

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790088

研究課題名（和文） プリン受容体をターゲットとした新規多角的免疫抑制剤の検討

研究課題名（英文） A novel anti-inflammatory drug targeting purinergic receptors

研究代表者

月本 光俊（TSUKIMOTO MITSUTOSHI）

東京理科大学・薬学部薬学科・助教

研究者番号：70434040

研究成果の概要（和文）：現在、様々な免疫異常を原因とした疾患が増加してきており、免疫異常亢進状態を制御する強力な抗炎症・免疫抑制剤の開発が重要課題となっている。本研究では、T 細胞およびマクロファージの活性化におけるプリン受容体の関与と免疫異常亢進状態へのプリン受容体阻害薬の効果を検討した。その結果、P2X7, P2Y6, P2Y11 受容体が炎症反応亢進に関与することを明らかにし、これら受容体阻害薬の新規抗炎症剤としての可能性を提示した。

研究成果の概要（英文）：It is important to establish a novel target of anti-inflammatory drug because immune disease is increasing in all over the world. In this study, I found that P2X7 and P2Y6 purinergic receptors play an important role in activation of T cells and macrophages. The antagonists of these receptors significantly suppressed the increase of pro-inflammatory cytokine levels in sepsis model. I propose that the antagonists of P2X7 and P2Y6 receptors would be candidates of novel anti-inflammatory drug.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：免疫学、薬学、プリン受容体、ATP、炎症

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

免疫過剰亢進状態が原因となる全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患には、未だ効果的な治療法が確立されておらず、有効な新規抗炎症・免疫抑制剤の開発が望まれている。また、鳥インフルエンザをはじめとする重度の感染症の際、全身性の急性免疫亢進状態が致死要因ともなる。その治療には抗生剤に加え、強力な抗炎症・免疫抑制剤も必須であるが、現状では免疫異常亢進を十分に抑制することは難しい。さらに、臓器移植の分野においても新規免疫抑制剤の開発は必須となる。このように、現在の先端医療において、過剰な免疫亢進状態を制御する新規抗炎症・免疫抑制剤は高い需要があり、緊急性が高い。

プリン受容体（P2 受容体）は、細胞膜上に発現する受容体であり、細胞から細胞外に放出された ATP などのヌクレオチドをリガンドとしている（イオンチャネル型：P2X₁₋₇ 受容体、G たんぱく共役型：P2Y₁₋₁₄ 受容体）。細胞外ヌクレオチドとプリン受容体の研究は、当初、中枢神経系における神経伝達物質と受容体としての役割について長年研究されてきたため、脳神経分野での研究が今なお活発である。しかし、近年、末梢組織においてもプリン受容体の役割が明らかになってきており、特に免疫細胞では、マクロファージ、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、肥満細胞など多くの細胞種においてプリン受容体の活性が認められており、免疫応答における重要性が示されてきている。これまでにプリン受容体をターゲットとした代表的薬物には抗血栓薬として P2Y₁₂ 受容体阻害薬クロピドグレルがある。

しかし、プリン受容体を標的とした抗炎症・免疫抑制剤は臨床応用されておらず、その開発は新規性・革新性が高い。

最近の注目すべき研究報告として、T 細胞の活性化過程において自発的 ATP 分泌とプリン受容体活性化が関与することが明らかにされた。この発見は、我々を含めた 3 つのグループから同時期に報告された。

特に申請者は P2X₇ 受容体阻害薬が T 細胞活性化を部分的に抑制することに対し、P2Y₆ 受容体阻害薬はほぼ完全に活性化を抑制することを発見した。T 細胞活性化過程に関してはこれまでに多くの研究がなされているが、プリン受容体の関与は最先端の概念である。そのため、国内はもとより、世界的にもまだ広く認知されていない先見性の高い研究分野である。

