

2016年度 博士論文

**Role of purinoceptor signaling in mast cell function:
Possible therapeutic target for allergic inflammatory disease**

マスト細胞の機能調節におけるプリン受容体シグナルの役割:

アレルギー性炎症疾患治療薬の標的としての可能性

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 1320101
氏名 吉田 一貴
指導教員 松岡 功

目次

第1章 序論	1
第2章 プリン作動性シグナルによるマスト細胞活性化の調節	6
2-1 緒言	6
2-2 実験材料及び実験方法	7
1) 試薬.....	7
2) マウス.....	8
3) 細胞培養	8
4) フローサイトメリー解析	9
5) 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定.....	9
6) BMMC からの messenger ribonucleic acid (mRNA) 抽出	10
7) 逆転写反応による complimentary deoxyribonucleic acid (cDNA) の作製.....	10
8) Real time polymerase chain reaction (PCR)	11
9) Small interfering ribonucleic acid (siRNA) 及びプラスミド DNA のトランスフェクション ...	13
10) 脱顆粒反応.....	13
11) 遺伝子導入した HEK293 細胞共培養下での脱顆粒反応	14
12) ウェスタンブロット.....	14
13) 細胞外無機リン酸 (Pi) 濃度の測定.....	15
14) 統計処理	15
2-3 結果	16
1) BMMC における P2 受容体の遺伝子発現.....	16
2) プリン受容体を介した $[Ca^{2+}]_i$ の変化	16
3) プリン受容体を介した脱顆粒反応.....	18

4) ATP による FcεRI/IgE を介した脱顆粒反応の増強における P2X4 受容体の役割	20
5) P2 受容体と P1 受容体の共刺激の脱顆粒反応に対する影響.....	24
6) ATP と Ade の共刺激反応における細胞外 ATP 分解酵素の役割	24
2-4 考察	26
第 3 章 P2X 受容体阻害薬の探索.....	32
3-1 緒言	32
3-2 実験材料及び実験方法	33
1) 試薬.....	33
2) 細胞培養	34
3) [Ca ²⁺] _i 測定	34
4) パッチクランプによる細胞膜電流の測定.....	34
5) ウェスタンブロット	35
6) Lactate dehydrogenase (LDH) の測定.....	35
7) 逆転写反応による cDNA の作成と real time PCR	35
8) 脱顆粒反応.....	36
9) Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) による MIP-2 の定量	36
10) ヒト、マウス、ラット P2X7 受容体発現プラスミドの作製.....	36
11) シークエンス.....	37
12) 遺伝子導入.....	38
13) Ethidium bromide (EtBr) の流入	38
14) CD23 のシェディング	38
15) 担癌モデルマウス.....	39
16) 統計処理	39
3-3 結果	39

1) 抗アレルギー薬の P2X4 受容体または P2X7 受容体に対する効果	39
2) N18TG2 細胞における ATP による Ca ²⁺ 応答及び細胞膜電流に対する oxatomide (Oxa) の効果	42
3) N18TG2 細胞と J774 細胞における P2X7 受容体を介した細胞機能変化に及ぼす Oxa の効果	44
4) P2X7 受容体を介した BMMC の脱顆粒反応におよぼす Oxa の効果	45
5) ヒト、マウス、ラット P2X7 受容体に対する Oxa の効果	46
6) ヒトミエローマ RPMI8226 細胞における ATP による Ca ²⁺ 応答に対する Oxa の効果	48
7) RPMI8226 細胞の P2X7 受容体を介したポアの形成と CD23 のシェディングに及ぼす Oxa の効果	51
8) B16 細胞担癌モデルマウスにおける P2X7 受容体依存性腫瘍増殖に及ぼす Oxa の作用	51
3-4 考察	53
第 4 章 マウスマスト細胞の P2X7 受容体に対するデキサメタゾン(DEX) の効果	58
4-1 緒言	58
4-2 実験材料及び実験方法	59
1) 試薬	59
2) 細胞培養	60
3) マウス	60
4) 逆転写反応による cDNA の作成と real time PCR	60
5) フローサイトメリー解析	60
6) EtBr の流入	61
7) [Ca ²⁺] _i 測定	61
8) 脱顆粒反応	61

9) 統計処理	61
4-3 結果	61
1) BMMC の P2X 受容体発現に対する DEX の効果.....	61
2) BMMC の P2X7 受容体活性化によるポアの形成と脱顆粒反応に対する DEX の効果..	63
3) マウス腹腔マスト細胞の P2X7 受容体発現量に対する DEX 投与の効果.....	65
4-4 考察	66
総括.....	69
謝辞.....	72
参考文献	73

略語表

本論文においては以下の略語を用いた

[Ca ²⁺] _i	:	細胞内 Ca ²⁺ 濃度
Ade	:	adenosine
ADP	:	adenosine diphosphate
AMP	:	adenosine monophosphate
AP-1	:	activator protein 1
APC	:	allophycocyanin
ATP	:	adenosine triphosphate
BMM	:	bone marrow-derived macrophage
BMMC	:	bone marrow-derived mast cell
BSA	:	bovine serum albumin
CD73	:	ecto-5'-nucleotidase
cDNA	:	complimentary DNA
COX-2	:	cyclooxygenase-2
DAMPs	:	damage-associated molecular patterns
DEX	:	dexamethasone
DMEM	:	dulbecco's modified eagle medium
DNA	:	deoxyribonucleic acid
DNase	:	deoxyribonuclease
DNP-HSA	:	dinitrophenyl-conjugated human serum albumin
E-ALP	:	ecto-alkaline phosphatase
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	:	enhanced green fluorescent protein

ELISA	:	enzyme-linked immune sorbent assay
E-NPP	:	ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase
E-NTPD	:	ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase
ERK	:	extracellular signal-regulated kinase
EtBr	:	ethidium bromide
FACS	:	fluorescence activated cell sorting
FBS	:	fetal bovine serum
FITC	:	fluorescein isothiocyanate
Fura2-AM	:	Fura2-acetoxymethyl ester
GAPDH	:	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPCR	:	G protein coupled receptor
GR	:	glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体)
GRE	:	glucocorticoid response element
HEPES	:	4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	:	horseradish peroxidase
HSP	:	heat shock protein
Ig	:	immunoglobulin
IL	:	interleukin
KRH	:	krebs ringer hepes buffer
LDH	:	lactate dehydrogenase
MAPK	:	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	:	macrophage colony stimulating factor
MIP-2	:	macrophage inflammatory protein 2
M-MLV RT	:	moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

mRNA	:	messenger RNA
NFκB	:	nuclear factor-kappa B
NLRP	:	NLR family-containing pyrin domain
Oxa	:	oxatomide (オキサトミド)
PAMPs	:	pathogen-associated molecular patterns
PBS (-)	:	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ free リン酸緩衝液
PCR	:	polymerase chain reaction
PE	:	phycoerythrin
Pi	:	無機リン酸
PI	:	propidium iodide
PMA	:	phorbol 12-myristate 13-acetate
PRRs	:	pattern-recognition receptors
PTX	:	pertussis toxin (百日咳毒素)
PVDF	:	polyvinylidene difluoride
RNA	:	ribonucleic acid
RNase	:	ribonuclease
RPMI	:	Roswell park memorial institute medium
SAIDs	:	steroidal anti-inflammatory drugs (ステロイド系抗炎症薬)
SDS	:	sodium dodecyl sulfate
siRNA	:	small interfering RNA
TBS-T	:	tris-buffered saline-tween
TLR	:	toll-like receptor
UDP	:	uridine diphosphate
UDP-G	:	uridine diphosphate-glucose

UTP : uridine triphosphate

β -Hex : β -hexosaminidase

第1章 序論

炎症反応は体内に侵入した細菌や死細胞などの異物を排除し、損傷部位を修復するために必要な生体防御機構である。生体の恒常性維持のために炎症反応はなくてはならないものであるが、過剰な反応は組織の破壊や線維化を引き起こす [1]。生体内に侵入した細菌やウイルスを排除するための炎症反応は、細菌やウイルスが有する pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を toll-like receptor (TLR) のような pattern-recognition receptors (PRRs) が認識することによって引き起こされる [2]。一方で、心筋梗塞やアテローム性血栓症、自己免疫疾患、がんなどでは damage-associated molecular patterns (DAMPs) と呼ばれる、生体内に元から存在する物質によって無菌的に炎症反応が進む。DAMPs はプロテアーゼによって切断された細胞外基質や細胞死によって細胞外に放出された細胞内分子(タンパク質または非タンパク質) などであり、PRRs に認識されることによって作用する [3]。DAMPs となる細胞内分子として、核の中でクロマチン結合因子として働く high-mobility group box-1 [4] や heat shock proteins (HSPs) [5]、尿酸結晶 [6]、adenosine triphosphate (ATP) [7]などが知られている。DAMPs の多くは、PRRs を介したシグナルやファゴサイトシスによって取り込まれた後に NLR family-containing pyrin domain (NLRP) 3 を活性化することによって炎症反応を引き起こすが [3]、ATP は細胞膜上の P2 受容体を介して炎症反応を引き起こすことが知られている [8]。P2 受容体には多くのサブタイプが存在するが、炎症反応の中心的役割を果たす受容体として P2X7 受容体がよく知られている。P2X7 受容体はリンパ球、マクロファージ、樹状細胞など多くの免疫細胞に発現しており、活性化により様々な炎症性サイトカインの産生・

放出や NLRP3 の活性化に関与する [9, 10]。さらに、P2X7 受容体は強力に刺激されることで細胞死を引き起こす巨大なポアを開口する [11]。これらの反応は結果的に炎症反応を増強し、炎症性腸疾患、アレルギー性疾患などの悪化に関与する [12, 13]。

細胞内における重要なエネルギー物質である ATP は、DAMPs としてのみならず、生体の環境変化に伴う様々な刺激に応じて細胞外に放出され、細胞間の情報伝達物質としても働く。細胞外に放出された ATP を認識する受容体サブタイプは複数存在し、P2 受容体と総称されている。P2 受容体はイオンチャネル型の P2X 受容体と G protein coupled receptor (GPCR) の P2Y 受容体に大別されており、P2X 受容体には 7 種類 (P2X1-7)、P2Y 受容体には 8 種類 (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) のサブタイプが存在する [14, 15]。さらに、ATP は細胞外 ATP 分解酵素である ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDase) と ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) によって adenosine diphosphate (ADP) 及び adenosine monophosphate (AMP) に加水分解され、AMP はさらに ecto-5'-nucleotidase (CD73) や ecto-alkaline phosphatase (E-ALP) によって加水分解され adenosine (Ade) に変換される [16, 17]。こうして ATP の水解により産生された Ade は、特異的なトランスポーターにより細胞内に取り込まれ再利用されるとともに、細胞外では P1 受容体に作用する生理活性物質として重要な役割を果たしている。P1 受容体は全て GPCR であり、4 種類 (A_{1, 2A, 2B, 3}) のサブタイプが存在する [18, 19]。このような、ATP やその分解産物によって引き起こされる情報伝達は Ade がプリン骨格を持つことからプリン作動性シグナルとして知られている [20, 21]。プリン作動性シグナルの概要とプリン受容体と細胞外 ATP 分解酵素の特性を

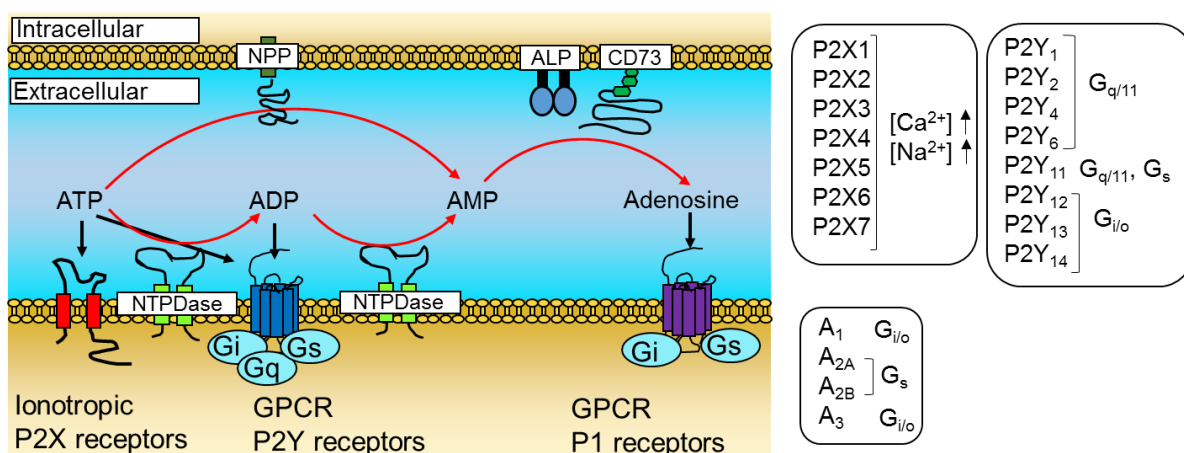


Fig. 1. An outline of purinergic signaling

Fig. 1 及び Table.1 - 4 に示す。

プリン作動性シグナルの起点となる ATP や uridine triphosphate (UTP) などのヌクレオチドは、細胞内には豊富に存在するが、細胞外には通常ごく微量にしか存在しない。そのため、必要な時に、必要な場所で、必要な量が放出される必要がある。細胞外 ATP の濃度は厳密にコントロールされており、様々な刺激に応じてエキソサイトーシスやヘミチャネルなどを介して細胞外に放出される。最もよく知られている P2 受容体の作用として、ADP による血小板凝集作用がある [22]。血小板は活性化すると、細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇し脱顆粒が起こる。その結果、顆粒内に貯蔵されていた ADP が放出され、血小板の P2Y₁ 及び P2Y₁₂ 受容体に作用することで凝集反応が促進される。その他にも、血管内皮細胞に発現している P2X₄ 受容体による血圧調節や P2X₇ 受容体によるマクロファージの活性化、P2X₂/ P2X₃ ヘテロ受容体による味覚の神経伝達などが知られている [23-25]。

I 型アレルギー反応の中心的な役割を担っているマスト細胞においてもプリン作動性シグナル

Table.1 Pharmacological properties of P1 receptors

Receptor	Endogenous ligand (pEC ₅₀)	Agonist (pEC ₅₀)		Antagonist (pIC ₅₀)	
A ₁	Adenosine (7.0)	NECA (4.9)	CCPA (6.1)	Caffeine (2.0)	DPCPX (5.5)
A _{2A}	Adenosine (6.5)	NECA (4.7)	CGS21680 (4.6)	Caffeine (1.6)	Istradefylline (3.9)
A _{2B}	Adenosine (4.8)	NECA (3.9)	BAY-60-6583 (5.5)	Caffeine (1.5)	MRS1754 (5.7)
A ₃	Adenosine (6.5)	NECA (4.6)	IB-MECA (5.7)	Caffeine (1.9)	MRS1220 (8.6)

Table.2 Pharmacological properties of P2X receptors

Receptor	Endogenous ligand (pEC ₅₀)	Agonist (pEC ₅₀)		Antagonist (pIC ₅₀)	
	ATP	$\alpha\beta$ -meATP	BzATP	Suramin	
P2X1	7.2	6.5	8.5	6.0	NF449 (9.5)
P2X2	5.9	> 3.5	6.1	5.0	
P2X3	6.3	6.1	7.1	5.5	
P2X4	5.0	> 3.5	5.2	> 3.3	5-BDBD (6.3)
P2X5	5.0	> 3.5	3.3	5.4	
P2X6	4.9	> 4.0		>4.0	
P2X7	4.0	> 3.5	4.7	3.3	AZ10606120 (7.7)

Table.3 Pharmacological properties of P2Y receptors

Receptor	Endogenous ligand (pEC ₅₀)		Agonist (pEC ₅₀)	Antagonist (pIC ₅₀)
P2Y ₁	ADP (5.1)		MRS2365 (9.4)	MRS2500 (9.0)
P2Y ₂	UTP (8.1)	ATP (7.1)	MRS2698 (8.1)	AR-C126313 (6.0)
P2Y ₄	UTP (5.6)			Suramin (> 4.0)
P2Y ₆	UDP (6.5)		5-IUDP (7.8)	MRS2578 (7.4)
P2Y ₁₁	ATP (4.8)		NF546 (6.3)	NF340 (7.1)
P2Y ₁₂	ADP (7.2)			AR-C69931MX (9.4)
P2Y ₁₃	ADP (7.9)			MRS2211 (6.0)
P2Y ₁₄	UDP (6.8)	UDP-glucose (6.5)	MRS2690 (7.3)	

の機能解析が行われており、Ade や ATP がマスト細胞の活性化を正に制御することが古くから知られている [26–28]。しかしながら、このような研究は P2 受容体のサブタイプや機能が多様であることが見いだされる前に行われたものが多く、マスト細胞の活性化に関与する ATP 受容体の詳細や P2 受容体を介する反応と細胞外 ATP 分解酵素によって産生された Ade による P1 受容体を介した反応との相互作用に関する解析は殆ど行われていない。そこで、本研究の第 2 章ではプリン作動性シグナルがマスト細胞の脱顆粒反応に及ぼす影響をマウス骨髄由来マスト細胞 (bone

Table.4 Properties of ecto-nucleotide enzymes

Enzyme	Localization	Substrate specificity	Additional name
E-NTPDase 1	cell surface	$NTP \rightarrow NDP + Pi \rightarrow NMP + 2Pi$	CD39
E-NTPDase 2	cell surface	$NDP \rightarrow NMP + Pi$	CD39L1
E-NTPDase 3	cell surface	$NTP \rightarrow NDP + Pi$	CD39L3
E-NTPDase 4	intracellular	$UDP \rightarrow UMP + Pi$	UDPase
E-NTPDase 5	intracellular	$NDP \rightarrow NMP + Pi$	CD39L4
E-NTPDase 6	intracellular	$NDP \rightarrow NMP + Pi$	CD39L2
E-NTPDase 7	intracellular	$ATP \rightarrow ADP + Pi$	
E-NTPDase 8	cell surface	$NTP \rightarrow NDP + Pi \rightarrow NMP + 2Pi$	
E-NPP1	cell surface	$NTP \rightarrow NMP + PPi$	PC-1
E-NPP2	secretion	$NTP \rightarrow NMP + PPi$	Autotaxin
E-NPP3	cell surface	$NTP \rightarrow NMP + PPi$	CD203c
Ecto-5'-nucleotidase	cell surface	$NMP \rightarrow \text{nucleoside} + Pi$	CD73
E-ALP	cell surface	$NTP \rightarrow NDP + Pi \rightarrow NMP + 2Pi$	

marrow-derived mast cell; BMMC) を用いて検討した。またマスト細胞の機能調節が多くの抗アレルギー薬の標的になっていることから、第3章では既存の抗アレルギー薬の中にプリン作動性シグナルに影響する薬物がないかを検討した。その結果、P2X7 受容体の阻害作用を持つ既知の薬物を見出したので、その性質を解析しドラッグリポジショニングの可能性を考察した。さらに、第4章では免疫反応を強力に抑制する dexamethasone (DEX) のプリン作動性シグナルに及ぼす影響について BMMC を用いて検討し、グルココルチコイドの抗アレルギー作用のメカニズムの一端として ATP 受容体の発現調節が関与する可能性について考察した。

第2章 プリン作動性シグナルによるマスト細胞活性化の調節

2-1 緒言

マスト細胞は全身に広く分布し、I型アレルギー反応や慢性アレルギー性炎症で中心的な役割を果たす造血幹細胞由来の免疫細胞である [29, 30]。マスト細胞は immunoglobulin E (IgE) 高親和性受容体 (FcεRI) に結合した IgE が抗原によって架橋されると活性化し、脱顆粒反応によってヒスタミンや tumor necrosis factor-α などの炎症性サイトカイン、プロテアーゼなどのケミカルメディエーターを放出する。FcεRI と抗原による活性化に加えて、様々なケミカルメディエーターが直接マスト細胞を活性化し、さらには、抗原による活性化を増強することが報告されている [30-32]。これらのケミカルメディエーターには神経細胞終末から放出されたサブスタンス P [33] や脂質メディエーターであるアラキドン酸代謝物のプロスタグランジン E₂ [34] 及びスフィンゴシン-1-リン酸 [35]、活性化または傷害を受けた細胞から放出された細胞外 ATP [12, 36] などが知られている。これらのうち、細胞外 ATP は P₂ 受容体を介して様々な免疫細胞の反応を調節する重要な因子として知られている [8]。マスト細胞には複数のプリン受容体サブタイプが発現しており、ATP 及びその類縁体の刺激に反応することが知られているが、各サブタイプがマスト細胞の脱顆粒やサイトカイン産生などの機能発現をどのように調節しているかは十分に解明されていない [37-40]。

一方、ATP の分解産物である Ade に関してはマスト細胞の機能を調節することがよく知られている [28, 41]。細胞外 ATP の分解は細胞膜表面に存在する E-NTPDase や E-NPP、CD73、E-ALP

によって行われる [16, 17]。これらの ATP 分解酵素の連携により、ATP や ADP などは速やかに Ade に分解される。その結果、ATP は P2 受容体のみならず、Ade の受容体である P1 受容体にも作用することができる [42–44]。しかしながら、細胞外 ATP 分解酵素が細胞外 ATP によるマスト細胞の活性化にどのような役割を担っているかは明らかになっていない。そこで、本章では BMMC を用いて、P1 及び P2 受容体と細胞外 ATP 分解酵素の機能的な発現を解析し、プリン作動性シグナルが脱顆粒反応に及ぼす影響を詳細に検討した。

2-2 実験材料及び実験方法

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。Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)、roswell park memorial institute (RPMI) 1640 medium : 和光純薬。Interleukin (IL) -3、stem cell factor (SCF) : Peprotec。Fura2-acetoxymethyl ester (Fura2-AM) : 同仁堂。SYBR premix EX Taq、ランダムプライマー、ribonuclease (RNase) inhibitor : タカラバイオ。Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT) : Invitrogen。ATP、ADP、UTP、uridine diphosphate (UDP)、uridine diphosphate-glucose (UDP-G)、adenosine、BzATP、 $\alpha\beta$ -meATP、 $\alpha\beta$ -meADP、ATP γ S、2MeATP、AppNHp、5-BDBD、Ivermectin、GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit、bovine serum albumin (BSA)、dinitrophenyl-conjugated human serum albumin (DNP-HSA)、p-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminide、百日咳毒素 (PTX)、抗 DNP IgE 抗体 (clone:

SPE-7) :Sigma。AZ10606120、MRS1220:Tocris bioscience。FuGENE HD:プロメガ。抗 P2X4 受容体抗体 (APR-002) :Alomone labs。抗 actin 抗体:Santa Cruz。horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG 抗体:Cell signaling。Phycoerythrin (PE)-conjugated anti FcεRI antibody (clone: MAR-1) : Affymetrix japan。Allophycocyanin (APC)-conjugated anti c-KIT antibody (clone: 2B8) :BD biosciences。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。

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。DMEM 培地には FBS (5 %)、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。

BMMC 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、18 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 (FACSCantII, BD Biosciences) によって BMMC のマーカである FcεRI と c-Kit が両陽性の細胞が 95 % 以上で有ることを確認して実験に用いた。HEK293 細胞は Invitrogen より入手し DMEM 培地で維持し、3 - 4 日ごとに継代した。

