

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15472

研究課題名(和文) 薬剤性アナフィラキシー克服を目指したマスト細胞の脱顆粒制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mast cell degranulation regulatory mechanisms to overcome drug-induced anaphylaxis

研究代表者

國村 和史 (KUNIMURA, Kazufumi)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：20844830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤性アナフィラキシー発症に関わるMas関連Gタンパク質共役型受容体(MRGPRX2/MRGPRB2)と、免疫細胞特異的に発現し細胞骨格制御因子として機能するDOCK2分子に着目し種々の機能解析を行った。その結果、DOCK2-Rac-PAK1経路が薬剤誘導性の脱顆粒反応および薬剤性アナフィラキシー症状に重要な役割を演じていること、DOCK2阻害剤やPAK1阻害剤によってその脱顆粒が抑制されることを見出した。すなわち、本研究により薬剤性アナフィラキシーに関わるマスト細胞の脱顆粒メカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、DOCK2-Rac-PAK1経路がMRGPRX2/MRGPRB2受容体を介した薬剤誘導性の脱顆粒反応に重要な経路であり、薬剤性アナフィラキシー制圧の鍵となる可能性が示唆された。最近、マスト細胞のMRGPRX2受容体を介した反応は慢性蕁麻疹や接触性皮膚炎などとの関連も指摘されていることから、薬剤性アナフィラキシーのみならず様々なアレルギー疾患を制御する上で有用な創薬ターゲットになり得る。

研究成果の概要(英文)：We focused on Mas-related G protein-coupled receptors involved in the pathogenesis of drug-induced anaphylaxis (DIA) and DOCK2 protein, which is specifically expressed in immune cells and functions as a cytoskeletal regulator. We found that the DOCK2-Rac-PAK1 pathway plays an important role in drug-induced degranulation and anaphylactic reactions. In addition, DOCK2 and PAK1 inhibitors could suppress drug-induced degranulation. Thus, this study reveals one aspect of the mast cell degranulation mechanisms involved in DIA.

研究分野：免疫・アレルギー

キーワード：薬剤性アナフィラキシー マスト細胞(肥満細胞) DOCKファミリー分子 脱顆粒 Mas関連Gタンパク質共役型受容体 MRGPRX2 MRGPRB2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アナフィラキシーは様々な原因物質 (アレルゲン) の侵入に対して全身的に引き起こされる即時型の過敏反応であり、重篤になると血圧低下・意識障害を招く(アナフィラキシーショック)。アナフィラキシーによる国内の死亡者数は薬剤に起因するものが最多であり、その原因薬剤も抗生剤・造影剤・筋弛緩剤・麻酔薬など医療現場で頻用されるものが含まれることから、医療安全を確保する上で問題となっている。しかし、その詳細な発症機序については分かっていないことが多いため積極的な予防法や治療法は確立されておらず、発症後の早期発見・アドレナリン投与に頼っているのが現状である。

薬剤性アナフィラキシーは、薬剤の刺激によってマスト細胞 (肥満細胞) からヒスタミンなどの血管に作用する物質が脱顆粒によって細胞外に放出されることが主な原因とされている。従来、アレルゲンの感作により誘導された免疫グロブリン E (IgE) 抗体と FcεR1 受容体を介した刺激が脱顆粒反応の入り口と考えられ、全世界で精力的に研究がなされてきた。その一方で、マスト細胞に発現する Mas 関連 G タンパク質共役型受容体 (Mas-related G protein-coupled receptor ; ヒト MRGPRX2 ; マウス MRGPRB2) に薬剤が直接結合して脱顆粒を誘導する経路が発見され、近年注目を集めている (McNeil et al. *Nature*. 2015)。FcεR1 受容体介在性と比較し、MRGPRX2/B2 介在性の脱顆粒では放出される顆粒が小さく、細胞膜融合および放出に至るまでのスピードが速いことなどが報告されており (Gaudenzio et al. *J. Clin. Invest.* 2016)、それぞれ異なった脱顆粒制御機構が働いていると示唆される。しかし、MRGPRX2/B2 の下流のシグナル経路はほとんど分かっておらず、その脱顆粒機構を解明することは薬剤性アナフィラキシーを克服するためのきっかけになり得ると考えられた。

