

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09920

研究課題名(和文) ドーパミンD2受容体活性化による好中球性炎症抑制の解析

研究課題名(英文) Inhibitory mechanisms of neutrophilic inflammation induced by the activation of dopamine D2 receptor

研究代表者

高木 理英 (Takagi, Rie)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：00569080

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)：ドーパミンが抗原提示相に作用すると未熟CD4+T細胞から寄生虫感染防御のためのTh2と、細胞外細菌進入防御のためのTh17を誘導しアレルギー疾患や好中球性炎症(自己免疫病を含む)を発症させる。その経路に作用するドーパミンD1様受容体(D1R)の拮抗薬はTh2応答およびTh17応答を抑制し好中球性炎症の病態を改善させる。ドーパミンD1R拮抗薬はドーパミンD2様受容体(D2R)の相対的な活性化を誘導するため、ドーパミンD2Rの活性化がその改善に関与していることが示唆されるがその詳細は不明であった。本研究ではドーパミンD2Rに焦点を当てドーパミンD2Rの活性化による好中球性炎症抑制機構を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

好中球性炎症を主体とする疾患は多く、自己免疫性好中球性炎症(多発性硬化症、1型糖尿病、自己免疫性腎炎)、非自己免疫性好中球性炎症(歯周病、化膿性アトピー性皮膚炎、好中球性気道炎症、子宮内膜症、副鼻腔炎、ニキビ)などに大別される。好酸球性炎症の特効薬として副腎皮質ステロイドがある一方で好中球性炎症に対する安価な特効薬は未だに知られていない。本研究では好中球性炎症モデルとして、歯周病のラットモデルを扱った。歯周病はヒトにおける感染症の中で最も有病率が高く脳梗塞や心筋梗塞に加え認知症などの発症リスクを上昇させる。その効果的な予防薬・治療薬の開発に研究成果を繋げる事に社会的意義を見出した。

研究成果の概要(英文)：When dopamine acts on antigen presentation, it induces Th2, from immature CD4+ T cells, which protects against parasitic infection, and Th17, which protects against extracellular bacterial invasion, leading to the development of allergic diseases and neutrophilic inflammation (including autoimmune diseases). Dopamine D1-like receptor (D1R) antagonists act on this pathway to suppress Th2 and Th17 responses and improve the pathology of neutrophilic inflammation. Since dopamine D1R antagonists induce relative activation of dopamine D2-like receptors (D2R), it has been suggested that activation of dopamine D2R is involved in the improvement, but the details remain unknown. In this study, we focused on dopamine D2R and analyzed the mechanism for the suppression of neutrophilic inflammation by dopamine D2R activation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ドーパミン(DA, dopamine) 好中球性炎症 ドーパミンD1様受容体 ドーパミンD2様受容体 Th17

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質の一つであるドーパミン (DA, dopamine) が抗原提示相に作用すると、未熟 CD4<sup>+</sup>T 細胞から寄生虫感染防御のための T-helper (Th) 2 と細胞外細菌進入防御のための Th17 を誘導することは研究者らの過去の研究より明らかにしてきたが、さらに不適切な Th2 応答、および Th17 応答は、それぞれアレルギー疾患や好中球性炎症 (自己免疫病を含む) の発症を誘導する。その経路に対して、ドーパミン D1 様受容体の拮抗薬である SCH23390 が Th2 応答および Th17 応答を抑制し様々な好中球性炎症の病態を改善させることもモデルマウスを用いた過去の研究により明らかにしてきた。ドーパミン D1 様受容体拮抗薬はドーパミン D2 様受容体の相対的な活性化を誘導するため、ドーパミン D2 様受容体の活性化がこれらの改善に関与していることが示唆されるが、その詳細は不明である。そこで本研究では、3 種類のドーパミン D2 様受容体 (D2, D3, D4) の中でも特にドーパミン D2 受容体に焦点を当てドーパミン D2 受容体の活性化による好中球性炎症抑制機構を解析する事とした。

