

平成 31 年 4 月 15 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08231

研究課題名(和文) IgE非依存的なマスト細胞活性化機構

研究課題名(英文) IgE-independent activation of mast cells

研究代表者

田中 智之 (Satoshi, Tanaka)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞は、花粉症や喘息といった即時型アレルギーに加えて、蕁麻疹やアトピー性皮膚炎といった慢性炎症性疾患の病態形成に関わることが知られている。しかしながら、後者においてどのような仕組みでマスト細胞が炎症を惹起、促進するかは明らかではない。本研究ではIgE-アレルギーとは異なる刺激である生理活性ペプチドや細菌毒素、あるいはポリカチオンによるマスト細胞の活性化について、その機序の一端を明らかにした。また、マスト細胞の活性化を抑制する機能をもつ膜タンパク質を新たに同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マスト細胞が病態形成に関わる炎症性疾患には決定的な治療法がないものも多く、近年注目されている抗体医薬による治療は費用面をはじめ患者への負担が大きい。本研究では、マスト細胞活性化の引き金に相当するステップに関わる分子、あるいはマスト細胞の活性化の抑制に関わる分子、およびそれらの機能を明らかにすることを通じて、低分子化合物による治療につながる基礎的知見を得ている。学術的には、機能が未知であるいくつかのGタンパク質共役型受容体の生理的機能の解明に貢献している。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence suggests that mast cells should be involved in various chronic inflammatory diseases including urticaria and atopic dermatitis in addition to immediate allergy such as pollen allergy and allergic asthma. However, it remains unknown how mast cells could trigger and exacerbate the chronic inflammatory diseases. Here, I clarified a part of the mechanism of mast cell activation induced by biogenic peptides, bacterial toxins, and polycations, which are different from IgE-mediated antigen stimulation. I, furthermore, identified a membrane protein that can suppress activation of mast cells in this study.

研究分野：生化学、免疫学

キーワード：マスト細胞 Mrgpr GPR35 毒素 アトピー性皮膚炎 蕁麻疹

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は、花粉症や喘息といった即時型アレルギーのみならず、アトピー性皮膚炎、接触性皮膚炎、慢性蕁麻疹、自己免疫疾患といった様々な慢性炎症性疾患の病態形成に関わることが示唆されているが、従来のマスト細胞研究は IgE を介してアレルゲンがマスト細胞を活性化する経路を対象とするものがほとんどであった。これは、IgE 非依存性の応答の多くが、培養細胞を用いて再現することができず、専ら個体レベルでの解析に頼らざるを得ないことに起因するものである。マスト細胞が関与することが推察されている慢性炎症性疾患の多くは、必ずしも IgE に依存しないことから、IgE 非依存性のマスト細胞活性化の機序を解明することは、これらの疾患の新たな治療法の開発に貢献するものである。

### 2. 研究の目的

マスト細胞は即時型アレルギーのみならず、数多くの慢性炎症性疾患の病態形成に関わることが示唆されている。しかしながら、こうした疾患において、何がマスト細胞を活性化し、その結果どのような応答が起こり、病態としての慢性炎症性疾患につながるかは不明である。マスト細胞の活性化については IgE 依存性の応答がよく研究されているが、慢性炎症性疾患の多くは IgE 非依存性である。申請者は組織に分布する成熟マスト細胞の性質を反映する培養モデルを構築し、IgE 非依存性の刺激に対する応答を解析する実験系を初めて確立した。本研究の目的は、IgE 非依存性のマスト細胞活性化のメカニズムを解明し、マスト細胞を標的とした新たな慢性炎症性疾患の治療薬開発の基礎的知見を得ることである。

### 3. 研究の方法

- (1) G タンパク質共役型受容体のリガンド解析：近年開発された TGF- $\alpha$  shedding アッセイを用いて、HK293 細胞に GPCR および G $\alpha_q$  融合型の各 G $\alpha$  サブユニット遺伝子を導入し、MrgprX2、GPR35 のアゴニストの評価を行った。
- (2) マウス培養マスト細胞を用いた解析：マウス骨髄細胞を IL-3 存在下、約 1 ヶ月培養することにより得られる骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)を用いた。また、これをさらに Swiss 3T3 線維芽細胞株と幹細胞因子存在下、16 日間共培養することにより得られる成熟マスト細胞を皮膚組織のマスト細胞のモデルとして用いた。
- (3) ラット腹腔マスト細胞：組織中の成熟マスト細胞として、ラット腹腔内の細胞を回収し、密度勾配遠心法によりマスト細胞を精製した。