4) フローサイトメトリー解析

細胞を Mg²⁺, Ca²⁺ free リン酸緩衝液 (PBS(-)) で 2 回洗浄し、100 μL の PBS (-) に浮遊させた。抗体溶液を加えて氷上で 30 分反応させた後、2 回洗浄した。1 μg/mL の propidium iodide (PI) を含む PBS (-) に再懸濁し、FACSCantIIによる解析を行った。使用した抗体の標識物質と希釈倍率を以下に示す。PE conjugated anti FcεRI antibody (×100)、APC conjugated anti c-KIT antibody (×100)

5) 細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 測定

細胞を 0.1 % BSA を含む krebs-ringer-HEPES (KRH; NaCl 130 mM, KCl 4.7 mM, NaHCO₃ 4.0

mM、 KH_2PO_4 1.2 mM、Glucose 11.5 mM、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 10 mM、 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.8 mM、 MgSO_4 1.2 mM、pH 7.4) に懸濁し最終濃度 1 μM の Fura-2 AM を 37 °C、20 分でローディングした後、2 度洗浄し KRH に再懸濁し細胞浮遊液とした。細胞浮遊液を石英セルに入れ、Fluorescence Spectrophotometer F-2500 (日立) を用いて 340 nm と 380 nm の励起波長で生じる 510 nm の蛍光を測定した。測定ごとに 0.1 % Triton X-100 と 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を用いて最大蛍光と最少蛍光を測定し、Fura-2 と Ca^{2+} の解離定数を 224 nM とした時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を FL solution 2.0 (日立バイオテクノロジー) を用いて算出した。

6) BMMC からの messenger ribonucleic acid (mRNA) 抽出

BMMC からの mRNA 抽出は GenElute Mammalian Total RNA Purification Kit を用いた。1 $\times 10^6$ 個以上の細胞を取扱説明書にしたがって処理し、最終的に 15 μL で溶出した。deoxy ribonuclease (DNase) 処理は行わなかった。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。

7) 逆転写反応による complimentary deoxyribonucleic acid (cDNA) の作製

2-2-6 で作成した mRNA 0.5 – 1.5 μg を用いて以下の組成で反応液 A 及び B を作成した。
反応液 A : RNA 溶液 (0.5 – 1.5 μg)、100 μM オリゴ p(dN) 6 ランダムプライマー (0.5 μL)、diethylpyrocarbonate 処理したミリ Q 水 (全量 5 μL)。

反応液 B : 5 × first strand buffer (2 μL)、5 mM deoxynucleotide triphosphate (1 μL)、0.1 M dithiothreitol (1 μL)、M-MLV RT (0.5 μL) RNase inhibitor (0.5 μL)

サーマルサイクラーを用いて以下のように反応させた。反応液 A を 95 °C で 2 分反応させ、氷上へ移し十分冷却した後に 37 °C で 5 分間反応させた。その後、反応液 B を加えて 37 °C で 90 分間反応させた。最後に、95 °C で 10 分加熱し反応を停止させた。反応終了後、ミリ Q 水を 190 μL 加えて cDNA 溶液とした。

8) Real time polymerase chain reaction (PCR)

2-2-7 で作成した cDNA 溶液を用いて行った。cDNA 溶液 (2 μL)、10 μM プライマー mix (1 μL)、SYBR Green premix (3 μL)、ミリ Q 水 (4 μL) を含む全量 10 μL の反応液を作成した。この反応液を 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 real time PCR を行った。

real time PCR で用いたプライマーは以下の塩基配列を用いた。

P2X1, 5'-TCTTCTTCATGAGGCTGAGA-3' (S), 5'-ACTGGTAGATGGGTTTGCAG-3' (AS)

P2X2, 5'-GAATCAGAGTGCAACCCCAA-3' (S), 5'-TCACAGGCCATCTACTTGAG-3' (AS)

P2X3, 5'-AAGTACCGCTGTGTGTCTGA-3' (S), 5'-ATCTAGCCGAGTGAAGGAAT-3' (AS)

P2X4, 5'-TTACCACCTCCTACCTCAAG-3' (S), 5'-CTGCTCGTAGTCTTCCACAT-3' (AS)

P2X5, 5'-ACACACACAATCCATCTCCT-3' (S), 5'-GCTTCATGTTACGAAGG-3' (AS)

P2X6, 5'-TAAGGAGCTGGAGAACCG-3' (S), 5'-TATGTGTTGTCCCAGGTTA-3'(AS)

P2X7, 5'-GAAGACCTGTGAAGTCTCTG-3' (S), 5'-CATGATTCCTCCCTGAACTG-3' (AS)

P2Y1, 5'-CTGATCTTGGGCTGTTGG-3' (S), 5'-GCTGTTGAGACTTGCTAGAC-3' (AS)

P2Y2, 5'-GGTTTATTACTACGCCCGGG-3' (S), 5'-AAGGAGTAGTAGAGGGTGCG-3' (AS)

P2Y4, 5'-CCTCGTCTACTACTATGCTGCC-3' (S), 5'-CCATGATTGTGGAAGTGAAG-3' (AS)

P2Y6, 5'-GTAGTGTGTGGAGTCGTGTG-3' (S), 5'-CTGTAAGAGATCGTGGGGTT-3' (AS)

P2Y12, 5'-CCAAAGTTCCCAAGAAAAAG-3' (S), 5'-CACCTTCTTGTCCCTTTCTTC-3' (AS)

P2Y13, 5'-TCTGGGTGTTTCATCCACATC-3' (S), 5'-CCTAAACGGTACGACGATCT-3' (AS)

P2Y14, 5'-TTCTTCGGGCTCATCAGCTT-3' (S), 5'-AGCAGAAGGAACACGATCCA-3' (AS)

E-NTPDase1, 5'-GAATGCCAAGTGAAAGGTCC-3' (S), 5'-GATCCAAAGCGCCAAAGGTT-3' (AS)

E-NTPDase2, 5'-ACAGGATGAAGGGGTGTTTG-3' (S), 5'-ACCCCATGAAGGAGCATTG-3' (AS)

E-NTPDase3, 5'-CAGATGCCAACATCAGCAAC-3' (S), 5'-GAATCCTGCAAATGCCACAA-3' (AS)

E-NTPDase8, 5'-TCTACTCAGCTACCTC-3' (S), 5'-CTCCATTGAAAGCACAATCC-3' (AS)

E-NPP1, 5'-AGTGCTGTCGCTGGTTTTGT-3' (S), 5'-AAGAGAGTAGGGGGTGATTC-3' (AS)

E-NPP3, 5'-TTTGTATCCAGAGTCGCACG-3' (S), 5'-GTTAGGGAAGGAGCCATTGA-3' (AS)

CD73, 5'-AGAGCAAACCAGCGATGACT-3' (S), 5'-TCAATCAGTCCTTCCACACC (AS) -3'

E-ALP, 5'-GACACAAGCATTCCCCTACTAT-3' (S), 5'-ATCAGCAGTAACCACAGTCA (AS) -3'

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 5'-TGCTGAGTATGTCGTGGAGT-3' (S), 5'-CATACTTGGCAGGTTTCTCC-3' (AS).

9) Small interfering ribonucleic acid (siRNA) 及びプラスミド DNA のトランスフェクション

2.5 × 10⁶ 個の BMMC を siRNA (200 pmol) を含んだ opti MEM (100 μL) に懸濁し Amaxa nucleofector (Lonza) のプロトコール Y-001 を用いて siRNA を導入した。その後、IL-3 及び SCF を含んだ RPMI1640 培地で 24 時間培養し実験に用いた。

HEK293 細胞への enhanced green fluorescent protein (EGFP) -C1 プラスミドまたは CD73 発現プラスミドの遺伝子導入は FuGene HD を用いた。遺伝子導入 8 時間後に Poly-L-lysine コートした 48 well plate に播種し、一晩培養してから実験に用いた。siRNA は以下の配列を用いた。P2X4R siRNA sequence: UGUAAAAUGUAAAAAUGCCGG (S), GGCAUUUUUACAUUUUAC AGG(AS). CD73 発現プラスミドは Takahashi-Sato K et al. (2013) [45]と同じものを用いた。

10) 脱顆粒反応

脱顆粒反応は抗 DNP-IgE 抗体 (500 ng/mL) で一晩感作した BMMC からの β-hexosaminidase (β-Hex) の放出率を測定することで評価した。PTX (50 ng/mL) は IgE と同時に加えた。感作した細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、1 × 10⁵ cells/100 μL になるように 0.1 % BSA-KRH に再懸濁した。5 -BDBD、Ivermectin、または AZ10606120 を用いた実験では、これらの薬物を含む KRH 中で 5 分間前処置した。その後、DNP-HSA 刺激を含む様々な刺激を 5 分間、37°Cで行った。反応液を氷

上に1分間静置し、遠心分離することで反応を止め、上清を回収し、沈殿した細胞を1% TritonX-100で溶解した。上清または細胞溶解液(50 μL)をβ-Hexの基質である1 mM *p*-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminideを含んだ citrate buffer (pH 4.5, 50 μL)と混合し37°Cで30分反応させた。その後、混合液にNa₂CO₃/NaHCO₃バッファー (pH 10.4, 100 μL)を加えて、405/655 nmの吸光度を測定した。放出率は次の式で計算した。

$$\beta\text{-Hex 放出率 (\%)} = \frac{\text{上清吸光度}}{(\text{上清吸光度} + \text{細胞溶解液吸光度})} \times 100$$

実験はすべて duplicate または triplicate で行った。

11) 遺伝子導入した HEK293 細胞共培養下での脱顆粒反応

2-2-9の方法に従って遺伝子導入した HEK293 細胞を Poly-L-lysine コートした 48 well plate に播種し 24 時間インキュベーションした。CD73 の活性を 2-2-13 の方法に従って確認してから実験を行った。48 well plate に播種した細胞を KRH で洗浄し、 1×10^5 cells/100 μL になるように BSA-KRH に懸濁した BMMC 溶液を 100 μL ずつ各 well に入れ 5 分間プレインキュベーションした。その後、目的の最終濃度になるように調整した抗原やヌクレオチドなどを含む KRH を 50 μL 加えて 10 分間反応させた。反応終了後、ピペッティングによって BMMC を浮遊させてから上清を全量回収し、2-2-8と同様にβ-Hexの放出率を測定した。

12) ウェスタンブロット

培地を取り除き sample buffer (25% glycerine、1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、62.5 mM Tris-Cl and 10 mM β-mercaptoethanol) 100 μLを加えて細胞を溶解した。細胞を溶解したサンプル溶液

を 500 μ L チューブに回収し、室温で一晩放置した。続いて、10 % アクリルアミドゲルでサンプル溶液を電気泳動 (100 V、90 分) した。次に泳動したサンプルタンパク質をセミドライ・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 $^{\circ}$ 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 90 分間振盪した。ECL blotting detection system を用いて化学発光させ、FUJIFILM INTERCLINICAL DARK BOX LAS-3000 を用いて撮影した。使用した抗体の希釈倍率を以下に示す。Anti P2X4 receptor (\times 300)、HRP conjugated anti-rabbit IgG (\times 10,000)

13) 細胞外無機リン酸 (Pi) 濃度の測定

BMMC を Pi free KRH (KH_2PO_4 を含まない KRH) で 2 回洗浄し、 1×10^5 cells/100 μ L になるように懸濁した。細胞懸濁液に最終濃度 100 μ M になるように ATP、ADP、AMP を加えて、5 から 30 分間インキュベーションした。遠心分離によって反応を止め、上清 (50 μ L) を 10 mM EDTA (50 μ L) と混合した。混合液 (50 μ L) をマラカイトグリーン液 (50 μ L) と混合し、室温で 30 分間反応させた後に 655 nm の吸光度を測定した。検量線は KH_2PO_4 を用いて作成した。

14) 統計処理

実験結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。2 群間の比較には Student's *t*-test を、また多群間の検定には Dunnett's 検定を用いた。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。

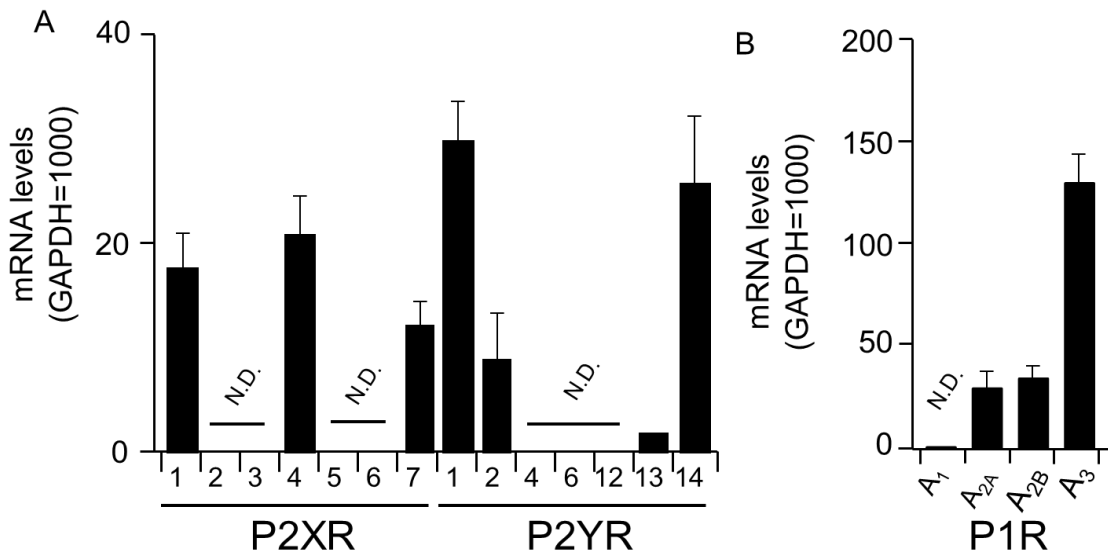


Fig. 2. Expression of purinoceptor mRNA in BMMC. P2 (A) and P1 (B) receptor mRNA levels in BMMC were analyzed by real-time PCR. Data were normalized by GAPDH mRNA levels. Values are shown as means \pm S.E.M. (n = 3). N.D., not detected.

2-3 結果

1) BMMC における P2 受容体の遺伝子発現

BMMC にどのようなプリン受容体の遺伝子が発現しているか real time PCR によって解析を行った。BMMC には、イオンチャネル型受容体である P2X₁、4、7 及び G タンパク質共役型受容体である P2Y₁、2、14 の発現が認められた。僅かではあるが、P2Y₁₃ 受容体の発現も認められた。また、Ade 受容体である P1 受容体は A_{2a}、A_{2b}、A₃ 受容体が発現しており、A₃ 受容体の発現が最も高かった(Fig. 2)。

2) プリン受容体を介した[Ca²⁺]_i の変化

IgE で感作した BMMC を抗原である DNP-HSA (50 ng/mL) で刺激すると瞬時に持続的な[Ca²⁺]_i

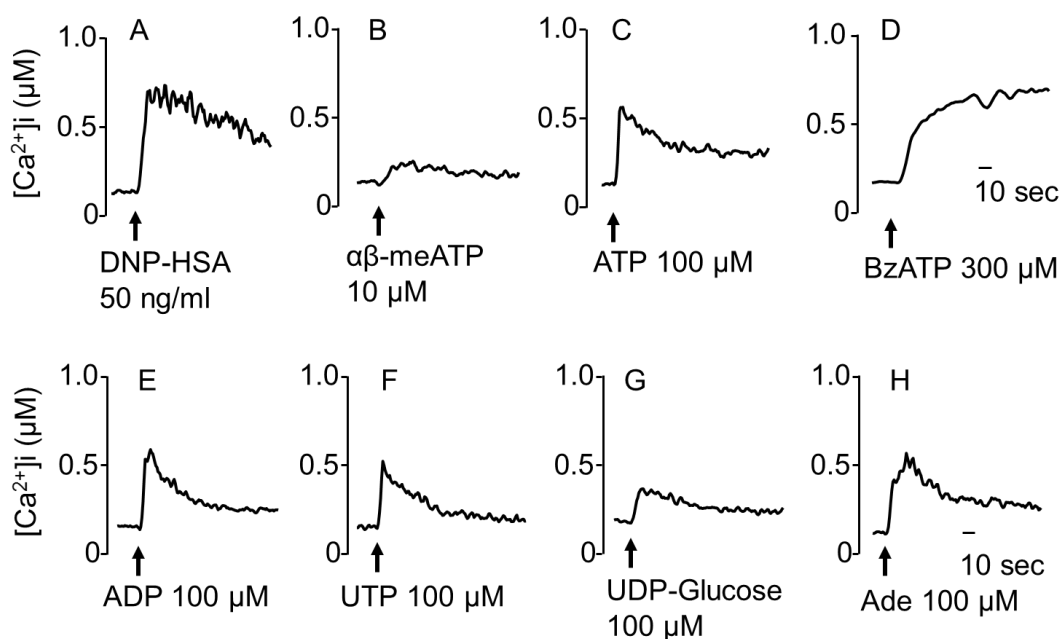


Fig. 3. Effects of purinoceptor agonists on intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in BMBC. BMBC were sensitized with anti-DNP- IgE overnight and then labelled with Fura-2AM. Results shown are typical traces of increased $[Ca^{2+}]_i$ induced by antigen DNP-HSA (A, 50 ng/mL) or purinoceptor agonists $\alpha\beta$ -meATP (B, 10 μ M), ATP (C, 100 μ M), BzATP (D, 300 μ M), ADP (E, 100 μ M), UTP (F, 100 μ M), UDP-G (G, 100 μ M), or Ade (E, 100 μ M). Results are representative of three independent experiments

の上昇が引き起こされた (Fig. 3A)。次に、DNP-HSA に替えて、プリン受容体刺激薬を加えた時の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を測定した。Table 5 に示すように、今回検討したプリン受容体刺激薬は mRNA レベルで BMBC に発現していることが確認されたプリン受容体を刺激するものであり、特異性を維持しつつ最大反応を引き出せる濃度で用いた [46]。P2X1 受容体アゴニストである $\alpha\beta$ -meATP はわずかに $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。P2X1、P2X4、P2Y₂ 受容体を刺激する ATP (100 μ M) 及び P1 受容体アゴニストである Ade (100 μ M) は一過性に $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、その後も高い状態に保った。P2X7 受容体アゴニストである BzATP (300 μ M) は持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こした。一方で、P2Y₁ 受容体アゴニストである ADP (100 μ M) と P2Y₂ 受容体アゴニストである UTP (100 μ M) 及び P2Y₁₄

Table 5. Pharmacological properties of purinergic receptors expressed in BMMCs.

	Agonist (EC ₅₀ (μM))						
	αβ-meATP	BzATP	ATP	ADP	UTP	UDP-glucose	Adenosine
P2X1	0.3	0.003	0.07				
P2X4	>300	>500	10				
P2X7	>300	20	100				
P2Y ₁				8.1			
P2Y ₂			0.09		0.008		
P2Y ₁₄						0.4	
A _{2A}							0.3
A _{2B}							15.0
A ₃							0.3

受容体アゴニストである UDP-G (100 μM) は一過性に[Ca²⁺]_iを上昇させた。これらの結果から、BMMC において遺伝子発現が認められたプリン受容体は全て機能的に発現していると考えられた (Fig. 3)。

3) プリン受容体を介した脱顆粒反応

次に、BMMC において発現が認められた P2 及び P1 受容体の刺激が脱顆粒反応に及ぼす影響を検討した。IgE で感作した BMMC を DNP-HSA (50 ng/mL) または ATP (0.5 mM) で刺激すると、刺激開始から 1 分後には脱顆粒反応が認められた。DNP-HSA では 1、3、5、10 分後、ATP では 3 分後と 5 分後の脱顆粒反応はほぼ同等であった。また、BMMC を様々な濃度の DNP-HSA または ATP で 5 分間刺激すると濃度依存的に脱顆粒が引き起こされた (Fig. 4)。これらの結果をもとに、刺激時間を 5 分とし、Fig. 3 で用いた各種プリン受容体アゴニストである αβ-meATP (10 μM)、ATP、ADP、UTP、UDP-G 及び Ade 各 100 μM で BMMC を 5 分間刺激すると、Ade のみが僅か

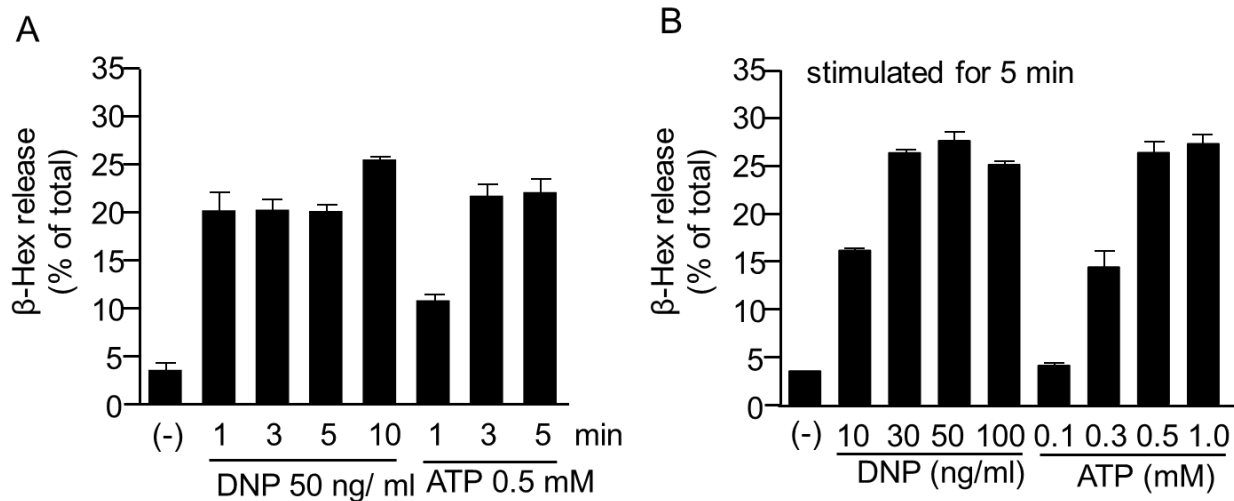


Fig. 4. Time course and dose-response relationship of DNP-HSA- and ATP-induced degranulation. BMDC were sensitized with anti-DNP-IgE overnight and stimulated with DNP-HSA (50 ng/mL) or ATP (0.5 mM) for the indicated time periods (A), or with different concentrations of DNP-HSA (10-100 ng/mL) or ATP (0.1-1 mM) for 5 min (B). Data are shown as means \pm S.E.M.