### 2. 研究の目的

神経伝達物質も多岐にわたるが、本研究では特に D2 様受容体 (D2, D3, D4) の中からドーパミン D2 受容体に着目した。ドーパミン D2 受容体の活性化による抑制効果は既に発表されている数本の論文でも示唆されているが、その分子機構は全く未知である。この機構の解明は学術的に非常に独自性が高く、この解析結果を基にしてドーパミン D2 受容体活性化機構を標的とした新規の好中球性炎症抑制法に関する知見が得られる事により新規の抑制剤の開発にも繋がること期待されることから、その活性化による Th17 に起因した好中球性炎症を抑制するメカニズムについて研究する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) ドーパミン D2 受容体シグナルによるサイトカイン抑制メカニズムの解析

我々のこれまでの解析で、タンニン酸 (TA, Tannic acid) にドーパミン D2 受容体作動薬としての活性があり、この作用は、タンニン酸に特徴的なガロイル基 (Galloyl residue) によるものであることが想定された。このことから、まず、ドーパミン D2 受容体シグナルによるサイトカイン抑制を解析するために、TA のドーパミン D2 受容体作動薬としての活性を有する部位の決定を行った。そのために、Galloyl residue を有する、漢方薬としても用いられる種々の天然化合物ポリフェノールであるフラボノイドを用意し、その活性を解析した。そのために、Galloyl residue を含まない、カテキン ((-)-Catechin)、エピカテキン ((-)-Epicatechin) を準備するとともに、Galloyl residue を含む、没食子酸 (Gallic acid)、エピカテキンガレート ((-)-Epicatechin gallate)、エピガロカテキン ((-)-Epigallocatechin)、エピガロカテキンガレート ((-)-Epigallocatechin gallate) を用意した。まず、Gallic acid、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートのドーパミン D2 受容体作動薬としての活性を解析した。そして、その活性とサイトカイン抑制との関連を解析するために、マウス脾臓細胞と、上記 6 種類のフラボノイドを反応させた後、Lipopolysaccharide (LPS) を作用させて 24 時間培養し、培養上清を回収した後、培養上清に含まれるサイトカイン量を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で解析した。

#### 2) ドーパミン D2 様受容体シグナルによる抗原提示細胞の Th17 抑制機構の解析

抗原提示細胞による Th17 の活性化がドーパミン D2 受容体アゴニスト活性によって抑制されることを示すために、健康人ボランティアから採血したヘパリン含有静脈血より、Ficoll-Plaque 法を用いて抹消血単核球 (PBMC, Peripheral blood mononuclear cells) を分離し、10% ヒト血清、L-グルタミン (2 mM)、ストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml)、ペニシリン (100 U/ml) 含有 RPMI1640 培養液に浮遊した。これを用いて、カンジダ抗原 (15  $\mu$ g/ml) 存在下にドーパミン D2 受容体作動薬である、ロピニロールを 3 濃度 (100x $C_{max}$ , 10x $C_{max}$ , 1x $C_{max}$ ) と 5% CO<sub>2</sub> 飽和水蒸気圧のもと、96 穴平底プレートを用いて PBMC  $1.5 \times 10^5$  個/well で共培養した。培養後 7 日目の上清を回収し、ELISA キットを用いてヒト IL-17A を定量した。PBMC 中には樹状細胞などの抗原提示細胞が含まれているため、これらの抗原提示細胞がカンジダ抗原に反応することで、関節的に獲得免疫応答として、Th17 などのヘルパー T 細胞が活性化し、活性化 Th17 細胞からの IL-17A 産生が誘導されることが期待される。ドーパミン D2 受容体作動薬によるロピニロールが抗原提示細胞および Th17 細胞に作用して、Th17 の活性化が抑制されれば Th17 細胞からの IL-17A 産生が抑制されることが期待された。

### 3) イムノシナプスにおけるドーパミン D2 受容体の機能解析

免疫細胞においてドーパミンD2受容体が機能的に働いていることを示すためにまず、蛍光抗体を用いた蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーを用いてCD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞および抗原提示細胞でドーパミンD2受容体が発現していることを解析した。そして、CD4<sup>+</sup>ヘルパーT細胞と抗原提示細胞を混合してイムノシナプスを形成させ、蛍光抗体を用いた蛍光顕微鏡観察でイムノシナプス内にドーパミンD2受容体が局在していることを解析した。