2. 研究の目的

アレルギー病態に関わるマスト細胞が秒～分単位で迅速に脱顆粒を引き起こすためには、細胞骨格系の再編成を伴う精緻なメカニズムが存在すると想定された。研究代表者の所属研究室では、ケモカイン受容体などの GPCR の下流で DOCK2 (Dedicator of cytokinesis 2) が低分子量 G タンパク質である Rac を活性化し、好中球やリンパ球の細胞骨格を制御することを見出してきた。また、マスト細胞による IgE-FcεR1 を介した脱顆粒反応において、DOCK2 と同じサブファミリーに属する DOCK5 が Rac 活性化とは無関係にアダプター分子として機能し、微小管ネットワークの形成を制御して脱顆粒に関与していることを明らかにした (Ogawa et al. *J. Exp. Med.* 2014)。

一方、マスト細胞における薬剤誘発性の脱顆粒反応に DOCK2 が関与するのかどうか、関わるとしたらどのような役割を担っているかは不明なままであった。以上のことから、研究代表者は MRGPRX2/B2 の下流で DOCK2 が働いている可能性を考え、DOCK2 を遺伝的に欠損したマウスやそのマウスから単離・培養したマスト細胞、ヒト由来のマスト細胞、DOCK2 阻害剤などを用いることで、薬剤性アナフィラキシーに関わるマスト細胞の脱顆粒誘導機構について検証を行った。

3. 研究の方法

(1) 薬剤性アナフィラキシーにおける DOCK2/DOCK5 の役割

MRGPRB2 と結合し活性化することが知られている Compound 48/80 や Ciprofloxacin(抗生剤) を野生型・DOCK2 欠損・DOCK5 欠損マウスに静注することで全身性アナフィラキシーを引き起こし、直腸温低下の程度を比較した。また、マウス足底に Compound 48/80 を皮下注射し、尾静脈から注入した色素の血管透過性を評価することで皮膚アナフィラキシーへの影響を調べた。

次に、MRGPRB2 の下流で脱顆粒に至るまでの機能解析を行うため、マウス腹腔洗浄液中の細胞を SCF 存在下で培養し、MRGPRB2 を発現する結合組織型マスト細胞を得た。そして、原因薬剤で刺激した際の α -Hexosaminidase release やヒスタミン放出量、Ca²⁺イオン濃度、リソソーム局在などの評価を行った。さらに、Western blot 法を用いて野生型および DOCK2 欠損マスト細胞における Rac 活性化、ならびに脱顆粒反応に重要なリン酸化シグナル (GSK3、Erk1/2、Akt、p38 MAPK など) の増減を評価した。

(2) DOCK2 阻害剤の薬剤性アナフィラキシー抑制効果

薬剤性アナフィラキシーの発症を DOCK2 阻害剤によって抑制できるか調べるため、野生型のマスト細胞に DOCK2 阻害剤 (CPYPP やコレステロール硫酸) を添加し、薬剤刺激時の

Hexosaminidase release およびヒスタミン放出量を評価した。また、DOCK2 阻害剤を添加した際の Rac 活性化やリン酸化シグナルの増減を Western blot で確認した。さらに、野生型マウスの腹腔内に阻害剤を投与し、薬剤による全身性アナフィラキシーの発症を抑制できるか検証した (*in vivo*)。