であるが有意な脱顆粒反応を引き起こした (Fig. 5A)。一方、BzATP (300 μ M) は抗原刺激と同様に脱顆粒反応を引き起こし、この反応は P2X7 受容体阻害剤である AZ10606120 (10 μ M) によって完全に抑制された (Fig. 5B)。次に、プリン受容体刺激作用が抗原刺激による反応に影響するかを検討した。抗原刺激のみで観察された脱顆粒反応は同時に ATP または Ade で刺激することにより顕著に増大したが、ほかのアゴニストでは影響は認められなかった (Fig. 5C)。Gi タンパク質と共役した受容体シグナルを阻害する PTX で前処理した細胞では、ATP による増強作用は変わらず認められたが、Ade による増強作用は抑制された (Fig. 5D)。

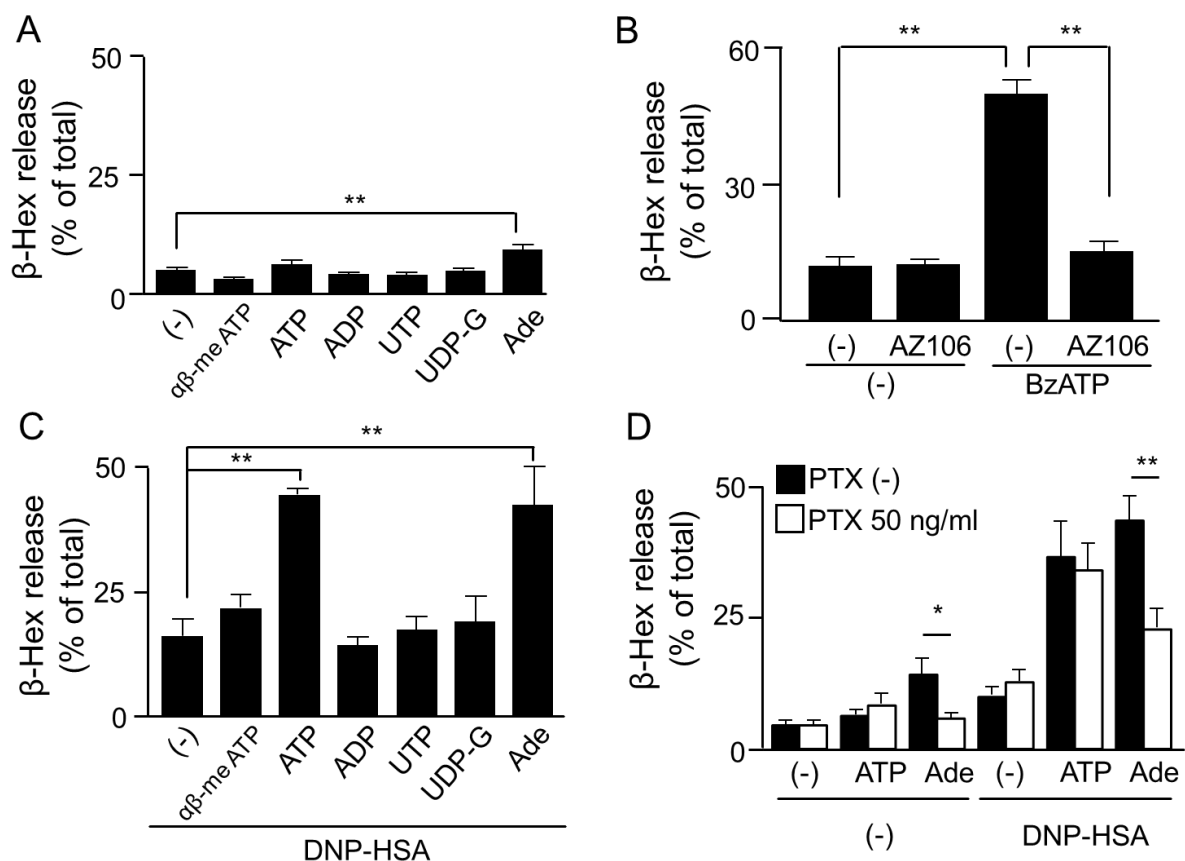


Fig. 5. Effects of purinoceptor stimulation on BMMC degranulation. BMMC were sensitized with anti-DNP IgE overnight and stimulated with various purinoceptor agonists. Degranulation was evaluated by measuring β -Hex release from BMMC. (A) BMMC were stimulated with $\alpha\beta$ -meATP (10 μ M), ATP, ADP, UTP, UDP-G, or Ade (100 μ M) for 5 min ($n = 4-8$). (B) BMMC were stimulated with BzATP (300 μ M) for 5 min in the presence or absence of AZ10606120 (AZ106, 3 μ M) ($n = 3$). (C) BMMC were stimulated with $\alpha\beta$ -meATP (10 μ M), ATP, ADP, UTP, UDP-G, or Ade (100 μ M) in the presence of DNP-HSA (10 ng/mL) for 5 min ($n = 4-8$). (D) BMMC were pre-treated with anti-DNP IgE in the presence or absence of PTX (50 ng/mL) overnight. Cells were stimulated with ATP or Ade (100 μ M) in the presence or absence of DNP-HSA (10 ng/mL) for 5 min ($n = 5$). Data shown are the means \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4) ATP による FcεRI/IgE を介した脱顆粒反応の増強における P2X4 受容体の役割

BMMC に発現している P2 受容体のうち、100 μ M の ATP に反応するのは P2X1、P2X4 及び

P2Y₂ 受容体である。このうち、P2X1 受容体アゴニストである $\alpha\beta$ -meATP 及び、P2Y₂ 受容体アゴニ

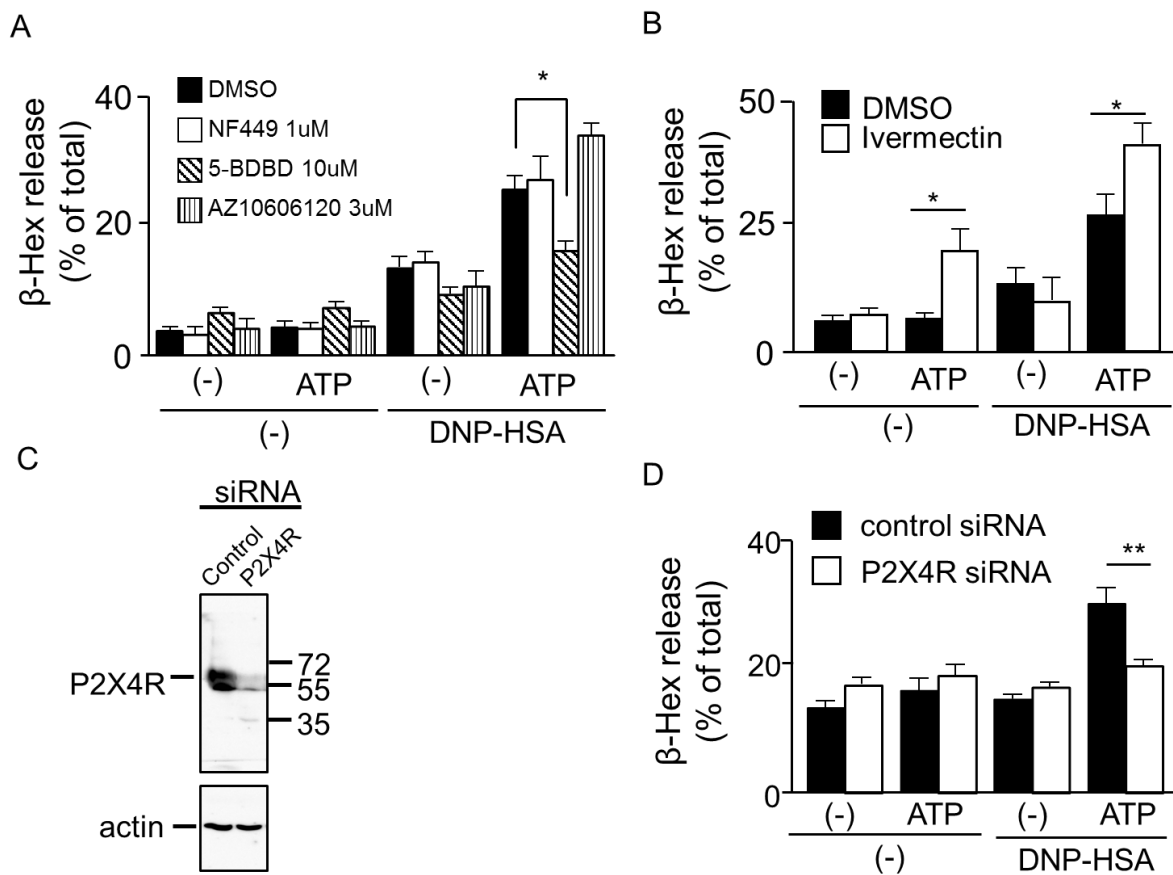


Fig. 6. Role of P2X4 receptors in the potentiating effects of ATP on FcεRI-mediated BMMC degranulation. (A, B) BMMC were sensitized with anti-DNP IgE overnight, and then stimulated with ATP (100 μM) and/or DNP-HSA (10 ng/mL) for 5 min in the presence or absence of 5-BDBD (10 μM) (A, n = 4-5) or ivermectin (1 μg/mL) (B, n = 4-5). (C) BMMC were transfected with control or P2X4 receptor-specific siRNA and incubated for 24 h. Cell lysates were analysed by western blotting with anti-P2X4 receptor or anti-actin antibody. (D) BMMC transfected with control or P2X4 receptor-specific siRNA were stimulated with ATP (100 μM) in the presence or absence of DNP-HSA (10 ng/mL) for 5 min (n = 3). Data are shown as means ± S.E.M. * $P < 0.05$.

ストである UTP は DNP-HSA による脱顆粒反応を増強しなかった。このことから、ATP による抗原依存的な脱顆粒反応の増強には P2X4 受容体の関与が考えられた。そこで P2X4 受容体特異的に作用する阻害薬を用いてさらに検討した。その結果 DNP-HSA と ATP の共刺激で誘起される脱顆

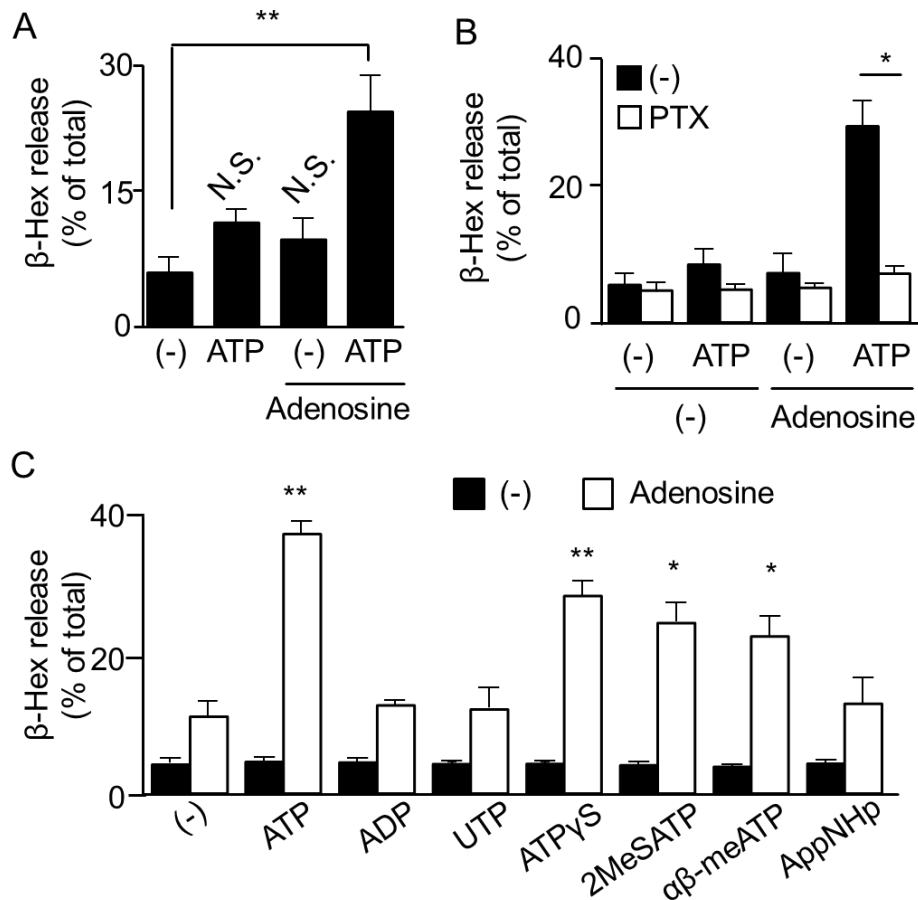


Fig. 7. Effects of adenosine on purinoceptor agonist-induced degranulation. (A) BMMC were sensitized with anti-DNP-IgE overnight and then stimulated with ATP (100 μ M) in the presence or absence of adenosine (100 μ M) for 5 min ($n = 3$). (B) BMMC treated with or without PTX (50 ng/mL) were stimulated with ATP (100 μ M) in the presence or absence of adenosine (100 μ M) for 5 min ($n = 3$). (C) BMMC were stimulated with ATP, ADP, UTP, ATP γ S, 2MeSATP, $\alpha\beta$ -meATP, or AppNHp (100 μ M) in the presence or absence of adenosine (100 μ M) for 5 min ($n = 3$). Data are shown as means \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs adenosine-induced response without other stimulants.

粒反応は予想通り P2X1 受容体阻害薬の NF449、P2X7 受容体阻害薬の AZ10606120 では抑制されなかったが P2X4 受容体阻害薬の 5-BDBD で抑制された (Fig. 6A)。逆に、P2X4 受容体の反応を増大させるポジティブアロステリックモジュレーターである ivermectin 存在下では ATP のみでも脱顆粒が認められ、抗原を加えることによってさらに脱顆粒反応が増大した (Fig. 6B)。P2X4 受

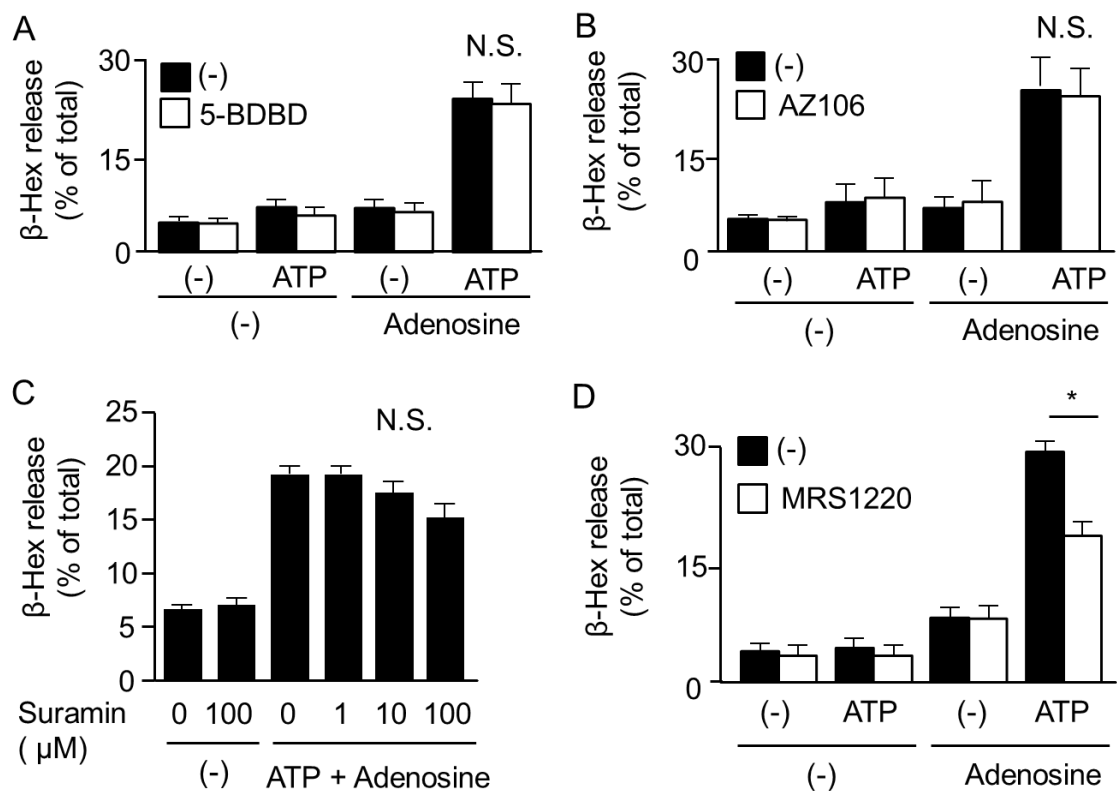


Fig. 8. Effect of purinoceptor antagonists on degranulation induced by co-stimulation with ATP and adenosine. (A) BMMC were sensitized with anti-DNP-IgE overnight and then stimulated with ATP (100 μ M) with or without adenosine (100 μ M) for 5 min in the presence or absence of 5-BDBD (10 μ M) ($n = 3$). (B) BMMC were stimulated with ATP (100 μ M) with or without adenosine (100 μ M) for 5 min in the presence or absence of AZ10609120 (AZ106, 3 μ M) ($n = 3$). (C) BMMC were stimulated with ATP (100 μ M) and adenosine (100 μ M) for 5 min in the presence of different concentrations of suramin (1-100 μ M) ($n = 3$). (D) BMMC were stimulated with ATP (100 μ M) with or without adenosine (100 μ M) for 5 min in the presence or absence of MRS1220 (1 μ M) ($n = 3$). Data are shown as means \pm S.E.M. * $P < 0.05$.

容体の関与をさらに確かめるために特異的 siRNA による P2X4 受容体ノックダウン細胞を作成し検討した。P2X4 受容体の siRNA を前処理すると、P2X4 受容体の発現が低下し、ATP による増強作用は消失した(Fig. 6C, D)。

5) P2 受容体と P1 受容体の共刺激の脱顆粒反応に対する影響

細胞外 ATP は E-NTPDase や CD73 などの細胞外分解酵素によって Ade に分解されると P1 受容体に作用する。そこで、P1 受容体と P2 受容体の共刺激が脱顆粒反応に及ぼす影響について検討した。BMMC を ATP あるいは Ade 単独で刺激してもほとんど脱顆粒を起こさなかったが、同時に作用させると顕著な脱顆粒反応を引き起こした (Fig. 7A)。この反応は、PTX 処理によって抑制された (Fig. 7B)。ATP 以外のヌクレオチドの反応を検討すると、Ade と P2Y₁ 受容体アゴニストである ADP、P2Y₂ 受容体アゴニストである UTP および AppNHp が Ade と共存しても脱顆粒は認められず、ATP アナログである ATP γ S、P2X 受容体アゴニストである 2MeSATP 及び $\alpha\beta$ -meATP は ATP より弱いながら脱顆粒を引き起こした (Fig. 7C)。

Ade と ATP による協調的な脱顆粒反応は P2X₄ 受容体アンタゴニストである 5-BDBD、P2X₇ 受容体アンタゴニストである AZ10606120、P2X₁ 受容体アンタゴニストである suramin では抑制されず、アデノシン A₃ 受容体アンタゴニストである MRS1220 によって抑制された (Fig. 8)。

6) ATP と Ade の共刺激反応における細胞外 ATP 分解酵素の役割

上述した ATP と Ade の共刺激による脱顆粒反応は、もし BMMC が ATP を Ade に分解する活性を持つのであれば単独では脱顆粒反応を引き起こさない低濃度の ATP(100 μ M) 単独で惹起されるはずである。しかし、実際は低濃度 ATP 単独では BMMC の脱顆粒を惹起しないことから ATP から Ade への分解が生じていない可能性が考えられた。そこで、BMMC に発現する細胞外 ATP 分解酵素の発現パターンを real time PCR で検討した。BMMC には ATP 及び ADP を AMP に分解

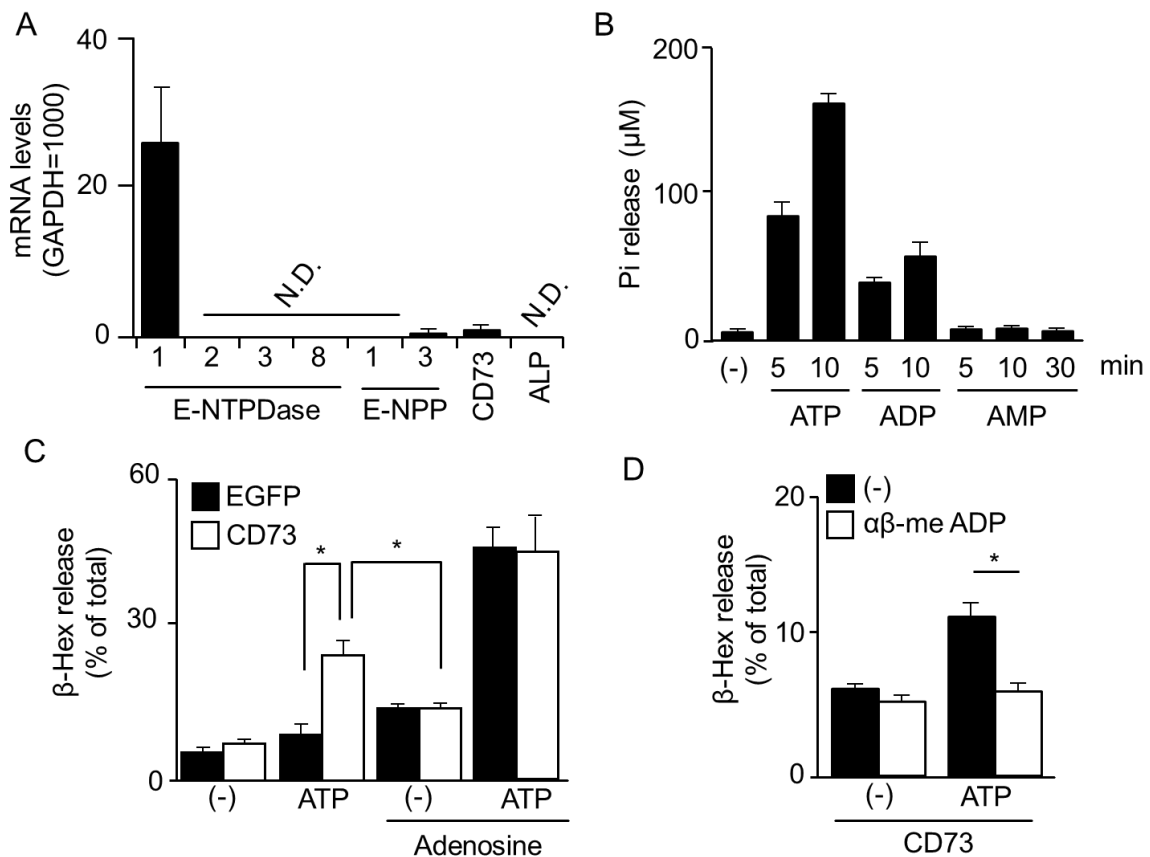


Fig. 9. Regulation of ATP-induced degranulation by ecto-nucleotidases. (A) Expression of ecto-nucleotidase mRNAs in BMDC were analysed by real-time PCR. Data were normalised to GAPDH mRNA levels. Values are shown as means \pm S.E.M. ($n = 3$). N.D., not detected. (B) Hydrolysis of ATP, ADP, or AMP (100 μ M) by BMDC were evaluated by inorganic phosphate (Pi) accumulation after incubation with substrates for the indicated time. Data are shown as means \pm S.E.M. ($n = 3$). (C) BMDC were sensitized with anti-DNP-IgE overnight and then co-cultured with EGFP- or CD73-expressing HEK293 cells and stimulated with ATP (100 μ M) in the presence or absence of Ade (100 μ M) for 10 min ($n = 3$). Data are shown as means \pm S.E.M. * $P < 0.05$. (D) BMDC co-cultured with CD73-expressing HEK293 cells were stimulated with ATP (100 μ M) for 10 min in the presence or absence of $\alpha\beta$ -meADP (100 μ M) ($n = 3$). Data are shown as means \pm S.E.M. * $P < 0.05$.

する NTPDase1 が発現していたが、AMP を Ade に変換する CD73 や E-ALP はほとんど発現していなかった(Fig. 9A)。実際に細胞外プリンヌクレオチドの分解活性を遊離リン酸の濃度を測定し評

価したところ、BMMC は ATP、ADP を加水分解し、無機リン酸を遊離したが、AMP の分解活性は認められなかった (Fig. 9B)。これらの結果から、BMMC は ATP を Ade まで分解することが出来ないため、Fig. 4 で示したように低濃度の ATP(100 μ M) のみでは、脱顆粒を起こせないと考えられた。しかし、生体内ではマスト細胞が存在する近傍には CD73 や E-ALP を発現する細胞が存在し、Ade が供給されることが考えられる。そこで、CD73 発現プラスミドを導入し、CD73 を発現させた HEK293 細胞と共培養し、ATP が脱顆粒反応を惹起できるかを検討した。対照には EGFP を発現させた HEK293 細胞を用いた。この条件下で BMMC を ATP で刺激すると CD73 を発現させた場合のみ脱顆粒反応が有意に増加した。一方で Ade 単独または ATP と Ade の同時刺激では両条件下で変化はなかった(Fig. 9C)。さらに、CD73 の阻害剤である $\alpha\beta$ -meADP により AMP からの Ade 産生を阻害すると、CD73 発現細胞存在下での ATP による脱顆粒反応は起こらなかった(Fig. 9D)。これらの結果から、CD73 発現細胞が BMMC の周囲に存在すれば、P2X7 受容体を刺激できないような低濃度の ATP のみでも脱顆粒反応を引き起こすことがわかった。

2-4 考察

本章では BMMC におけるプリン作動性シグナルの脱顆粒反応に対する役割を検討した。real time PCR と各種アゴニストに対する Ca^{2+} 応答性による解析によって BMMC にはイオンチャネル型受容体である P2X1、P2X4、P2X7 受容体及び G タンパク質共役型受容体である P2Y₁、P2Y₂、P2Y₁₄ 受容体が発現していると考えられた (Fig. 2, 3)。これらの P2 受容体発現プロファイルは、これまでに様々な種類のマスト細胞で報告されている結果とほぼ一致した [37-40]。BMMC は高濃

度の ATP ($\geq 500 \mu\text{M}$) によって FcεRI/IgE を介した反応と同等の脱顆粒反応を引き起こした。この反応は P2X7 受容体アゴニストである BzATP で再現され、P2X7 受容体アンタゴニストである AZ10606120 によって消失したことから P2X7 受容体を介していると考えられた (Fig. 5B)。これまでも、P2X7 受容体はマスト細胞を活性化することがマウスマスト細胞株である MC9 やヒトマスト細胞で報告されている [26, 47]。加えて、生体内においてマスト細胞の P2X7 受容体による活性化はアレルギー性炎症性反応に関与していることが知られている [12]。P2X7 受容体は他の P2 受容体と比べ、その活性化に高濃度の ATP が必要であり、このような状況は組織の損傷や大量の細胞死がおこる急性相に生じる反応と考えられる。以上のことから、抗原刺激がない状況でも組織の損傷などによって細胞外に放出された比較的高濃度の ATP によって P2X7 受容体が刺激されるとマスト細胞は直接活性化され、病態の形成に関与することが示唆された。

一方、低濃度の ATP ($100 \mu\text{M}$) は、BMMC の P2X4 及び P2Y₂ 受容体を刺激し $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は惹起するものの、脱顆粒反応は起きなかったが、抗原による FcεRI/IgE を介した脱顆粒反応を著しく増強した (Fig. 5C)。この反応は、P2X4 受容体アンタゴニストである 5-BDBD 及び P2X4 受容体 siRNA によるノックダウンによって抑制され、P2X4 受容体ポジティブアロステリックモジュレーターによってさらに増強した (Fig. 6)。加えて、BMMC に発現している他の P2 受容体に対するアゴニストでは、この反応は起こらなかった (Fig. 5C)。これらの結果から、ATP による脱顆粒反応の増強は P2X4 受容体を介したものであると考えられた。P2X4 受容体は脊椎のミクログリアの活性化による神経因性疼痛の進行や血管内皮のシェアストレスによる機械刺激を介した一酸化窒素の産生

において重要な役割を担っている [23, 48]。今回の発見は、P2X4 受容体を持つ多様な生理学的意義に新たな役割を付与するものである。

これまでに、P2Y₂、P2Y₁₃、P2Y₁₄ 受容体もヒト肺マスト細胞や RBL-2H3、LAD2 のような細胞株で脱顆粒反応に関与することが報告されている [27, 37, 38, 49]。しかしながら、今回 BMMC で行った検討では P2Y 受容体の脱顆粒反応への作用は確認できなかった。これらの反応の違いの根底にあるものは不明なままであるが、マスト細胞は培養条件や分布した組織の環境によって異なる性質を有することが原因ではないかと考えられる [50–52]。

P2X4 受容体の刺激は非選択的な陽イオンチャネルを開口し細胞外から Ca²⁺を流入する。しかしながら、Gq タンパク質と共役した UTP の受容体である P2Y₂ や ADP の受容体である P2Y₁ の活性化による[Ca²⁺]_iの上昇では抗原による脱顆粒反応は増強しなかった。このことから、P2X4 受容体が活性化すると Ca²⁺の流入以外の機構も働いている可能性が考えられた。本研究では P2X4 受容体がどのように抗原依存的な脱顆粒反応を増強しているか詳しい機序を明らかにすることはできなかったため、さらなる解析が必要である。

P2 受容体とは対照的に、P1 受容体によるマスト細胞の制御に関しては相当数の報告はなされており、Ade は喘息の病態を制御する重要な物質であることが示唆されている [28, 53]。本研究において、Ade は単独での刺激では弱い脱顆粒しか引き起こさないにもかかわらず、抗原依存的な脱顆粒反応を著しく増強させることを示した。BMMC には P1 受容体のサブタイプである A_{2A}、A_{2B}、A₃ 受容体が発現しており、Ade による抗原依存的脱顆粒反応の増強は PTX によって阻害された

(Fig. 2, 5D)。したがって、Gs タンパク質と共役している A_{2A} 及び A_{2B} 受容体ではなく、Gi タンパク質と共役している A₃ 受容体が中心的な役割を果たしていると考えられた。これらの結果は、Leung らの報告と同様であった [41]。

Fig. 7 において、BMMC は ATP または Ade 単独での刺激では脱顆粒しなかったが、同時に刺激すると抗原非依存的に脱顆粒することを示した。ATP は生理的または病態時に様々な刺激に応じて細胞外に放出されること、また細胞外ヌクレオチダーゼによって Ade に変換されることなどを考えると、この現象はマスト細胞のプリン作動性シグナルによる調節において特に重要な機構であると考えられる [16]。本研究で用いた BMMC には ATP と ADP を AMP に分解する NTPDase 1 は豊富に発現しているが、AMP を Ade に分解する CD73 や ALP は発現していなかった (Fig. 9A)。そのため低濃度の ATP(100 μM) 単独での刺激では、ATP を Ade に分解できず脱顆粒しなかったと考えられる。しかし、CD73 を発現させた HEK293 細胞と BMMC を共培養させた状態で ATP による刺激を行うと CD73 依存的に脱顆粒反応が引き起こされた (Fig. 9)。これらの結果は、ATP とその分解産物である Ade が共同して作用することでマスト細胞を活性化する新しい機構が存在することを示唆している。細胞外ヌクレオチダーゼの発現は脳や血管において虚血や炎症などで大きく変化する [45, 54]。このような背景を踏まえると、本研究で見出したマスト細胞のプリン作動性シグナルによる協調的な活性化機構は微小環境におけるマスト細胞の機能調節を理解するうえで重要であり、臨床的にも意義があるのではないかと考えられる。加えて、多くのヒト固形がんは CD73 を豊富に発現し [55]、マスト細胞はがんの血管新生を抑制することが知られている [56]。このような

環境では、ATP が P2 受容体と P1 受容体、両方のアゴニストとして働き、マスト細胞を活性化する可能性が考えられた。

Fig. 7 および Fig. 8 ではマスト細胞の脱顆粒における ATP と Ade による協調的な作用のメカニズムについて検討した。この作用は PTX と A₃ 受容体アンタゴニストである MRS1220 によって阻害されたことから、Ade は A₃ 受容体に作用していると考えられた。しかしながら、ATP による作用は P2X4 受容体アンタゴニストである 5-BDBD や P2X7 受容体アンタゴニストである AZ10606120、P2X1 受容体阻害剤である suramin では阻害されなかった (Fig. 8)。ほかの P2 受容体アゴニストである ADP や UTP、AppNHp による刺激ではこの反応は再現できず、ATP_γS や 2MeSATP、αβ-meATP で再現できた (Fig. 7)。しかし、これらのアンタゴニスト及びアゴニストの選択性と合致する P2 受容体は知られていない。一方で、RBL-2H3 における Ca²⁺ シグナルと脱顆粒反応の促進が細胞外キナーゼによる膜タンパク質のリン酸化によって引き起こされることが示唆されている [57]。ATP による反応を再現できた ATP アナログは全て、ATP 依存性キナーゼの基質となりうるため、このような機構が働いている可能性も考えられるがその解明には更なる検討が必要である。

アレルギー反応はかゆみを伴うことが多く、掻爬によって症状が悪化することが知られている [58]。また、ATP は機械的な刺激によって細胞外に放出されることが知られている [59, 60]。このような知見から、本研究で見出した ATP による脱顆粒反応の増強作用が掻爬によるアレルギー反応の増悪に関与する可能性が考えられた。しかしながら、本研究で用いた BMMC は組織常在性マスト細胞と比べると、未分化な集団である。そのため、ATP と Ade によるマスト細胞の活性化増強が

どの程度アレルギー反応や炎症に関与しているかを明らかにするためには *in vivo* での検証が必要だと考えられた。

本章では、マスト細胞の脱顆粒反応にプリン作動性シグナルが重要な働きをしていることを明らかにした。まず、高濃度の ATP によって P2X7 受容体が活性化すると抗原非依存的に脱顆粒した。次に、低濃度の ATP によって P2X4 受容体が活性化すると抗原依存的脱顆粒反応が増強した。最後に、ATP と Ade によって同時に刺激すると脱顆粒反応の相乗的活性化が起こった。この反応は ATP 単独でも細胞外ヌクレオチダーゼによる Ade 産生に依存して生じうることを示した。マスト細胞を取り巻く、これらのプリン作動性シグナルによる機能調節が、実際のアレルギー反応にどの程度寄与しているかを明らかにすることで、アレルギー疾患の治療に新たな選択肢を加えることができるのではないかと考えられた。

第3章 P2X 受容体阻害薬の探索

3-1 緒言

第2章で述べたように、細胞外 ATP によるマスト細胞の活性化にはイオンチャネル型の P2X 受容体が重要な役割を果たしていた。P2X 受容体は刺激によって開口する非選択性陽イオンチャネル型の受容体で、その生体内のリガンドは ATP である。P2X 受容体には P2X1-7 の7種類のサブタイプが存在するが、その中でも P2X7 受容体は他の P2X 受容体にはない特徴を有している [61]。まず、P2X7 受容体の活性化には高濃度の ATP が必要で、持続的な刺激によって、900 Da 程度の物質を透過する巨大なポアを開口し、一度活性化すると脱感作せず、持続的に Ca^{2+} を細胞内に流入させる。加えて、細胞質内に存在する長い C 末端領域が他のタンパク質と相互作用することによってイオンチャネルとしての機能とは別に細胞内にシグナルを伝達している [62]。これらの反応の結果、神経細胞死や免疫細胞の活性化が引き起こされ炎症性腸疾患や喘息、皮膚炎、神経障害性疼痛など様々な疾患の症状に寄与すると考えられている [12, 63-65]。

第2章において、P2X4 受容体と P2X7 受容体がマスト細胞の活性化を正に制御していることを示した。これらの受容体は神経因性疼痛や炎症反応を伴う多くの疾患を増悪させる受容体だと考えられており、創薬ターゲットとして阻害活性を有する多くの物質が合成され評価されている [66-68]。加えて、P2X4 受容体では、すでに臨床で使用されている医薬品から新規薬効を見出すドラッグリポジショニングの観点から、抗うつ薬の一部に阻害作用を有するものが見出されている [69,

70]。しかしながら、これらの受容体を標的とした医薬品は未だ存在しない。

代表的な抗アレルギー薬は、主作用であるヒスタミン受容体阻害作用以外にも多彩な薬理作用を有しており、その一つとしてケミカルメディエーターの遊離阻害などマスト細胞の機能調節を標的とすることが報告されている [71]。そこで、本章では P2X4 受容体または P2X7 受容体阻害作用を有する抗アレルギー薬がないか探索を行い、oxatomide (Oxa) が P2X7 受容体阻害作用を有することを見出し、その薬理学的プロファイルを詳細に検討した。

3-2 実験材料及び実験方法

1) 試薬

本章で使用した試薬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。

Azelastine、Cetirizine、Chlorpheniramine、Diphenhydramine、Clemastine、Cromoglicate、Fexofenadine、Ketotifen、Tranilast、Oxa:和光純薬。CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay kit:プロメガ。ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready mix:Thermo Fisher Scientific。Macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) ELISA kit:R & D systems。抗 phospho-extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 抗体、抗 ERK 1/2 抗体、抗 phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 抗体、抗 p38 MAPK 抗体:Cell signaling。Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated 抗 CD23 抗体 (clone: M-L233):Santa Cruz。

2) 細胞培養

ヒト B 細胞様ミエローマである RPMI8226 細胞、マウスマクロファージ細胞株である J774 及び RAW264.7 は 10 % FBS、100 units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む RPMI1640 培地で培養した。マウス神経芽細胞株である N18TG2、マウスメラノーマ細胞株である B16 細胞およびヒト胎児由来腎臓細胞である HEK293 細胞株は 10 % FBS、100 units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM 培地で培養した。ラット P2X7 受容体発現 1321N1 細胞は 0.7 mg/mL G418 を上記 DMEM に加えて培養した。BMMC は 2-2-3 と同様の方法で培養した。

3) $[Ca^{2+}]_i$ 測定

2-2-5 と同様の方法で行った。

4) パッチクランプによる細胞膜電流の測定

P2X7 受容体を介した膜電流の測定は Watano ら (2002) の方法を参考にホールセルパッチクランプによる膜電位固定法によって行った [72]。パッチピペットは抵抗が 6-10 MΩ になるようにし、intercellular solution (30 mM CsCl, 110 mM CsOH, 5 mM MgATP, 3 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM EGTA, 20 mM HEPES, 50 mM aspartic acid; pH 7.2) を充填した。N18TG 細胞、または 3-2-10 に示す方法で作成したヒト、マウス、ラット P2X7 受容体発現プラスミドを 3-2-12 に示した方法でトランスフェクションした HEK293 細胞を Poly-L-lysine でコートしたチャンバーに撒き、37°C に保った Tyrode solution (2.4 mM NaOH, 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.33 mM

NaH₂PO₄、5 mM HEPES、1.8 mM CaCl₂、5.5 mM、glucose、pH 7.4) をフローさせた。膜電位は Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments) を用いてコントロールし、膜電流の取得及び解析は pCLAMP10.4 software (Axon Instruments) を用いた。膜電流の測定中は膜電位を-10 mV に保持し、3 秒毎に 1 V/sec で-10 mV から 60 mV にして脱分極させた後に-120 mV にし過分極させ、-10 mV に戻しランプ波をかけ、-60 mV の時の膜電流を用いて解析を行った。

5) ウェスタンブロット

反応終了後、メディウムまたはバッファーを取り除き sample buffer 250 µL を加えることによって細胞を溶解した。その後の操作は 2-2-12 と同様に行った。使用した抗体の希釈倍率を以下に示す: phospho-ERK 1/2 (× 1,000)、ERK1/2 (× 1,000)、phospho-p38 MAPK (× 1,000)、p38 MAPK (× 1,000)、HRP conjugated anti-rabbit IgG (× 10,000)

6) Lactate dehydrogenase (LDH) の測定

N18TG2 細胞を 48 well plate に播種し、様々な条件でインキュベートした後に上清を回収した。LDH の活性測定は CytoTox 96 non-radioactive cytotoxicity assay kit を用いて添付された説明書に従って行った。放出率は、以下の式で計算して百分率で示した。

$$\text{LDH 放出率 (\%)} = \frac{\text{上清吸光度}}{(\text{上清吸光度} + \text{細胞溶解液吸光度})} \times 100$$

7) 逆転写反応による cDNA の作成と real time PCR

Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction 法により RNA を抽出し、その後は 2-2-7 及び 2-2-8 と同様の方法で行った。

使用したプライマーの配列を以下に示す。

MIP-2、5'-TTCAAGAACATCCAGAGCTT-3' (S)、5'-TAGCCTTGCCTTTGTTTCAGT-3' (AS)

Cyclooxygenase-2 (COX-2) 、 5'-ACCCGAGGACTGGGCCATGG-3' (S) 、 5'-TGCCCCACAGCAAAGTGCAGG-3' (AS)

8) 脱顆粒反応

2-2-10と同様の方法で行った。

9) Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) による MIP-2 の定量

J774細胞を48 well plate に播種し、一晩培養し、血清を含まないRPMI1640培地に置換した後に様々な条件で3時間インキュベートし、上清を回収した。上清は300 × gで5分間遠心分離し、細胞を取り除いた。培養液中のMIP-2の測定はMIP-2 ELISA kitを用いて添付された説明書に従って行った。

10) ヒト、マウス、ラット P2X7 受容体発現プラスミドの作製

ヒト P2X7 受容体の全長 cDNA は RPMI8226 細胞から *KpnI* サイトを含む sense primer :

gtaggtaccGGAGGGAGGCTGTCACCATGC と *XbaI* サイトを含む antisense primer :

tgctctAGACGTGAGCCACGGTGCCTG を用いて PCR によって増幅した。同様の方法でマウスと

ラット P2X7 受容体の全長 cDNA を N18TG2 細胞とラット脳由来 cDNA から *EcoRI* サイトを含む

マウス・ラット sense primer : aggaattcTTGCTGTAGTCTAGCCTGGGAA と、*XhoI* サイトを含むマウス

・ラット antisense primer : gtctcgagTCAGTAGGGATACTTGAAGCCA を用いて PCR によって

増幅した。増幅したヒト P2X7 受容体の全長 cDNA は TOPO TA クローニングキットを用いて pcDNA3.3 にクローニングした。増幅したマウス、ラット P2X7 受容体の全長 cDNA は TOPO XL PCR クローニングキットを用いて pCR-XL-TOPO にサブクローニングした後に、プライマーで導入した制限酵素サイトを用いて pcDNA3.1 にクローニングした。全てのクローンは 3-2-11 で示す方法でシーケンスを行い、塩基配列が正しいことを確認した。

11) シーケンス

塩基配列の決定は、蛍光標識化合物である BigDye Terminator を用いたジデオキシ法により、Applied Biosystems 3730xl DNA シーケンサー (Thermo Fisher Scientific) で行った。サイクルシーケンシング反応は ABIPRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready mix を用いて行った。すなわち、ABIPRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready mix (1 μ L)、鋳型 DNA (150 ng)、4 μ M プライマー (1 μ L)、5 \times sequencing 緩衝液を含む反応液 20 μ L を調整した。反応は 96 $^{\circ}$ C で 4 分加熱後、96 $^{\circ}$ C で 30 秒、50 $^{\circ}$ C で 15 秒、60 $^{\circ}$ C で 4 分を 1 サイクルとして計 25 サイクル行った。反応終了後、125 mM EDTA (2 μ L)、3M CH₃COOH (2 μ L)、100 % エタノール (60 μ L) を加えて 10 分間 5000 g で遠心分離した。沈殿を 70 % エタノール (200 μ L) で洗浄し 5 分間 5000 g で遠心分離し、乾燥させた。得られた沈殿を Hi-Di Formamide (10 μ L) に溶解し、94 $^{\circ}$ C で 2 分間熱変性した後、Applied Biosystems 3730xl DNA シーケンサーを用いて添付された説明書にしたがって解析した。

12) 遺伝子導入

3-2-10 で作成したヒト、マウスまたはラット P2X7 受容体発現プラスミドを 1321N1 細胞に solution V とプログラム T16 で Amaxa を用いてエレクトロポレーションし、G418 (0.7 mg/mL) でセレクトクッションを行った。上記の方法でラット P2X7 受容体安定発現株を取得した。HEK293 細胞にヒト、マウスまたはラット P2X7 受容体発現プラスミドと pEGFP-C1 ベクターを 2 : 1 の割合で混合したものを FuGENE HD を用いてトランスフェクションした。48-72 時間インキュベーションした後に、EGFP 陽性細胞をパッチクランプによる解析に用いた。

13) Ethidium bromide (EtBr) の流入

細胞を 0.1 % BSA を含む Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free KRH (Ca^{2+} と Mg^{2+} を含まない KRH) で 2 回洗浄後、様々な条件で 2.5 μM EtBr を含んだ Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free KRH 中で反応させた。反応は 4 °C の 20 mM MgCl_2 を含んだ KRH を加えて、300 × g で 5 分間遠心分離し停止した。エチジウムの流入は FACSCantoII を用いて PI と同様の蛍光強度を測定することで評価した。

14) CD23 のシェディング

細胞を 0.1 % BSA を含む Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free KRH で 2 回洗浄後、様々な条件で反応した。反応は 4 °C の 20 mM MgCl_2 を含んだ KRH を加えて、300 × g で 5 分間遠心分離し停止した。細胞を FITC で標識した抗 CD23 抗体で染色し、FACSCantoII を用いて FITC の蛍光強度を測定することで評価した。

15) 担癌モデルマウス

B16 細胞を用いた担癌モデルマウスは 2-2-2 の条件下で飼育した 7-8 週齢の C57BL/6 マウスを用いて作成した。マウス腹部の毛をバリカンと除毛クリームを用いて除去した。24 時間後に麻酔下で腹部の皮下に B16 細胞を個体当たり 1×10^6 ずつ接種し、day 1 とした。Day 6 にマウス腹部に腫瘍が形成されていることを確認し、Vehicle (0.5 % カルボキシメチルセルロース 経口投与) 群、AZ10606120 (1.5 mg/kg 腹腔投与) 群、Oxa (20 mg/kg 経口投与) 群、Clemastine (20 mg/kg 経口投与) 群の 4 群に分けて投与を開始した。6 日目から 16 日目まで毎日、薬物の投与と腫瘍径の測定を行った。腫瘍の体積は長径 (W1) と短径 (W2) を測定し、以下の式を用いて算出した。腫瘍体積 (mm^3) = $\pi/6 \times (W1 \times W2^2)$

16) 統計処理

2-2-14 と同様に行った。

3-3 結果

1) 抗アレルギー薬の P2X4 受容体または P2X7 受容体に対する効果

P2X4 受容体及び P2X7 受容体に対する様々な抗アレルギー薬の作用は、P2X4 及び P2X7 受容体を内在性に発現している J774 細胞と P2X7 受容体を内在性に発現している N18TG2 細胞に Fluo-4 AM を導入し、リガンド刺激による Ca^{2+} 応答に対する影響を解析することによって評価した。これまでの研究から、ATP に応答する受容体として J774 細胞には P2Y₂、P2X4 及び P2X7 受容体

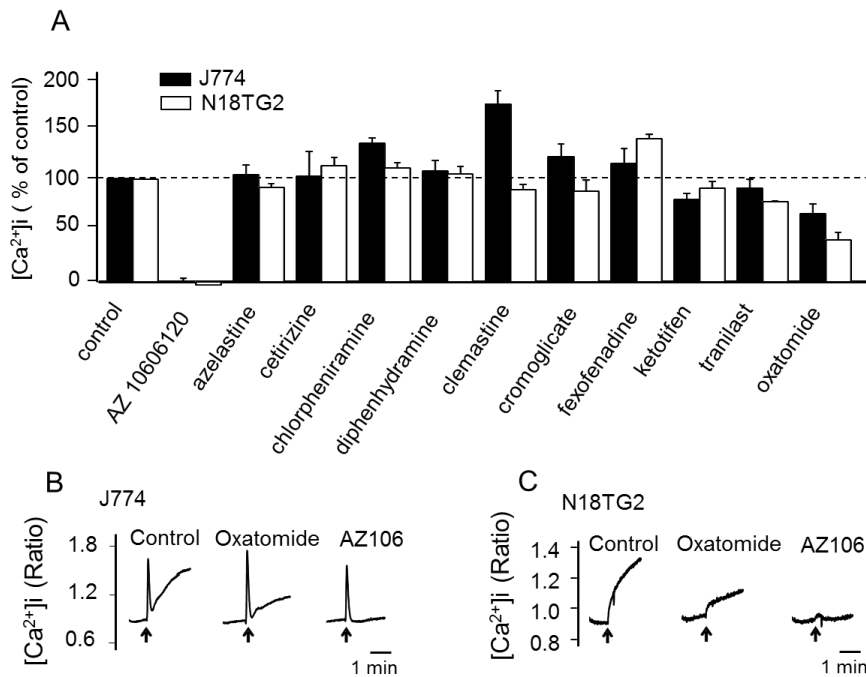


Fig. 10. (A) Effect of the selective P2X7 receptor antagonist AZ10606120 (AZ106) and anti-allergic agents on ATP-induced P2X7 receptor-mediated Ca²⁺ response in J774 (black column) and N18TG2 (open column) cells. Fluo-4 AM-treated cells were pre-treated with 0.1 mM UTP for 3 min (to desensitize the P2Y₂ receptor) in the presence or absence of AZ10606120 or anti-allergic agents at 3 μM. Then, P2X7 receptor-mediated Ca²⁺ influx was triggered by the addition of 1 mM ATP. Data are shown as means ± S.E.M. (*n* = 6). (B, C) Representative P2X7 receptor-mediated ATP-induced [Ca²⁺]_i change in J774 (B) and N18TG2 cells (C) with Oxatomide or AZ10606120 (AZ106).