### 4) ドーパミンD2受容体アゴニストによる歯周病に対する効能解析

2)の解析結果からは、ドーパミン D2 受容体作動薬は、抗原提示細胞および Th17 細胞に作用して、IL-17A 産生を抑制し、その結果、好中球性炎症が抑制されることが期待される。歯周病は好中球性炎症を主体としていることから、ドーパミン D2 受容体作動薬を投与することで好中球性炎症が抑制され、その結果、歯周病の病態が改善することが期待される。このことを解析するために、Carrageenan 誘導ラット歯周病モデル、および、Carrageenan を作用させたマウス歯肉上皮細胞株である GE1 細胞を用いて、ドーパミン D2 受容体アゴニストによる歯周病に対する効能解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) ドーパミン D2 受容体シグナルによる炎症性サイトカイン抑制メカニズムの解析

ドーパミン D2 受容体シグナルによる炎症性サイトカイン抑制メカニズムを解析するため、没食子酸 (Gallic acid)、エピカテキンガレート、エピガロカテキンガレートのドーパミン D2 受容体作動薬としての活性を解析した。細胞内 cAMP の下落を指標にドーパミン D2 受容体作動薬としての活性を評価した結果、期待した通り、Gallic acid、エピカテキンガレート、および、エピガロカテキンガレートのいずれもドーパミン D2 受容体作動薬としての活性を示すことを明らかにした (Curr. Trends Immunol., 2021)。これらのフラボノイドに共通の構造はガロイル基 (Galloyl residue) であることから、ドーパミン D2 受容体作動薬としての活性は、Galloyl residue に由来することが示唆された (Curr. Trends Immunol., 2021)。そして、その活性とサイトカイン抑制との関連を解析するために、マウス脾臓細胞と、タンニン酸 (TA, Tannic acid)、カテキン (C, (-)-Catechin)、エピカテキン (EC, (-)-Epicatechin)、没食子酸 (GA, Gallic acid)、エピカテキンガレート (ECG, (-)-Epicatechin gallate)、エピガロカテキン (EGC, (-)-Epigallocatechin)、および、エピガロカテキンガレート (EGCG, (-)-Epigallocatechin gallate)を反応させた後、Lipopolysaccharide (LPS) を作用させて培養し、培養上清を回収した後、培養上清に含まれる IFN- $\gamma$ および IL-1 $\beta$ の量 cytokine ELISA で解析した。この結果、IFN- $\gamma$ および IL-1 $\beta$ の抑制挙動の TA との類似性から、GA, EGC, EGCG にはそのドーパミン D2 受容体作動薬としての活性により TA と同様の LPS 誘導性炎症性サイトカインの抑制効果が存在することが示唆された。その一方で、ECG も Galloyl residue を有するが、IFN- $\gamma$ および IL-1 $\beta$ の抑制挙動は TA とは異なり、その濃度依存的な IFN- $\gamma$  および IL-1 $\beta$ の抑制効果は見られなかった。ECG は Galloyl residue を有しているため、ドーパミン D2 受容体作動薬としての活性は検出されるが、TA と同じ IFN- $\gamma$ および IL-1 $\beta$ の抑制効果が ECG には見られなかった理由としては、ECG においては、さらに異なる受容体への作用や他の細胞性因子との相互作用が存在し、それらの因子への作用により、TA と同じ IFN- $\gamma$ および IL-1 $\beta$ の抑制効果が検出されなかったものと推察された。

### 2) ドーパミン D2 様受容体シグナルによる抗原提示細胞の機能調節機構の解析

抗原提示細胞による Th17 の活性化がドーパミン D2 受容体アゴニスト活性によって抑制されることを示すために、カンジタ抗原を作用させたヒト PBMC からの IL-17A 産生が、ドーパミン D2 受容体作動薬のロピニロールの投与によって抑制されることを解析した。この結果、100x $C_{max}$  のロピニロールの投与によって IL-17A 産生が優位に抑制されることが明らかになった。このことから、ドーパミン D2 受容体の活性化を介したシグナル伝達によって抗原提示細胞による Th17 細胞の分化・活性化および Th17 細胞の活性化が抑制されることが示唆された。

### 3) イムノシナプスにおけるドーパミン D2 受容体の機能解析

ドーパミン D2 受容体が CD4<sup>+</sup>Th 細胞および抗原提示細胞において発現していることを解析するために、磁気ビーズを用いてマウス脾臓より CD4<sup>+</sup>Th 細胞を単離すると共に、マウス骨髄細胞から IL-4 と GM-CSF を用いて分化誘導することにより、抗原提示細胞である血球系由来樹状細胞を調製した。そして、蛍光抗体を用いた蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメトリーによる解析により、ドーパミン D2 受容体が CD4<sup>+</sup>Th 細胞および樹状細胞において発現していることを確認した。また、CD4<sup>+</sup>Th 細胞と抗原提示細胞を混合して培養した結果、CD4<sup>+</sup>Th 細胞と抗原提示細胞同士の相互作用が確認されたことから、イムノシナプス形成が誘導されたことが推察された。そこで、蛍光抗体を用いた蛍光顕微鏡観察により、CD4<sup>+</sup>Th 細胞と抗原提示細胞同士の相互作用部位のイムノシナプスにおけるドーパミン D2 受容体の局在の解析を行った。そ

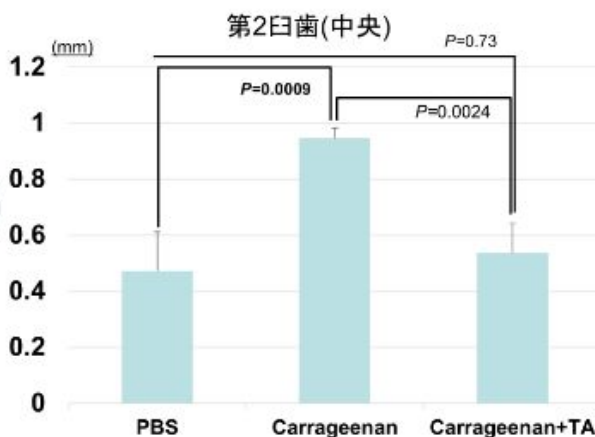
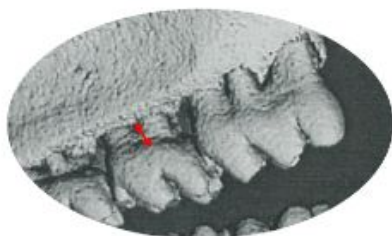
の結果、蛍光の局在だけではイムノシナプスにおけるドーパミン D2 受容体の局在を特定するには至らなかった。原因としては、CD4<sup>+</sup>Th 細胞の大きさが抗原提示細胞などの他の細胞と比べて非常に小さく、さらにその CD4<sup>+</sup>Th 細胞上のイムノシナプスのような小さな領域におけるドーパミン D2 受容体の局在を解析するためには、高い解像度の蛍光顕微鏡が必要であることが考えられた。今後は解像度が最大で 90 nm に達する新型の超解像共焦点レーザー顕微鏡を用いてイムノシナプスにおけるドーパミン D2 受容体の局在の解析を試みたいと考えている。

