

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：92667

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16541

研究課題名(和文)革新的受容体合成技術を利用した新規核酸医薬品(アナフィラキシー予防薬)の開発

研究課題名(英文)A novel nucleic acid medicine (anaphylaxis preventive drug) using innovative receptor synthesis technology

研究代表者

鈴木 康之(SUZUKI, YASUYUKI)

社会福祉法人恩賜財団済生会(済生会保健・医療・福祉総合研究所研究部門)・済生会保健・医療・福祉総合研究所研究部門・客員研究員

研究者番号：10745144

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):手術で使用される様々な物質は時に重篤なアレルギー反応を引き起こす。一般に重症アレルギー反応は、原因物質が特異的IgE抗体を介して肥満細胞を刺激し、ヒスタミンなどの物質を放出して起こる。近年この経路ではなくMas関連G蛋白共役型受容体X2(MRGPRX2)を直接刺激してアレルギー反応が起こる経路が発見され。しかし、この経路を特異的に阻害する薬剤は見つかっていなかった。そこで、我々は有する無細胞蛋白質合成系で合成したMRGPRX2を鋳型として、核酸医薬品アプタマーを開発して、同物質が培養された肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制することを示した。本発見は、新たなアレルギー治療薬のシードとなり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた核酸医薬品は、これまでのアレルギー治療薬と全く違う作用機序でアレルギー反応を抑える薬に結びつく重要なシードである。また、このシードを作成するに際し、培養細胞に合成させた蛋白質では無く、無細胞蛋白質合成系で合成した蛋白質を鋳型とした点が新しく、今後様々な核酸医薬品を容易に見出すことが可能になってくるかもしれない。

研究成果の概要(英文):Various substances used in surgery sometimes cause severe allergic reactions. Generally, severe allergic reactions occur when the causative substance stimulates mast cells via specific IgE antibodies, releasing substances such as histamine. Recently, a new pathway that directly stimulates Mas-related G protein-coupled receptor X2 (MRGPRX2) has been found to cause allergic reactions. However, no drug that specifically inhibits this pathway has been found. Therefore, we developed a nucleic acid drug aptamer using MRGPRX2 synthesized by cell-free protein synthesis system as a template, and showed that the aptamer inhibited histamine release from cultured mast cells. This finding could be a seed for a new allergy drug.

研究分野：周術期管理

キーワード：アナフィラキシー 周術期管理 麻酔 無細胞蛋白質合成 核酸医薬品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

周術期に起こるアナフィラキシーは、重篤な合併症の一つである。

これまでの報告で、非脱分極性筋弛緩薬によるアレルギー反応が多い。日本国内では、同薬剤はロクロニウムが最も多く使用されている。ロクロニウムは四級アミン構造を有しており、同様の構造を持つ化粧品などの日用品に感作されて、特異的 IgE 抗体を有することで、反応が起こると言われていた。しかし、肥満細胞に発現する Mas 関連 G 蛋白共役型受容体 X α (MRGPRX2) が、ロクロニウムをはじめとする非脱分極性筋弛緩薬や、ある種の抗菌薬により刺激され、ヒスタミンが遊離する報告されはじめた。過去の報告でも、特異的 IgE 抗体が検出されないケースが約半数あることから、MRGPRX2 を介する反応経路を検討することは、周術期アナフィラキシー予防の観点から非常に重要であると考えた。またそれだけで無く、これまでに明らかにされていないリスク因子を明らかにすることも、アナフィラキシー予防のためには重要である。

2. 研究の目的

MRGPRX2 に対する、特異的な拮抗薬は存在していなかったため、これを新規に開発することで、これまでのアレルギー治療とは違う視点で、アナフィラキシーの治療や予防を可能にすることを目的とする。

また遺伝子学的な視点と、ビッグデータを用いた網羅的な検討(機械学習)により、これまでに明らかになっていないリスク因子を明らかにし、アナフィラキシーの予防につなげたい。

3. 研究の方法

#1 MRGPRX2 に対する新規拮抗薬の開発

新規薬剤のターゲットとして、核酸医薬品である DNA アプタマーを選んだ。

これまでに、われわれが開発している、無細胞蛋白質合成系を用いた機能性を有する G 蛋白共役型受容体合成技術¹を用いて、MRGPRX2 を大量に合成した。合成産物を鋳型として、ランダムな配列を有する DNA ライブラリーを混合し、結合した DNA 配列のみを選別していく Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX 法)²を用いて、目的の配列を抽出した。結合しやすいと考えられる候補配列に蛍光物質を付加した状態で大量に合成し、MRGPRX2 を発現させたラット好塩基球様細胞 (RBL-2H3-MRGPRX2) と結合実験を行い、さらに候補を絞った。最終候補の DNA アプタマーを再び大量合成し、RBL-2H3-MRGPRX2 細胞に投与することで、MRGPRX2 受容体を介した同細胞からのヒスタミン遊離が抑制されているかを検討した。また、最後に、RBL-2H3-MRGPRX2 をラットの皮下に移植したアナフィラキシーモデルラットにも、同アプタマーを投与することで、アナフィラキシー予防効果を確認することにした。³