が、N18TG2 細胞には P2Y₂ 及び P2X7 受容体が発現していることが明らかとなっている [73, 74]。

これらの細胞を 0.1mM UTP で刺激すると P2Y₂ 受容体のみが活性化し脱感作され、その後 0.1

mM ATP で刺激しても P2Y₂ 受容体は活性化しなくなる (データ示さず)。そのため、UTP で刺激し

た後に 1 mM ATP で刺激すると J774 細胞では、P2X4 受容体による一過性の Ca²⁺の流入と P2X7

受容体による持続的な Ca²⁺の流入が引き起こされ、N18TG2 細胞では P2X7 受容体による持続的

な Ca²⁺の流入が引き起こされる。これらの、P2X4 受容体および P2X7 受容体による Ca²⁺の流入を

評価した。J774 細胞と N18TG2 細胞において、1 mM ATP による刺激は P2Y₂ 受容体による一過性の[Ca²⁺]_i 上昇反応を示さず、P2X7 受容体活性化による持続的な[Ca²⁺]_i 上昇反応は、P2X7 受容体阻害剤である AZ10606120 (3 μM) の前処置によって、完全に阻害された (Fig. 10)。したがって、本評価系は P2X4 受容体及び P2X7 受容体機能を測定することができると考え、最終濃度 3 μM に調整した様々な抗アレルギー薬の P2X4 受容体及び P2X7 受容体を介した Ca²⁺の流入の持続相に対する影響を検討した。その結果、J774 細胞の P2X4 受容体を介した Ca²⁺の流入に対して抗アレルギー薬は作用しなかったが、J774 細胞と N18TG2 細胞の両細胞で Oxa が安定して P2X7 受容体を介した Ca²⁺の流入を阻害した。clemastine は抗ヒスタミン薬であるが P2X7 受容体の機能を亢進させることが Nörenberg ら (2011) によって報告されている[75]。これと一致して、clemastine は J774 細胞における P2X7 受容体を介した Ca²⁺の流入を増強させた (Fig. 10A)。J774 細胞と N18TG2 細胞の P2X4 受容体及び P2X7 受容体を介した Ca²⁺反応の代表的なチャートを Fig. 10B、C に示す。J774 細胞を 1 mM ATP で刺激すると、P2X4 受容体を介して一過性に[Ca²⁺]_i が上昇した後に P2X7 受容体を介して持続的な Ca²⁺の流入が起こる。この P2X7 受容体を介した持続的な Ca²⁺の流入は Oxa を前処置することによって抑制された。また、N18TG2 細胞を 1 mM ATP で刺激すると P2X7 受容体を介して持続的な Ca²⁺の流入が引き起こされるが、Oxa を前処置することによって抑制された (Fig. 10B, C)。

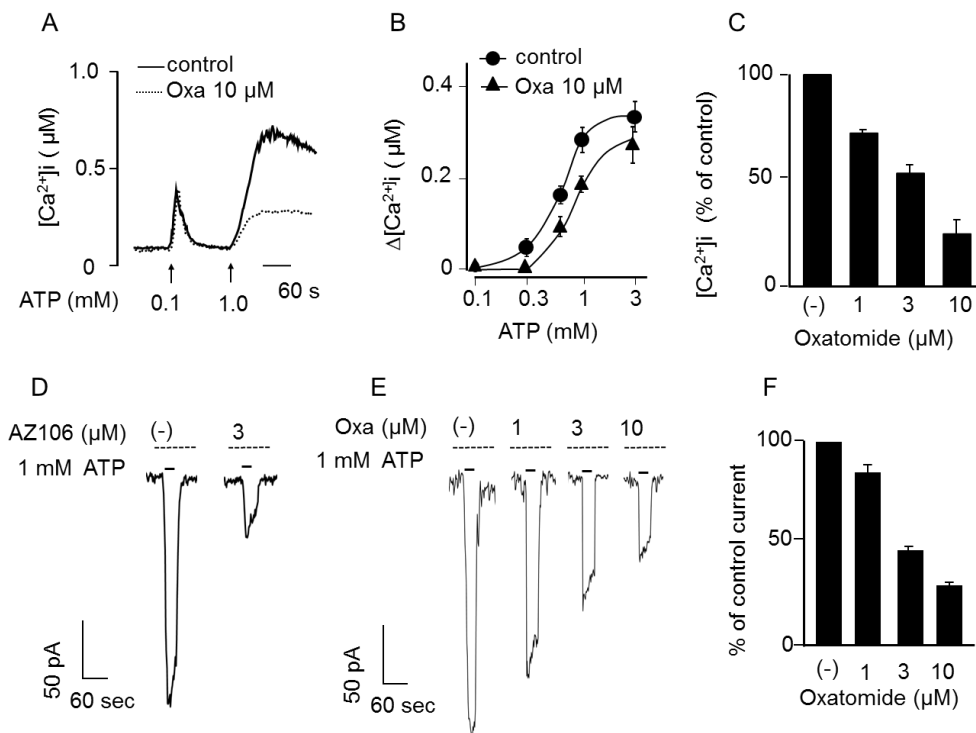


Fig. 11. Effect of oxatomide (Oxa) on P2X7-mediated increase of $[Ca^{2+}]_i$ and membrane current in N18TG2 cells. (A) Representative Ca^{2+} response of N18TG2 cells to 0.1 and 1 mM ATP in the presence or absence of 10 μM Oxa. (B) $[Ca^{2+}]_i$ response curve at different concentrations of ATP with or without 10 μM Oxa. Data points represent means \pm S.E.M. ($n = 3-6$). (C) Effect of different concentrations of Oxa on 1 mM ATP-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation. Results show means \pm S.E.M. ($n = 3-6$) expressed as percentage of the control response. (D, E) Representative whole cell current induced by 1 mM ATP with or without AZ10606120 (AZ106, D) or Oxa (E). Whole-cell recordings were performed in N18TG2 cells at a holding potential of 60 mV. (F) Effect of different concentrations of Oxa on 1 mM ATP-induced current. Results are expressed as percentage of control response. Data show means \pm S.E.M. ($n = 3-6$).

2) N18TG2 細胞における ATP による Ca^{2+} 応答及び細胞膜電流に対する oxatomide (Oxa) の効

果

N18TG2 細胞における Ca^{2+} の流入とパッチクランプ法を用いた P2X7 受容体電流に及ぼす作用を

指標として Oxa の P2X7 受容体阻害作用を更に検討した。10 μM Oxa の前処置によって 1 mM

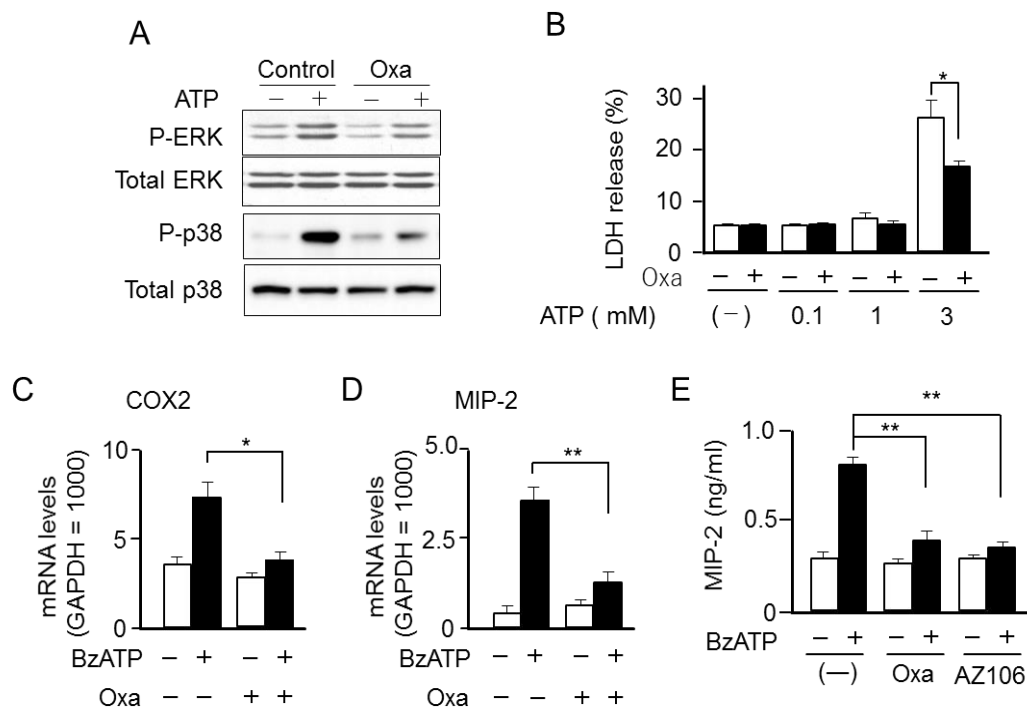


Fig. 12. Effect of oxatomide (Oxa) on P2X7 receptor-mediated responses in N18TG2 and J774 cells. (A) N18TG2 cells were stimulated with 1 mM ATP for 5 min in the presence or absence of 10 μ M Oxa. Cell lysates were subjected to western blot analysis for phospho-ERK (P-ERK), total ERK, phospho-p38 MAPK (P-p38) and total p38MAPK. The data presented are from a single experiment that is representative of the two performed. (B) N18TG2 Cells were stimulated with 0.1, 1, and 3 mM ATP for 30 min in the presence or absence of 10 μ M Oxa. Extracellular LDH activity was shown as % of total cellular LDH content ($n = 3$). Data are shown as means \pm S.E.M., * $P < 0.05$ (C, D) J774 cells were stimulated with 0.1 mM BzATP for 1 h in the presence or absence of 10 μ M Oxa, and then COX-2 (C) and MIP-2 (D) mRNA levels were analyzed by real-time PCR. Data show means \pm S.E.M. ($n = 3-5$). * $P < 0.05$ (E) J774 cells were stimulated with 0.1 mM BzATP for 3 h in the presence or absence of 10 μ M Oxa or 3 μ M AZ10606120 (AZ106) ($n = 3$). The content of MIP-2 in the culture supernatant was measured using ELISA. Data show means \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

ATP によって引き起こされる Ca^{2+} の流入は阻害されたが、100 μ M ATP による反応は阻害されなかつた。100 μ M ATP を処置した後に、0.3 - 3 mM ATP で刺激すると濃度依存的に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。10 μ M Oxa 存在下では ATP による Ca^{2+} の流入が全ての濃度で阻害された。1 mM ATP による

[Ca²⁺]_i の上昇を Oxa は濃度依存的に阻害し、IC₅₀ は 3.3 ± 1.0 μM であった (Fig. 11A-C)。

ATP によって誘起される細胞膜電流はホールセルパッチクランプ法によって測定した。1 mM ATP による刺激は P2X7 受容体阻害剤である AZ10606120 によって阻害される細胞膜電流を惹起した (Fig. 11D)。Oxa は 1 mM ATP によって引き起こされる細胞膜電流を濃度依存的に阻害し、IC₅₀ は 3.2 ± 0.7 μM であった (Fig. 11E-F)。

3) N18TG2 細胞と J774 細胞における P2X7 受容体を介した細胞機能変化に及ぼす Oxa の効果次に、Oxa が P2X7 受容体の活性化によって引き起こされる細胞内シグナルに対しても作用するか検討した。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は P2X7 受容体の刺激によって活性化され、membrane blebbing やポアの形成に関与することが知られている [61]。N18TG2 細胞を 1 mM ATP で 5 分間刺激すると ERK と p38 MAPK がリン酸化された。同時に、P2Y₂ を介する反応も引き起こされるが、100 μM ATP によるリン酸化は僅かであった (データ示さず)。Oxa を 10 μM 濃度で前処置すると ATP による ERK と p38 MAPK のリン酸化は阻害された (Fig. 12A)。高濃度の ATP による P2X7 受容体刺激は巨大なポアを細胞膜に形成し、LDH のような細胞質内の酵素を放出する。N18TG2 細胞を 3 mM 以上の高濃度 ATP で刺激すると細胞外に LDH が放出された。この反応は 10 μM Oxa を前処置することで著しく抑制された (Fig. 12B)。

マクロファージにおいて P2X7 受容体の活性化はプロスタグランジン E₂ の産生を促進する COX-2 や好中球の遊走を促進するケモカインである MIP-2 の発現を誘導する。J774 マクロファージ細

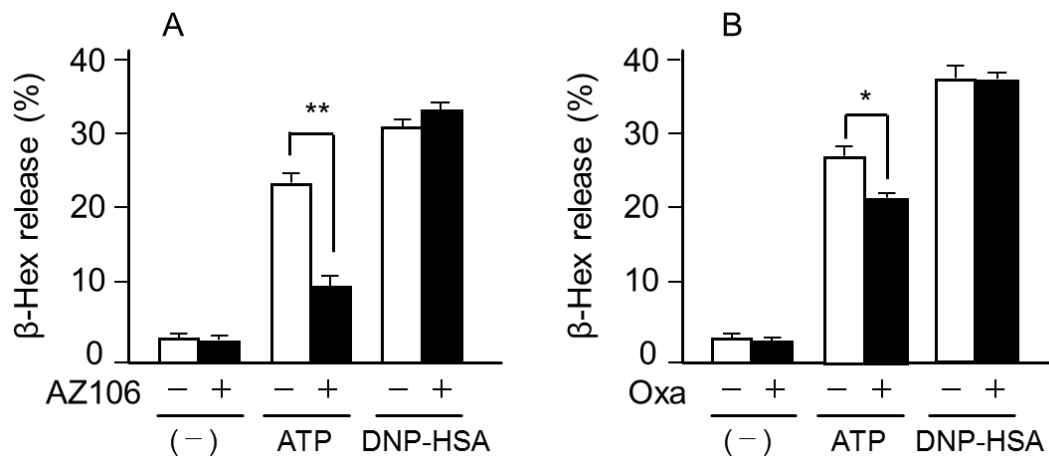


Fig. 13. Effects of oxatomide (Oxa) on ATP-induced degranulation in BMMC. BMMC were sensitized with anti-DNP IgE overnight. (A) BMMC were stimulated with 0.5 mM ATP or 50 ng/mL DNP-HSA in the presence or absence of 3 μ M AZ106120 (AZ106) for 5 min ($n = 3$). (B) BMMC were stimulated by 0.5 mM ATP or 50 ng/mL DNP-HSA with or without 3 μ M Oxa for 5 min ($n = 3$). Data are shown as means \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

胞株を P2X7 受容体アゴニストである 100 μ M BzATP で刺激すると COX-2 と MIP-2 の遺伝子発現量が上昇し、その上昇は 10 μ M Oxa の前処置によって阻害された。さらに、Oxa と AZ10606120 は BzATP による MIP-2 の分泌を阻害した (Fig. 12C-E)。

4) P2X7 受容体を介した BMMC の脱顆粒反応におよぼす Oxa の効果

マスト細胞における P2X7 受容体の活性化は脱顆粒反応を引き起こすことは第 2 章で述べた。そこで、BMMC における P2X7 受容体活性化による脱顆粒反応を Oxa が抑制するか β -Hex の活性を測定することで検討した。BMMC を 0.5 mM ATP または 50 ng/mL DNP-HSA で刺激すると脱顆粒反応が惹起され、P2X7 受容体阻害剤である 3 μ M AZ10606120 は ATP による反応のみを阻害した (Fig. 13A)。高濃度 (> 10 μ M) の Oxa は脱顆粒反応そのものを抑制することが知られている。

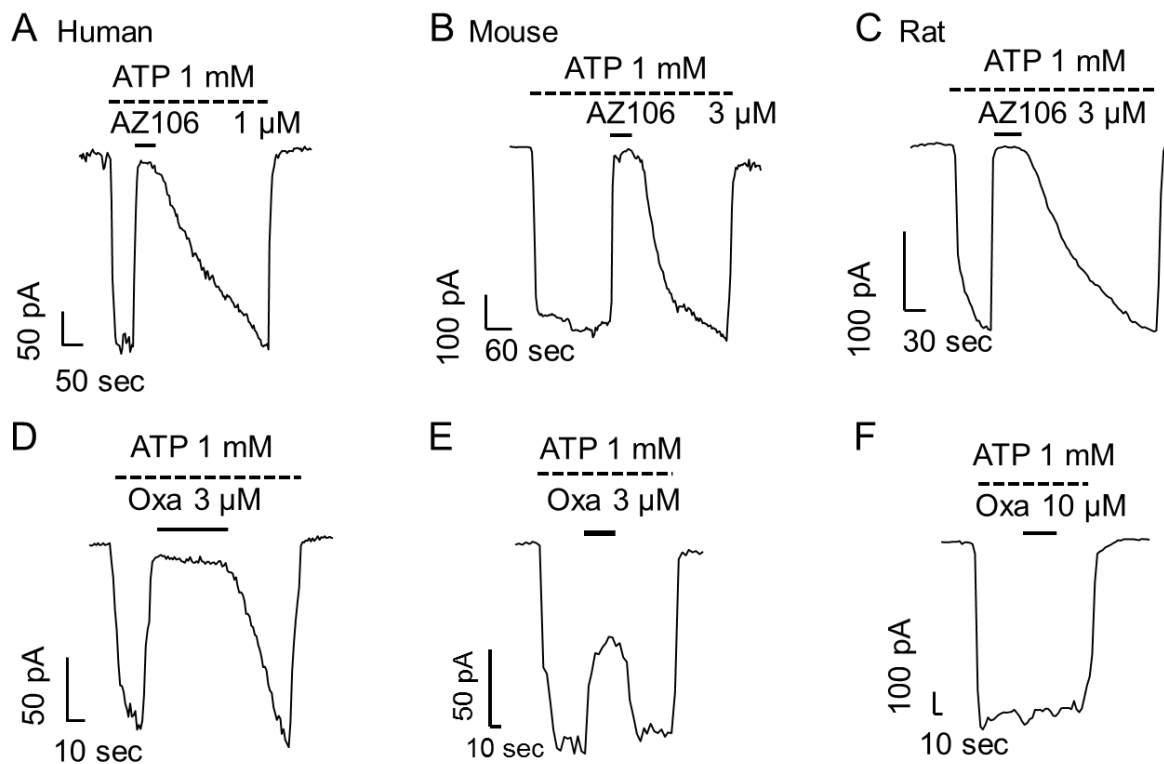


Fig. 14. Representative results showing the effects of oxatamide (Oxa) and AZ10606120 (AZ106) on the whole-cell current induced by human, mouse and rat P2X7 receptors. Human (A, D), mouse (B, E) and rat (C, F) P2X7 receptor-expressing HEK293 cells were stimulated by 1 mM ATP as indicated by dashed line. Once the currents had reached a steady state, AZ106 (A-C) or Oxa (D-F) was co-applied with 1 mM ATP as indicated by black line. The currents shown were obtained at a membrane potential of -60 mV.

そこで、Oxa の P2X7 受容体阻害作用を DNP-HSA による反応には影響を及ぼさない濃度で評価した。Oxa を 3 μM 濃度で前処置すると ATP による脱顆粒反応を有意に阻害したが DNP-HSA による反応には影響しない結果が得られた (Fig. 13B)。

5) ヒト、マウス、ラット P2X7 受容体に対する Oxa の効果

P2X7 受容体アンタゴニストの薬理的効果は種差の影響を大きく受けることが知られている

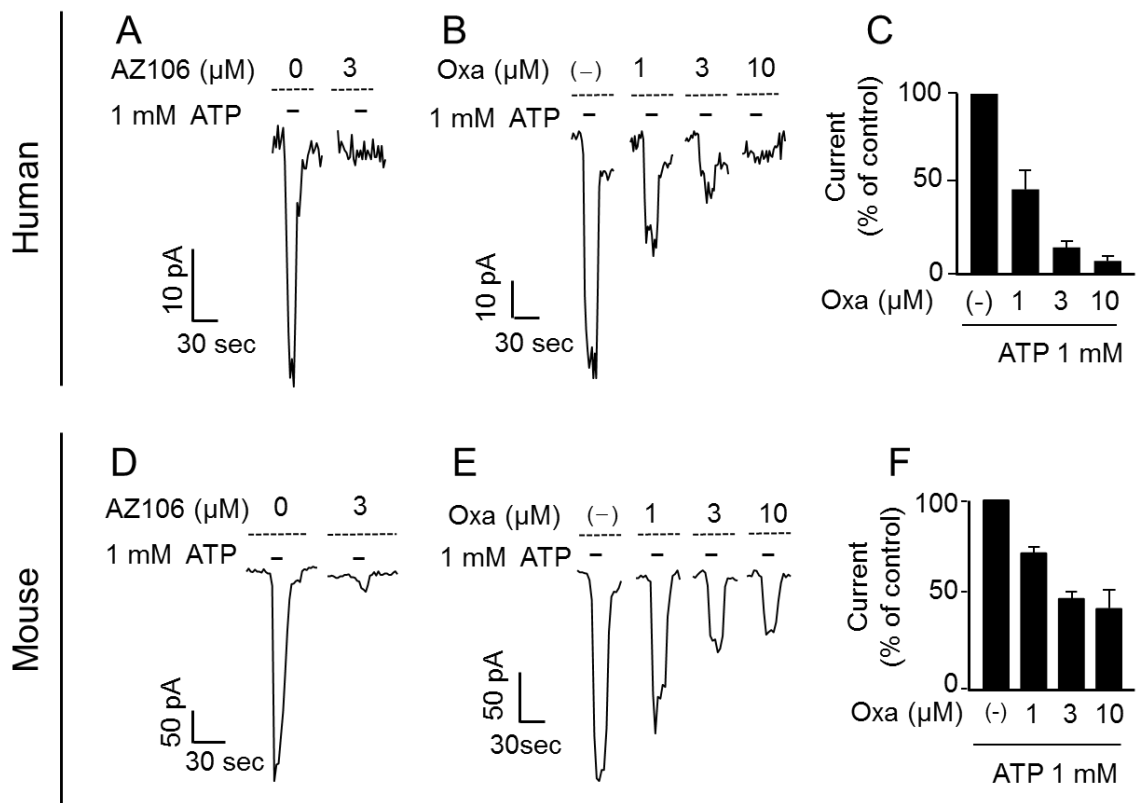


Fig. 15. Effect of different concentrations of oxatomide (Oxa) on whole cell current mediated by human and mouse P2X7 receptors. Human (A-C) or mouse (D-F) P2X7 receptor expressing HEK293 cells were stimulated with 1 mM ATP as indicated by black line in the presence of AZ10606120 (AZ106, 3 μM) or different concentrations of Oxa. Trace shown are representative of those obtained in human (A, B) and mouse (D, E) P2X7 receptor-expressing cells. Results obtained in human and mouse P2X7 expressing cells are summarized in C and F, respectively. Data show means ± S.E.M. ($n = 3-5$).

[76]。そこで、HEK293 細胞に発現させたヒト、マウス、ラット P2X7 受容体に対する Oxa の効果をパッチクランプ法による細胞膜電流の測定によって評価した。P2X7 受容体を発現させていない HEK293 細胞では ATP 刺激によって細胞膜電流は誘発されない。ヒト、マウス、ラット P2X7 受容体を発現させた HEK293 細胞を 1 mM ATP で刺激すると内向き電流が瞬時に引き起こされた。ATP による反応が最大になった後に AZ10606120 を同時に処置すると内向き電流は完全に抑制され、

AZ10606120 を除去することで最大反応まで徐々に回復した (Fig. 14A-C)。これらの結果から、AZ10606120 のヒト、マウス、ラット P2X7 受容体阻害作用に種差は認められなかった。一方、Oxa のヒト、マウス、ラット P2X7 受容体阻害作用には種により大きな差が見られた。ATP によって引き起こされるヒト P2X7 受容体を介した細胞膜電流は 3 μM Oxa によって完全に抑制され、除去することで最大反応まで回復した。しかしながら、同様の実験でマウス P2X7 受容体は 3 μM Oxa によって部分的にしか抑制されず、ラット P2X7 受容体は 10 μM Oxa を用いても抑制されなかった (Fig. 14D-F)。次に、ヒト及びマウス P2X7 受容体を発現させた HEK293 細胞における ATP 誘発膜電流に対する Oxa の濃度依存性を検討した。1, 3, 10 μM の Oxa を 1 分間前処置すると 1 mM ATP によるヒト P2X7 受容体を介する膜電流は濃度依存的に阻害された (Fig. 15B, C)。Oxa は濃度を上昇させることでヒト P2X7 受容体による ATP 誘発電流を完全に阻害したが ($\text{IC}_{50} = 0.95 \pm 0.15$ μM)、マウス P2X7 受容体は最大でコントロールの 40 %までしか阻害しなかった ($\text{IC}_{50} = 4.1 \pm 1.3$ μM) (Fig. 15E, F)。

6) ヒトミエローマ RPMI8226 細胞における ATP による Ca^{2+} 応答に対する Oxa の効果

P2X7 受容体を内因性に発現していることが知られているヒト骨髄腫由来 RPMI8226 細胞を用いて Oxa のヒト P2X7 受容体阻害作用を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を指標に検討した [77]。RPMI8226 細胞には P2Y₂ 受容体と P2X7 受容体が発現しており、100 μM ATP で刺激すると P2Y₂ 受容体を介して一過性に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇し、その後、750 μM ATP で刺激すると、持続的に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇した (Fig.

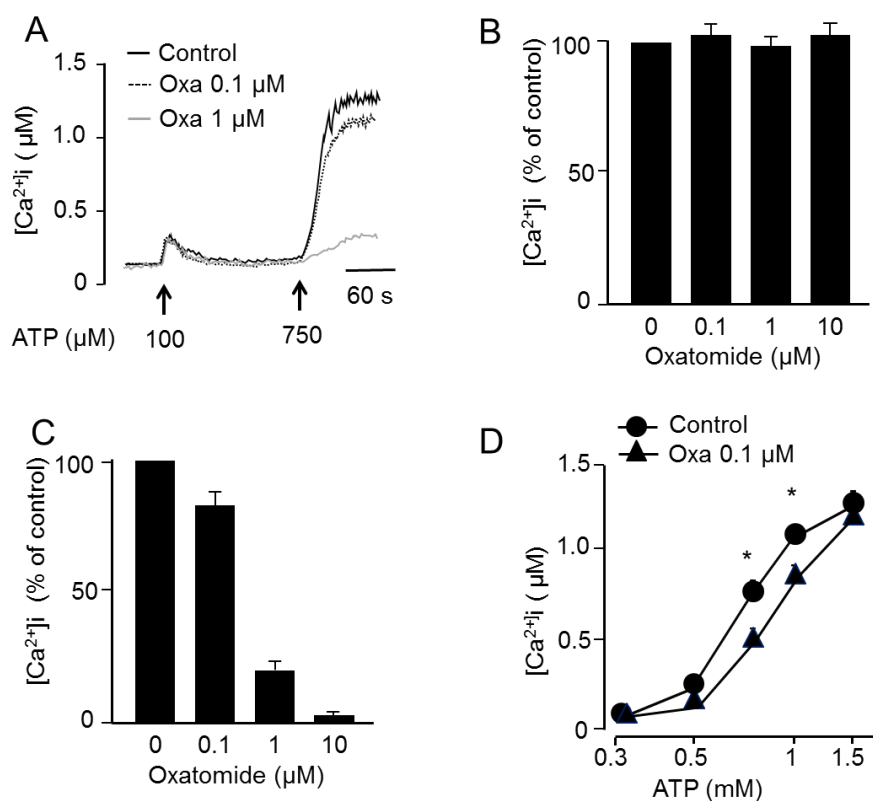


Fig. 16. Effect of oxatomide (Oxa) on human P2X7 receptor-mediated Ca²⁺ response in RPMI8226 cells. (A) Representative Ca²⁺ response to 100 μM ATP and 750 μM ATP in the presence or absence of 0.1 and 1 μM Oxa. (B, C) Effect of different concentrations of Oxa on the Ca²⁺ response induced by 0.1 mM ATP (B) or 0.75 mM ATP (C). Results are expressed as a percentage of the control response. Data show means ± S.E.M. (*n* = 4). (D) Effects of 0.1 μM Oxa on the concentration-Ca²⁺ response curve for ATP in RPMI8226 cells. Cells were pre-incubated with 0.1 μM Oxa for 1 min, followed by treatment with different concentrations of ATP. Data show means ± S.E.M. (*n* = 3–12). * *P* < 0.05.

16A)。Oxa を前処置した後に 100 μM 及び 750 μM ATP による刺激を行うと、P2Y₂ 受容体を介した [Ca²⁺]_i の上昇は変化しなかったが、P2X7 受容体を介した [Ca²⁺]_i の上昇は濃度依存的に抑制された (Fig. 16A-C)。さらに、0.1 μM Oxa は ATP による P2X7 受容体を介した [Ca²⁺]_i 上昇の用量反応曲線を高濃度側にシフトさせるような結果が得られた (Fig. 16D)。

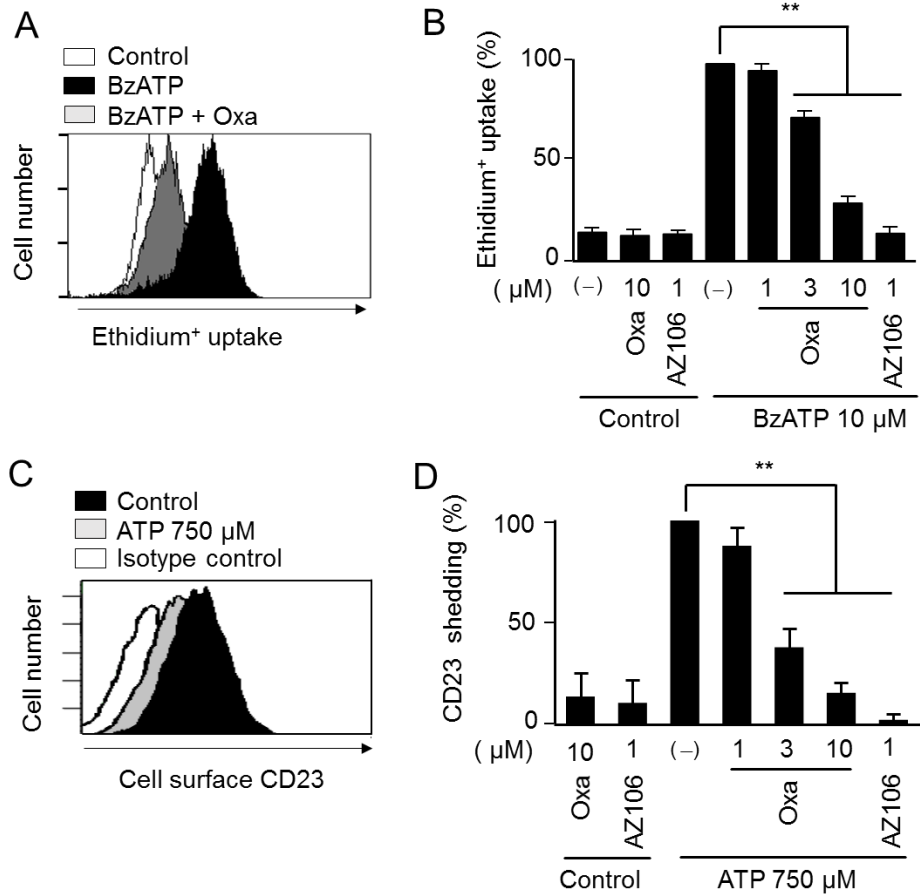


Fig. 17. Effects of oxatamide (Oxa) on human P2X7 receptor-mediated responses in RPMI8226 cells. (A) Representative FACS analysis of ethidium⁺ accumulation induced by 10 μM BzATP for 5 min. (B) Cells were pre-incubated with AZ10606120 (AZ106, 1 μM) or various concentration of Oxa for 5 min, followed by treatment with 10 μM BzATP for 5 min in the presence of 2.5 μM ethidium bromide. Data show means ± S.E.M. (*n* = 3) expressed as a percentage of the response induced by BzATP alone (*n* = 3). * *P* < 0.05 (C) Representative FACS analysis of membrane CD23 shedding induced by 750 μM ATP for 30 min. The membrane surface CD23 was labelled with FITC-conjugated anti-CD23 monoclonal antibody or isotype control (mouse IgG2a), and analyzed using FACS. (D) Cells were pre-incubated with AZ106 (1 μM) or various concentrations of Oxa for 5 min, followed by treatment with 750 μM ATP for 30 min. The membrane surface CD23 levels were analysed using FACS. Data show means ± S.E.M. (*n* = 5) expressed as the percentage of control response induced by ATP alone (*n* = 5). ** *P* < 0.01.

7) RPMI8226 細胞の P2X7 受容体を介したポアの形成と CD23 のシェディングに及ぼす Oxa の効果

細胞膜電流及び Ca^{2+} 流入のレベルで P2X7 受容体に及ぼす Oxa の作用が確認できたので、次に RPMI8226 細胞において P2X7 受容体を介する細胞応答について、細胞膜ポアの形成や細胞表面タンパク質である CD23 のシェディングを指標に、Oxa がこれらの反応を抑制するか検討を行なった [77, 78]。これらの反応は、P2X7 受容体アゴニストの親和性を高めるために 2 価のカチオンである Mg^{2+} と Ca^{2+} をバッファーから除去した状態で行った [61]。RPMI8226 細胞を P2X7 受容体アゴニストである $10 \mu\text{M}$ BzATP で刺激したときに形成されるポアを介して細胞内に流入するエチジウムの蛍光を FACS で解析した (Fig. 17A)。BzATP によるエチジウムの流入は P2X7 受容体特異的阻害剤である AZ10606120 によって阻害されたため、P2X7 受容体を介したものであると考えられた。Oxa を前処置することで BzATP によるエチジウムの流入は濃度依存的に抑制された (Fig. 17B)。

ポアの形成に加えて、P2X7 受容体の活性化は膜タンパク質である CD23 のシェディングを引き起こし、細胞膜表面の CD23 を減少させて上清中の可溶性 CD23 を増加させる [77]。750 μM ATP で刺激を行うと細胞膜表面の CD23 が減少し、この反応は AZ10606120 によって阻害された。Oxa は濃度依存的に ATP による CD23 のシェディングを阻害した (Fig. 17C, D)。

8) B16 細胞担癌モデルマウスにおける P2X7 受容体依存性腫瘍増殖に及ぼす Oxa の作用

腫瘍内では細胞外に高濃度の ATP が存在していることが知られている [79]。加えて、マウスメラ

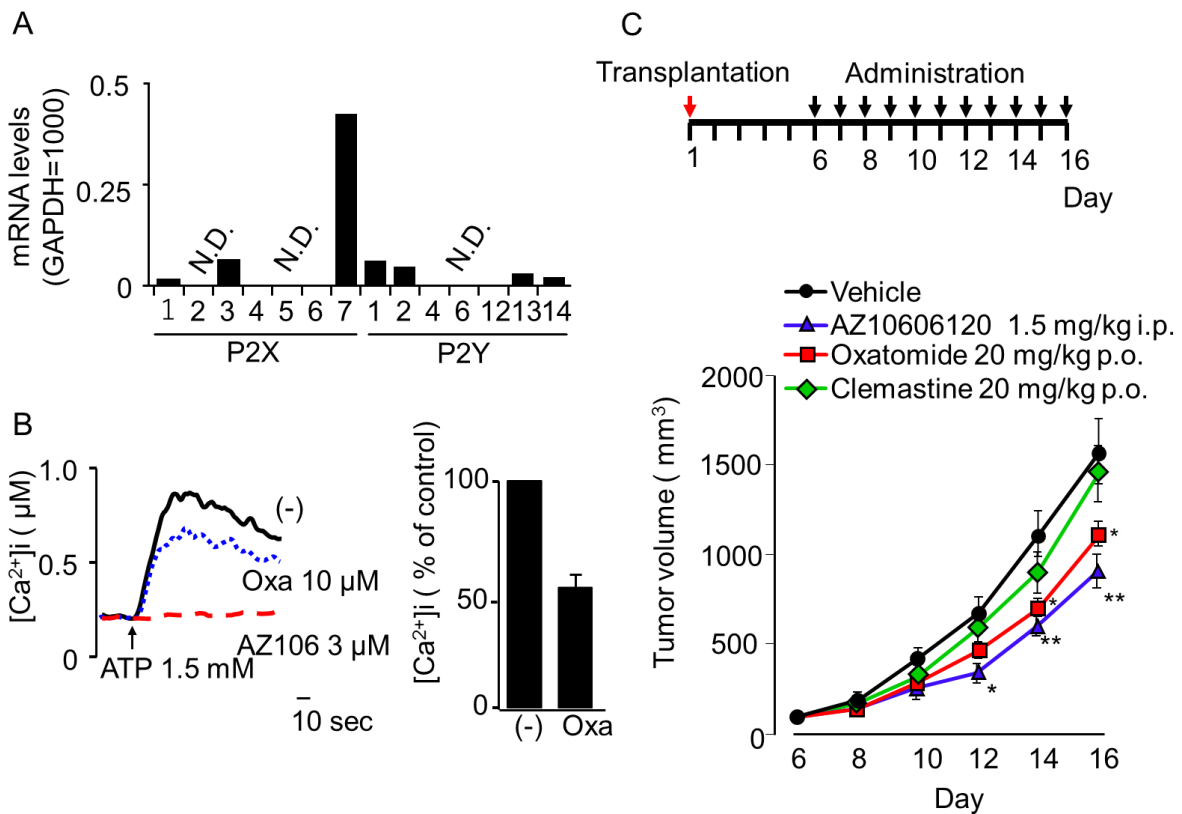


Fig. 18. Effect of oxatomide (Oxa) on tumor growth in B16 melanoma-bearing mouse *in vivo*. (A) Expression of P2 receptors mRNA in B16 cells. mRNA levels were analyzed by real-time PCR. Data were normalized by GAPDH mRNA levels. N.D., not detected. (B) Effects of ATP (1.5 mM) on [Ca²⁺]_i in B16 cells. B16 cells were preincubated with AZ10606120 (AZ106, 3 μM) or oxa (10 μM) for 30 s and then stimulated by ATP. Values are shown as means ± S.E.M. (n = 3). (C) Experimental protocol for measuring tumor growth in B16 melanoma-bearing. B16 melanoma cells (1 × 10⁶ cell/mouse) were injected on day 1. Oxa (20 mg/kg), AZ106 (1.5 mg/kg), clemastine (20 mg/kg) were orally administered from day 6 to day 16, and tumor size were measured. Values are shown as means ± S.E.M. (n = 7-9). * P < 0.05. ** P < 0.01 vs corresponding vehicle.

ノーマ細胞株である B16 細胞は P2X7 受容体が発現しており、増殖を正に制御している [80, 81]。

そこで、Oxa が生体内でも P2X7 受容体阻害効果を示すか B16 細胞を用いた担癌モデルマウスで

検討を行った。B16 細胞には、主要な P2 受容体として P2X7 受容体を発現しており、ATP (1.5 mM)

によって顕著な [Ca²⁺]_i の上昇を引き起こした。この反応は AZ10606120 (3 μM) と Oxa (10 μM) に

よって阻害された (Fig. 18A, B)。この細胞を C57BL/6 マウスの腹部皮下に移植し、6 日目から AZ10606120 (1.5 mg/kg) を腹腔内投与、Vehicle, Oxa (20 mg/kg)、Clemastine (20 mg/kg) を 1 日 1 回、経口投与し 16 日目まで腫瘍径を測定した (Fig. 18C)。Vehicle に対して、AZ10606120 の投与により腫瘍の増殖は有意に阻害された。Oxa の投与も腫瘍の増殖を抑制したが、P2X7 受容体阻害作用を有さない抗アレルギー薬である Clemastine の投与では抑制されなかった (Fig. 18D)。

3-4 考察

本章では、抗アレルギー薬である Oxa が P2X7 受容体阻害作用を有することを示した。これまでに、P2X7 受容体選択的アンタゴニストとして AZ10606120 や A438079 等が開発されているが、カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ阻害剤である KN-62 や青色色素であるブリリアントブルーGのような別の用途で用いられていた物質も P2X7 受容体阻害作用を持つことが見出されている [76]。抗アレルギー薬は、抗ヒスタミン作用以外にも抗コリン作用や抗ロイコトリエン受容体作用、脱顆粒反応の抑制作用等を有している。このような多様な作用を示す抗アレルギー薬の中に P2X7 受容体阻害作用を有する薬物がないかを、P2X4 受容体及び P2X7 受容体を内因性に発現している N18TG2 細胞 [73] と J774 細胞 [74] を用いて検討を行った。これらの細胞を UTP で刺激するとアゴニストに対して高親和性である P2Y₂ 受容体が活性化し一過性に [Ca²⁺]_i が上昇する。その後、高濃度の ATP で刺激することで P2X4 受容体による一過性の反応と P2X7 受容体による持続的な反応を観測することができる。このような方法を用いて P2X7 受

容体の活性化による Ca^{2+} の流入を Oxa が阻害することを見出した (Fig. 10)。Oxa は N18TG2 細胞で P2X7 受容体活性化による細胞膜電流の変化や ERK 及び p38 のリン酸化、LDH の放出を抑制した (Fig. 11, 12)。加えて、Oxa は J774 細胞で P2X7 受容体活性化による COX-2 や MIP-2 のような炎症に関係する遺伝子の発現を抑制した (Fig. 12)。さらに、Oxa は BMMC の P2X7 受容体活性化による脱顆粒反応を、抗原依存的な脱顆粒反応を抑制する濃度よりも低い濃度で抑制した (Fig. 13)。これらの結果から、Oxa の抗アレルギー作用の一部は P2X7 受容体阻害作用によるものであることが示唆された。

P2X7 受容体アンタゴニストの効果は種差により異なることが知られている。例えば、KN-42 はヒト P2X7 受容体に対する作用は強いがマウス P2X7 受容体に対する作用は弱く、ブリリアントブルー G はラット P2X7 受容体をマウス及びヒト P2X7 受容体よりも強く阻害する [76]。HEK293 細胞にヒト、マウス、ラット P2X7 受容体を発現させ電気生理学的な手法を用いて Oxa の P2X7 受容体阻害作用を検討したところ、ヒト P2X7 受容体に対して最も強い効果を示した。Oxa はヒト P2X7 受容体の膜電流を濃度依存的に阻害し、 IC_{50} は $0.95 \pm 0.15 \mu\text{M}$ であった。マウス P2X7 受容体に対してはコントロールの約 40% までしか阻害効果を示さず、 IC_{50} は $4.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$ であった。さらに、ラット P2X7 受容体に対して Oxa は $10 \mu\text{M}$ まで濃度を上げても阻害効果を示さなかった (Fig. 14, 15)。Oxa のヒト P2X7 受容体に対する薬理的な性質は P2X7 受容体を内因性に発現する RPMI8223 細胞においても再現され、P2X7 受容体活性化による Ca^{2+} の流入を Oxa は濃度依存的に阻害し IC_{50} は $0.43 \pm 0.08 \mu\text{M}$ であった (Fig. 16)。これらの結果から Oxa の P2X7 受容体阻

