

## 論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名：大林 昂右

学位の種類：博士（薬学）

学位記番号：博（薬）甲第六号

学位授与年月日：令和5年3月3日

### 審査委員

主査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 常岡 誠



副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 福地 守



副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 中道 範隆



### 論文題目

マスト細胞におけるプリン作動性シグナルを介した サイトカイン産生亢進機構の解析  
— Mechanism of enhanced cytokine production mediated by purinergic signals in mast cells —

#### 【論文の内容の要旨】

Adenosine triphosphate (ATP) は、細胞呼吸のもと細胞の代謝によって常に供給される重要な細胞内エネルギー源であり、細胞質内に高濃度で存在する。細胞はこの貴重な ATP を細胞間情報伝達物質として細胞外に放出し、P2 受容体と呼ばれる多様な受容体を介して様々な生理機能を調節していることが明らかになってきた。当初、ATP は腸、膀胱、精嚢などの臓器の平滑筋収縮を調節する非コリン作動性、非アドレナリン作動性神経伝達の伝達物質として注目されていた。しかし、組織の損傷や機械的刺激により、ダメージ関連分子として ATP が大量に放出され、免疫細胞の制御に重要な役割を果たすことが分かってきた。

マスト細胞は、生体内で外界と接する皮膚や気道、消化管粘膜ならびに血管周囲に分布する免疫細胞で、外界からの異物の侵入に対して最初に応答し、種々のアレルギー炎症反応において中心的な役割を果たしている。今日の日本では 2 人に一人が何らかのアレルギー反応を示すことが知られており、国民病の一つとしてその対応が重要な課題になっている。マスト細胞には様々な P1 および P2 プリン作動性受容体の発現が報告されているが、プリン受容体を介した機能調節については、他の免疫細胞のリンパ球やマクロファージ、好中球などと比較して限られた情報しか明らかになっていない。我々はマウス骨髄由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cells ; BMDCs) を用いて、細胞外 ATP のマスト細胞における役割を詳細に検討し、ATP がイオンチャネル型 P2X4 受容体(P2X4R)を介して抗原刺激による脱顆粒反応を相乗的に亢進することを報告した。また、P2X4R 刺激作用は、抗原

非依存的な刺激、すなわち Gi 蛋白質と結合したプロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub> の EP<sub>3</sub> 受容体 (EP<sub>3</sub>R) や Adenosine の A<sub>3</sub> 受容体との共刺激により、顕著な脱顆粒反応を誘導することを見出した。さらに、このような抗原依存性および抗原非依存性の脱顆粒反応の増強は、in vivo でのアレルギー反応の重症度に影響を及ぼすことも判明した。以上の結果から、P2X<sub>4</sub>R を介した脱顆粒反応の増強はアレルギー反応を理解する上で重要であると考えられた。

マスト細胞は、ヒスタミン、セロトニン、各種プロテアーゼなどの顆粒内容物を放出することにより即時型アレルギー反応を引き起こすだけでなく、遅延型反応として各種ケモカイン、サイトカインを産生し、アレルギー性炎症反応にも深く関与する。しかし、マスト細胞におけるサイトカイン産生におけるプリン作動性制御機構は未解明の課題として残されていた。そこで BMMCs を用いて、細胞外 ATP が抗原および非抗原刺激によるサイトカイン産生に影響を与えるか検討を行い、この反応に関与する受容体およびシグナル伝達経路の解析を行った。

本研究において細胞外 ATP が抗原や PGE<sub>2</sub> との共刺激により、炎症性サイトカイン interleukin (IL)-6 と腫瘍壊死因子 (TNF)- $\alpha$ 、Th-2 サイトカイン IL-13 の遺伝子発現と分泌を顕著に増加させることを明らかにした。受容体作動薬および阻害薬を用いた薬理的解析により、ATP および PGE<sub>2</sub> の効果は、脱顆粒反応への影響と同様に、それぞれ P2X<sub>4</sub>R および EP<sub>3</sub>R によって媒介されることが明らかとなった。ATP 誘発効果への P2X<sub>4</sub>R の関与は、P2X<sub>4</sub>R ノックアウトマウスから調製した BMMCs を用いてさらに明確に示すことができた。PGE<sub>2</sub> と ATP の共刺激によるサイトカイン分泌の増大は、mRNA レベルの上昇を伴っていた。すなわち、P2X<sub>4</sub>R と EP<sub>3</sub>R の共刺激シグナルは炎症性サイトカインの転写を促進することが示唆された。nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) は、様々な炎症性サイトカインの転写に関与している。BMMCs を ATP または PGE<sub>2</sub> 単独で刺激しても NF- $\kappa$ B の活性化状態を示すリン酸化 p65 の蓄積は顕著でなかったが、共刺激を行うと顕著なリン酸化 p65 の蓄積が認められ、この現象がサイトカイン産生亢進と密接に関係すると考えられた。実際、このリン酸化 p65 の蓄積は、P2X<sub>4</sub>R ノックアウトマウスから調製した BMMCs では認められなかった。EP<sub>3</sub>R の下流シグナルのうち、extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 と phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt の活性化が NF- $\kappa$ B シグナル経路に関与することが示唆されている。PGE<sub>2</sub> 刺激は ERK1/2 および Akt のリン酸化を強力に促進することから P2X<sub>4</sub>R の刺激は、ERK/Akt 経路による NF- $\kappa$ B の活性化を促進している可能性が考えられた。この考えは、PI3K 阻害剤や ERK 阻害剤、そして NF- $\kappa$ B 阻害剤により PGE<sub>2</sub> と ATP の共刺激による炎症性サイトカイン発現の上昇が抑制された結果と一致する。一方、P2X<sub>4</sub>R シグナル側の要因としては、細胞内 Ca<sup>2+</sup>キレート薬とカルシニューリン阻害薬の抑制作用から、P2X<sub>4</sub>R の活性化による Ca<sup>2+</sup>流入がカルシニューリンの活性化を介して nuclear factor of activated T cells (NFAT) を活性化している可能性が示唆された。このように、PGE<sub>2</sub> と ATP の共刺激は転写因子である NF- $\kappa$ B と NFAT の活性化を介して炎症性サイトカイン発現を亢進していると考えられた。

本研究結果から、マスト細胞の機能調節における P2X<sub>4</sub>R の重要性が明らかとなり、アレルギー疾患に対する新規治療薬開発において P2X<sub>4</sub>R を標的とする戦略は有用な可能性を持

つと考えられる。

#### 【論文審査の結果の要旨】

細胞内で作られた ATP は様々な方法で細胞外に放出される。細胞外の ATP は細胞表面に存在する数種のプリン受容体によって認識され、シグナル伝達物質として作用する。大林氏らはこれまでに、BMBCs における細胞外ヌクレオチドの役割を研究し、ATP がイオンチャンネル型 P2X4R を介して抗原刺激による脱顆粒反応を亢進すること、プロスタグランジン E2 の EP<sub>3</sub>R やアデノシン A2 受容体との共刺激により、脱顆粒反応を誘導することを報告してきた。これらはアレルギー応答を理解する上で重要である。一方、マスト細胞は遅延型の反応として各種サイトカインを産生する。サイトカイン産生もアレルギー応答に貢献するが、プリン作動性シグナルの関与は明らかにされていない（第1章）。本研究において、大林氏はサイトカイン産生における ATP と抗原刺激及び ATP と PGE<sub>2</sub> との相互作用を発見した。特に IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$  において ATP と PGE<sub>2</sub> の組み合わせによる相乗効果が顕著であったことから、ATP と PGE<sub>2</sub> の組み合わせについてさらに研究を進めた。時間依存性及び用量依存性に関して適当な測定条件を探し、100  $\mu$ M ATP と 0.1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> による刺激後 3 時間でのサイトカイン放出及び 1 時間での mRNA 発現が適当であると判断し、この条件で検討を進めた（第2章）。PGE<sub>2</sub> によるサイトカイン発現に及ぼすプリン受容体について、各種プリン受容体のアゴニストやアンタゴニスト、さらにノックアウトマウスからの BMBCs を用いて検討したところ、多数のプリン受容体の中で、特に P2X4R が PGE<sub>2</sub> との相乗効果に責任あることを明らかとした（第3章）。次に PGE<sub>2</sub> の受容体について検討し、各種アゴニスト・アンタゴニストを用いた実験結果から、EP<sub>3</sub>R が重要であることが示された。この結果は BMBCs に EP<sub>3</sub>R が大量に発現していることと一致した。上記結果は、サイトカイン産生が P2X4R と EP<sub>3</sub>R の組み合わせによる相乗効果により強く誘導されることを示している（第4章）。この組み合わせは BMBCs の脱顆粒亢進の組み合わせと同一であった。ATP と PGE<sub>2</sub> によるサイトカイン産生に関係する細胞内のシグナル伝達系を、ウエスタンブロットによる候補シグナル系の蛋白質のリン酸化の検出及びシグナル伝達系の阻害薬を用いて検討したところ、PI3K-AKT 経路、MEK-ERK 経路、Ca<sup>2+</sup>-NF- $\kappa$ B 経路、Ca<sup>2+</sup>-カルシニューリン経路の関与が示唆された（第5章）。以上の結果は、プリン作動性シグナルによるアレルギー惹起の機構を理解する上で新しい知見を提供する。

論文精査の結果、審査員よりいくつか意見が寄せられた。まず、この結果の医療への応用、観察された現象を説明する分子機構、実験結果を説明するこれまでの現状の説明、統計処理の方法、定量に関する手法、略語・図の説明について、修正が求められた。第1回目の再投稿は 1/26 になされ、かなり改善がみられたが不十分な点が残し、2/6 に第2回目の再投稿がなされた。最終的な修正論文では十分な改善がみとめられた。また、学位論文公開発表会において、“医療への応用への可能性”、“サイトカイン産生上昇における ATP と PGE<sub>2</sub> による著しい相乗効果の機構”、また“サイトカイン mRNA 量とサイトカインタンパク質量の測定の意味”についてなど、予定時間を超え多くの質問がなされた。質問の中には

論文のスコープを超えるものも含まれていたが、それらに対しても真摯な応答がなされた。大林氏の学位論文で示された発見は明瞭であり、新規医療への応用の可能性があるため実質的な議論が行われたと考えられる。今後の研究の発展が大いに期待される。以上により、論文審査および最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が博士（薬学）の学位に十分値するものであると判断した。