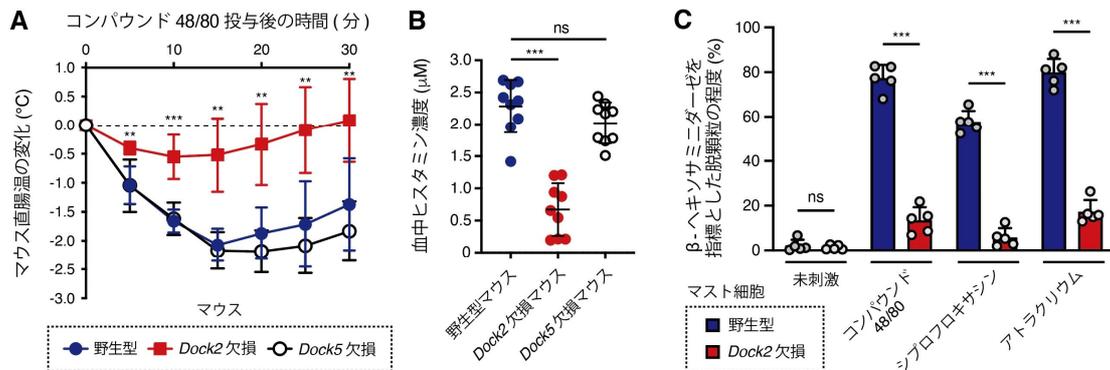
(3) ヒトのマスト細胞における各種阻害剤の臨床応用の可能性

ヒトのマスト細胞における効果を *in vitro* で検証するため、既報 (Folkerts et al. *Nat. Protoc.* 2020) のプロトコルを参考に、男女それぞれのヒト末梢血より CD34 陽性造血幹細胞を磁気ビーズで単離したのち rhSCF/rhIL-3/rhIL-6 存在下で結合組織型マスト細胞を分化・培養した。このマスト細胞に DOCK2 阻害剤やリン酸化シグナル分子の阻害剤を作用させ、薬剤刺激時に Hexosaminidase release が抑制できるかどうかを検証した。

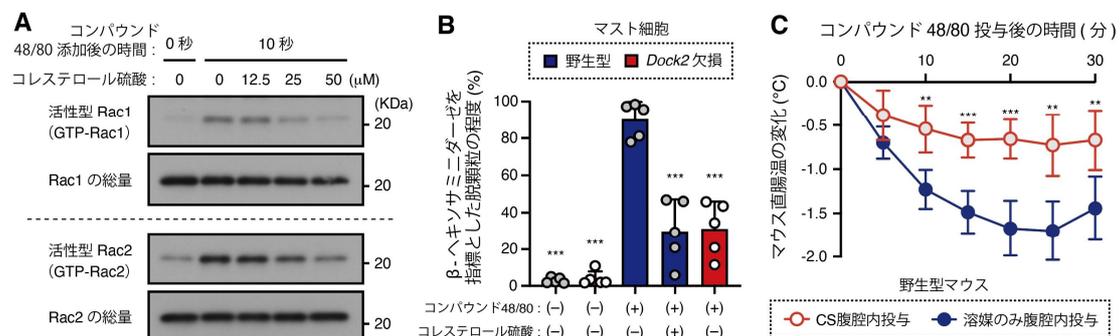
4. 研究成果

野生型・DOCK2欠損・DOCK5欠損マウスに対して、Compound 48/80を静注した後の直腸温をモニタリングした結果、野生型・DOCK5欠損マウスでは速やかに体温が低下したが、DOCK2欠損マウスでは抵抗性を示すことが分かった(下図:A)。これはCiprofloxacinの投与においても同様だった。また、薬剤投与後30分時点の血中ヒスタミン濃度を解析したところ、野生型・DOCK5欠損マウスに比べ、DOCK2欠損マウスでは軽度の上昇に留まった(下図:B)。さらに、皮膚アナフィラキシーモデルにおいてもDOCK2欠損マウスは薬剤投与に対して抵抗性を示した。以上のことからDOCK2は薬剤性アナフィラキシーの発症を規定する分子であることが示唆された。