2. 研究の目的

【新規多角的免疫抑制剤の概念】

免疫反応は、抗原を認識した抗原提示細胞やリンパ球自身の活性化とそれに伴い産生が増大したサイトカイン、ヌクレオカインなど炎症性メディエータによって迅速かつ強力に増幅される。免疫異常亢進状態においては過度の急激な免疫応答によって生体に著しい障害をもたらされてしまう。この強力な免疫応答誘導を抑制するためには、個々の免疫細胞自身の活性化と炎症性メディエータの産生放出機構を阻害する必要がある。例えば、感染症に伴う免疫異常亢進状態の初期病態には、大量の細菌由来リポ多糖（LPS）によって活性化するマクロファージや抗原提示を受けて活性化する炎症性 T 細胞（Th1, Th2 や Th17）が全身性の急

性炎症反応を引き起こす。そのため、この病態を制御するには、感染菌に対する抗生剤、既存の抗炎症剤の投与に加え、免疫細胞ネットワーク全体を抑制する強力な免疫抑制剤の使用が必要となる。そこで本研究では、(1) T細胞、マクロファージ自身の活性化を強力に阻害し、(2) 炎症性サイトカイン・ヌクレオカイン放出を抑制し、(3) 免疫異常亢進状態に治療効果を発揮するプリン受容体阻害薬を探索し、新規抗炎症・免疫抑制剤としての可能性を提示したい。

T細胞、マクロファージ両細胞のプリン受容体を標的とし、免疫活性化ネットワーク全体を制御する抗炎症・免疫抑制剤の開発研究は世界的にも例が無く、革新的な試みである(図1参照)。本研究により強力な抗炎症・免疫抑制剤としての新規標的および新規阻害薬の可能性が示されれば、現在治療が困難な自己免疫疾患、重度感染症、移植拒絶、その他様々な炎症性疾患に広く応用が可能であり、大きな波及効果が期待できる。特に、生産コストが安く製造効率の良い低分子化合物薬の開発は、最先端の医療施設が整っておらず、また高額な医薬品の使用が困難な地域にも波及効果をもたらすことができる。そのため、本研究では、低分子化合物である受容体阻害薬の新たな有用性を再認識し、検討していきたい。

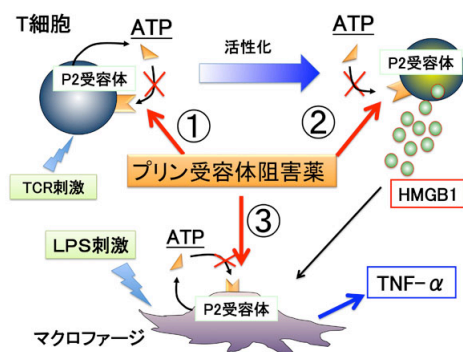


図1 プリン受容体阻害薬による多角的免疫抑制作用を介した抗炎症薬の創成

- ① プリン受容体阻害薬による T 細胞受容体 (TCR) 介在性 T 細胞活性化過程の抑制
- ② プリン受容体阻害薬による活性化 T 細胞からの免疫活性化因子 (HMGB1 など) の放出抑制作用
- ③ プリン受容体阻害薬による LPS 誘発マクロファージ活性化による炎症性サイトカイン (TNF- α など) 産生の抑制作用

【研究到達目標】

本研究では、免疫異常亢進病態に有効なプリン受容体を標的とした新規抗炎症・免疫抑制剤を世界に提示することを最終的な目標とする。22年度にT細胞・マクロファージ活性化過程および炎症性メディエータ放出に関与するプリン受容体を特定する。23年度にプリン受容体阻害薬を用いて免疫過剰亢進モデルマウスへの治療効果を検討する。これらの検討により、新規抗炎症・免疫抑制剤としてのプリン受容体阻害薬の可能性を総合的に評価する。

3. 研究の方法

初年度は、免疫応答におけるプリン受容体活性化の重要性と責任受容体を明らかにするため、マウス T 細胞・マクロファージ活性化過程および炎症性サイトカイン・ヌクレオカイン放出機構におけるプリン受容体の関与を *in vitro*、*ex vivo* において検討する。二年目には、免疫細胞活性化抑制効果の認められたプリン受容体阻害薬を用いて免疫異常亢進モデルマウスに対する治療効果を *in vivo* において検討する。また、T 細胞活性化・分化過程におけるプリン受容体関与の詳細についても shRNA による遺伝子ノックダウンや T 細胞 *in vitro* 分化誘導法を用いて検討する。以上の成果をもとに、