害作用にも種差が存在し、マウス P2X7 受容体よりもヒト P2X7 受容体に対して約 4 倍の阻害効果を示し、ラット P2X7 受容体は阻害しないと考えられた。Oxa と同様にヒト P2X7 受容体を阻害するがラット P2X7 受容体は阻害しない P2X7 受容体阻害薬として KN62 が知られている。KN62 の作用に種差が生じる原因として P2X7 受容体の 95 番目のアミノ酸が重要であることが明らかとなっている [82]。ラット P2X7 受容体の 95 番アミノ酸はロイシンであるが、ヒト P2X7 受容体はフェニルアラニンであり、ヒト P2X7 受容体の 95 番アミノ酸をロイシンに置換すると KN62 の作用が消失する。加えて、別の P2X7 受容体阻害薬である GW791343 も 95 番アミノ酸がロイシンだと阻害作用を示さなくなる [82]。このことから、Oxa がラット P2X7 受容体に作用しなかった原因の一つは 95 番アミノ酸の違いである可能性が考えられる。一方で、マウス P2X7 受容体の 95 番アミノ酸はヒト P2X7 受容体と同じくフェニルアラニンであることから Oxa が作用出来たのではないかと考えられる。しかしながら、ヒトとマウス P2X7 受容体に対する Oxa の作用にも種差が認められたため 95 番アミノ酸以外にも種差の原因となるアミノ酸の存在が考えられた。

ヒト及びマウス P2X7 受容体を発現した HEK293 細胞を用いた電気生理学的な実験において、Oxa は可逆的に ATP 誘発膜電流を阻害した。すなわち、暴露した Oxa を除去すると、ATP に対する反応が元のレベルに回復した (Fig. 14)。さらに、RPMI8226 細胞を用いた Ca^{2+} の流入測定では 0.1 μ M の Oxa によって最大反応を変化させることなく用量反応曲線を高濃度側にシフトさせた (Fig. 16D)。これらの結果から、Oxa は P2X7 受容体の競合的アンタゴニストであることが示唆された。しかしながら、同様の阻害効果をもたらす AZ10606120 はアロステリックモジュレーター

として作用すると報告されており [83]、Oxa の阻害様式を決定するにはさらなる検討が必要であると考えられた。

B16 細胞を用いた担癌モデルマウスにおいて P2X7 受容体阻害薬である AZ10606120 は腫瘍の増殖を有意に抑制した。同様に、Oxa も腫瘍の増殖を抑制したが、P2X7 受容体阻害作用を示さない Clemastine は抑制しなかった。このことから、Oxa はヒトよりも P2X7 受容体阻害作用が弱いマウス生体内においても P2X7 受容体を阻害することが示された。一方で、P2X7 受容体の癌における役割は多様な報告がなされており、活性化によって直接癌細胞に死をもたらす報告や阻害によって増殖を抑制する報告、阻害によってがん免疫をも抑制してしまう報告などが存在する [84–86]。そのため、癌治療に P2X7 受容体阻害薬を利用するためには更なる検討が必要であると考えられた。

Oxa は抗アレルギー薬として臨床で使用されている医薬品であり、アレルギー性結膜炎や慢性じんましん、アレルギー性皮膚炎、小児気管支喘息などに用いられている [87, 88]。Oxa は臨床での投与量 (30 mg を一日二回) で血中濃度は約 40 ng/mL (約 0.1 μ M) に達する [89]。これらの知見と Oxa が 0.1 μ M からヒト P2X7 受容体阻害作用を示すことを勘案すると、Oxa は抗アレルギー薬として用いられた際にヒトの体内においても P2X7 受容体を阻害していることが示唆された。すなわち、Oxa の抗アレルギー作用の一部に P2X7 受容体阻害作用が関与している可能性が考えられた。Oxa は、既存医薬品であるため安全性は担保されている。しかしながら、多くの抗アレルギー薬が持つ眠気や口渇などの副作用が強く、血中濃度を上げるために投与量を増やすこと

は難しい。そのため、軟膏などの外用剤や吸入剤のような局所で作用することを目的とした製剤を開発することで、十分に Oxa の P2X7 受容体阻害作用を引き出し、アレルギー性皮膚炎や気管支炎の治療に利用できるのではないかと考えられた。

第4章 マウスマスト細胞の P2X7 受容体に対するデキサメタゾン(DEX) の効果

4-1 緒言

ステロイド系抗炎症薬 (SAIDs) は、グルコルチコイドあるいはその誘導体を含んだ医薬品であり、様々な炎症またはアレルギー性疾患の治療に幅広く用いられている [90]。グルコルチコイドは細胞質に存在するグルコルチコイド受容体 (GR) に作用することで強力な抗炎症作用を示す。GR は Heat shock protein 90 (HSP90) と結合した状態で細胞質に存在しており、リガンドが結合すると HSP90 から解離して細胞質内に移行する。細胞質内に移行した GR はホモダイマーを形成し、ゲノム上に存在する glucocorticoid response element (GRE) に結合することで転写を制御する。加えて、nuclear factor-kappa B (NFκB) や activator protein 1 (AP-1) といった転写因子とヘテロダイマーを形成することで、これらの転写活性を抑制する [91, 92]。これらの結果、phospholipase A2 阻害タンパクであるリポコルチンの産生や、様々な炎症性サイトカインの産生抑制が引き起こされることで抗炎症作用を示す [93, 94]。このような、遺伝子発現変化を介した反応を genomic effect と呼ぶ一方で、遺伝子発現を介さず、数秒から数分で起こる反応は non genomic effect と呼ばれている [95]。この反応は膜脂質や膜タンパク、細胞質タンパクに対するグルコルチコイドの直接的な作用、またはグルコルチコイドが GR と結合することで、GR と複合体を形成していたタンパクが解離することで引き起こされると考えられている [96]。Non-genomic effect によって引き起こされる現象として、マスト細胞の細胞膜表面における FcεRI の発現低下や、T 細胞のアポトーシス、T cell

receptor からのシグナルの抑制などが知られている [97-99]。

第 2 章において、細胞外ヌクレオチドをリガンドとする P2X 受容体がマスト細胞の活性化を正に制御していることを明らかにした。特に、P2X7 受容体刺激は単独でマスト細胞の活性化を引き起こし、P2X4 受容体刺激は抗原刺激による脱顆粒反応を増強した。一方で、マスト細胞は全身に分布しているが、組織によって異なるフェノタイプを示すことが知られている [100]。P2X7 受容体の発現も組織によって異なり、腸、肺、腹腔マスト細胞では高いが、皮膚マスト細胞ではほとんど発現していない [51]。これは、マスト細胞における P2X7 受容体の発現に必要なレチノイン酸を皮膚繊維芽細胞が分解するためであることが明らかとなっている。このように、マスト細胞の P2X7 受容体発現は組織ごとに制御されていると考えられるがレチノイン酸の他にマスト細胞の P2X 受容体の発現を調節している因子は知られていない。そこで、本章では免疫反応を強力に抑制する Dexamethasone (DEX) のマスト細胞における P2X 受容体発現に及ぼす影響を検討した。

4-2 実験材料及び実験方法

1) 試薬

本章の実験で使用した試薬の入手先は以下のとおりである。第 2 章及び第 3 章に記載したものは省略した。DEX、prednisolone、mifepristone: 和光純薬。phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、ionomycin :Sigma。FITC conjugated anti P2X7 receptor antibody (clone: hano43) :Bio Rad。PE conjugated anti CD11b antibody (clone: M1/70)、APC conjugated anti F4/80 antibody (clone :

BM8) :BD Biosciences。 macrophage colony stimulating factor (M-CSF) :Peprotec。

2) 細胞培養

2-2-3 と同様の方法を用いて BMMC を培養した。

骨髄由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophage, BMM) は 2-2-3 と同様の方法を用いて採取した骨髄細胞を採取して調製した。骨髄細胞を M-CSF (10 ng/mL) を含んだ RPMI1640 培地を用いてペトリディッシュ内で培養した。3~4 日ごとに培地を交換し接着細胞を培養した。10~14 日間培養した後にマクロファージのマーカーである F4/80 と CD11b の発現を FACS で確認して実験に用いた。

3) マウス

2-2-2 の条件下で C57BL/6 マウスを飼育した。DEX は生理食塩水に溶解し、10 mg/kg で 4 日間連続経口投与した。コントロール群には生理食塩水を経口投与した。5 日目に腹腔細胞を RPMI1640 培地で回収し FACS でマスト細胞の P2X7 受容体の発現を解析した。

4) 逆転写反応による cDNA の作成と real time PCR

2-2-7 及び 2-2-8 と同様の方法で行った。

5) フローサイトメトリー解析

2-2-4 と同様の方法で行った。使用した抗体の希釈倍率と標識物質を以下に示す。

FITC conjugated anti P2X7 receptor antibody (×30)、APC conjugated anti F4/80 antibody (×100)、

PE conjugated anti CD11b antibody (×100)

6) EtBr の流入

3-2-13と同様に行った。

7) $[Ca^{2+}]_i$ 測定

2-2-5と同様の方法で行った。

8) 脱顆粒反応

2-2-10と同様の方法で行った。

9) 統計処理

2-2-14と同様の方法で行った。

4-3 結果

1) BMMC の P2X 受容体発現に対する DEX の効果

まず、P2X 受容体の遺伝子発現量に対する DEX の効果を検討した。DEX (1 μ M) の 24 または 72 時間処置によって、BMMC では P2X1 受容体及び P2X4 受容体の遺伝子発現量は変化しなかったが P2X7 受容体の遺伝子発現が減少した (Fig. 19A-C)。一方で、BMM の P2X7 受容体の遺伝子発現量は DEX 処置によって変化しなかった (Fig. 19D)。

次に、FACS を用いて BMMC の P2X7 受容体のタンパク質発現量に対する DEX の効果を検討した。DEX (1 μ M) 存在下、BMMC を 24 または 72 時間培養すると細胞膜表面の P2X7 受容体のタンパク質発現量は時間依存的に減少した (Fig. 20A, B)。また、1 - 1000 nM の DEX 存在下、

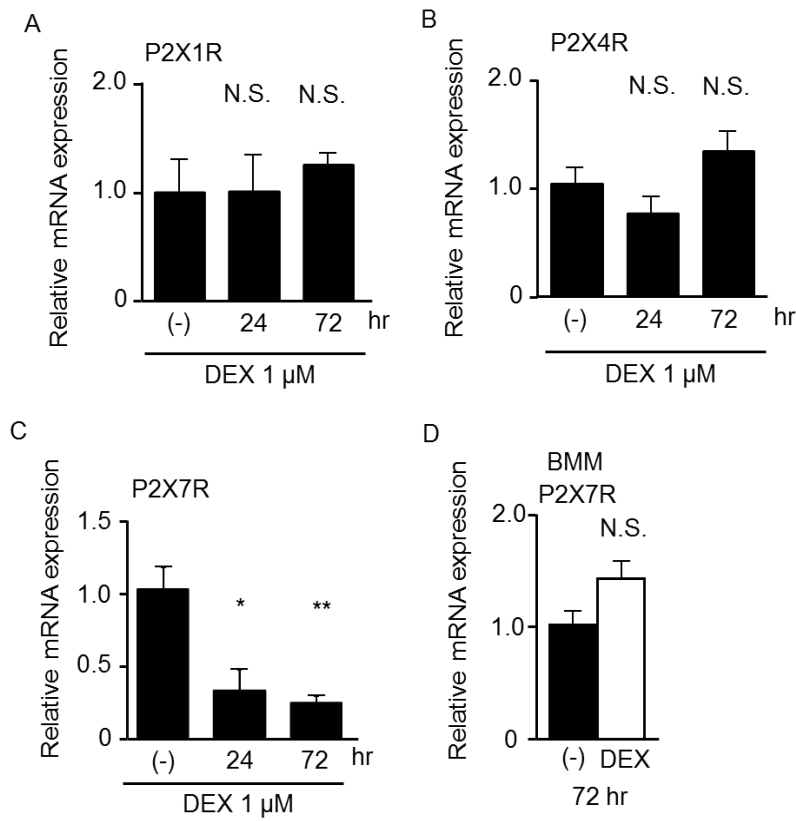


Fig. 19. Effects of dexamethasone (DEX) on P2X1, P2X4 and P2X7 receptor mRNA expression in BMMC. BMMC (A-C) or bone marrow derived macrophage (BMM), (D) were treated with DEX (1 μM) for 24 or 72 hr, and then P2X1 (A), P2X4 (B) and P2X7 (C, D) receptor mRNA levels were analyzed by real-time PCR ($n = 3-6$). Data were normalized by GAPDH mRNA level. Values are shown as means \pm S.E.M. N.S., not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

BMMC を 72 時間培養すると P2X7 受容体のタンパク発現量は濃度依存的に減少し、最大で対照の $54.0 \pm 9.4\%$ まで減少した (Fig. 20C)。BMM の P2X7 受容体タンパク質発現量は遺伝子発現量と同様に変化しなかった (Fig. 20D)。DEX による P2X7 受容体タンパク質の発現量抑制作用は、GR アンタゴニストであるミフェプリストンによって濃度依存的に阻害された (Fig. 21A)。加えて、GR アゴニストであるプレドニゾロンも DEX と同様に BMMC の P2X7 受容体タンパク発現量を減少させた (Fig. 21B)。

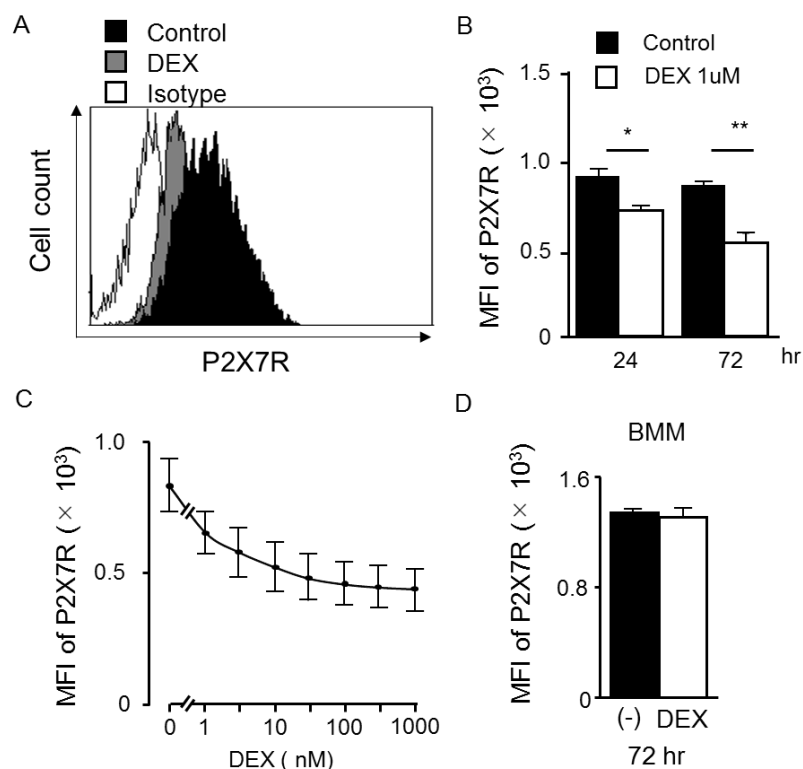


Fig. 20. Effects of dexamethasone (DEX) on P2X7 receptor protein expression in BMMC. (A) Typical results of FACS analysis of P2X7 receptor protein expression with or without DEX treatment after 24 hr. (B) BMMC were treated with DEX (1 μ M) for 24 or 72 hr, and then mean fluorescent intensity (MFI) of P2X7 receptor was measured by FACS ($n = 3-4$). (C) BMMC were treated with different concentrations of DEX (1 - 1000 nM) for 72 hr, and then MFI of P2X7 receptor was measured by FACS ($n = 3$). (D) BMM were treated with DEX (1 μ M) for 72 hr, and then MFI of P2X7 receptor was measured by FACS ($n = 3$). Values are shown as means \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2) BMMC の P2X7 受容体活性化によるポアの形成と脱顆粒反応に対する DEX の効果

DEX による BMMC の P2X7 受容体発現量の減少が機能にも影響を及ぼすか検討した。P2X7

受容体の活性化は巨大なポアを開口し、エチジウムのような分子を透過させる事が知られている。

そこで、BzATP (0.1 または 0.3 mM) で BMMC を刺激した時に形成されるポアを介したエチジウ

ムの流入を、FACS で評価した。BzATP によるエチジウムの流入は P2X7 受容体特異的アンタゴニ

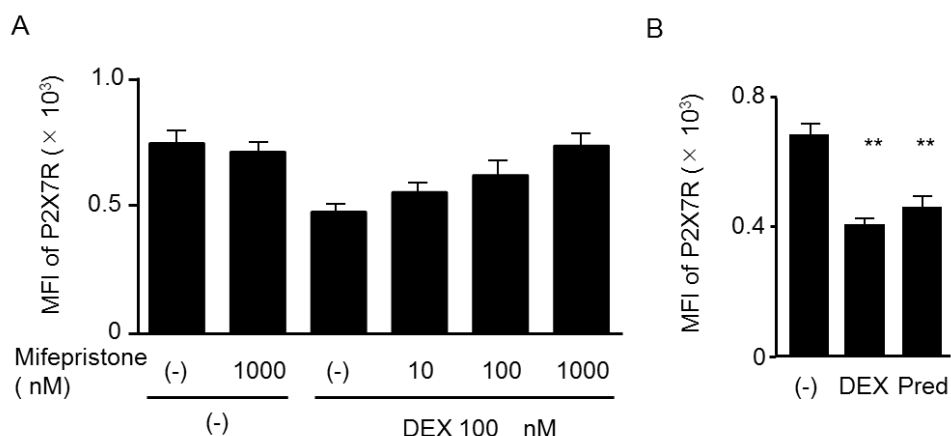


Fig. 21. Role of glucocorticoid receptor in dexamethasone (DEX)-induced down-regulation of P2X7 receptor expression in BMMC. (A) BMMC were treated with DEX (100 nM) for 72 hr in the presence or absence of glucocorticoid receptor antagonist mifepristone (10-1000 nM), and then MFI of P2X7 receptor was measured by FACS ($n = 3$). (B) BMMC were treated with DEX (100 nM) or prednisolone (Pred, 100 nM) for 72 hr, and then MFI of P2X7 receptor was measured by FACS ($n = 3$). Values are shown as means \pm S.E.M. * $P < 0.01$.

ストである AZ10606120 によって阻害された。DEX (0.1 μ M) を 24 時間処置した BMMC では BzATP によるエチジウムの流入が減少した (Fig. 22A, B)。次に BMMC の P2X7 受容体活性化によって引き起こされる脱顆粒反応に及ぼす DEX の作用を検討した。BMMC を BzATP で刺激すると顕著な脱顆粒反応が引き起こされ、この反応は AZ10606120 によって阻害された (Fig. 22C)。DEX (0.1 μ M) を 24 時間処置した BMMC では BzATP および DNP-HSA による脱顆粒反応が抑制されたが、ionomycin + PMA による脱顆粒反応は抑制されなかった (Fig. 22D)。以上の結果から、DEX による BMMC の P2X7 受容体発現のダウンレギュレーションは、BMMC の P2X7 受容体を介する機能発現の抑制を伴っていることが確認できた。

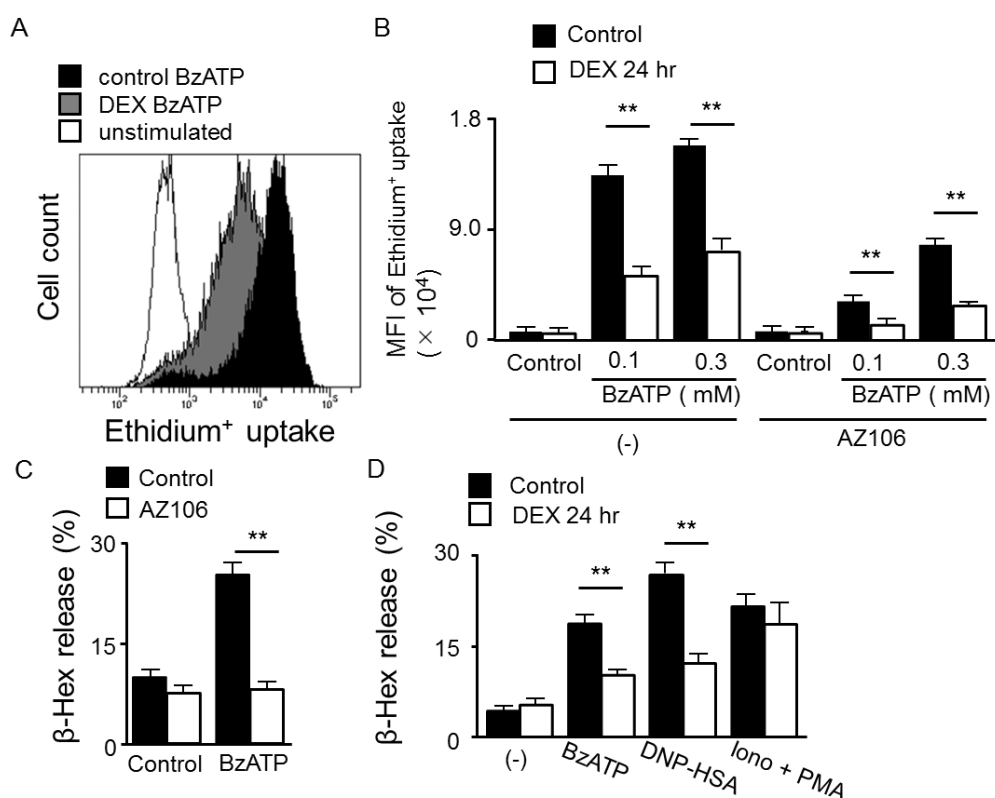


Fig. 22. Effects of dexamethasone (DEX) on P2X7 receptor-mediated responses in BMMC. (A) Typical results of FACS analysis of the effect of DEX on BzATP-induced ethidium⁺ uptake. (B) BMMC were stimulated with BzATP (0.1 or 0.3 mM) for 5 min in the presence or absence of P2X7 receptor antagonist AZ10606120 (AZ106, 10 μM) and then analyzed for ethidium⁺ uptake by FACS (*n* = 3). (C) BMMC were sensitized with anti-DNP-IgE overnight and then stimulated with BzATP (0.3 mM) for 5 min in the presence or absence of AZ106 (10 μM, *n* = 3). (D) Effects of DEX (100 nM) on degranulation from BMMC in response to BzATP (0.3 mM), DNP-HSA (100 ng/mL) or ionomycin (1 μM) + PMA (0.1 μM) for 5 min (*n* = 3). Values are shown as means ± S.E.M. ** *P* < 0.01.