次に、マスト細胞に着目した *in vitro* 解析に進んだ。従来研究で頻用されてきた骨髄由来マスト細胞はMRGPRB2を発現しないため、本受容体を発現する結合組織型マスト細胞を準備し、薬剤誘導性の脱顆粒を野生型とDOCK2欠損間で比較した。その結果、野生型に比べてDOCK2欠損ではCompound 48/80、Ciprofloxacin、Atracurium (筋弛緩剤) に対する脱顆粒が顕著に障害されていた(下図:C)。



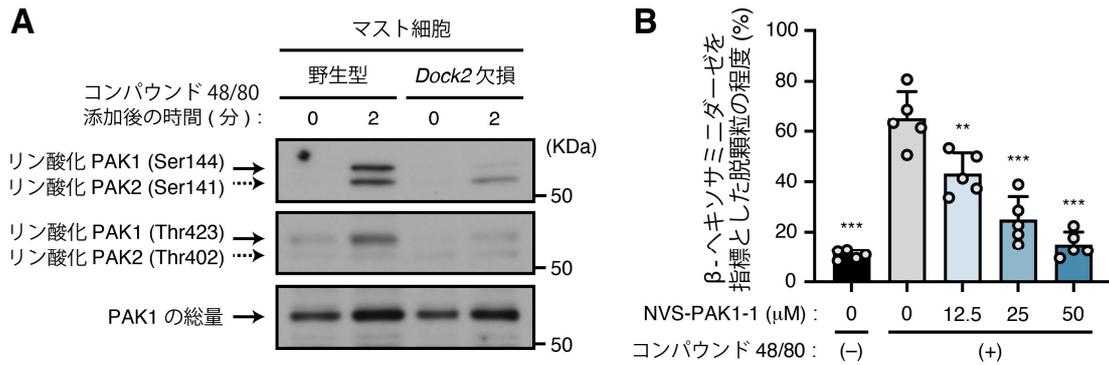
薬剤誘導性の脱顆粒をDOCK2がどのように制御しているのか調べるべく、まずCa²⁺流入やAkt・Erk1/2などのシグナル分子のリン酸化を検証したが、野生型とDOCK2欠損間で差は認められなかった。しかし、DOCK2欠損マスト細胞では薬剤刺激後のRac活性化が障害されており、野生型マスト細胞にDOCK2阻害剤として機能するコレステロール硫酸を添加した際もRac活性化(下図:A)および脱顆粒反応(下図:B)が低下することを見出した。さらに、コレステロール硫酸をマウスに投与すると、薬剤性アナフィラキシー反応は減弱した(下図:C)。



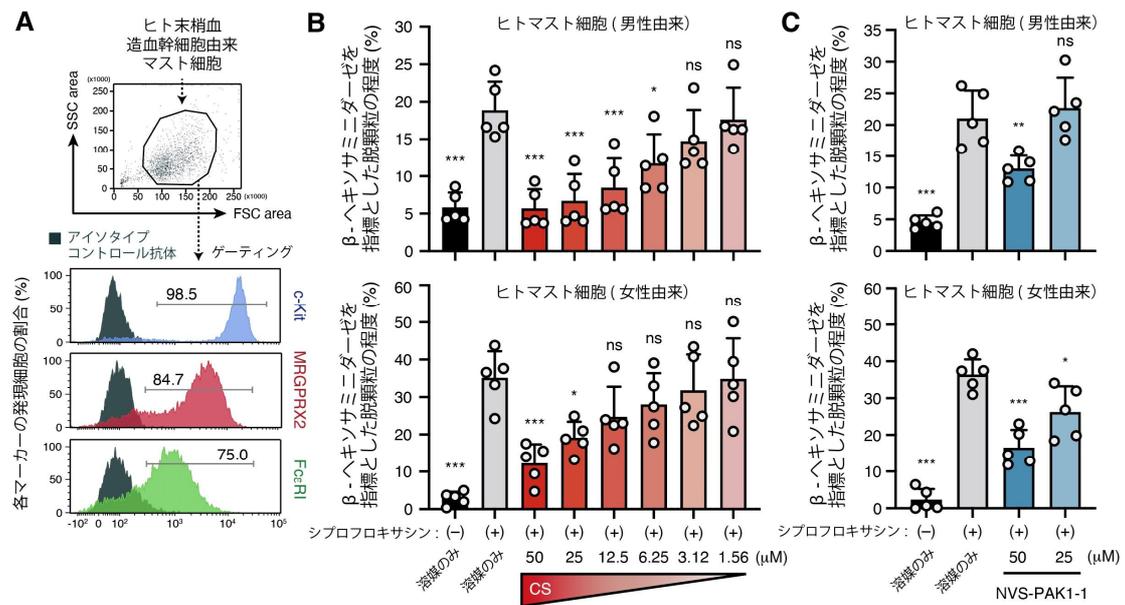
Racと脱顆粒を繋ぐ経路を明らかにする上で、Racのエフェクター分子であり、かつ、アクチン