①免疫応答におけるプリン受容体の生理的役割とその重要性を明らかにし、②免疫異常亢進病態における新規治療薬としてのプリン受容体阻害薬の可能性を世界に先駆けて提示することを本研究課題の目標とする。

【方法】

- (1) T細胞受容体 (TCR) 刺激による T細胞活性化過程に関するプリン受容体の同定
- (2) 抗原二次感作による T細胞活性化過程に関するプリン受容体の同定
- (3) マクロファージ活性化過程に関するプリン受容体の同定
- (4) High mobility group box-1 (HMGB1) 放出機序におけるプリン受容体関与の検討
- (5) マウス T細胞分化過程におけるプリン受容体関与の検討
- (6) ヒト白血病 T細胞株 Jurkat 細胞活性化におけるプリン受容体の関与
- (7) 免疫過剰亢進致死モデルにおけるプリン受容体阻害薬による治療効果の検討

以上より、免疫異常亢進状態を改善する新規治療標的となりうるプリン受容体サブタイプおよび阻害薬を提示する

4. 研究成果

マウス T細胞を TCR 刺激した結果、細胞内 Ca 濃度の上昇、IL-2 産生、CD25 発現が認められた。これらは、P2X7 および P2Y6 受容体阻害薬の処置により抑制されたことから、T細胞活性化に P2X7 及び P2Y6 受容体の関与が示唆された。

また、マウス単球由来 RAW264.7 細胞を LPS によって刺激したところ、p38 MAPK の活性化、IL-6 および TNF- α 産生が認められた。p38 MAPK の活性化は、P2Y6 受容体

阻害薬および P2X7 受容体阻害薬によって抑制された。一方、IL-6 産生および TNF- α 産生については、P2Y6 阻害薬によるのみ抑制された。

マクロファージおよび T細胞を ATP 刺激することによって炎症メディエータである HMGB1 の放出が認められた。これは、P2X7 受容体阻害薬で抑制され、P2X7 KO マウス由来の T細胞およびマクロファージでは、ATP 刺激後に HMGB1 放出が認められなかったことから、P2X7 受容体の関与が明らかとなった。また、この P2X7 に依存した HMGB1 の放出は、P2X4 受容体によって制御されていることが示された。

T細胞サブセット分化におけるプリン受容体の関与を検討したところ、制御性 T細胞の分化にアデノシン A2b 受容体が関与していることが明らかとなった。

マウス T細胞およびヒト T細胞株において TCR 刺激による T細胞活性化は、ATP の開口放出とそれに伴う P2Y6 および P2X7 受容体活性化が重要であることが示唆された。

より病態に近い慢性敗血症モデルである盲腸結紮穿孔による腹膜炎モデルを用いて P2X7 および P2Y6 受容体阻害薬の効果を検討した。その結果、血中 TNF- α および IL-6 濃度の上昇が顕著に抑制された (図 2)。一方、IL-17 上昇は抑制しなかった。以上より、P2X7 受容体阻害薬および P2Y6 受容体阻害薬は、新規抗炎症薬となる可能性が示唆された。

以上より、新規抗炎症・免疫抑制剤としての P2X7 および P2Y6 受容体阻害薬の可能性を提示することに成功し、到達目標を達成した。今後、これらの阻害薬がどのような病態に有効であるかについて検討を行う予定である。