### 4. 研究成果

#### (1) MrgprX2 の機能に関する解析：

MrgprX2 がマスト細胞の secretagogue (脱顆粒誘導物質) の有力な受容体候補であることが既に報告されているが、TGF- $\alpha$  shedding assay の系で検証したところ、substance P およびポリカチオンである compound 48/80 がそれぞれ MrgprX2 のアゴニスト活性を示すことが確認できた。広島大学医学部(秀道弘教授)との共同研究を通じて、皮膚組織に誘導される生理活性ペプチドである neuromedin U がマスト細胞の脱顆粒応答を誘導することを見出し、同様に TGF- $\alpha$  shedding アッセイを用いて MrgprX2 に対するアゴニスト活性があることを明らかにした。

以上の結果は、ヒト皮膚組織における生理活性ペプチドを介するマスト細胞の脱顆粒応答において、MrgprX2 が重要な役割を果たすことを示唆するものである。

#### (2) マウス Mrgpr ファミリーの mRNA 発現に関する解析：

未成熟な培養マスト細胞モデルである BMMC には、MrgprA4, E が発現していた。BMMC を線維芽細胞と幹細胞因子存在下共培養するモデルでは、これらに加えて MrgprB1, B2, B10, C11 が誘導された。一方、1  $\mu$ M の dexamethasone 存在下で共培養を実施すると、これらの Mrgpr 遺伝子群はいずれも発現が抑制された。マウスの耳介皮膚組織では、MrgprA4, B2, B10, E が発現しており、これらは耳介組織に 6 日間連続して dexamethasone を塗布することにより、いずれも発現レベルが低下した。

BMMC では compound 48/80 および substance P による脱顆粒応答は起こらないが、共培養により得られる成熟マスト細胞は応答性を獲得した。一方、Dexamethasone 存在下で成熟したマスト細胞は、compound 48/80 および substance P による脱顆粒応答能が顕著に低下していた。Dexamethasone を皮膚に連続して塗布する系においても同様に compound 48/80 に応答して脱顆粒応答を引き起こすマスト細胞数が顕著に低下した。

以上の結果は、Mrgpr ファミリーがマスト細胞の分化に伴い発現誘導を受ける遺伝子であること、またマスト細胞に発現するサブタイプはステロイド性抗炎症薬により発現が低下することを示している。これはステロイド性抗炎症薬の新たな作用機序として重要な発見であり、Mrgpr サブタイプを標的とした創薬が有望であることを示唆するものである。

(3) 黄色ブドウ球菌 毒素によるマスト細胞の脱顆粒応答に関する解析：

黄色ブドウ球菌はアトピー性皮膚炎の発症、増悪の要因のひとつであることが知られており、産生される種々の毒素は様々な血球系細胞を活性化する。近年、毒素がマスト細胞の脱顆粒応答を惹起することが報告されたが、標的となる受容体分子を含めて活性化の機序は不明であった。本研究では、毒素はサイトゾルの  $Ca^{2+}$  濃度の増大を誘導するが、一方で細胞外  $Ca^{2+}$  非存在下においても一定の脱顆粒応答が残存することを見出した。毒素による脱顆粒応答は、抗原刺激や thapsigargin 刺激といった既存の脱顆粒応答を遮断するシグナル伝達阻害剤による影響を受けないことから、FcεRI を介するチロシンキナーゼカスケード、および GPCR を介する  $G_{\alpha i}$  の活性化、いずれの経路にも寄らない新しいシグナル経路を利用している可能性が考えられた。

(4) GPR35 アゴニストによるマスト細胞の脱顆粒応答の抑制

マスト細胞安定化作用をもつと説明される化合物群がいずれも *in vitro* のアッセイにおいて GPR35 のアゴニスト活性を示すという報告に基づき、クロモグリク酸ナトリウム(DSCG)、ザプリナストといった GPR35 アゴニストの脱顆粒抑制作用を検証した。既知の GPR35 アゴニストはいずれもラット腹腔マスト細胞における抗原刺激による脱顆粒応答を強く抑制した。そこで、工学院大学(松野研司教授)との共同研究を通じて、新たな GPR35 アゴニストを設計、合成し、評価を行った。TGF- $\alpha$  shedding アッセイにおいて優れたアゴニスト活性を示した化合物は、いずれもラット腹腔マスト細胞においても脱顆粒抑制作用を示した。また、GPR35 をほとんど発現しないラットマスト細胞株にラット GPR35 遺伝子を導入した細胞株を用いた検討においても、既知のアゴニストおよび新規アゴニストはいずれも抗原刺激による脱顆粒応答を抑制した。

以上の結果は、消化管吸収が悪いために投与経路が限定されている DSCG に代わるマスト細胞安定化剤の開発に貢献する基礎的知見である。また、GPR35 はゲノムワイド相関研究を通じて炎症性腸疾患、および 2 型糖尿病との関連が示唆されており、優れたアゴニストの開発はこれらの疾患の治療法の開発にも寄与することが期待できる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 8 件)