線維による細胞骨格を制御する分子「PAK1」に注目した。野生型マスト細胞を薬剤で刺激するとPAK1の活性化に関わるアミノ酸残基がリン酸化される一方、DOCK2欠損マスト細胞ではそのリン酸化が障害されていた(下図:A)。

また、野生型マスト細胞をPAK1選択的なアロステリック阻害剤であるNVS-PAK1-1で処理するとPAK1リン酸化が障害されるとともに、脱顆粒反応も抑制された(下図:B)。以上のことから、MRGPRX2/B2の下流で脱顆粒に至るまでにはDOCK2-Rac-PAK1経路が重要であることが明らかになった。



最後に、今までの知見がヒトにおいても当てはまるかどうか検証するため、男女それぞれより健康人由来の末梢血からCD34陽性造血幹細胞を採取し、各種成長因子とともに培養することでMRGPRX2を発現するマスト細胞を得た(下図:A)。その上で、DOCK2阻害剤(コレステロール硫酸)やPAK1阻害剤(NVS-PAK1-1)でヒトマスト細胞を処理すると、薬剤誘導性の脱顆粒が抑制されることが分かった(下図:B、C)。



以上の結果より、マウスおよびヒトにおいて DOCK2-Rac-PAK1 経路が薬剤誘導性の脱顆粒反応を制御しており、薬剤性アナフィラキシー制圧の鍵になることが明らかとなった。また、DOCK2阻害剤として今回用いたコレステロール硫酸は私達の身体で合成されている天然物質であり、異物に対する過剰なアレルギー反応が起きないよう生理的な意義を持っている可能性がある。

さらに、最近の臨床研究によるとマスト細胞の MRGPRX2 を介した反応は慢性蕁麻疹や皮膚肥満細胞症、接触性皮膚炎などに関連していることが指摘されており、本知見の各種アレルギー疾患制御への応用も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kunimura Kazufumi, Akiyoshi Sayaka, Uruno Takehito, Matsubara Keisuke, Sakata Daiji, Morino Kenji, Hirotsu Kenichiro, Fukui Yoshinori | 4. 巻 151 |
| 2. 論文標題 DOCK2 regulates MRGPRX2/B2-mediated mast cell degranulation and drug-induced anaphylaxis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology | 6. 最初と最後の頁 1585-1594 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jaci.2023.01.029 | 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 國村 和史、福井 宣規 |
| 2. 発表標題 薬剤アナフィラキシーに関わるMRGPRB2/X2受容体のシグナル経路の解明 |
| 3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|-----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 國村 和史 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 科学評論社 | 5. 総ページ数 - |
| 3. 書名 月刊 臨床免疫・アレルギー科, 第77巻・第3号 | |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|