#2 遺伝子学的な視点からのリスク因子の検討

MRGPRX2 は、ヒトの肥満細胞に発現する受容体であるが、全ての患者が筋弛緩薬などで過敏反応を起こさないことから、受容体のアミノ酸変異により薬剤との親和性が変化することで、過敏反応を起こしやすくなる可能性を考えた。我々は、皮内テストでロクロニウムが原因物質と同定されたが、特異的 IgE 抗体が検出されなかった、アナフィラキシー既往患者の血液検体から DNA を抽出し、Primer walking 法により遺伝子変異を探索した。⁴

また、同様にロクロニウムによりアナフィラキシーを来した 1 症例を追加した 2 症例の血液検体から RNA を抽出し bulk-RNA-seq を行い、非アナフィラキシー群と比較して発現変動が見られる遺伝子の検出を行った。

#3 ビッグデータを用いた網羅的な検討(機械学習)による予測

済生会松山病院と愛媛大学医学部附属病院において、周術期アナフィラキシーを来した患者を電子カルテの手術看護記録の情報を元に抽出し、その患者の身体情報、既往歴、術前血液検査などの情報を詳細に集積した。複数の分類器を用いて機械学習させ、最も高い確率で周術期アナフィラキシーを予測するシステムを開発する。⁵

4. 研究成果

#1 MRGPRX2 に対する新規拮抗薬の開発

5'-ATGACCATGACCCTCCACACTGTAGGCACCACGGGTCCCTGGCAGTTAAAAGTACGTTTGTGCAGACTGTGGCAGGGAAC A-3'の配列が最も特異的かつ親和性が高く、この DNA アプタマーを RBL-2H3-MRGPRX2 に投与した後に刺激したところ、ヒスタミン遊離が約 70%抑制された。また、アナフィラキシーモデルラットの皮下に投与したところ、アナフィラキシーの発症を予防することができた。³

MRGPRX2 に対する新規拮抗薬としてアナフィラキシー治療のシードとなるものを開発できたが、DNA アプタマーは、容易に代謝されるため、ドラッグデリバリーの問題を解決する必要がある。既存の核酸医薬品は局所注射で投与されるものであり、今回開発したアプタマーも血中への投与では無く、病変部位への直接投与が望まれる。一つの可能性として、気管支喘息患者では気道内の MRGPRX2 発現量が増加していると報告があり、我々の開発したアプタマーを吸入投与することが可能であれば、臨床応用することが可能であるかもしれない。

#2 遺伝子学的な視点からのリスク因子の検討

アナフィラキシー既往患者の MRGPRX2 遺伝子を解析したところ 3 カ所のアミノ酸変異を発見した。⁴

その後、この報告を元に、変異させた MRGPRX2 を発現させた培養細胞での実験を行ったグループより、この変異がむしろ肥満細胞の活性化を抑えたと報告された。⁶しかしながら、この報告では肥満細胞から強く脱顆粒される際に検出されるヘキソミニダーゼで評価しており、アレルギー症状を引き越すヒスタミンを測定していない。MRGPRX2 を介する反応では完全な脱顆粒では無く、kiss and runと言われる、細胞膜と小胞が結合と離解を繰り返し、低分子のみ、つまりヘキソミニダーゼではなく、ヒスタミンのみを放出する形式でアレルギー反応が起こる可能性が報告されている。^{7,8}今後詳細調査を進めることで、遺伝子変異とヒスタミン遊離の関係が明らかになるかもしれない。

Bulk-RNA-seq は、前述の症例に加え、同様にロクロニウムによるアナフィラキシー反応を来した症例を含めた 2 例と、患者背景が類似する非アナフィラキシー症例 2 例の計 4 例の血液検体を用いて行った。変動遺伝子を検出し、パスウェイ解析をしたところ、アナフィラキシー群において好中球の活動が抑制されている可能性が示唆された。現在論文投稿の準備を進めている。