#### 4) ドーパミンD2受容体アゴニストによる歯周病に対する効能解析

ドーパミンD2受容体作動薬は、抗原提示細胞およびTh17細胞に作用して、IL-17A産生を抑制し、その結果、好中球性炎症が抑制されることが期待される。歯周病は好中球性炎症を主体としていることから、ドーパミンD2受容体作動薬を投与することで好中球性炎症が抑制され、その結果、歯周病の病態が改善することが期待される。このことを解析するためにまず、マウス歯肉上皮細胞株であるGE1細胞において、自然免疫賦活剤であり歯周病疾患誘導薬であるCarrageenanが好中球の遊走を誘導するケモカインであるCXCL1およびIL-17A受容体の発現を上昇させることを定量PCRにより明らかにした。また、この発現上昇がドーパミンD2受容体作動薬であるロピニロールの投与で抑制されることを定量PCRにより明らかにした。さらに、GE1細胞において、IL-17A作用により誘導されたCXCL1およびIL-17A受容体の発現上昇もドーパミンD2受容体作動薬であるロピニロールの投与で抑制されることを定量PCRにより明らかにした。このことから、歯周病においてドーパミンD2受容体の作動薬は、歯肉上皮細胞からの好中球性炎症誘導を抑制し、その結果歯周病の病態を改善することが期待された。このことを明らかにするために、ラット歯周病モデルにおいて、Carrageenanを用いて歯周病を誘導すると同時にドーパミンD2受容体作動薬を用いてその効能を評価した。歯周病モデルは第2臼歯を中心に疾患誘導薬であるCarrageenanをしみこませ絹糸を埋め込み誘導した。コントロール群に比べて、疾患誘導群では有意な歯槽骨の吸収増大が確認したが、ドーパミンD2受容体作動薬であるロピニロール、および、ドーパミンD2受容体作動薬活性を有するタンニン酸 (TA, Tannic acid) 群では歯槽骨の吸収抑制が確認した。このことから、期待したとおり、ドーパミンD2受容体作動薬は歯周病の病態を著しく改善させることが明らかとなった (Exp. Ther. Med., Article Number 78, 2022) (特許第 6562332 号 (2019 年 8 月2日登録))。

### 自然免疫賦活剤carrageenanを用いた歯周病モデルラットにおける タンニン酸(TA)の歯槽骨吸収抑制効果

- 1: Rat上顎左右第二臼歯舌側にPBS, 1%Carrageenan, 1%Carrageenan+1%TAに浸漬した絹糸2~3mmを挿入する作業を、週に1回 3週間に渡って行った(n=4)。
- 2: 開始より4週間経った時点でμCTによる歯槽骨の吸収度を測定したところ、1%Carrageenanで誘発される歯槽骨の吸収が1%TAにより有意に抑制された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Yuta Isozaki, Tsuyoshi Sato, Rie Takagi, Ko Ito, Michihiko Usui, Masaaki Kawano, Sho Matsushita.	4. 巻 25
2. 論文標題 Ropinirole inhibits inflammatory cytokine production in gingival epithelial cells and suppresses alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2022.11777	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 Rie Takagi, Masaaki Kawano, Tsuyoshi Sato and Sho Matsushita.	4. 巻 22
2. 論文標題 Tannic acid, a dopamine receptor agonist, ameliorates periodontitis, atopic dermatitis and psoriasis in animal models.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Trends in Immunology	6. 最初と最後の頁 11-17
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 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 Tokano, M., Kawano, M., Takagi, R. and Matsushita, S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Istradefylline, an adenosine A2a receptor antagonist, ameliorates neutrophilic airway inflammation and psoriasis in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin. Exp. Neuroimmunol	6. 最初と最後の頁 267-275
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 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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川野雅章 戸叶美枝子 高木理英 松下祥
2. 発表標題 アデノシン受容体を介した好中球性炎症制御
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸叶美枝子 松下祥 高木理英 川野雅章
2. 発表標題 アデノシンはエフェクターCD4陽性T細胞に作用しIL-17産生を介して好中球性炎症を惹起する
3. 学会等名 第70回日本アレルギー学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸叶美枝子 松下祥 高木理英 川野雅章
2. 発表標題 アデノシンはTh17細胞の分化を誘導しアデノシンA2a受容体拮抗薬はEAEを制御する
3. 学会等名 第33回日本神経免疫学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaaki Kawano, Mieko Tokano, Rie Takagi, Toshimasa Yamamoto, Sho Matsushita.
2. 発表標題 Extracellular adenosine induces hypersecretion of IL-17A by T-helper 17 cells through the adenosine A2a receptor to promote neutrophilic inflammation
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 アデノシンA2A受容体の活性化を抑制する組成物	発明者 川野雅章、松下祥、 高木理英、戸叶美枝子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許、PCT/JP2021/31777	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 播種性血管内凝固症候群の予防又は治療用組成物	発明者 松下祥、川野雅章、 戸叶美枝子、高木理英	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許、特願2021-071128	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 播種性血管内凝固症候群の予防又は治療用組成物	発明者 松下祥、川野雅章、 戸叶美枝子、高木理英、前崎繁文、樽本	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許、PCT/JP2022/001353	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------