (図 3)。次にロイコトリエン (LTC4)・サイトカイン (TNF

) の産生・放出における IRE1 ノックアウトの影響について検討したところ、これらの反応においてもほとんど影響は見られなかった。以上の結果より、マスト細胞の活性化において、IRE1 は、マスト細胞を刺激した際に活性化されるものの、脱顆粒反応、脂質メディエータ、サイトカインの産生・放出にはあまり重要な働きをしていない可能性が示された。

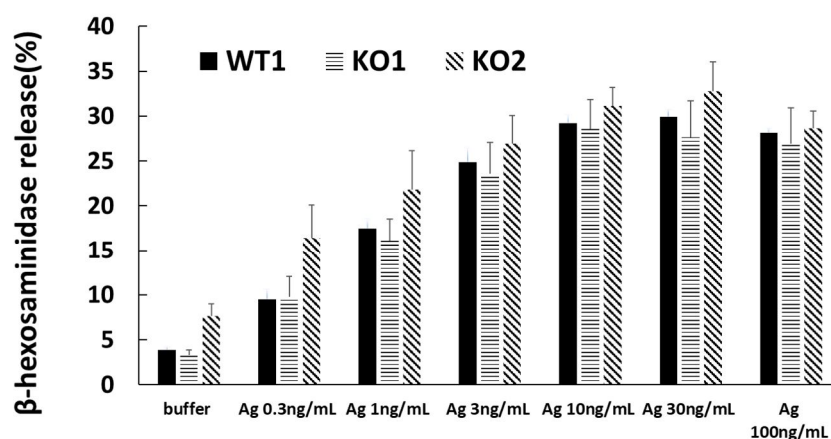


図3 RBL-2H3細胞を抗原刺激した際のIRE1ノックアウトの影響

今後、IRE1 に加えて、PERK、ATF6 の働きについてもより詳細な検討を行うことで、小胞体ストレスセンサタンパクとマスト細胞機能の詳細な関係を明らかにし、マスト細胞の機能を効果的に抑制できる新しいアレルギー治療薬標的の開発に繋がるものと期待する。

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 0件）

1. 発表者名 岡本花乃、松嶋剛志、中川直、細井徹、柳瀬雄輝、吉井美智子、小澤孝一郎
2. 発表標題 IgE受容体を介したマスト細胞活性化におけるIRE1 の役割解明
3. 学会等名 第62回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松嶋 剛志、岡本 花乃、松井 優里、梅田 渚、中川 直、柳瀬 雄輝、細井 徹、吉井 美智子、小澤 孝一郎
2. 発表標題 マスト細胞の活性化におけるIRE1 の役割解明
3. 学会等名 日本薬学会144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松嶋剛志、梅田渚、垣本真衣、柳瀬雄輝、細井徹、小澤光一郎
2. 発表標題 マスト細胞の脱顆粒に対するAPY29の効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
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
研究分担者	細井 徹 (Hosoi Toru) (40379889)	山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授 (25503)	

6. 研究組織（つづき）

	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	柳瀬 雄輝 (Yanase Yuhki) (40452586)	広島大学・医系科学研究科(薬)・准教授 (15401)	

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