#3 ビッグデータを用いた網羅的な検討（機械学習）による予測

電子カルテより、周術期アレルギー症例（軽症例を含む）25 例を抽出し、患者背景・血液検査・使用薬剤など 150 項目を調査した。またコントロール群として 200 例のデータを集めた。4 つの方法で特徴量を選別し、5 つの分類器を用いて最も正解率が良い組み合わせ選別した。その結果、正解率 0.867 マシユー相関係数 0.558 である予測するシステムを開発できた。現在論文投稿中である。しかし、アナフィラキシーの発症率は 1 万例に 1 例程度であり、臨床的に有用性がある予測システムの開発は非常に難しいと感じている。

参考資料

1. Suzuki Y, Ogasawara T, Tanaka Y, et al. Functional G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Synthesis: The Pharmacological Analysis of Human Histamine H1 Receptor (HRH1) Synthesized by a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System Combined with Asolectin Glycerosomes. *Front Pharmacol.* 2018;9:38. doi:10.3389/fphar.2018.00038
2. Darmostuk M, Rimpelova S, Gbelcova H, Ruml T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv.* 2015;33(6 Pt 2):1141-1161. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.008
3. Suzuki Y, Liu S, Ogasawara T, et al. A novel MRGPRX2-targeting antagonistic DNA aptamer inhibits histamine release and prevents mast cell-mediated anaphylaxis.

Eur J Pharmacol. 2020;878:173104. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173104

4. Suzuki Y, Liu S, Kadoya F, Takasaki Y, Yorozuya T, Mogi M. Association between mutated Mas-related G protein-coupled receptor-X2 and rocuronium-induced intraoperative anaphylaxis. *Br J Anaesth.* 2020;125(6):e446-e448. doi:10.1016/j.bja.2020.05.046
5. 爽劉., 康之鈴木, 正樹茂木. 全身麻酔によるアナフィラキシー様反応のリスク予測. 日本薬理学会年会要旨集. 2020;93:3-P-385. doi:10.1254/jpssuppl.93.0_3-P-385
6. Chompunud Na Ayudhya C, Amponnawarat A, Roy S, Oskeritzian CA, Ali H. MRGPRX2 Activation by Rocuronium: Insights from Studies with Human Skin Mast Cells and Missense Variants. *Cells.* 2021;10(1). doi:10.3390/cells10010156
7. Suzuki Y, Liu S, Kadoya F, Takasaki Y. Association between mutated Mas-related G-protein-coupled receptor-X2 and rocuronium-induced intraoperative anaphylaxis. Comment on Br J Anaesth 2020; 125 *British journal of.* Published online 2021. <https://www.bjanaesthesia.org.uk/article/S0007091221002385/abstract>
8. McNeil BD. MRGPRX2 and adverse drug reactions. *Front Immunol.* 2021;12:676354. doi:10.3389/fimmu.2021.676354

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 0件）

1. 著者名 Suzuki Yasuyuki, Liu Shuang, Kadoya Fumito, Takasaki Yasushi, Yorozuya Toshihiro, Mogi Masaki	4. 巻 127
2. 論文標題 Association between mutated Mas-related G-protein-coupled receptor-X2 and rocuronium-induced intraoperative anaphylaxis. Comment on Br J Anaesth 2020; 125: e448?50	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Anaesthesia	6. 最初と最後の頁 e21 ~ e22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bja.2021.04.009	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 Suzuki Yasuyuki, Liu Shuang, Kadoya Fumito, Takasaki Yasushi, Yorozuya Toshihiro, Mogi Masaki	4. 巻 125
2. 論文標題 Association between mutated Mas-related G protein-coupled receptor-X2 and rocuronium-induced intraoperative anaphylaxis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Anaesthesia	6. 最初と最後の頁 e446 ~ e448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bja.2020.05.046	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 Suzuki Yasuyuki, Liu Shuang, Ogasawara Tomio, Sawasaki Tatsuya, Takasaki Yasushi, Yorozuya Toshihiro, Mogi Masaki	4. 巻 878
2. 論文標題 A novel MRGPRX2-targeting antagonistic DNA aptamer inhibits histamine release and prevents mast cell-mediated anaphylaxis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173104 ~ 173104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173104	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 -

〔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 劉 爽・鈴木康之・茂木正樹
2. 発表標題 全身麻酔によるアナフィラキシー様反応のリスク予測
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木康之
2. 発表標題 周術期アナフィラキシーの新規予防薬の開発
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 康之
2. 発表標題 Mas関連G蛋白質共役型受容体X2に対する新規拮抗薬によるanaphylax予防法の開発
3. 学会等名 日本集中治療医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 康之
2. 発表標題 周術期アナフィラキシーの新規予防薬の開発
3. 学会等名 第65回日本麻酔科学会学術集会
4. 発表年 2018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
研究協力者	劉 爽 (Liu Shuang) (60403812)	愛媛大学・医学系研究科薬理学・准教授	

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
---------	---------