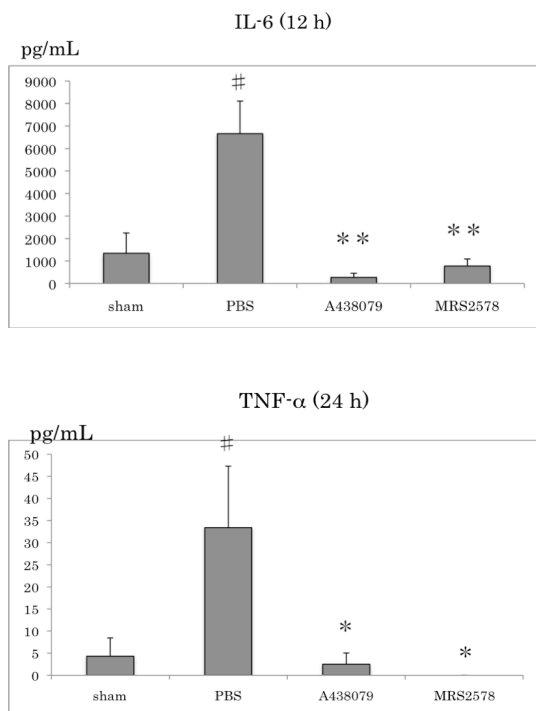


図2 腹膜炎モデルにおける血中サイトカイン濃度増加に対する P2X7 受容体阻害薬 (A438079) および P2Y6 受容体阻害薬 (MRS2578) の効果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(#共第一著者, *責任著者)

- ①. A. Kawano[#], M. Tsukimoto^{**}, D. Mori, T. Noguchi, H. Harada, T. Takenouchi, H. Kitani and S. Kojima, Regulation of P2X7-dependent inflammatory functions by P2X4 receptor in mouse macrophages *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420(1) 102-7 (2012) (査読有り)
- ②. A. Kawano[#], M. Tsukimoto^{**}, Taisei Noguchi, Noriyuki Hotta, Hitoshi Harada, Takato Takenouchi, Hiroshi Kitani, Shuji

Kojima, Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419 (2) 374-80 (2012) (査読有り)

- ③. H. Nakatsukasa[#], M. Tsukimoto^{**}, H. Harada, S. Kojima, Adenosine A(2B) receptor antagonist suppresses differentiation to regulatory T cells without suppressing activation of T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409 (1) 114-9 (2011) (査読有り)
- ④. A. Tokunaga[#], M. Tsukimoto^{**}, H. Harada, Y. Moriyama, and S. Kojima, Involvement of SLC17A9-Dependent Vesicular Exocytosis in the Mechanism of ATP Release During T Cell Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (23) 17046-17416 (2010) (査読有り)

[学会発表] (計6件)

- ①. 河野 鮎美、月本 光俊、原田 均、小島 周二、P2X7 受容体依存性細胞死における P2X4 受容体の関与、**日本薬学会第 132 年会**、2012 年 3 月 29 日 北海道大学 (北海道)
- ②. 月本 光俊、榊隼人、原田 均、森山芳則、小島 周二、P2X7 受容体依存性細胞死における P2X4 受容体の関与、**日本薬学会第 132 年会**、2012 年 3 月 29 日 北海道大学 (北海道)
- ③. 河野 鮎美、月本 光俊、原田 均、小島 周二、P2X7 受容体を介した炎症反応における P2X4 受容体の関与、**生理学研究所研究会『情報伝達物質としてのプリンの意義』** 2011 年 10 月 21 日、生理学研究所

(愛知県)

- ④. 河野 鮎美、月本 光俊、小島 周二、
P2X7 受容体を介した細胞死誘導における
P2X4 受容体の関与の検討、**第 55 回 日
本薬学会関東支部大会**、2011 年 10 月 8
日 東邦大学 (千葉県)
- ⑤. 榊 隼人、月本 光俊、小島 周二、マク
ロファージ活性化過程における ATP シグ
ナリングの関与、**第 55 回 日本薬学会関
東支部大会**、2011 年 10 月 8 日 東邦大
学 (千葉県)
- ⑥. 中島 隆文、月本 光俊、小島 周二、メ
サンギウム細胞における TGF- β 誘発
COX-2 発現への ATP シグナリングの関与
の検討、**第 55 回 日本薬学会関東支部
大会**、2011 年 10 月 8 日、東邦大学 (千
葉県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

月本光俊 (Tsukimoto Mitsutoshi)
東京理科大学・薬学部薬学科・助教
研究者番号：70434040

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし