

2022 年度 博士論文

Mechanism of enhanced cytokine production mediated by
purinergic signals in mast cells

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

高崎健康福祉大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

学籍番号 1920101

氏名 大林 昂右

指導教員 松岡 功

目次

略語表	iv
第 1 章 序論	1
第 2 章 マスト細胞の抗原および PGE ₂ によるサイトカイン産生に及ぼす細胞外 ATP の作用に 関する解析	4
2-1 緒言	4
2-2 実験材料および方法	5
1) 試薬	5
2) マウス	6
3) 細胞培養	6
4) サイトカイン放出量の測定	7
5) 遺伝子発現量解析	7
6) 統計処理	8
2-3 結果	9
1) BMBCs の抗原および PGE ₂ によるサイトカインの遺伝子発現と放出に及ぼす ATP の作用	9
2) サイトカイン放出に及ぼす ATP と PGE ₂ の時間依存性	11
2-4 考察	13
第 3 章 BMBC のサイトカイン産生に影響を及ぼす ATP 受容体の解析	15
3-1 緒言	15
3-2 実験材料および方法	16
1) 試薬	16

2) マウス	16
3) 細胞培養.....	16
4) サイトカイン放出量の測定	16
5) 遺伝子発現量解析.....	16
6) 統計処理.....	16
3-3 結果.....	17
1) BMMC における PGE ₂ による IL-6、IL-13 および TNF- α の遺伝子発現に及ぼす種々の プリン受容体刺激薬の影響.....	17
2) ATP と PGE ₂ の共刺激によるサイトカインの遺伝子発現と放出増強における P2X4 受容 体の役割	18
3-4 考察.....	20
第 4 章 マスト細胞のサイトカイン産生に影響を及ぼす PGE ₂ 受容体の解析	21
4-1 緒言	21
4-2 実験材料および方法	22
1) 試薬.....	22
2) マウス	22
3) 細胞培養.....	22
4) サイトカイン放出量の測定	22
5) 遺伝子発現量解析.....	22
4-3 結果.....	23
1) ATP と PGE ₂ の共刺激によるサイトカイン放出と遺伝子発現の増強における EP ₃ 受容体の 役割	23

4-4 考察.....	25
第5章 ATPとPGE ₂ の共刺激におけるシグナル伝達経路の解析.....	26
5-1 緒言.....	26
5-2 実験材料および方法.....	26
1) 試薬.....	26
2) マウス.....	27
3) 細胞培養.....	27
4) ウェスタンブロット.....	27
5) 遺伝子発現量解析.....	28
6) 統計処理.....	28
5-3 結果.....	28
1) ERK/Akt/NF- κ B シグナル伝達経路に対するATPおよびPGE ₂ の影響.....	28
2) ATPとPGE ₂ の共刺激によるサイトカイン遺伝子発現増強に対するシグナル伝達経路阻 害剤の影響.....	29
5-4 考察.....	31
第6章 総括.....	33
謝辞.....	35
参考文献.....	36

略語表

本論文においては以下の略語を用いた

Ade : adenosine

ADP : adenosine diphosphate

AMP : adenosine monophosphate

ATP : adenosine triphosphate

BMDCs : bone marrow-derived mast cells

BSA : bovine serum albumin

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CCL : C-C motif chemokine ligand

CD73 : ecto-5'-nucleotidase

cDNA : complimentary DNA

CXCL : C-X-C motif chemokine ligand

DEX : dexamethasone

DNA : deoxyribonucleic acid

DNase : deoxyribonuclease

DNP-HSA : dinitrophenyl-conjugated human serum albumin

E-ALP : ecto-alkaline phosphatase

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA : enzyme-linked immune sorbent assay

E-NPP : ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase

E-NTPD : ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase

ERK : extracellular signal-regulated kinase

FBS : fetal bovine serum

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HEPES : 4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid

HRP : horseradish peroxidase

Ig : immunoglobulin

I κ B : Inhibitor of κ B

IKK : I κ B kinase

IL : interleukin

KRH : krebs ringer hepes buffer

LPS : lipopolysaccharide

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MCP : monocyte chemoattractant protein

MIP : macrophage inflammatory protein

M-MLV RT : moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

mRNA : messenger RNA

NFAT : nuclear factor of activated T cells

NF- κ B : nuclear factor-kappa B

PBS (-) : Mg²⁺, Ca²⁺ free リン酸緩衝液

PCR : polymerase chain reaction

PE : phycoerythrin

PG : prostaglandin

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PL : phospholipase

PVDF : polyvinylidene difluoride

RNA : ribonucleic acid

RNase : ribonuclease

RPMI : Roswell park memorial institute medium

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction

SCF : stem cell factor

SDS : sodium dodecyl sulfate

TBS-T : tris-buffered saline-tween

TGF : transforming growth factor

TNF : tumor necrosis factor

UDP : uridine diphosphate

UTP : uridine triphosphate

第1章 序論

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、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 [1]。細胞外に放出されたATPは、P2受容体と呼ばれる多様な受容体によって認識される (図1)。イオンチャネル型のP2X受容体には7つのサブタイプ (P2X1-7) が存在し、ATPのみを認識して非選択的なカチオンチャネルを開く [2]。一方、G蛋白質共役型のP2Y受容体は、ヒトではP2Y₁、Y₂、Y₄、Y₆、Y₁₁₋₁₄の8つのサブタイプが同定されており、リガンドはATPだけでなくadenosine diphosphate (ADP)やuridine triphosphate(UTP)、uridine diphosphate(UDP)、UDP-グルコースなどのウリジヌクレオチドも認識する [3]。受容体の活性化は、G蛋白質依存性のシグナルによって細胞内に伝達される [3]。また、細胞外のATPは様々な細胞外ATP分解酵素

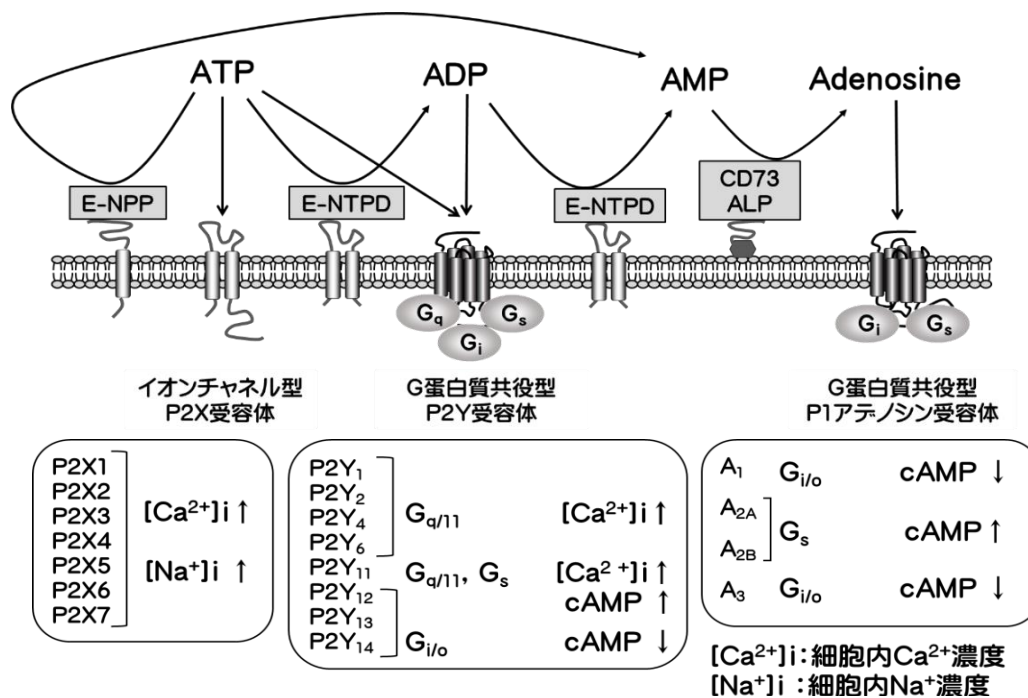


図 1. プリン作動性シグナルの概要

細胞外 ATP およびその分解産物を認識するプリン受容体と細胞内シグナルを示した。ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPD)、ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP)、ecto-5'-nucleotidase (CD73)、ecto-alkaline phosphatase (E-ALP)は、いずれも ATP の分解に関与する酵素である。

素によって速やかにadenosine (Ade)に脱リン酸化され、Gi共役型のA₁、A₃受容体、Gs共役型のA_{2A}、A_{2B}受容体など、別のP1 Ade受容体に作用する [4]。このように、ATPは空間的・時間的に多様な細胞間情報伝達物質として生理機能の調節に関与している (図 1)。

当初、ATPは腸 [5]、膀胱 [6]、精囊 [7]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 [8]。例えば、アポトーシス細胞から放出されるATPやUTPは、好中球 [9]、マクロファージ [10]、リンパ球 [11]のP2Y受容体やAde受容体を刺激し、患部への遊走を促進する。マクロファージでは、P2X7受容体の刺激により、インフラマソームが活性化され、interleukin (IL)-1 β のプロセッシングが促進され、IL-1 β の放出が誘導される [12]。ミクログリアにおけるP2X4受容体(P2X4R)の活性化は、神経障害性疼痛の誘発に不可欠な役割を担っている [13]。

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 [14]。例えば、高濃度のATPでマスト細胞を刺激すると、P2X7受容体を介して直接脱顆粒反応が起こり、炎症性腸疾患 [15]や皮膚過敏症 [16]の病態形成に関与していることが報告されている。また、Adeは A₃ 受容体を介して抗原刺激による脱顆粒反応を促進する [17]。G蛋白質共役型P2Y受容体もマスト細胞に多く発現しているが、その作用はモデル細胞株におけるP2Y₁₃およびP2Y₁₄受容体の刺激による抗原誘発性脱顆粒反応の促進が報告されているのみである [18][19]。このような背景のもと、我々はマウス骨髄由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cells ; BMMCs)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がイオンチャンネル型

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 [20]。さらに、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)E₂のEP₃受容体(EP₃R)やAdeのA₃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 [21]。また、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 [20]。このように、P2X4R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 [22]。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。そこで本研究では、第2章において細胞外ATPがマスト細胞の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した。その過程でサイトカイン産生におけるATPとPGE₂の顕著な相互作用が認められたため、第3章でATPの反応、第4章でPGE₂の反応に関与する其々の受容体の解析を行った。そして、第5章においてこれらの受容体のシグナル伝達経路の解析を行った。

第2章 マスト細胞の抗原および PGE₂によるサイトカイン産生に及ぼす細胞外 ATP の作用に関する解析

2-1 緒言

マスト細胞は骨髄由来の免疫担当細胞の 1 つであり、皮膚や気道粘膜、腸管粘膜などに多く存在し、寄生虫や細菌感染症などに対する防御機能において重要な役割を担っている。マスト細胞にはヒスタミン、セロトニンなどの生理活性アミンや種々のプロテアーゼなどあらかじめ合成されたケミカルメディエーターが顆粒内に貯蔵されている。マスト細胞は、活性化されると貯蔵された顆粒内容物を放出するとともにロイコトリエンなど脂質メディエーターを産生することで、即時型アレルギー反応を引き起こす。さらに遅発性の反応として腫瘍壊死因子 (TNF)- α 、インターロイキン (IL)-6、IL-13 などのサイトカインの de novo 産生が亢進しアレルギー性炎症の遷延や増悪に関与する [23]。マスト細胞によるサイトカイン産生は、抗原や Compound 48/80、lipopolysaccharide (LPS) などによって亢進することが分かっている [22]。マスト細胞の活性化を引き起こす典型的な機序として、細胞に発現する高親和性イムノグロブリン E (IgE) 受容体である Fc ϵ RI に結合した IgE が抗原を認識し、架橋されて複合体を形成して惹起される機構が知られている [24]。また、マスト細胞の活性化は様々な因子によって制御されており、幹細胞増殖因子 (stem cell factor ; SCF) や Ade、PGE₂ などは抗原による IgE- Fc ϵ RI を介した反応を増強し、逆にアドレナリン β_2 受容体刺激などで細胞内 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 濃度が上昇するとマスト細胞の機能が阻害される [25][26]。細胞外 ATP やヌクレオチドもマスト細胞の機能に影響しており、高濃度 ATP はマスト細胞の P2X7 受容体を介して直接脱顆粒反応を生じさせ、炎症性腸疾患 [15] や皮膚過敏症 [16] の病態形成に関与していることが報告されている。我々はこれまでに BMMC_s を用いて、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促進する [20] とともに、PGE₂ や Ade などの本来単独では脱顆粒を惹起しない G 蛋白質共役型受容体刺激が ATP による P2X4R 共刺激により顕著な抗原非依存的脱顆粒反応を誘発することを報告した [21]。

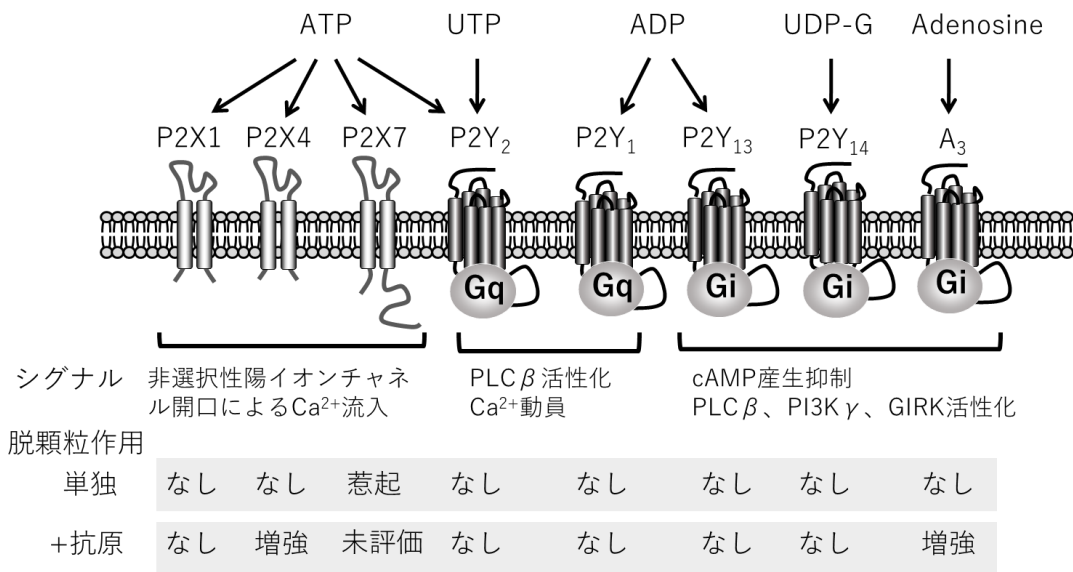


図 2. マウス骨髄由来マスト細胞に発現するプリン受容体サブタイプとそのシグナルおよび脱顆粒反応に及ぼす影響

BMMCs に発現しているプリン受容体と、それぞれの受容体に特異的に作用する内因性アゴニストと受容体により活性化されるシグナルを示した。下段にはそれぞれのプリン受容体刺激が抗原非存在下(単独)および存在下での脱顆粒反応に及ぼす影響を示した。

図 2 にこれまで本研究室で明らかにされた BMMCs に発現する P2 受容体ファミリーと脱顆粒反応に及ぼす影響を示す。一方、序論で述べたようにマスト細胞は、脱顆粒反応は即時型アレルギーの病態を形成するが、引き続いて様々なサイトカイン産生を介して遅発性アレルギー性炎症反応にも関与することが知られているが、マスト細胞のサイトカイン産生において細胞外 ATP がどのような役割を担っているか明らかになっていない。図 2 に示すようにマスト細胞には多様な P2X および P2Y 受容体サブタイプが発現しておりサイトカイン産生には脱顆粒反応とは異なる制御機構がある可能性も考えられる。そこで、本章では 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どのような影響を与えるか検討した。

2-2 実験材料および方法

1) 試薬

本章で示した実験に使用した試薬とその入手先は以下のとおりである。Roswell park memorial institute (RPMI) 1640 medium: 和光純薬。IL-3、SCF : Peprotech。TB

Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)、 Random Primer (hexadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)₆), ribonuclease (RNase) inhibitor:タカラバイオ。Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) :Invitrogen。ATP、PGE₂、GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit、bovine serum albumin (BSA)、dinitrophenyl-conjugated human serum albumin (DNP-HSA)、抗DNP-IgE抗体 (clone: SPE-7) :Sigma-Aldrich。Phycoerythrin (PE)-conjugated anti FcεRI antibody (clone: MAR-1) :Affymetrix japan。Allophycocyanin (APC)-conjugated anti c-KIT antibody (clone: 2B8) :BD biosciences。Mouse IL-1 β、IL-6、IL-13、TNF-α enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) kits :Thermo Fisher Scientific、その他の試薬については市販の特級試薬あるいはそれに準ずるものを用いた。

2) マウス

C57BL/6マウスはSLCより購入し、12時間明暗周期のSPF区域で飼育した。これらのマウスを用いる実験計画は高崎健康福祉大学の動物実験委員会において承認され、施設の規定に基づいて行った(承認番号:2033)。

3) 細胞培養

RPMI1640培地はfetal bovine serum (FBS) (10 %)、ペニシリン(100 units/mL)、ストレプトマイシン(100 μg/mL) を加えて増殖培地とした。BMMCsは6 - 12週齢のC57BL/6マウス大腿骨から採取した骨髓細胞より調製した。マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、全身に70 % エタノールを噴霧してから、両足の大腿骨を採取した。採取した大腿骨の両端を切除した後、70 % エタノールを噴霧したディッシュに回収した。以下の操作はクリーンベンチ内で行った。37 °Cに加温したRPMI1640培地を注射筒に充填し、25 Gの注射針を用いて、大腿骨内の骨髓細胞を1.5 mLチューブに回収し、400 gで3 分間遠心分離した。上清を捨て、ammonium-chloride-potassium lysateバッファー(150 mM NH₄Cl、10 mM KHCO₃、1 mM EDTA・2Na) を加えてよく懸濁し、氷上で5分間インキュベーションすることで赤血球を溶血した。再度、400 gで3分間遠心分離し上清を捨て、IL-3 (10 ng/mL) を含んだRPMI1640培地に懸濁し培養した。以降の培養は全てIL-3 (10 ng/mL) を含んだRPMI1640培地を用いた。3~4日ごとに培地を交換し非接着細胞を培養した。2週目以降はIL-3 (10 ng/mL) 及びSCF (10 ng/mL) を加えたRPMI1640培地で培養した。30~40日間培養し、接着細胞がほとんどない状態

になってから、フローサイトメトリー(FACSCant II、BD Biosciences) によってBMMCsのマーカであるFc ϵ RIとc-Kitが両陽性の細胞が95%以上であることを確認して実験に用いた。

4) サイトカイン放出量の測定

測定に用いるBMMCsは、RPMI1640増殖培地に50 ng/mL 抗DNP-IgEを加えて一晩感作した。細胞を0.1%BSAを含むRPMI1640培地で2回洗浄し、その後37°Cで様々な条件下で刺激した。遠心分離により反応を終了させ、上清および細胞ペレットをそれぞれELISAによるサイトカイン測定およびRNA抽出に用いた。

5) 遺伝子発現量解析

BMMCsからのmRNA抽出はGenElute Mammalian Total RNA Purification Kitを用いた。抽出したmRNA溶液の濃度および260 nmと280 nmの吸光度比(260/280) が1.8以上であることをNano drop (Thermos Fisher Scientific) を用いて確認した。cDNAの合成は、抽出したmRNA 0.5 ~ 1.5 μ gを鋳型として行った。鋳型とするmRNA溶液、ランダムプライマー 1 μ L、Milli-Q水 3 μ Lを混合し、サーマルサイクラーを用いて95°Cで2分間処理した後に4°Cで冷却させた後、5 \times first strand buffer 2 μ L、5 mM deoxynucleotide triphosphate 1 μ L、0.1 M dithiothreitol 1 μ L、M-MLV RT 0.5 μ L、RNase inhibitor 0.5 μ Lを混合した反応液を加え、37°Cで90分間反応させた。さらに、98°Cで5分間加熱し、反応を停止させ、Milli-Q水 90 μ Lを加えてcDNA溶液とした。reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)は、作成したcDNA溶液 2 μ L、10 μ M プライマー mix 1 μ L、SYBR Green premix 3 μ L、Milli-Q水 4 μ Lを含む全量 10 μ Lの反応液をreal time PCR system MX3000P (STRATAGENE) にセットし、1サイクルを95°C 15秒、56°C 20秒、72°C 50秒の条件で40サイクル反応させて行い、遺伝子発現量を解析した。

RT-PCRで用いたプライマーは以下の塩基配列である。

Target	Sense	Antisense
IL-1 β	AGCCTCGTGCTGTCCGACCC	TCCAGCTGCAGGGTGGGTGT
IL-4	CCAGCTAGTTGTCATCCT	CTGTGGTGTTCCTTCGTTG
IL-5	ACAGTGGTGAAAGAGACCTT	GGAATAGCATTTCACAGTACC
IL-6	TTCCTCTCTGCAAGAGAC	CACGATTTCCAGAGAAC
IL-10	TGCCTTCAGTCAAGTGAAGACT	AAACTCATTTCATGGCCTTGTA
IL-12b	TGTGTCCTCAGAAGCTAACC	TCCAGAGCCTATGACTCCA
IL-13	GCCAAGATCTGTGTCTCT	ATATCCTCTGGGTCCTGT
TGF- β	GTCTGGATCAGGTTTACCAC	AATCTCTGCCTCTCGGAA
TNF- α	GCACAGAAAGCATGATCC	TGGGCCATAGAAGTATG
MCP-1(CCL-2)	CTTCTGGGCCTGCTGTTCA	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
MIP-1 α (CCL-3)	ACAAGCAGCAGCGAGTACCA	CATGATGTTGAGCAGGTGTACCA
CXCL-1	GCGAAAAGAAGTGCAGAGAG	ATGCCCTACCAACTAGACAC
CXCL-2	CATCCAGAGCTTGAGTGTGACG	GGCTTCAGGGTCAAGGCAAAC
CXCL12	TCCAAACTGTGCCCTTCA	CTTTGGGCTGTTGTGCTT
CCL-17	AGACCTTCACCTCAGCTT	TAATCCAGGCAGCACTCT
CCL-22	TGGTGCCAATGTGGAAGA	CGGCACAGATATCTCGGTT
GAPDH	TGCTGAGTATGTCGTGGAGT	CATACTTGGCAGGTTTCTCC

6) 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で示した。2群間の比較にはStudent's *t*-testを用いた。P値は0.05より小さい時、統計的に有意な差があるとみなした。

2-3 結果

1) BMMCs の抗原および PGE₂ によるサイトカインの遺伝子発現と放出に及ぼす ATP の作用

まず、BMMCsにおいて各種サイトカイン、ケモカインの遺伝子発現がATP存在下でPGE₂または抗原DNP-HASによって如何に変化するかRT-PCRにより検討した（表1）。本研究で使用したBMMCsは、未刺激の状態ではTGF-β、MCP-1、MIP-αを除いてmRNAの発現は少量であり、IL-4、IL-5、IL-12βなどはほとんど発現していなかった。未刺激で少量ながらも発現があるもののうち、ATP(100 μM)による刺激は、IL-4、IL-13、TNF-αおよびMIP-1αの遺伝子発現を亢進させた。PGE₂(1 μM)および低用量の抗原DNP-HSA(3 ng/mL)も多くのサイトカインの遺伝子発現を亢進させたが、ATPとの共刺激ではmRNAの発現量がさらに相乗的に亢進した。中でも、IL-1β、IL-6、IL-13、TNF-αおよびMIP-1αではATPとPGE₂の組み合わせによる相乗効果は顕著で、高濃度の抗原刺激に匹敵する発現量の亢進を示した（表1）。

	ATP (100 μM)		DNP-HAS (3 ng/mL)		PGE2 (1 μM)		DNP-HAS (30 ng/mL)	
	none							
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
IL-1β	2.61	1	1.5	2.0	7.5	4.4	15.4	7.6
IL-4	0.01	1	81	332	896	39	1387	1224
IL-5	0.05	1	1.5	1.1	10.8	2.6	8.6	2.4
IL-6	1.22	1	1.2	76	267	76	841	419
IL-10	0.46	1	0.9	1.2	1.2	1.2	1.3	2.3
IL-12b	<0.01	1	5.6	5.2	11.1	6.9	1.6	3.5
IL-13	2.51	1	20	101	260	91	660	651
IL-23	0.47	1	0.9	0.4	0.5	1.1	0.6	0.7
TGF-β	142	1	0.9	0.8	1.0	0.9	0.9	0.7
TNF-α	1.24	1	7.0	130	203	17	481	657
MCP-1	137	1	1.0	4.2	3.6	2.0	5.6	11.6
MIP-1α	12.8	1	28	61	153	28	221	321
CXCL-1	0.79	1	0.7	0.7	0.9	1.0	0.6	1.3
CXCL12	0.15	1	0.8	1.2	1.6	1.0	0.7	0.9
CCL-17	0.99	1	1.3	1.0	1.5	1.1	1.4	1.3
CCL-22	<0.01	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND

相対的 mRNA 発現量
多
少

表 1. BMMCs の抗原および PGE₂ による各種サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現に及ぼす ATP の影響

BMMCs を ATP(100 μM) 非存在下(-)または存在下(+)において抗原(DNP-HSA、3 ng/mL)または PGE₂(1 μM) で1時間刺激し、回収した total RNA を用いて各種サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量変化を RT-PCR で解析した。左の1列目は非刺激時の BMMCs が発現する mRNA 発現量を GAPDH=1000 とした時の相対量、その他の数値は非刺激時の mRNA 発現量を1とした変化量を示す。陽性対照として抗原(DNP-HSA、30 ng/mL) で刺激した時の結果を最右列に示す。

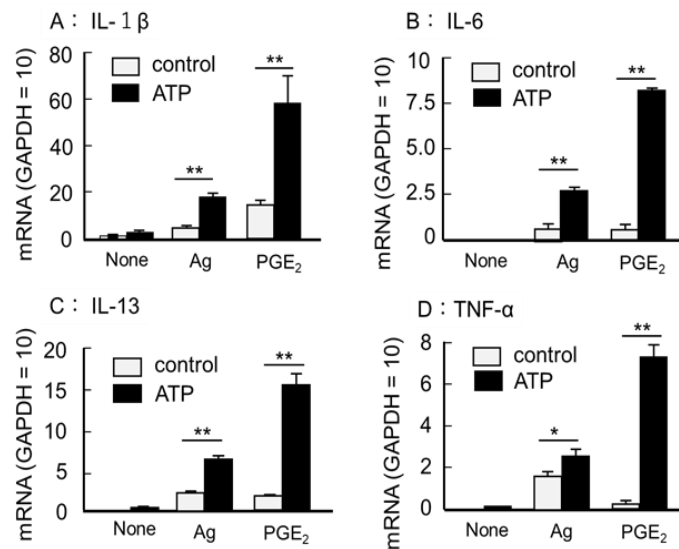


図 3. BMMCs の抗原および PGE₂ による IL-1β、IL-6、IL-13 および TNF-α mRNA 発現に及ぼす ATP の作用

BMMCs を ATP(100 μM)非存在下または存在下において抗原(DNP-HSA、10 ng/mL) または PGE₂(1 μM)で1時間刺激し、回収した total RNA を用いて IL-1β (A)、IL-6(B)、IL-13(C)および TNF-α (D)の遺伝子発現を RT-PCR 法で解析した。結果は GAPDH の発現量を 10 として平均値±標準誤差(n=3)で示す。* P<0.05、** P<0.01

以上の結果をもとに、検討した遺伝子群の内、IL-1β、IL-6、IL-13およびTNF-αの mRNA発現に対するATPの影響を詳細に検討した。この検討において、未刺激の状態では微量しか発現していなかった炎症性サイトカインのmRNA量は、ATP(100 μM)とPGE₂(1 μM)およびATP(100 μM)と低用量の抗原DNP-HSA (10 ng/mL)の共刺激により顕著に増加した (図 3)。

次に、mRNAの変化がサイトカイン放出を反映しているかどうかを検討した。ATP (100 μM)単独でBMMCsを3時間刺激してもIL-6、IL-13、TNF-αの産生にはほとんど影響がなかったが、抗原(3 ng/mL)またはPGE₂(1 μM)との共刺激によりサイトカインの放出量は顕著に増加した。その増加率および絶対値は、ともに抗原よりもPGE₂との共刺激の方が顕著であった (図 4)。一方、IL-1βはほとんど放出されなかった。そこで、以降はATPとPGE₂の共刺激によるIL-6、IL-13、TNF-αの産生を詳細に解析した。

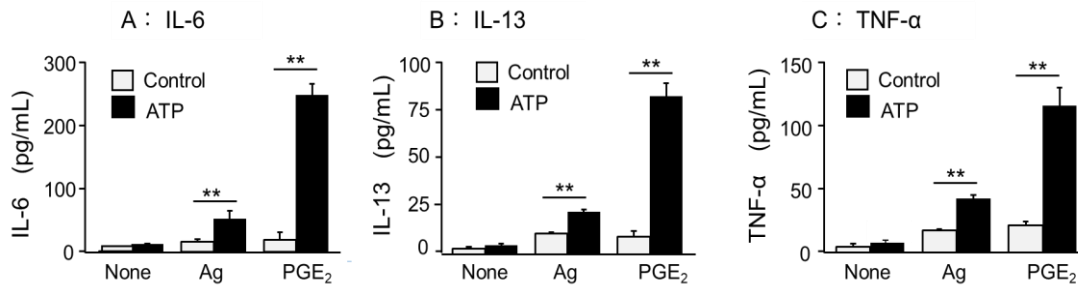


図 4. BMMCs の抗原および PGE₂ による IL-1β、IL-6、IL-13 および TNF-α 産生に及ぼす ATP の作用

BMMCs を ATP(100 μM)非存在下または存在下において抗原(DNP-HSA、10 ng/mL) または PGE₂(1 μM)で3時間刺激し、反応液を回収して IL-6(A)、IL-13(B)および TNF-α (C)の放出量を ELISA で解析した。結果は平均値±標準誤差(n=3)で示す。** P<0.01

2) サイトカイン放出に及ぼす ATP と PGE₂ の時間依存性

サイトカイン放出の増加には刺激に応じたde novo合成を伴うが、TNF-αのように顆粒に貯蔵されていたものが刺激直後に急激に放出される場合がある [27]。そこで、サイトカイン分泌量の変化の詳細な時間経過を検討した (図 5)。

ATP(100 μM) 刺激のみでは24時間まで有意なサイトカイン放出は認められなかった。一方、PGE₂(1 μM) 刺激は刺激後3時間でIL-13とTNF-α、6時間でIL-6の放出を起こした。IL-6とIL-13の産生は、ATP(100 μM) とPGE₂(1 μM) の共刺激後1時間では作用がなく、刺激後3時間で顕著な放出の増加が観察された。

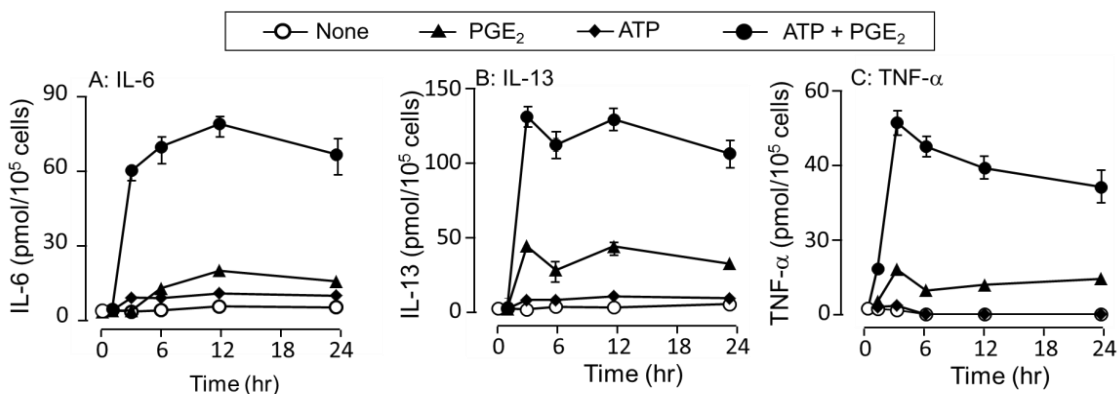


図 5. BMMCs の PGE₂、ATP および PGE₂ と ATP の共刺激による IL-6、IL-13、TNF-α 放出の時間依存性

BMMCs を ATP(100 μM)非存在下または存在下において PGE₂(1 μM)で 1、3、6、12 時間刺激し、回収した反応液中の IL-6(A)、IL-13(B)および TNF-α (C)の放出量を ELISA で測定した。結果は平均値±標準誤差(n=3)で示す。

一方、TNF- α はATPとPGE₂の共刺激1時間後に若干放出が増加し、3時間後に放出のピークを迎えた。以上の結果から、以下の実験ではサイトカイン放出を刺激後3時間、mRNA発現を刺激後1時間で検討した。

次に、異なる濃度のATPとPGE₂がIL-6、IL-13、TNF- α の放出にどのように影響を及ぼすか検討した。ATP単独では100 μ Mの濃度まではIL-6、IL-13およびTNF- α の放出を促進しなかったが1 mMでは若干の増加が認められた。PGE₂(1 μ M)存在下では、ATPは1~100 μ Mの範囲では濃度依存的にIL-6、IL-13、TNF- α の放出を増加させ、1 mMでその増強は減少した。一方、PGE₂はATP非存在下でも0.1~1 μ MでIL-6、IL-13、TNF- α の放出を惹起したが、100 μ M ATP存在下でその効果は顕著に増加した(図6)。これらの結果から、以降はサイトカインの相乗的放出を評価するための最適濃度として100 μ M ATPと0.1 μ M PGE₂を選択した。

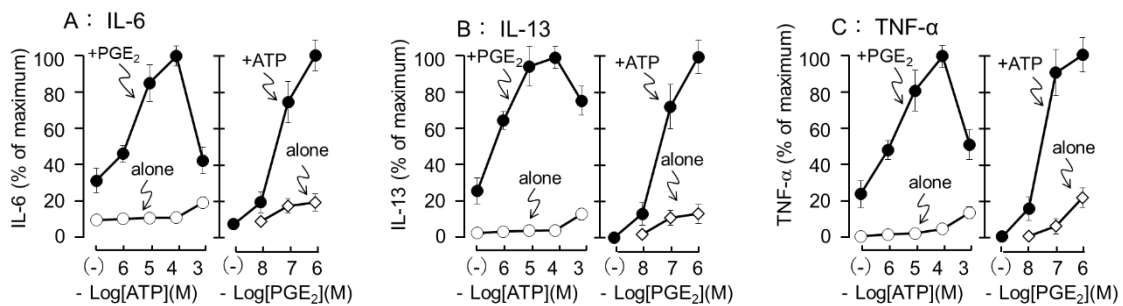


図6. BMDCsのPGE₂によるIL-6、IL-13、TNF- α 放出に及ぼすATPの濃度依存的な作用

BMDCsをATP(右、100 μ M)またはPGE₂(左、1 μ M)存在下において異なる濃度のATP(左)またはPGE₂(右)で刺激し、回収した反応液中のIL-6(A)、IL-13(B)およびTNF- α (C)の放出量をELISAで測定した。結果は平均値±標準誤差(n=3)で示す。

2-4 考察

マスト細胞は顆粒に貯蔵されたケミカルメディエーター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が、遅発期にはその後多様な炎症性サイトカインやケモカインを分泌し、他の免疫細胞の遊走や活性化を引き起こし、アレルギー性炎症が引き起こされると考えられている [22]。本章ではBMMCsにおける抗原およびPGE₂によるサイトカイン産生に及ぼす細胞外ATPの作用について検討した。未刺激状態のBMMCsではサイトカイン、ケモカインの多くがほとんど遺伝子を発現していなかったが、ATPとPGE₂および抗原の共刺激によって炎症性サイトカインのIL-1 β 、IL-6、IL-13、TNF- α の遺伝子発現が顕著に増加した。IL-6、IL-13、TNF- α はサイトカイン分泌の増加も認められたが、IL-1 β では増加しなかった。これは、IL-1 β の分泌には、活性化されたインフラマソームによってIL-1 β 前駆体がプロセッシングを受ける必要があるためであると考えられる [12]。ATPとPGE₂およびATPと低濃度の抗原刺激では、遺伝子発現が増加し、プロIL-1 β が産生されても、インフラマソームの活性化が起これず、IL-1 β の放出が生じなかったと考えられる。インフラマソームの活性化に関するシグナルとしてはP2X7受容体の活性化が知られている [12]。マスト細胞には機能的なP2X7受容体が発現していることから、より高濃度のATPの暴露によりIL-1 β の放出が促進するかを調べることは興味深い課題であると思われる。

ATPによる脱顆粒反応の増強については、抗原とPGE₂の同時刺激で最大反応に有意な差はなかった [20][21]。しかし、サイトカインの最大分泌量は、ATPとPGE₂との共刺激の方が、ATPと抗原との共刺激よりはるかに大きかった。この差は、G蛋白質共役型受容体を介するPGE₂の刺激効果と、Fc ϵ RIに共役するチロシンキナーゼカスケードを介する抗原刺激効果の違いに起因するものと思われる。例えば、Fc ϵ RIに共役するチロシンキナーゼカスケードを介する反応にはネガティブフィードバック機構が存在し、過剰な反応を抑制する機序が知られている [28]。一方、本章の結果で示したようにATPはG蛋白質共役型受容体を介するPGE₂の刺激効果を顕著に増幅したことから、ATPおよびPGE₂の作用を媒介する受容体の同定が重要であると考えられた。

ATPまたはPGE₂の濃度を固定し、異なる濃度のATPおよびPGE₂の効果を検討した結果、PGE₂存在下、ATPは1~100 μ Mの範囲で濃度依存的にIL-6、IL-13およびTNF- α の産生を亢進したが、1 mMでは相乗効果はむしろ減弱した。この結果から、

高濃度のATPで活性化するP2X7受容体 [15]の相乗効果における役割は小さいと考えられる。マスト細胞に発現しATPに応答する他の受容体の関与は、詳細な解析が必要である。一方、ATP存在下、PGE₂は10~1000 nMの範囲で濃度依存的なIL-6、IL-13およびTNF- α の産生を亢進した。PGE₂の受容体にはEP1-EP4受容体サブタイプが存在し、BMDCにはすべてのタイプの遺伝子発現が認められる。また、各受容体のPGE₂に対する親和性は10~100 nMの範囲にあり、受容体の同定に特異的なアゴニストおよびアンタゴニストを使用した解析が必要と考えられた。

マスト細胞の顆粒にはTNF- α などの炎症性サイトカインが貯蔵されており、刺激直後に急激に放出される場合がある [27]。しかし、IL-6とIL-13の産生は、ATPとPGE₂の共刺激に対して1時間後では認められず、3時間後に顕著な放出が観察された。一方、TNF- α は1時間後に既に若干の放出が認められた。この結果は、一部のTNF- α の放出には貯蔵されているプールからの放出が関与する可能性が考えられるが、3時間後に認められる顕著なサイトカイン放出は遺伝子発現を介したde novo合成に依存して放出されると考えられた。

第3章 BMMC のサイトカイン産生に影響を及ぼす ATP 受容体の解析

3-1 緒言

ATPは生命活動に必須なエネルギー通貨であり、細胞内において酸素とグルコースを消費して生産され、数mMの細胞内濃度に保たれている。一方、細胞外では様々な分解酵素の基質となり、静止時ATP濃度が数nMレベルとなっている [29]。そのため、細胞内ATPを少量放出するだけでも細胞間のシグナル伝達が可能である。ATPの細胞外への放出は、搔破などの機械刺激や生理活性物質の刺激によるヘミチャネルやアニオンチャネルの活性化を介し、体内のどの部位でも生じると考えられる [30] (図7)。図2で示したように、BMMCにはATPやその代謝物のADPおよびAdeが作用する多様なプリン受容体が発現している。すなわち、イオンチャネル型P2X受容体ではP2X1、P2X4およびP2X7受容体、G蛋白共役型ではP2Y₁、P2Y₂、P2Y₁₃およびP2Y₁₄受容体、P1 Ade受容体ではA₃受容体の発現が認められ、細胞内Ca²⁺濃度の上昇に及ぼす作用から全て生理的機能を示すレベルで発現していると考えられた [29]。

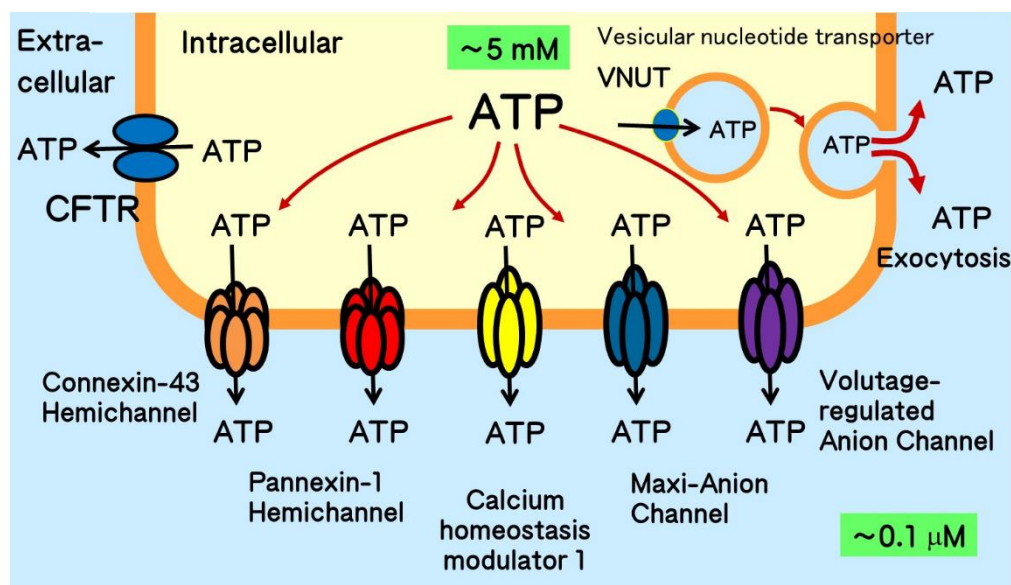


図7. 細胞からの制御されたATP 放出機構

このような多様なプリン受容体のうち、我々はこれまでにBMMCsを用いて、ATPがイオン性P2X4Rを介して抗原刺激性の脱顆粒反応を促進することを報告した [20]。しかし、サイトカイン産生においてATPがどのプリン受容体を介して作用しているのか明らか

かになっていない。そこで、本章では、マスト細胞のサイトカイン産生に影響を及ぼすATP受容体のサブタイプについて解析を行った。

3-2 実験材料および方法

1) 試薬

本章で示した実験に使用した試薬とその入手先は以下のとおりである。なお、第2章に記載したものは省略した。 α , β -methylene ATP (α β meATP)、ADP、UTP : Sigma-Aldrich。NP-1815-PX (阻害剤) : 日本ケミファ株式会社。

2) マウス

2-2-2の条件下で飼育したC57BL/6マウスおよび山本希美子博士(東京大学)により確立されたP2X4Rノックアウト(*P2rx4^{-/-}*)マウス(健大遺伝子第1604号) [31]を使用した(承認番号:2033)。

3) 細胞培養

2-2-3と同様の方法を用いてBMBCsを培養した。

4) サイトカイン放出量の測定

2-2-4と同様の方法で行った。

5) 遺伝子発現量解析

2-2-5と同様の方法で行った。

6) 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で示した。2群間の比較にはStudent's *t*-testを、多群間の検定には一元配置分散分析後、Dunnett's testを用いた。P値は0.05より小さい時、統計的に有意な差があるとみなした。

3-3 結果

1) BMMC における PGE₂ による IL-6、IL-13 および TNF- α の遺伝子発現に及ぼす種々のプリン受容体刺激薬の影響

我々の研究で使用した BMMCs は、P2X₁、P2X₄、P2X₇、P2Y₁、P2Y₂、および P2Y₁₃ など、ATP によって刺激される複数の P2 受容体を発現していた [32]。ATP が PGE₂ によるサイトカイン放出を増強する際に関与する受容体サブタイプを調べるために、様々な各P2受容体サブタイプの刺激薬の効果を検討した。使用した作動薬は、P2X₁ 作動薬の $\alpha\beta$ meATP、P2Y₁ および P2Y₁₃ 作動薬の ADP、P2Y₂ 作動薬の UTP である。このうち、ADP は IL-6 と IL-13 の発現を若干増強したが、ATP より弱かった。 $\alpha\beta$ meATP と UTP は PGE₂ の作用を増加させなかった (図 8)。また、図には示さなかったが P2Y₁₄ 受容体刺激薬の UDP-グルコースも作用を示さなかった。

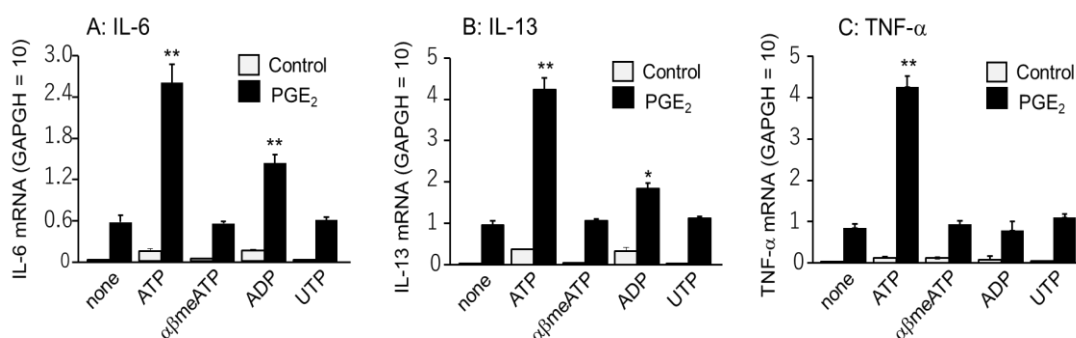


図 8. PGE₂ 刺激による BMMCs の IL-6、IL-13、TNF- α 遺伝子発現に及ぼす P2 受容体作動薬の作用

BMMCs を ATP(100 μ M)、 $\alpha\beta$ meATP(10 μ M)、ADP(100 μ M)、UTP(100 μ M) 存在下および非存在下において PGE₂(0.1 μ M) で刺激し、回収した total RNA を用いて IL-6(A)、IL-13(B) および TNF- α (C) の遺伝子発現を RT-PCR 法で解析した。結果は GAPDH の発現量を 10 として平均値 \pm 標準誤差(n=3) で示す。

* P<0.05、** P<0.01 vs PGE₂ 単独

2) ATP と PGE₂ の共刺激によるサイトカインの遺伝子発現と放出増強における P2X4 受容体の役割

図 8に示した種々のP2作動薬に対する反応は、P2X4Rを介した抗原およびPGE₂によるマスト細胞の脱顆粒反応への影響と同様であった。そこで、P2X4R阻害剤であるNP-1815-PX [33]のサイトカイン放出への影響を検討した。NP-1815-PX (10 μM)はPGE₂によるサイトカイン放出には影響を与えなかったが、ATPによる反応増強を有意に抑制した (図 9)。

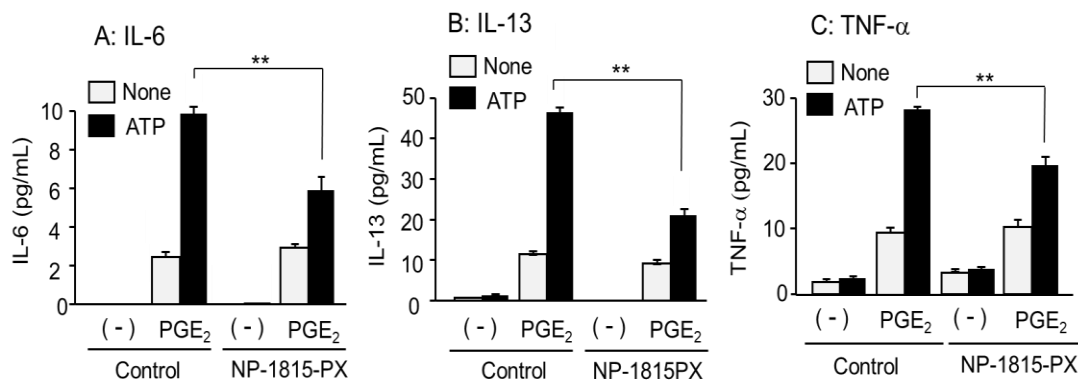


図 9 .BMMCs の ATP と PGE₂ の共刺激による IL-6、IL-13、TNF-α 放出増強に及ぼす P2X4 受容体阻害薬の作用

BMMCs を溶媒または P2X4 阻害剤である NP-1815-PX(10 μM)で 10 分間処理した後、ATP (100 μM)非存在下または存在下において PGE₂ (0.1 μM)で 3 時間刺激し、回収した反応液中の IL-6(A)、IL-13(B)および TNF-α (C)の放出量を ELISA で測定した。結果は平均値±標準誤差(n=3)で示す。** P<0.01

さらにP2X4Rの関与を明らかにするために、*P2rx4*^{-/-}マウスから調製したBMMCsを用いて検討した。*P2rx4*^{-/-}マウスのBMMCsでは、ATP(100 μM)とPGE₂ (0.1 μM)の共刺激によるサイトカインmRNA発現 (図 10)およびサイトカイン分泌の増大は認められなかった (図 11)。

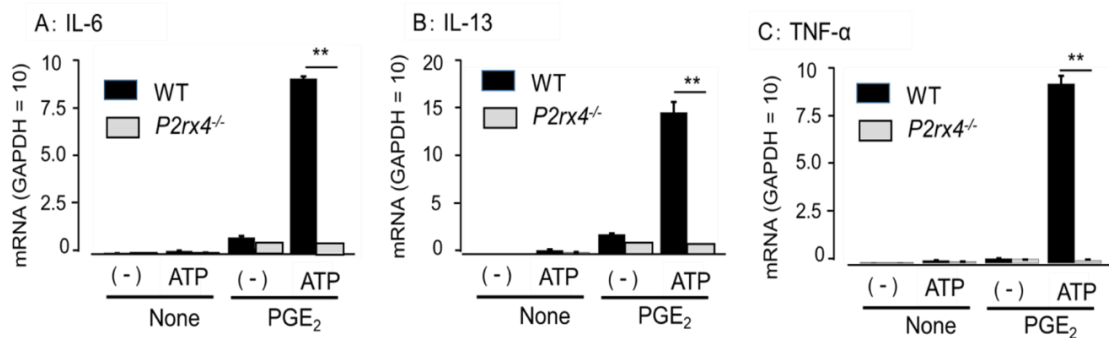


図 10. 野生型マウス(Wild type;WT)および P2X4 受容体ノックアウトマウス(*P2rx4*^{-/-})由来の BMMCs における PGE₂によるサイトカイン mRNA 発現に及ぼす ATP の作用

WT または *P2rx4*^{-/-}マウスから作製した BMMCs を ATP(100 μM)非存在下または存在下において PGE₂(1 μM)で 1 時間刺激し、回収した total RNA を用いて IL-6(A)、IL-13(B)および TNF-α (C) の遺伝子発現を RT-PCR 法で解析した。結果は GAPDH の発現量を 10 として平均値±標準誤差 (n=3)で示す。** P<0.01

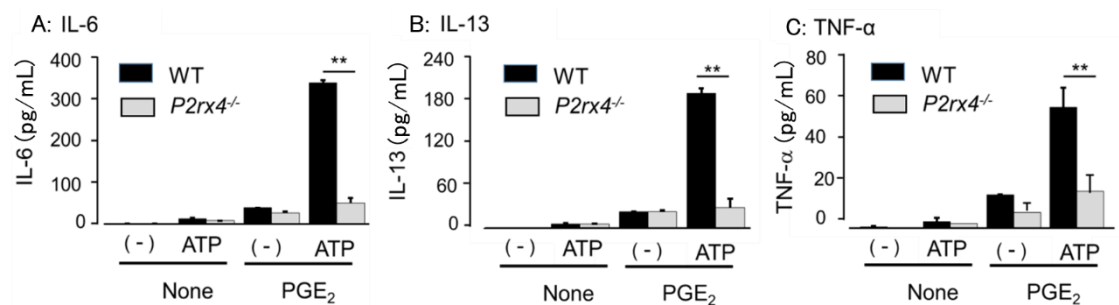


図 11. 野生型マウス(Wild type;WT)および P2X4 受容体ノックアウトマウス(*P2rx4*^{-/-})由来の BMMCs における PGE₂によるサイトカイン産生に及ぼす ATP の作用

WT または *P2rx4*^{-/-}マウスから作製した BMMCs を ATP(100 μM)非存在下または存在下において PGE₂(0.1 μM)で 3 時間刺激し、反応液を回収して IL-6(A)、IL-13(B)および TNF-α (C)の放出量を ELISA で解析した。結果は平均値±標準誤差(n=3)で示す。** P<0.01

3-4 考察

本章ではマスト細胞のサイトカイン産生に影響を及ぼすATPの受容体について検討した。PGE₂存在下においてP2受容体を認識する様々な細胞外ヌクレオチド作動薬の効果を解析したところ、ATPが最も強くサイトカイン分泌を促進した。BMMC_sに発現するP2受容体のうちATPを認識できるのはP2X₁、P2X₄、P2X₇受容体とP2Y₂受容体である。このうちP2X₁受容体の選択的な刺激薬である α β meATPやP2Y₂受容体刺激薬であるUTPに作用が認められなかったことからP2X₁受容体とP2Y₂受容体の関与は小さいと考えられた。また、P2X₇受容体は刺激に用いたATPの濃度(100 μ M)では活性化しないことから、P2X₄Rの関与が示唆された [32]。この考えと一致して、P2X₄R阻害剤で処理したBMMC_sでは、PGE₂単独でのサイトカイン分泌には影響を与えなかったが、PGE₂存在下におけるATP刺激による反応増強を有意に抑制した。さらに、*P2rx4*^{-/-}マウスから調製したBMMC_sでは、PGE₂とATPの共刺激によるサイトカインの遺伝子発現および分泌の増強が認められなかった。以上のことから、PGE₂存在下でのATPによるサイトカイン産生増強に関与する受容体はP2X₄Rであると考えられた。

今回の結果から、同じイオンチャネル型のP2X₁受容体やP2X₇受容体の活性化では、なぜサイトカイン産生の亢進が生じないのかという疑問が生じる。実際、P2X₄Rのチャネル活性の特性は、非選択性陽イオンチャネルとしてのコンダクタンス(脱分極の起こり易さ)やCa²⁺イオンの透過性は、ともにP2X₇受容体のほうが大きい事が知られている [34]。しかし、図 6で示したように、P2X₇受容体を活性化できる1 mMのATPとPGE₂の共刺激では、サイトカイン産生の増強作用をむしろ減弱することが認められた。以上の結果から、P2X₄Rを介する反応には、他の受容体との細胞膜上での局在やイオンチャネル活性だけでなく何らかの付加的なシグナルが作動している可能性が考えられ、今後の検討が必要な課題である。

第4章 マスト細胞のサイトカイン産生に影響を及ぼす PGE₂ 受容体の解析

4-1 緒言

PGE₂は様々な細胞において刺激に応じて産生される主要な脂質メディエーターの1つであり、生体膜の構成成分であるアラキドン酸を基質としてシクロオキシゲナーゼ経路にて産生される [35]。産生されたPGE₂は短時間で速やかに代謝されるため、主に生成部位の近傍において局所的に作用すると考えられている。PGE₂受容体には4種類のサブタイプが存在しており、EP₁受容体がG_q共役型、EP₂受容体およびEP₄受容体がG_s共役型、EP₃受容体がG_i共役型である (図 12)。PGの作用は、平滑筋の弛緩または収縮の誘導、神経伝達物質の放出調節、侵害刺激に対する感受性亢進、発熱や睡眠の誘発など多様である [36]。それぞれのEP受容体をノックアウトしたマウスでは、EP₃Rノックアウトマウスのみ、PGE₂、IL-1 β 、LPSのいずれに対しても発熱反応を示さないことが報告されている [37]。マスト細胞においては、PGE₂/EP₃シグナルが脱顆粒反応を促進し、ヒスタミンを遊離させる事で血管透過性を亢進させ、急性炎症に関わることが報告されている [38][39]。我々はATPによるP2X4RおよびPGE₂によるEP₃Rの共刺激がマスト細胞における脱顆粒反応を増強することを報告した [21]。

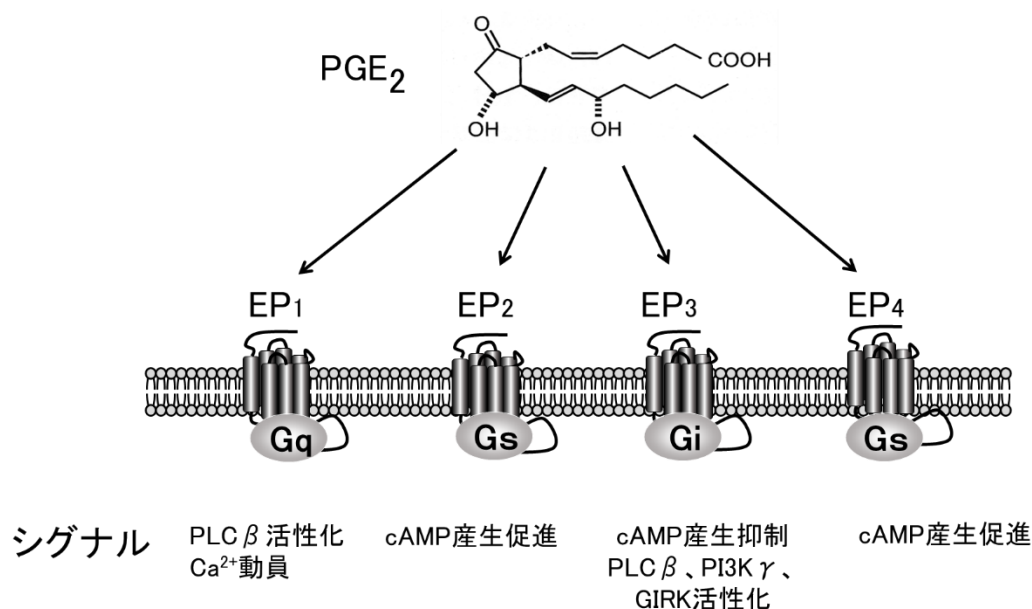


図 12. PGE₂受容体サブタイプとそのシグナル

第三章において、ATPとPGE₂との共刺激によるサイトカイン産生亢進に關与するATPの受容体はP2X4Rであることを示したが、PGE₂がどのEP受容体を介して作用しているのか明らかになっていない。そこで、本章では、マスト細胞のサイトカイン産生に影響を及ぼすEP受容体サブタイプについて各EP受容体サブタイプに選択的な刺激薬および阻害薬を用いて薬理学的な解析を行った。

4-2 実験材料および方法

1) 試薬

本章で示した実験に使用した試薬とその入手先は以下のとおりである。なお、第2章に記載したものは省略した。ONO-DI-004 (EP₁受容体作動薬)、ONO-AE1-259-01 (EP₂受容体作動薬)、ONO-AE-248 (EP₃受容体作動薬)、ONO-AE1-329 (EP₄受容体作動薬)、ONO-8713 (EP₁受容体阻害薬)、ONO-AE3-208 (EP₃受容体阻害薬)、ONO-AE3-240 (EP₄受容体阻害薬):小野薬品工業株式会社。AH6809 (EP₂受容体阻害薬):Cayman Chemical。

2) マウス

2-2-2の条件下で飼育したC57BL/6マウスおよび山本希美子博士(東京大学)により確立されたP2X4Rノックアウト(*P2rx4^{-/-}*)マウス(健大遺伝子第1604号) [31]を使用した(承認番号:2033)。

3) 細胞培養

2-2-3と同様の方法を用いてBMDCsを培養した。

4) サイトカイン放出量の測定

2-2-4と同様の方法で行った。

5) 遺伝子発現量解析

2-2-5と同様の方法で行った。RT-PCRで用いたプライマーは2-2-5に記載したものに加えて、以下の塩基配列のものを用いた。

Target	Sense	Antisense
EP ₁	CTCCCCAATACATCTGTGGT	ACAGCCAAGCAAAAGTGG
EP ₂	GCTAATGGAGGACTGCAAGA	AGCACCAATTCCGTTACCAG
EP ₃	AACCTGTCAAGTACTACCGA	CCGAACACTGTCATGGTTAG
EP ₄	GGTTGGAGGTACCATTCTAGA	TACCAACAAGGTGCCAGAA
P2X4	TTACCACCTCCTACCTCAAG	CTGCTCGTAGTCTCCACAT

6) 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で示した。2群間の比較にはStudent's *t*-testを、多群間の検定には一元配置分散分析後、Dunnett's testを用いた。P値は0.05より小さい時、統計的に有意な差があるとみなした。

4-3 結果

1) ATP と PGE₂ の共刺激によるサイトカイン放出と遺伝子発現の増強における EP₃ 受容体の役割

PGE₂ の作用を媒介する受容体について検討した。PGE₂ と ATP の共刺激によるサイトカイン放出の相乗的増加は、EP₃R 作動薬 ONO-AE-248 でのみ再現され、EP₁、EP₂、EP₄ 受容体作動薬は効果を示さなかった (図 13A-C)。逆に、PGE₂ と ATP の共刺激によるサイトカイン放出の相乗的増加は、EP₃R 阻害薬 ONO-AE3-240 によって抑制されたが、EP₁、EP₂、EP₄ 受容体阻害薬では抑制されなかった (図 14A-C)。実際に BMMCs に EP₃R が発現しているか RT-PCR による定量的な解析を行った結果、BMMCs には EP₃ 受容体が豊富に発現しており、ATP によるサイトカイン産生増強作用が消失した *P2rx4*^{-/-} マウス由来の BMMCs においても EP 受容体遺伝子発現パターンは変化していない事を確認した (図 15)。

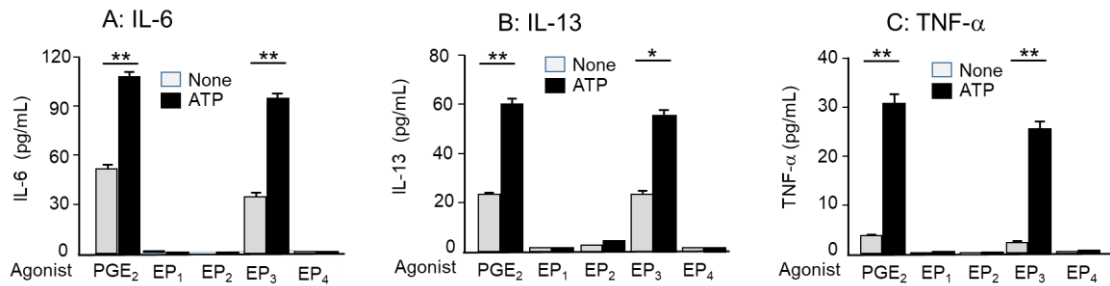


図 13. EP 受容体刺激薬によるサイトカイン産生に及ぼす ATP の作用

BMMCs を ATP (100 μ M) 非存在下または存在下において PGE₂ または ONO-DI-004 (EP₁ 刺激薬)、ONO-AE1-259-01 (EP₂ 刺激薬)、ONO-AE-248 (EP₃ 刺激薬)、ONO-AE1-329 (EP₄ 刺激薬) (各 0.1 μ M) で 3 時間刺激し、回収した反応液中の IL-6 (A)、IL-13 (B) および TNF- α (C) の放出量を ELISA で測定した。結果は平均値 \pm 標準誤差 (n=3) で示す。

* P<0.05, ** P<0.01

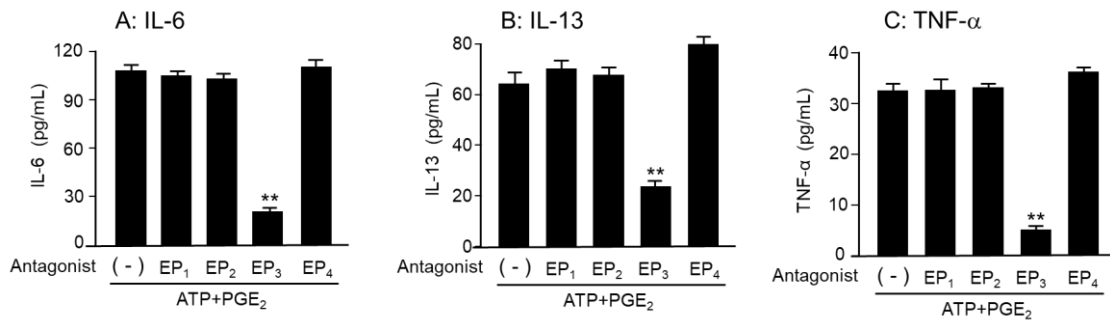


図 14. PGE₂ と ATP の共刺激によるサイトカイン産生に及ぼす EP 受容体阻害薬の作用

BMMCs を溶媒 (-) または ONO-8713 (EP₁ 阻害薬)、AH6809 (EP₂ 阻害薬)、ONO-AE3-208 (EP₃ 阻害薬)、ONO-AE3-240 (EP₄ 阻害薬) (各 1 μ M) で 5 分間処理した後、ATP (100 μ M) および PGE₂ (0.1 μ M) で 3 時間刺激し、回収した反応液中の IL-6 (A)、IL-13 (B) および TNF- α (C) の放出量を ELISA で測定した。結果は平均値 \pm 標準誤差 (n=3) で示す。

** p < 0.01 vs 溶媒 (-)

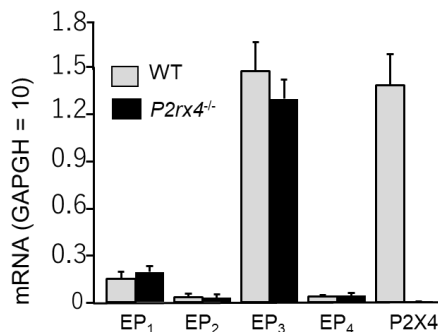


図 15. 野生型 (Wild type; WT) マウスと P2X4R ノックアウト (P2rx4^{-/-}) マウスから得た BMMCs における EP 受容体サブタイプの遺伝子発現

EP₁、EP₂、EP₃、EP₄ および P2X4 受容体遺伝子発現を RT-PCR 法で解析した。結果は GAPDH の発現量を 10 として平均値 \pm 標準誤差 (n=3) で示す。

4-4 考察

本章ではマスト細胞のサイトカイン産生に影響を及ぼす PGE₂ 受容体について検討した。ATP受容体と異なり、PGE₂が作用する EP 受容体サブタイプには特異的な刺激薬と阻害薬が開発されている。そこで ATP との共刺激によるサイトカイン産生の亢進に関与する EP 受容体サブタイプを薬理的に解析した。ATP と PGE₂ の共刺激によるサイトカイン産生の亢進は、EP₃R 作動薬である ONO-AE-248 でのみ再現され、EP₁ 受容体作動薬である ONO-DI-004、EP₂ 受容体作動薬である ONO-AE1-259-01 および EP₄ 受容体作動薬である ONO-AE1-329 は全く作用を示さなかった。さらに、ATP と PGE₂ の共刺激作用は EP₃R 阻害薬の ONO-AE3-240 でのみ抑制され、他の受容体阻害薬は効果が認められなかった。このことから ATP 存在下での PGE₂ によるサイトカイン産生に関与する EP 受容体は、EP₃R であると考えられた。この P2X4R と EP₃R のコンビネーションは、BMMC_s の脱顆粒反応の亢進と同じ組み合わせである。

また、EP₃R は Gi 共役型受容体であり、刺激されると G 蛋白の β γ サブユニットを介した phospholipase (PLC) β および phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) γ の活性化、Akt のリン酸化の増加が生じると考えられている [40][41]。また、Gi 共役型受容体の活性化は、アデニル酸シクラーゼの活性化を阻害し、マスト細胞の機能を阻害する cAMP シグナルを減弱させる可能性もあるが、BMMC_s では PGE₂ による EP₃R の活性化は、細胞の cAMP 含量に影響しないことが示されている [42]。一方、我々は以前、*P2rx4*^{-/-}マウス由来の BMMC_s を用いた Ca²⁺アッセイにおいて、ATP と PGE₂ の共刺激によって Ca²⁺の流入が増強し、PI3K γ 阻害剤で事前に処理すると一部抑制されたことを報告した。P2X4R の機能は、細胞膜リン脂質のホスファチジルイノシトール-3、4、5 三リン酸の蓄積により活性が亢進するため、PI3K γ 活性化が P2X4R を介した Ca²⁺流入を促進すると考えられた [21]。さらに、マスト細胞では Gi の β γ サブユニットで活性化される K⁺チャネルが存在し、この K⁺チャネルの開口により、P2X4R チャネルを介した Ca²⁺流入の駆動力が高まると可能性も考えられた [21]。PGE₂ と ATP の共刺激によるサイトカイン分泌の相乗的増加にも、こうした機序が関与しているものと推測される。EP₃R と P2X4R の共刺激で生じるシグナルの解析を進めることは抗原非依存的なアレルギー性炎症反応を明らかにする上で有用と考えられる。次章ではその解析を行った結果を示し、考察を加えた。

第5章 ATPとPGE₂の共刺激におけるシグナル伝達経路の解析

5-1 緒言

第3章および第4章よりATPとPGE₂の共刺激による遺伝子発現およびサイトカイン産生の増加にはそれぞれP2X₄RおよびEP₃Rが関与していることが示唆された。P2X₄Rはイオンチャネル型受容体であり、刺激されると非選択性カチオンチャネルが活性化され、Ca²⁺の流入と膜電位の脱分極が起こる[43]。また、EP₃Rを刺激すると、G蛋白のβγサブユニットを介したPLCβの活性化による細胞内貯蔵Ca²⁺の動員およびPI3Kγの活性化の下流でAktのリン酸化の増加、Ca²⁺流入の機能的促進が生じると考えられている[40][41]。これらのシグナル伝達経路の相加的または相乗的な作用によってATPとPGE₂の共刺激によるサイトカインの遺伝子発現および産生の増加が生じるものと推測されるが、詳細は明らかとなっていない。炎症性サイトカインの遺伝子発現にはActivator protein-1 (AP-1)[44]やsignal transducer and activator of transcription (STAT)[45]など多くの転写因子が関与するが、中でもnuclear factor-κB (NF-κB)のシグナル伝達経路が重要な役割を果たすと考えられている[46]。NF-κBは、活性化B細胞において働く重要な分子として発見された転写因子である。不活性なNF-κBは細胞質に存在しIκB (Inhibitor of κB)と結合することによりその活性が抑制されている。様々な炎症性刺激によりIκBをリン酸化するIκBキナーゼ (IKK)が活性化されると、リン酸化されたIκBはプロテアソームにより分解を受け、遊離したNF-κB (p50-p65)が核内に移行し種々の炎症性蛋白質遺伝子の転写が活性化する。このNF-κB経路は種々の細胞内シグナルで活性化されることが知られており、AktやERKなどEP₃Rの下流で活性化するシグナルもIKKを活性化することが示されている[47]。そこで、本章ではP2X₄RおよびEP₃Rシグナル伝達がNF-κBやAktおよびERKの活性化レベルでどのような相互作用を示すか、シグナル伝達分子のリン酸化をウェスタンブロットで解析することにより検討した。

5-2 実験材料および方法

1) 試薬

本章で示した実験に使用した試薬とその入手先は以下のとおりである。なお、第2章に記載したものは省略した。dexamethasone、cyclosporine A :Sigma-Aldrich。1,2-

Bis (2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N' -tetraacetic acid tetrakis acetoxymethyl ester (BAPTA-AM) : Abcam。SB203580、wortmannin、:Cayman Chemical。

InSolution NF- κ B activation inhibitor : Calbiochem。U0126, anti-extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2抗体、anti-phospho-ERK1/2抗体、anti-Akt抗体、anti-phospho-Akt (Thr308)抗体、anti-NF- κ B p65抗体、anti-phospho-NF- κ B p65 (Ser536)抗体、horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit IgG抗体 : Cell Signaling Technology

2) マウス

2-2-2の条件下で飼育したC57BL/6マウスおよび山本希美子博士(東京大学)により確立されたP2X4Rノックアウト(*P2rx4^{-/-}*)マウス(健大遺伝子第1604号) [31]を使用した(承認番号:2033)。

3) 細胞培養

2-2-3と同様の方法を用いてBMSCsを培養した。

4) ウェスタンブロット

回収した細胞をKrebs-Ringer-HEPES緩衝液(130 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 4.0 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 1.8 mM CaCl₂, 11.5 mM グルコース, 10 mM HEPES (pH 7.4))で2回洗浄し、37°Cで種々の条件で刺激した。反応は4x Laemmli sample bufferを加えることで終了させた。細胞を溶解したサンプルを電気泳動(100 V, 90分)した。次に泳動したサンプル蛋白質をセミドライ・トランスファー装置(AE-665、ATTO)を用いてpolyvinylidene difluoride (PVDF)膜にトランスファー(120 mA, 90分)し、1% skim milk tris-buffer saline-tween 0.1% (TBS-T、室温、1時間)でブロッキングさせた。1次抗体を希釈した2% BSA/TBS-TにPVDF膜を浸し4°Cで一晩反応させた。PVDF膜をTBS-Tで5分間4回洗浄し、HRPが結合した2次抗体を希釈したTBS-Tに浸し室温で120分間振盪した。ECL blotting detection systemを用いて化学発光させ、LAS-3000(FUJIFILM)を用いて撮影した。バンドの密度はMulti Gauge version 3.0を用いて定量し、総蛋白質に対するリン酸化蛋白質の量をローディングの指標として、リン酸化の倍数変化を算出した。使用した抗体の希釈倍率を以下に示す。anti-phospho-ERK1/2 (1:1000)、anti-ERK1/2 (1:1000)、anti-phospho-Akt (1:1000)、anti-Akt (1:1000)、anti-phospho-NF- κ B p65

(1:1000)、anti-NF- κ B p65 (1:1000)、horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit IgG (1:10,000)。

5) 遺伝子発現量解析

2-2-5と同様の方法で行った。

6) 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で示した。2群間の比較にはStudent's *t*-testを、多群間の検定には一元配置分散分析後、Dunnett's testを用いた。P値は0.05より小さい時、統計的に有意な差があるとみなした。

5-3 結果

1) ERK/Akt/NF- κ B シグナル伝達経路に対する ATP および PGE₂ の影響

BMMCs を PGE₂ で刺激すると、5 分以内に ERK1/2 と Akt が急速にリン酸化され、その後 10 分、20 分とリン酸化レベルは低下していった。一方、ATP 刺激は BMMCs の ERK1/2 および Akt のリン酸化に 5 分ではほとんど影響を与えなかったが、10 分および 20 分後にわずかにリン酸化の促進が認められた。ATP と PGE₂ の共刺激は、5 分後のピークレベルのリン酸化は変化しなかったが、10 分と 20 分後の ERK1/2 と Akt のリン酸化の減衰が緩やかになり、リン酸化が持続的になった (図 16A、C、D)。ERK1/2 と Akt のリン酸化に対する ATP と PGE₂ のこれらの共刺激効果は、*P2rx4*^{-/-} BMMCs では見られなかった (図 16B、C、D)。Akt は、様々な炎症性サイトカインの転写因子である NF- κ B を活性化することが知られている [47]。ATP または PGE₂ 単独では、NF- κ B の活性化体であるリン酸化 NF- κ B p65 のレベルをわずかに増加させただけであった。しかし、ATP と PGE₂ による共刺激は、リン酸化 NF- κ B のレベルを著しく増加させた (図 16A、E)。この ATP と PGE₂ による NF- κ B のリン酸化は、*P2rx4*^{-/-} BMMCs では認められなかった。

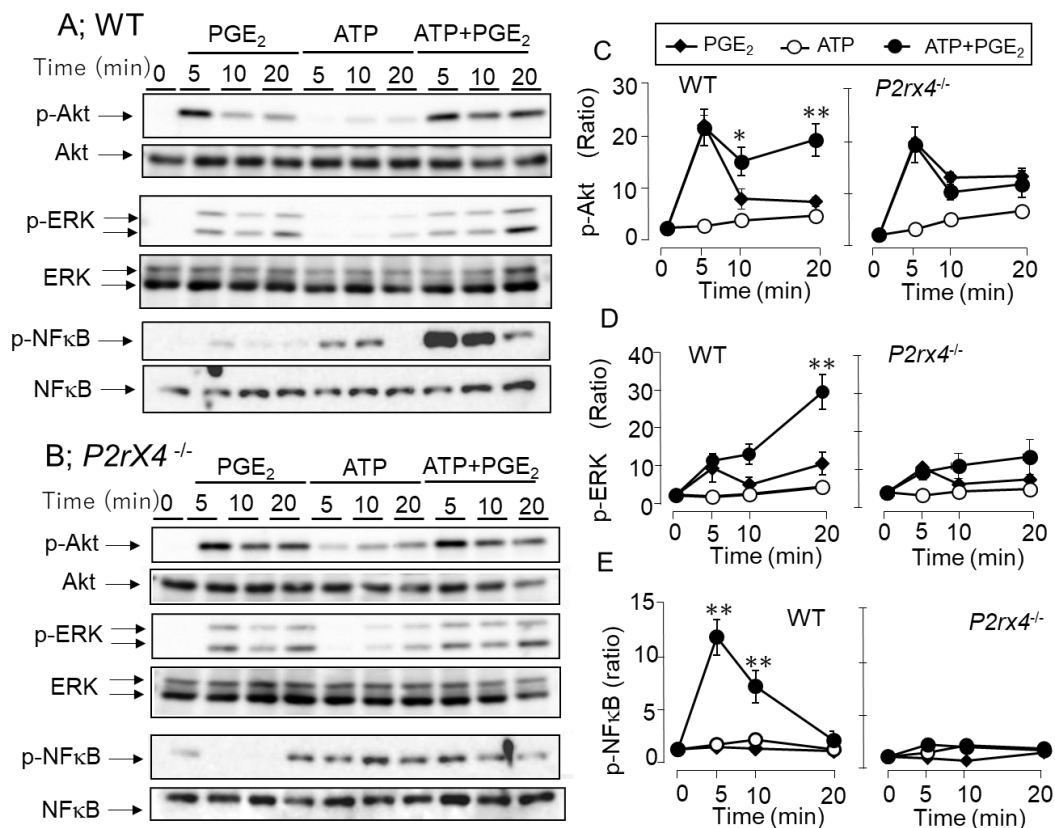


図 16. BMMCs における ERK 1/2、Akt、NF-κB のリン酸化に対する PGE₂ および ATP の影響
 WT(A)と *P2rx4^{-/-}* マウス(B)から調製した BMMCs を PGE₂ (0.1 μM)、ATP (100 μM)、PGE₂ および ATP で 5、10、20 分間刺激し、リン酸化 Akt および総 Akt (上)、リン酸化 ERK 1/2 および総 ERK 1/2 (中)、リン酸化 NF-κB および総 NF-κB (下) についてのウェスタンブロットで解析した。また、リン酸化 Akt (C)、リン酸化 ERK 1/2 (D)、リン酸化 NF-κB (E) の蛋白質バンドの強度を、非刺激細胞(時間 0)で得られた結果を 1 とした相対強度で示した。結果は平均値 ± 標準誤差 (n=3) で示す。* p < 0.05, ** p < 0.01 PGE₂ vs ATP + PGE₂

2) ATP と PGE₂ の共刺激によるサイトカイン遺伝子発現増強に対するシグナル伝達経路阻害剤の影響

BMMCs において ATP と PGE₂ の共刺激による炎症性サイトカイン遺伝子の発現上昇に関与するシグナルを明らかにするために、ERK、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、PI3K、カルシニューリンおよび NF-κB に対する阻害剤の効果を検討した。ATP と PGE₂ の共刺激による IL-6、IL-13 および TNF-α の mRNA レベルの上昇は、ERK 阻害剤 U0126、PI3K 阻害剤 wortmannin、NF-κB 活性化阻害剤 NF-

κ BI、カルシニューリン阻害剤 cyclosporine A、細胞内 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM、ステロイド抗炎症剤 dexamethasone により有意に抑制された。一方、p38MAPK 阻害剤 SB203580 は、サイトカインの mRNA 発現を抑制しなかった(図 17)。

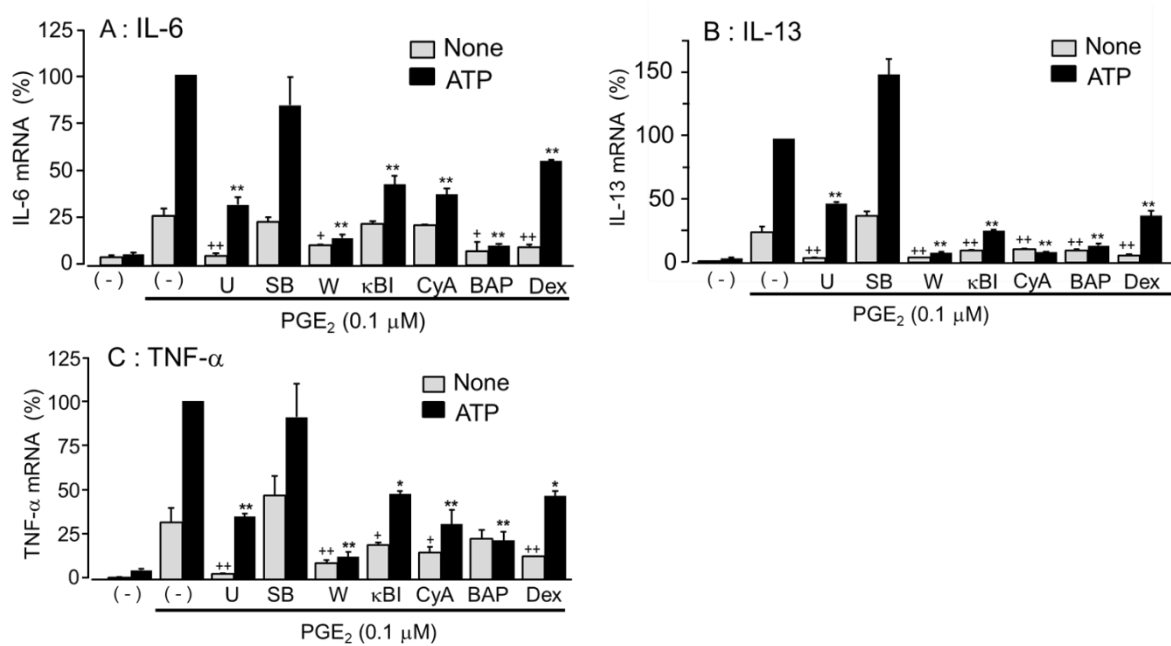


図 17. ATP と PGE₂ の共刺激によるサイトカイン mRNA の上昇に対する阻害剤の効果

BMMCs を溶媒、MEK1/2 阻害剤 U0126(U、5 μ M)、p38 MAPK 阻害剤 SB203580(SB、10 μ M)、PI3K 阻害剤 wortmannin(W、0.1 μ M)、NF- κ B 阻害剤 (κ BI、1 μ M)、カルシニューリン阻害剤 cyclosporine A (CyA、5 μ M)、細胞内 Ca^{2+} キレート剤 BAPTA-AM(BAP、5 μ M)、dexamethasone (Dex、0.1 μ M) で 10 分間処理した後、ATP (100 μ M) の存在下または非存在下で PGE₂ (0.1 μ M) で 1 時間刺激し、IL-6(A)、IL-13(B) および TNF- α (C) の遺伝子発現量を RT-PCR 法で解析した。結果は、GAPDH mRNA で補正し、PGE₂ と ATP の共刺激の反応を 100% として示した。結果は平均値 \pm 標準誤差 (n=3) で示す。

*p < 0.05, **p < 0.01 vs ATP+PGE₂, +p < 0.05, ++p < 0.01 vs PGE₂

5-4 考察

本章では ATP と PGE₂ の共刺激におけるシグナル伝達経路について検討した。NF- κ B は、様々な炎症性サイトカインの転写に関与している [22][48]。非活性化状態において NF- κ B は I κ B と複合体として細胞質内に存在している。I κ B が IKK によってリン酸化されると、I κ B のユビキチン化によりプロテアソームでの分解が進み、解離した NF- κ B は核内に移行して炎症性サイトカイン遺伝子の発現を促す [46][49]。EP₃R の下流シグナルのうち、ERK1/2 と PI3K-Akt の活性化が NF- κ B シグナル経路に関与する可能性が示唆されている [47]。PGE₂ は ERK1/2 および Akt のリン酸化を急速に上昇させ、その後、低い定常レベルまで低下させた。また、ATP は弱いながら時間依存的に ERK1/2 と Akt のリン酸化を増加させたが、この作用は *P2rx4*^{-/-} BMMCs でも残存しており、P2X4R 以外の受容体を介した作用と考えられた。すなわち、P2X4R 刺激効果は直接 ERK1/2 と PI3K-Akt のシグナル伝達系には影響しないと考えられた。しかし、ATP と PGE₂ の共刺激は、PGE₂ による初期 (5 分) の ERK1/2 および Akt のリン酸化に影響せず、後期 (10~20 分) ではリン酸化を持続的に有意に増加させることが判明した。重要なことは、この ATP による PGE₂ 誘導の ERK1/2 および Akt リン酸化の増強が、*P2rx4*^{-/-} BMMCs では見られなかったことである。さらに、PI3K 阻害剤 wortmannin、ERK 阻害剤 U0126 および NF- κ B 阻害剤は、PGE₂ 存在下での ATP による炎症性サイトカイン発現の増強を抑制した。これらの結果から、P2X4R 刺激は ERK1/2 および PI3K/Akt シグナル伝達経路を増強し、炎症性サイトカイン遺伝子発現を増強させる可能性が示唆された。さらに興味深い現象が、活性化された NF- κ B の一形態であるリン酸化 NF- κ B p65 の変化で観察された。ATP および PGE₂ はいずれも単独ではリン酸化 NF- κ B p65 の増加作用は弱かったが、これらの組み合わせではリン酸化 NF- κ B p65 の顕著な増加が認められた。さらに、この効果は *P2rx4*^{-/-} BMMCs では見られなかったことから、ATP は P2X4R を介して EP₃R シグナルと共役して相乗的な NF- κ B p65 のリン酸化を惹起すると考えられた。この NF- κ B p65 のリン酸化の上昇は、刺激後 5 分以内に急速に誘導されるのに対して、上述した ATP と PGE₂ の共刺激による ERK1/2 および Akt リン酸化の増強は 10~20 分後に認められることから、ERK1/2 および Akt の持続的な活性化は NF- κ B のリン酸化亢進には関与せず、NF- κ B 依存性のサイトカイン遺伝子の転写をサポートしている可能性が考えられた。実際、ERK1/2 のシグナルを阻害する U0126 および Akt のシグナル伝達を阻害する wortmannin は、ATP と PGE₂ の共刺激による IL-6、IL-13 および

TNF- α の遺伝子発現の亢進を抑制した。また、NF- κ B のシグナル伝達を阻害する dexamethasone [50]や NF- κ B 阻害薬によっても、サイトカイン遺伝子発現亢進は強く抑制された。以上の結果から、ATPとPGE₂の共刺激によるIL-6、IL-13およびTNF- α の遺伝子発現の亢進にはERK/Akt/NF- κ B 経路の活性化が関与すると考えられた。

Jordan らによって報告された最近の研究では、NF- κ B 依存性シグナルに加えて、Ca²⁺-カルシニューリンシグナルがマスト細胞のサイトカイン分泌亢進に関与することが明らかにされた [51]。本研究では、細胞内 Ca²⁺キレート剤 BAPTA-AM とカルシニューリン阻害剤 cyclosporine A が ATP と PGE₂ によって誘導される炎症性サイトカインの mRNA 発現を強く抑制することを明らかにした。P2X4R による Ca²⁺流入は、カルシニューリン依存性の nuclear factor of activated T cells (NFAT)シグナルを刺激し、炎症性サイトカイン遺伝子の転写を増加させる可能性がある。しかし、第 2 章において明らかにしたように P2X4R と定性的には類似したシグナル伝達、すなわち細胞内への Ca²⁺流入を促進する P2X1 および P2X7 受容体の活性化は、EP₃R シグナルとの相互作用を示さなかったことから、P2X4R はまだ特定されていない独自のシグナル伝達機構を有している可能性があり、その解明は今後の重要な課題と考えられる。

第6章 総括

我々は以前の研究で、ATP が P2X4R の活性化を介して IgE 依存性および IgE 非依存性のマスト細胞の脱顆粒反応を増大させることを報告した [20][21]。マスト細胞は顆粒に貯蔵されたケミカルメディエーター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が、遅発期にはその後多様な炎症性サイトカインやケモカインを分泌し、他の免疫細胞の遊走や活性化を引き起こし、アレルギー性炎症が引き起こされると考えられている [22]。本研究では、細胞外 ATP が抗原や PGE₂ との共刺激により、炎症性サイトカイン IL-6 と TNF- α 、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 PGE₂ の効果は、脱顆粒反応への影響と同様に、それぞれ P2X4R および EP₃R によって媒介されることが明らかとなった [20][21]。ATP 誘発効果への P2X4R の関与は、*P2rx4*^{-/-}マウスから調製した BMMC_s を用いてさらに明確に示すことができた。これまでに報告してきた P2X4R を介するマスト細胞の脱顆粒増強が、IgE を介した抗原シグナルや種々の G 蛋白質共役型受容体を介した広範囲なシグナルと相互作用を示したのに比べ、サイトカイン放出の亢進における P2X4R を介した増強作用は、EP₃R との間で最も顕著であった。この違いは、脱顆粒反応が細胞内 Ca²⁺の上昇に依存した即時的な反応であるのに対し、サイトカイン放出の亢進は複数の転写因子の活性化による遺伝子発現の上昇を介した de novo 産生に依存しているためと考えられる。すなわち、本研究は P2X4R と EP₃R 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を示した。NF- κ B は、様々な炎症性サイトカインの転写に関与している [22][48]。BMMC_s を ATP または PGE₂ 単独で刺激しても NF- κ 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、*P2rx4*^{-/-}マウスから調製した BMMC_s では認められなかった。EP₃R の下流シグナルのうち、ERK1/2 と PI3K-Akt の活性化が NF- κ B シグナル経路に関与することが示唆されている [47]。PGE₂ 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 P2X4R の刺激は、ERK/Akt 経路による NF- κ 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 阻害剤の wortmannin や ERK 阻害剤 U0126、そして NF- κ B 阻害剤により PGE₂ 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、P2X4R シグナル側の要因としては、細胞内 Ca²⁺キレート薬の BAPTA-AM とカルシニューリン

阻害薬の cyclosporine A の抑制作用から、P2X4R の活性化による Ca^{2+} 流入がカルシニューリンの活性化を介して NFAT を活性化している可能性が示唆された。このように、 PGE_2 と ATP の共刺激は転写因子である NF- κ 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。

ATP と PGE_2 は、組織の損傷などによる炎症部位では細胞外に蓄積し、マスト細胞を共刺激する事は珍しい事ではないと思われる。実際、我々の研究室では PGE_2 の皮内投与が内因性の ATP-P2X4R シグナルに依存してマスト細胞を活性化し血管透過性亢進を起こすことを報告している。本研究結果から、マスト細胞の機能調節における P2X4R 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 P2X4R を標的とする戦略は有用な可能性を持つと考えられる。ヒトにおいて P2X4R には遺伝子多型が知られているが [52]、アレルギー疾患の症状との関連を解析することは重要と考えられる。

最後に、本研究で得られた結果に基づいた BMSCs における P2X4R および EP_3R を介するサイトカイン産生制御機構の概要を図示する (図 18)。

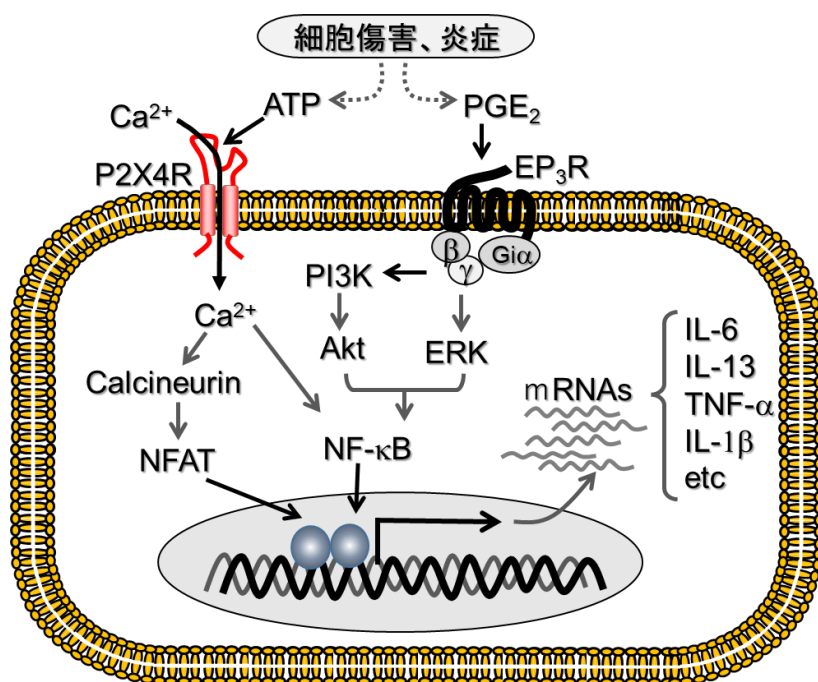


図 18. P2X4R と EP_3R を介するサイトカイン産生

謝辞

本研究は、高崎健康福祉大学大学院薬学研究科 薬学専攻博士課程 薬効解析学研究室において行われました。本研究を遂行するにあたり、終始熱心な御指導と激励を賜りました高崎健康福祉大学薬学部 薬効解析学研究室教授 松岡功先生に謹んで御礼申し上げます。

本論文を審査していただき、適切かつ有益な御助言を賜りました高崎健康福祉大学薬学部 遺伝子機能制御学研究室教授 常岡誠先生、高崎健康福祉大学薬学部 分子神経科学研究室教授 福地守先生、高崎健康福祉大学薬学部 分子薬物治療学研究室教授 中道範隆先生に深く感謝申し上げます。

多くの御助力、御討論をいただきました高崎健康福祉大学薬学部 薬効解析学研究室講師 伊藤政明先生、高崎健康福祉大学薬学部 免疫・アレルギー学研究室教授 森哲哉先生、高崎健康福祉大学薬学部 薬効解析学研究室助教 吉田一貴先生に深謝の意を表します。

本研究に用いた P2X4 受容体ノックアウトマウスを御提供いただきました東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻医用生体工学講座准教授 山本希美子先生、P2X4 受容体阻害剤を御提供いただきました日本ケミファ株式会社 創薬研究所創薬第二研究室 今井利安様に厚く御礼申し上げます。

社会人大学院生として研究生活を送りにあたり、御協力を賜りました伊勢崎市民病院の職員の皆様に深く感謝いたします。

最後に、学部生の時から御世話になりました高崎健康福祉大学薬学部の皆様に感謝の意を表します。

参考文献

- [1] Burnstock, G. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev.* 2006, 58, 58-86.
- [2] North, R.A.; Surprenant, A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000, 40, 563-580.
- [3] Jacobson, K.A.; Delicado, E.G.; Gachet, C.; Kennedy, C.; von Kugelgen, I.; Li, B.; Miras-Portugal, M.T.; Novak, I.; Schoneberg, T.; Perez-Sen, R.; Thor, D.; Wu, B.; Yang, Z.; Muller, C.E. Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol.* 2020, 177, 2413-2433.
- [4] Matsuoka, I.; Ohkubo, S. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: adenosine receptor activation by ATP through rapid and localized generation of adenosine by ecto-nucleotidases. *J Pharmacol Sci.* 2004, 94, 95-99.
- [5] Pinna, C.; Knight, G.E.; Puglisi, L.; Burnstock, G. Neurogenic and non-neurogenic responses in the urinary bladder of hibernating hamster. *Br J Pharmacol.* 1998, 123, 1281-1287.
- [6] Hoyle, C.H.; Knight, G.E.; Burnstock, G. Suramin antagonizes responses to P2-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli. *Br J Pharmacol.* 1990, 99, 617-621.
- [7] Nakanishi, H.; Takeda, H. The possibility that adenosine triphosphate is an excitatory transmitter in guinea-pig seminal vesicle. *Jpn J Pharmacol.* 1972, 269-270.

- [8] Elliott, M.R.; Chekeni, F.B.; Trampont, P.C.; Lazarowski, E.R.; Kadl, A.; Walk, S.F.; Park, D.; Woodson, R.I.; Ostankovich, M.; Sharma, P.; Lysiak, J.J.; Harden, T.K.; Leitinger, N.; Ravichandran, K.S. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 2009, 461, 282-286.
- [9] Chen, Y.; Corriden, R.; Inoue, Y.; Yip, L.; Hashiguchi, N.; Zinkernagel, A.; Nizet, V.; Insel, P.A.; Junger, W.G. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*. 2006, 314, 1792-1795.
- [10] Kronlage, M.; Song, J.; Sorokin, L.; Isfort, K.; Schwerdtle, T.; Leipziger, J.; Robaye, B.; Conley, P.B.; Kim, H.C.; Sargin, S.; Schon, P.; Schwab, A.; Hanley, P.J. Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Sci Signal*. 2010, 3, ra55.
- [11] Yip, L.; Woehrle, T.; Corriden, R.; Hirsh, M.; Chen, Y.; Inoue, Y.; Ferrari, V.; Insel, P.A.; Junger, W.G. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB J*. 2009, 23, 1685-1693.
- [12] Karmakar, M.; Katsnelson, M.A.; Dubyak, G.R.; Pearlman, E. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat Commun*. 2016, 7, 10555.
- [13] Tsuda, M.; Shigemoto-Mogami, Y.; Koizumi, S.; Mizokoshi, A.; Kohsaka, S.; Salter, M.W.; Inoue, K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003, 424, 778-783.
- [14] Bulanova, E.; Bulfone-Paus, S. P2 receptor-mediated signaling in mast cell biology. *Purinergic Signal*. 2010, 6, 3-17.
- [15] Kurashima, Y.; Amiya, T.; Nochi, T.; Fujisawa, K.; Haraguchi, T.; Iba, H.; Tsutsui, H.; Sato, S.; Nakajima, S.; Iijima, H.; Kubo, M.; Kunisawa, J.; Kiyono, H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun*. 2012, 3, 1034.

- [16] Weber, F.C.; Esser, P.R.; Muller, T.; Ganesan, J.; Pellegatti, P.; Simon, M.M.; Zeiser, R; Idzko, M.; Jakob, T.; Martin, S.F. Lack of the purinergic receptor P2X(7) results in resistance to contact hypersensitivity. *J Exp Med.* 2010, 207, 2609-2619.
- [17] Laffargue, M.; Calvez, R.; Finan, P.; Trifilieff, A.; Barbier, M.; Altruda, F.; Hirsch, E.; Wymann, M.P. Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity.* 2002, 16, 441-451.
- [18] Gao, Z.G.; Ding, Y.; Jacobson, K.A. P2Y13 receptor is responsible for ADP-mediated degranulation in RBL-2H3 rat mast cells. *Pharmacol Res.* 2010, 62, 500-505.
- [19] Gao, Z.G.; Wei, Q.; Jayasekara, M.P.; Jacobson, K.A. The role of P2Y14 and other P2Y receptors in degranulation of human LAD2 mast cells. *Purinergic Signal.* 2013, 9, 31-40
- [20] Yoshida, K.; Ito, M.A.; Sato, N.; Obayashi, K.; Yamamoto, K.; Koizumi, S.; Tanaka, S.; Furuta, K.; Matsuoka, I. Extracellular ATP augments antigen-induced murine mast cell degranulation and allergic responses via P2X4 receptor activation. *J Immunol.* 2020, 204, 3077-3085.
- [21] Yoshida, K.; Tajima, M.; Nagano, T.; Obayashi, K.; Ito, M.; Yamamoto, K.; Matsuoka, I. Co-stimulation of purinergic P2X4 and prostanoid EP₃ receptors triggers synergistic degranulation in murine mast cells. *Int J Mol Sci.* 2019, 20, 5157.
- [22] Mukai, K.; Tsai, M.; Saito, H.; Galli, S.J. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunol Rev.* 2018, 282, 121-150.
- [23] Galli, S.J.; Tsai, M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med.* 2012, 18, 693-704.
- [24] Bischoff, S.C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol.* 2007, 7, 93-104.

- [25] Kuehn, H.S.; Gilfillan, A.M. G Protein-coupled receptors and the modification of Fc ϵ RI-mediated mast cell activation. *Immunol Lett.* 2007, 113, 59-69.
- [26] Hill, P.B.; MacDonald, A.J.; Thornton, E.M.; Newlands, G.F.; Galli, S.J.; Miller, H.R. Stem cell factor enhances immunoglobulin E-dependent mediator release from cultured rat bone marrow-derived mast cells: activation of previously unresponsive cells demonstrated by a novel ELISPOT assay. *Immunology.* 1996, 87, 326-333.
- [27] Gordon, J.R.; Galli, S.J. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med.* 1991, 174, 103-107.
- [28] Xiao, W.; Nishimoto, H.; Hong, H.; Kitaura, J.; Nunomura, S.; Maeda-Yamamoto, M.; Kawakami, Y.; Lowell, C.A.; Ra, C.; Kawakami, T. Positive and Negative Regulation of Mast Cell Activation by Lyn via the Fc ϵ RI. *J Exp Med.* 1991, 174, 103-107. *J Immunol.* 2005, 175, 6885-6892
- [29] Zimmermann, H.; Zebisch, M.; Sträter, M. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* 2012, 8, 437-502.
- [30] Taruno, A. ATP Release Channels. *Int J Mol Sci.* 2018, 19, 808.
- [31] Yamamoto, K.; Sokabe, T.; Matsumoto, T.; Yoshimura, K.; Shibata, M.; Ohura, N.; Fukuda, T.; Sato, T.; Sekine, K.; Kato, S.; Isshiki, M.; Fujita, T.; Kobayashi, M.; Kawamura, K.; Masuda, H.; Kamiya, A.; Ando, J. Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat. Med.* 2006, 12, 133-137.
- [32] Yoshida, K.; Ito, M.; Matsuoka, I. Divergent regulatory roles of extracellular ATP in the degranulation response of mouse bone marrow-derived mast cells. *Int Immunopharmacol.* 2017, 43, 99-107.

- [33] Matsumura, Y.; Yamashita, T.; Sasaki, A.; Nakata, E.; Kohno, K.; Masuda, T.; Tozaki-Saitoh, H.; Imai, T.; Kuraishi Y.; Tsuda, M.; Inoue, K. A novel P2X4 receptor-selective antagonist produces anti-allodynic effect in a mouse model of herpetic pain. *Sci Rep.* 2016, 6, 32461.
- [34] Di, Virgilio.F.; Dal, Ben.D.; Sarti, A.C.; Giuliani, A.L.; Falzoni, S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity.* 2017, 47, 15-31.
- [35] Narumiya, S. Physiology and pathophysiology of prostanoid receptors. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2007, 83, 296–319.
- [36] Narumiya, S.; Sugimoto, Y.; Ushikubi, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 1999, 79, 1193–1226.
- [37] Ushikubi, F.; Segi, E.; Sugimoto, Y.; Murata, T.; Matsuoka, T.; Kobayashi, T.; Hizaki, H.; Tuboi, K.; Katsuyama, M.; Ichikawa, A.; Tanaka, T.; Yoshida, N.; Narumiya, Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature.* 1998, 395, 281–284.
- [38] Kawahara, K.; Hohjoh, H.; Inazumi, T.; Tsuchiya, S.; Sugimoto, Y. Prostaglandin E₂-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2015, 1851, 414–421.
- [39] Morimoto K, Shirata N, Taketomi Y, Tsuchiya S, Segi-Nishida E, Inazumi T, Kabashima K, Tanaka S, Murakami M, Narumiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E₂-EP₃ signaling induces inflammatory swelling by mast cell activation. *J Immunol.* 2014, 92, 1130–1137.

- [40] Kuehn, H.S.; Beaven, M.A.; Ma, H.-T.; Kim, M.-S.; Metcalfe, D.D.; Gilfillan, A.M. Synergistic activation of phospholipases C γ and C β : A novel mechanism for PI3K-independent enhancement of Fc ϵ RI-induced mast cell mediator release. *Cell. Signal.* 2008, 20, 625-636.
- [41] Laffargue, M.; Calvez, R.; Finan, P.; Trifilieff, A.; Barbier M.; Altruda, F.; Hirsch, E.; Wymann, M.P. Phosphoinositide 3-kinase γ is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity.* 2002, 16, 441-451.
- [42] Nguyen M, Solle M, Audoly LP, Tilley SL, Stock JL, McNeish JD, Coffman TM, Dombrowicz D, Koller BH. Receptors and signaling mechanisms required for prostaglandin E2-mediated regulation of mast cell degranulation and IL-6 production. *J Immunol.* 2002,169, 4586-4593.
- [43] Suurväli, J.; Boudinot, P.; Kanellopoulos, J.; Boudinot, S.R. P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor. *Biomed. J.* 2017, 40, 245-256.
- [44] MacNeil, A.J.; Junkins, R.D.; Wu, Z.; Lin, T.J. Stem cell factor induces AP-1-dependent mast cell IL-6 production via MAPK kinase 3 activity. *J Leukoc Biol.* 2014, 95, 903-915.
- [45] Morales, J.K.; Falanga, Y.T.; Depcrynski, A.; Fernando, J.; Ryan, J.J. Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway. *Genes Immun.* 2010, 11, 599-608.
- [46] Baldwin, A.S.Jr. Series introduction: The transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest.* 2001, 107, 3-6.

- [47] Kane, L.P.; Mollenauer, M.N.; Xu, Z.; Turck, C.W.; Weiss, A. Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription. *Mol. Cell Biol.* 2002, 22, 5962-5974.
- [48] Lee, S.A.; Fitzgerald, S.M.; Huang, S.K.; Li, C.; Chi, D.S.; Milhorn, D.M.; Krishnaswamy, G. Molecular regulation of interleukin-13 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mast cells by interleukin-1 β . *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004, 31, 283-291.
- [49] Karin, M.; Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 2000, 18, 621-663.
- [50] Ray, A.; Prefontaine, K.E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 91, 752-756.
- [51] Jordan, P.M.; Andreas, N.; Groth, M.; Wegner, P.; Weber, F.; Jager, U.; Kuchler, C.; Werz, O.; Serfling, E.; Kamradt, T.; et al. ATP/IL-33-triggered hyperactivation of mast cells results in an amplified production of pro-inflammatory cyto-kines and eicosanoids. *Immunology.* 2021, 164, 541-554.
- [52] Kanellopoulos, J.M.; Almeida-da-Silva, C.L.C.; Rützel Boudinot, S.; Ojcius, D.M. Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An Immunological Perspective. *Front Immunol.* 2021, 12, 645834.