Yamada, K., Sato, H., Sakamaki, K., Kamada, M., Okuno, Y., Fukuishi, N., Furuta, K., Tanaka, S. Suppression of IgE-independent degranulation of murine connective tissue-type mast cells by dexamethasone. *Cells*, 8, 112 (2019)

Uchida, R., Egawa, T., Fujita, Y., Furuta, K., Taguchi, H., Tanaka, S., Nishida, K. Identification of the minimal region of peptide derived from ADP-ribosylation factor1 (ARF1) that inhibits IgE-mediated mast cell activation. *Mol. Immunol.*, 105, 32-37 (2019)

Kamei, M., Otani, Y., Hayashi, H., Nakamura, T., Yanai, K., Furuta, K., Tanaka, S. Suppression of IFN- $\gamma$  production in murine splenocytes by histamine receptor antagonists. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 4083 (2018)

Matsuo, Y., Yanase, Y., Irifuku, R., Takahagi, S., Mihara, S., Ishii, K., Kawaguchi, T., Tanaka, A., Iwamoto, K., Watanuki, H., Furuta, K., Tanaka, S., Inoue, A., Aoki, J., Hide, M. Neuromedin-U directly induces degranulation of skin mast cells, presumably via MRGPRX2. *Allergy*, 73, 2256-2260 (2018)

Takeuchi, T., Harada, Y., Moriyama, S., Furuta, K., Tanaka, S., Miyaji, T., Omote, H., Moriyama, Y., and Hiasa, M. Vesicular polyamine transporter mediates vesicular storage and release of polyamine from mast cells. *J. Biol. Chem.*, 292, 3909-3918 (2017)

Manabe, Y., Yoshimura, M., Sakamaki, K., Inoue, A., Kakinoki, A., Hokari, S., Sakanaka, M., Aoki, J., Miyachi, H., Furuta, K., and Tanaka, S. 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene and its derivatives act as secretagogues on rodent mast cells. *Eur. J. Immunol.*, 47, 60-67 (2017)

Hattori, M., Yamazaki, M., Ohashi, W., Tanaka, S., Hattori, K., Todoroki, K., Fujimori, T., Ohtsu, H., Matsuda, N., and Hattori, Y. Critical role of endogenous histamine in promoting end-organ tissue injury in sepsis. *Intensive Care Med. Exp. (ICMx)*, 4, 36 (2016)

Sakanaka, M., Kurimune, Y., Yamada, K., Hyodo, N., Natsuhara, M., Ichikawa, A., Furuta, K., and Tanaka, S. Down-modulation of antigen-induced activation of murine cultured mast cells sensitized with a highly cytokinergic IgE clone. *Immunol. Lett.* 174, 1-8 (2016)

### 〔学会発表〕(計 6 件)

武内 雅志、山下 晶子、古田 和幸、田中 智之、活性化マウスマスト細胞における IL-10 産生の制御、第 92 回日本薬理学会(3/14-16, 2019) (大阪)

Satoshi Tanaka, IgE-independent degranulation of murine cutaneous mast cells., World Histamine Symposium 2018 (WHS)(7/7-9, 2018) (神戸)

Satoshi Tanaka, Keiko Yamada, Kazuma Sakamaki, Hitomi Sato, Mayumi Kamada, Yasushi Okuno, Nobuyuki Fukuishi, Kazuyuki Furuta, Suppression of IgE-independent degranulation of murine mast cells by dexamethasone. 第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議(18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology) / 第 91 回日本薬理学会年會(7/1-6, 2018) (京都)

田中 智之、山田 圭位子、佐藤 仁美、鎌田 真由美、奥野 恭史、福石 信之、古田 和幸、IgE非依存的なマスト細胞活性化に対するデキサメタゾンの作用、第20回日本ヒスタミン学会(11/24, 25, 2016) (倉敷)

Satoshi Tanaka, IgE-independent activation of mast cells: An experimental contact allergen, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene is a mast cell secretagogue., 2016 XVI PHRS (ポーランドヒスタミン研究会) (10/27-29, 2016) Poland

田中 智之、山田 圭位子、佐藤 仁美、鎌田 真由美、奥野 恭史、福石 信之、古田 和幸、マウスマスト細胞の成熟過程におけるデキサメタゾンの作用、第89回日本生化学会(9/25-27, 2016) (仙台)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：複素環化合物又はその塩、GPR35 作動薬及び医薬組成物

発明者：松野研司、大野修、田中智之、古田和幸

権利者：同上

種類：特許

番号：2017-174799

出願年：2017

国内外の別：国内

〔その他〕

京都薬科大学薬理学分野 web サイト

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/yakuri/>