3) マウス腹腔マスト細胞の P2X7 受容体発現量に対する DEX 投与の効果

DEX が生体内のマスト細胞においても P2X7 受容体の発現量を減少させるか検討した。

C57BL/6 マウスに DEX (10 mg/kg) を 4 日間経口投与し、腹腔マスト細胞における P2X7 受容体の発現量を FACS で解析した。DEX を投与しても腹腔細胞に占めるマスト細胞の比率は変化しな

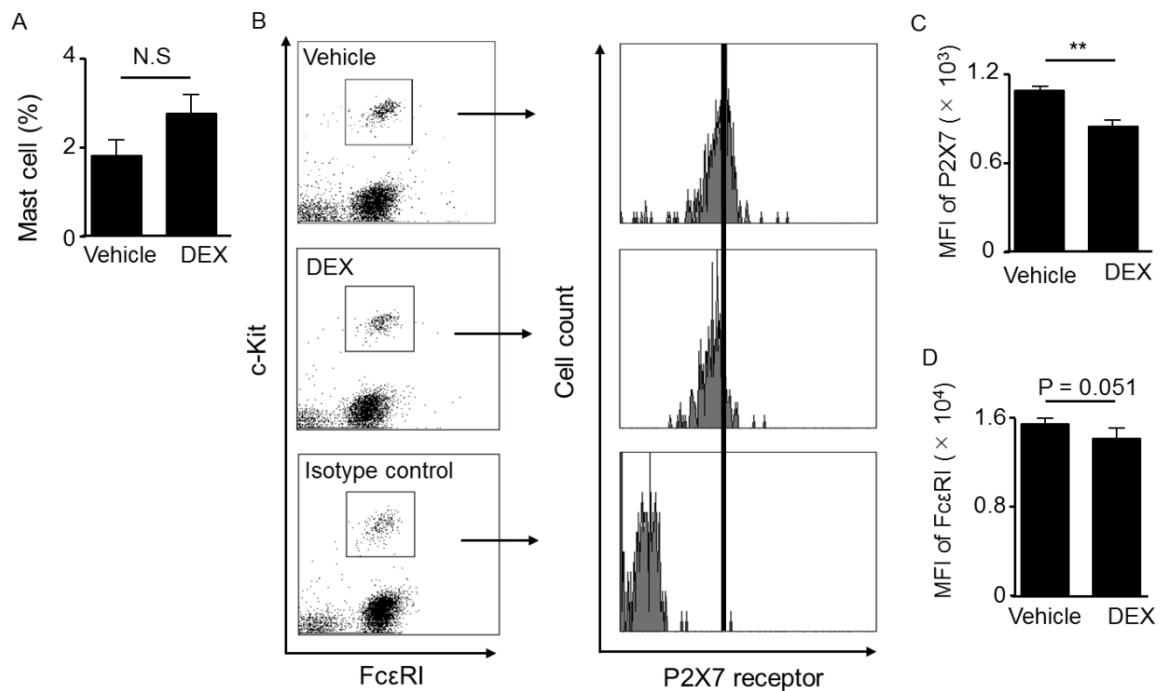


Fig. 23. Effect of dexamethasone (DEX) on P2X7 receptor expression in peritoneal mast cells *in vivo*. Mice were administrated with DEX (10 mg/kg/day, p.o.) or vehicle for 4 days, and resident mast cells (c-kit⁺ and FcεRI⁺ cells) were collected from peritoneal cavity. (A) Rate of mast cells were calculated with total peritoneal cells. (B) Typical result of FACS analysis of P2X7 receptor expression in peritoneal mast cells (c-kit⁺ and FcεRI⁺ cells) (C, D) Effects of DEX treatments *in vivo* on expression of P2X7 receptor (C) and FcεRI (D) in peritoneal mast cells were examined by FACS. Values are shown as means ±S.E.M. (n = 4). N.S., not significant. ** P < 0.01.

かった (Fig. 23A)。DEX を投与したマウスの腹腔マスト細胞では FcεRI のわずかな減少傾向が認められたが、P2X7 受容体発現量はより顕著に減少しており、有意な差が認められた (Fig. 23B-D)。

4-4 考察

本章では、グルココルチコイドである DEX がマスト細胞の P2X7 受容体発現量を減少させることを明らかにした。グルココルチコイドは様々なアレルギー性疾患の炎症反応を抑制し、抗炎症薬と

して広く用いられている。その作用は多岐にわたり、マスト細胞の活性化を抑制する作用も知られている。例えば、グルココルチコイドはマスト細胞表面の FcεRI 受容体発現量を減少させ、FcγRIIb を増加させる [97, 101]。また、細胞内シグナル伝達を調節することでマスト細胞の活性化を制御している [102]。

BMMC には P2X1, 4, 7 受容体が発現しており、DEX は P2X7 受容体の発現量のみを時間及び濃度依存的に減少させた (Fig. 19)。この反応は GR アンタゴニストであるミフェプリストンによって濃度依存的に阻害され、DEX と類縁のグルココルチコイド誘導体であるプレドニゾンでも同様の結果が得られたことから、GR を介した反応であると考えられた (Fig. 21)。一方で、BMM には GR が発現しているにも関わらず [103]、DEX を処置しても P2X7 受容体の mRNA 及びタンパク質の発現量はともに変化しなかった (Fig. 19, 20)。これらの結果から、P2X7 受容体の発現は BMMC と BMM では異なる転写調節を受けていると考えられた。

BMMC を P2X7 受容体選択的アゴニストである BzATP で刺激するとポアの形成と脱顆粒反応が起こり、P2X7 受容体特異的阻害薬である AZ10606120 によってこの反応は抑制された。DEX を処置した BMMC でも同様に、BzATP によるポアの形成と脱顆粒反応は抑制された (Fig. 22)。これらの結果から、DEX は BMMC の P2X7 受容体発現の減少によって P2X7 受容体活性化により引き起こされる機能を抑制すると考えられた。

DEX をマウスに経口投与すると腹腔マスト細胞の P2X7 受容体発現量は有意に減少したが FcεRI 発現量は有意な変化を示さなかった (Fig. 23)。この結果から、生体内においても DEX はマ

スト細胞の P2X7 受容体発現を減少させており、SAIDs による抗炎症、抗アレルギー作用の一部はマスト細胞の P2X7 受容体発現量減少によるものであることが示唆された。しかしながら、DEX の投与によってマスト細胞の FcεRI 受容体の発現量は減少したものの有意な差はなかった。これまでの研究から、マウスマスト細胞における SAIDs による FcεRI 受容体の細胞膜表面での発現量減少は non-genomic effect であると考えられている [97]。それに対して、P2X7 受容体の発現量減少は genomic effect であることを本研究で明らかにした。このような、作用機序の違いによって *in vitro* と *in vivo* では反応が異なっていると考えられた。

グルココルチコイドによる P2 受容体の機能調節は細胞ごとに異なることが報告されている。例えばグルココルチコイドによってラット脊髄後根細胞では ATP 刺激による P2X3 受容体を介した膜電流が阻害され、ヒト気管支上皮細胞では ATP 刺激による Ca²⁺の流入と Cl⁻の流出が阻害されるが、これらは non genomic effect である [104, 105]。一方で、ヒト皮膚血管内皮細胞株である HMEC-1 では genomic effect によって P2Y₂ 受容体の発現が上昇する [106]。しかしながら、グルココルチコイドの P2X7 受容体に対する作用はこれまで報告されていなかった。P2X7 受容体によるマスト細胞の活性化は炎症性腸疾患やアレルギー性疾患、ビタミン A 過剰症による皮膚炎を悪化させることが報告されている [12, 51, 107]。これらの疾患の治療には SAIDs が広く用いられている。SAIDs は多くの炎症・アレルギーに関与する因子に影響して抗炎症・抗アレルギー作用を示すが、本研究によって、その作用点の一つに、マスト細胞における P2X7 受容体発現の減少が寄与している可能性が示唆された。

総括

ATP は細胞内におけるエネルギー物質としてだけでなく、細胞外において情報伝達物質としても働く。ATP は全身に普遍的に存在し、多様な刺激に応じて細胞外に放出されることから ATP とその代謝物を中心としたプリン作動性シグナルは多くの生命現象の調節に非常に重要であると考えられる。実際に、プリン作動性シグナルは神経伝達や免疫・アレルギー反応、循環機能、代謝、細胞分化など様々な生命現象に関与していることが報告されている。プリン作動性シグナルのアレルギー反応に対する研究は精力的に行われているが、対象とする免疫細胞には偏りがある。例えば、自然免疫で重要な働きを担っているマクロファージや中枢神経系でマクロファージ様作用を持つミクログリアに対するプリン作動性シグナルの研究は詳細に行われ、多くの知見が蓄積されているが、アレルギー反応で中心的な役割を果たしているマスト細胞については詳細な検討が行われていない。そこで、本研究ではマスト細胞に着目してプリン作動性シグナルの脱顆粒反応に対する作用を検討し、以下の知見を得た。

第 2 章では BMMC において P2X4 受容体が抗原刺激による脱顆粒反応を増強することと、P1 及び P2 受容体の相互作用によっても脱顆粒反応が起こることを示した。BMMC には複数の P2 受容体が発現していたが、抗原刺激による脱顆粒反応を増強するのは ATP を加えたときのみであった。この反応は P2X4 受容体の阻害薬、ポジティブアロステリックモジュレーター及び siRNA による影響を受けたことから P2X4 受容体を介していると考えられた。さらに、ATP は Ade との共刺激によっても脱顆粒を起こすことを示した。この反応では Ade が A₃ 受容体を介していることを明らかにし

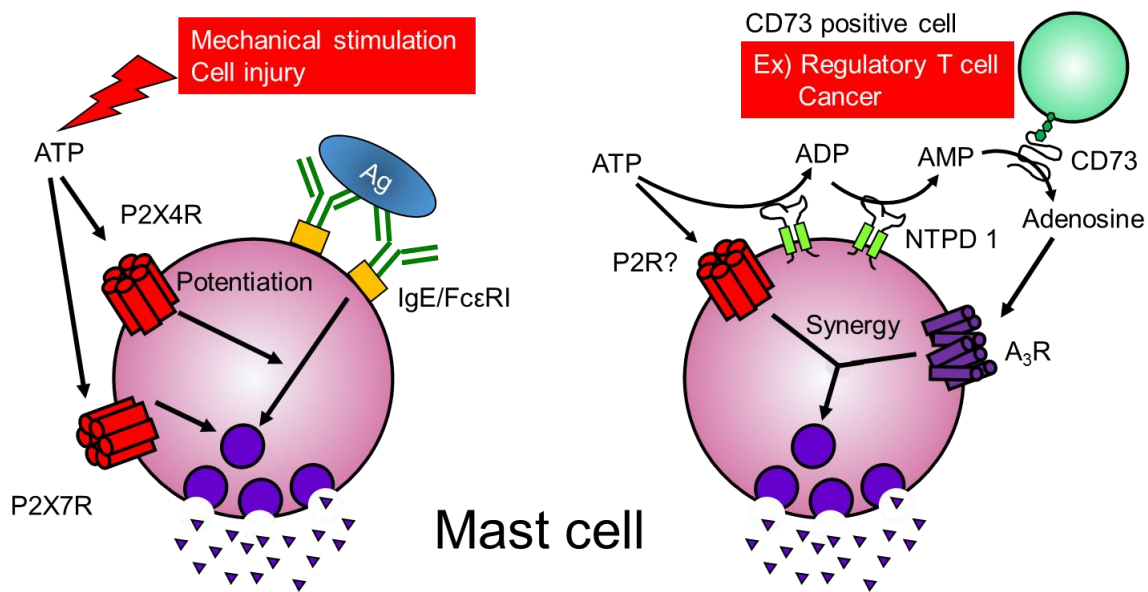


Fig. 24. An outline of purinergic signaling-mediated mast cell degranulation

たものの、ATP の作用点を明らかにするには至らなかった。一方で、BMMC は単独では ATP を Ade に分解できなかったことから、P2 受容体と P1 受容体の相互作用によるマスト細胞の活性化は分布した組織や環境による影響を大きく受ける可能性を示した。

第 3 章ではドラッグリポジショニングの観点から P2X4 受容体及び P2X7 受容体に作用する既存薬を探索し、P2X7 受容体阻害作用を有する医薬品として抗アレルギー薬の Oxa を見出した。電気生理学的検討により Oxa はヒト、マウス P2X7 受容体を阻害するが、ラット P2X7 受容体は阻害せず、作用に種差が有るものの、ヒトで最も効果的であることを示した。加えて、Oxa はヒト及びマウス細胞株や BMMC において P2X7 受容体の活性化を介した炎症性サイトカインの産生、脱顆粒、ポアの形成、シェディングなど様々な反応を抑制した。さらに、Oxa は B16 細胞を用いた担癌モデルマウスにおいて腫瘍の増殖を抑制した。これらの結果から、Oxa は P2X7 受容体阻害薬としてド

ラッグリポジショニングを行える可能性が示唆された。

第 4 章ではグルココルチコイドがマスト細胞において P2X7 受容体の発現を減少させることを示した。BMMC に DEX を処置すると P2X7 受容体の発現が時間、濃度依存的に減少し、この反応は GR を介したものであった。さらに、DEX を経口投与したマウスでは腹腔マスト細胞において P2X7 受容体の発現が減少していた。これらの結果から、グルココルチコイドの抗アレルギー作用の一部はマスト細胞の P2X7 受容体発現減少作用であると考えられた。

以上、本研究によりプリン作動性シグナルによるマスト細胞の活性化制御機構とマスト細胞の P2X7 受容体がグルココルチコイドによる発現調節を受ける事を明らかにし、P2X7 受容体阻害薬として抗アレルギー薬である Oxa を見出した。本研究成果は、既存薬の新規薬効による臨床応用への可能性とマスト細胞のプリン作動性シグナルをターゲットにした医薬品の開発に発展することが期待される。

最後に、本研究で明らかにしたプリン作動性シグナルによるマスト細胞活性化機構について概要を図示する(Fig. 24)。

謝辞

本博士論文は、筆者が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った研究をまとめたものである。本研究を行うにあたり、終始変わらぬ御指導、御鞭撻を承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、適切かつ有益なご助言を賜りました高崎健康福祉大学薬学部・病態生理学研究室教授 吉田真先生、高崎健康福祉大学薬学部・細胞生理化学研究室教授 八田慎一先生、高崎健康福祉大学薬学部・分子生体制御学研究室教授 大根田絹子先生に深く感謝申し上げます。

また、多くの有益な御助言、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助教 伊藤政明先生、高崎健康福祉大学薬学部分子生体制御学研究室助教 大森慎也先生、高崎健康福祉大学薬学部免疫・アレルギー学研究室准教授 森哲哉先生に厚く感謝致します。

さらに、研究生生活をご支援して頂きました日本薬学会長井記念薬学研究奨励金に厚く御礼申し上げます

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職員の皆様、卒業研究生として研究を手伝っていただいた高崎健康福祉大学薬学部薬効解析学研究室の卒業生の皆さまに深く感謝致します。

参考文献

1. Medzhitov R (2008) Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454:428–435. doi: 10.1038/nature07201
2. Takeuchi O, Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
3. Schaefer L (2014) Complexity of Danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem* 289:35237–35245. doi: 10.1074/jbc.R114.619304
4. Rovere - Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, et al (2004) HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep* 5:825–830. doi: 10.1038/sj.embor.7400205
5. Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, et al (2008) A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci* 28:2320–2331. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4760-07.2008
6. Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, et al (2005) Innate immunity conferred by toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 52:2936–2946. doi: 10.1002/art.21238
7. Riteau N, Gasse P, Fauconnier L, et al (2010) Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 182:774–783. doi: 10.1164/rccm.201003-0359OC
8. Burnstock G, Boeynaems J-M (2014) Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal* 10:529–564. doi: 10.1007/s11302-014-9427-2
9. Jacob F, Novo CP, Bachert C, Crombruggen KV (2013) Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal* 9:285–306. doi: 10.1007/s11302-013-9357-4
10. Piccini A, Carta S, Tassi S, et al (2008) ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in

- an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci* 105:8067–8072. doi: 10.1073/pnas.0709684105
11. Auger R, Motta I, Benihoud K, et al (2005) A role for mitogen-activated protein kinaseerk1/2 activation and non-selective pore formation in P2X7 receptor-mediated thymocyte death. *J Biol Chem* 280:28142–28151. doi: 10.1074/jbc.M501290200
 12. Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, et al (2012) Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nat Commun* 3:1034. doi: 10.1038/ncomms2023
 13. Manthei DM, Jackson DJ, Evans MD, et al (2012) Protection from asthma in a high-risk birth cohort by attenuated P2X7 function. *J Allergy Clin Immunol* 130:496–502. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.040
 14. Burnstock G (2006) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58:58–86. doi: 10.1124/pr.58.1.5
 15. Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, et al (2001) International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 53:107–118.
 16. Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1783:673–694. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.01.024
 17. Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* 8:437–502. doi: 10.1007/s11302-012-9309-4
 18. Sheth S, Brito R, Mukherjea D, et al (2014) Adenosine receptors: Expression, function and regulation. *Int J Mol Sci* 15:2024–2052. doi: 10.3390/ijms15022024
 19. Kumar V, Sharma A (2009) Adenosine: An endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol* 616:7–15. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.05.005
 20. Idzko M, Ferrari D, Riegel A-K, Eltzschig HK (2014) Extracellular nucleotide and nucleoside signaling in vascular and blood disease. *Blood* 124:1029–1037. doi:

10.1182/blood-2013-09-402560

21. Cekic C, Linden J (2016) Purinergic regulation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 16:177–192. doi: 10.1038/nri.2016.4
22. Dorsam RT, Kunapuli SP (2004) Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 113:340–345. doi: 10.1172/JCI20986
23. Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, et al (2006) Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 12:133–137. doi: 10.1038/nm1338
24. Thomas LM, Salter RD (2010) Activation of macrophages by P2X7-induced microvesicles from myeloid cells is mediated by phospholipids and is partially dependent on TLR4. *J Immunol* 185:3740–3749. doi: 10.4049/jimmunol.1001231
25. Finger TE, Danilova V, Barrows J, et al (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310:1495–1499. doi: 10.1126/science.1118435
26. Sudo N, Tanaka K, Koga Y, et al (1996) Extracellular ATP activates mast cells via a mechanism that is different from the activation induced by the cross-linking of Fc receptors. *J Immunol* 156:3970–3979.
27. Schulman ES, Glaum MC, Post T, et al (1999) ATP modulates anti-IgE-induced release of histamine from human lung mast cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:530–537. doi: 10.1165/ajrcmb.20.3.3387
28. Rudich N, Ravid K, Sagi-Eisenberg R (2012) Mast cell adenosine receptors function: a focus on the A3 adenosine receptor and inflammation. *Front Immunol* 3:134. doi: 10.3389/fimmu.2012.00134
29. Galli SJ, Tsai M (2012) IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 18:693–704. doi: 10.1038/nm.2755
30. Rao KN, Brown MA (2008) Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1143:83–104. doi: 10.1196/annals.1443.023
31. Gilfillan AM, Tkaczyk C (2006) Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol* 6:218–230. doi: 10.1038/nri1782

32. Galli SJ, Tsai M (2008) Mast cells: Versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci* 49:7–19. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.09.009
33. Matsuda H, Kawakita K, Kiso Y, et al (1989) Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J Immunol* 142:927–931.
34. Morimoto K, Shirata N, Taketomi Y, et al (2014) Prostaglandin E2–EP3 signaling induces inflammatory swelling by mast cell activation. *J Immunol* 192:1130–1137. doi: 10.4049/jimmunol.1300290
35. Oskeritzian CA, Hait NC, Wedman P, et al (2015) The sphingosine-1-phosphate/sphingosine-1-phosphate receptor 2 axis regulates early airway T-cell infiltration in murine mast cell–dependent acute allergic responses. *J Allergy Clin Immunol* 135:1008–18. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.044
36. Henríquez M, Herrera-Molina R, Valdivia A, et al (2011) ATP release due to Thy-1–integrin binding induces P2X7-mediated calcium entry required for focal adhesion formation. *J Cell Sci* 124:1581–1588. doi: 10.1242/jcs.073171
37. Gao Z-G, Ding Y, Jacobson KA (2010) P2Y13 receptor is responsible for ADP-mediated degranulation in RBL-2H3 rat mast cells. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc* 62:500–505. doi: 10.1016/j.phrs.2010.08.003
38. Gao Z-G, Wei Q, Jayasekara MPS, Jacobson KA (2013) The role of P2Y14 and other P2Y receptors in degranulation of human LAD2 mast cells. *Purinergic Signal* 9:31–40. doi: 10.1007/s11302-012-9325-4
39. Wareham K, Vial C, Wykes R, et al (2009) Functional evidence for the expression of P2X1, P2X4 and P2X7 receptors in human lung mast cells. *Br J Pharmacol* 157:1215–1224. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00287.x
40. Bradding P, Okayama Y, Kambe N, Saito H (2003) Ion channel gene expression in human lung, skin, and cord blood-derived mast cells. *J Leukoc Biol* 73:614–620. doi: 10.1189/jlb.1202602
41. Leung CT, Li A, Banerjee J, et al (2014) The role of activated adenosine receptors in degranulation of human LAD2 mast cells. *Purinergic Signal* 10:465–475. doi: 10.1007/s11302-014-9409-4

42. Matsuoka I, Ohkubo S, Kimura J, Uezono Y (2002) Adenine nucleotide-induced activation of adenosine A2B receptors expressed in xenopus laevis oocytes: Involvement of a rapid and localized adenosine formation by ectonucleotidases. *Mol Pharmacol* 61:606–613. doi: 10.1124/mol.61.3.606
43. Ohkubo S, Kumazawa K, Sagawa K, et al (2001) β , γ -Methylene ATP-induced cAMP formation in C6Bu-1 cells: involvement of local metabolism and subsequent stimulation of adenosine A2B receptor. *J Neurochem* 76:872–880. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00098.x
44. Ohkubo S, Kimura J, Matsuoka I (2000) Ecto-alkaline phosphatase in NG108-15 cells: a key enzyme mediating P1 antagonist-sensitive ATP response. *Br J Pharmacol* 131:1667–1672. doi: 10.1038/sj.bjp.0703750
45. Takahashi-Sato K, Murakawa M, Kimura J, et al (2013) Loss of ectonucleotidases from the coronary vascular bed after ischemia-reperfusion in isolated rat heart. *BMC Cardiovasc Disord* 13:53. doi: 10.1186/1471-2261-13-53
46. Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M (2002) Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem* 45:4057–4093. doi: 10.1021/jm020046y
47. Wareham KJ, Seward EP (2016) P2X7 receptors induce degranulation in human mast cells. *Purinergic Signal* 12:235–246. doi: 10.1007/s11302-016-9497-4
48. Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al (2003) P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424:778–783. doi: 10.1038/nature01786
49. Gao Z-G, Ding Y, Jacobson KA (2010) UDP-glucose acting at P2Y14 receptors is a mediator of mast cell degranulation. *Biochem Pharmacol* 79:873–879. doi: 10.1016/j.bcp.2009.10.024
50. Takano H, Nakazawa S, Okuno Y, et al (2008) Establishment of the culture model system that reflects the process of terminal differentiation of connective tissue-type mast cells. *FEBS Lett* 582:1444–1450. doi: 10.1016/j.febslet.2008.03.033
51. Kurashima Y, Amiya T, Fujisawa K, et al (2014) The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity* 40:530–541. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.014

52. Yamada N, Matsushima H, Tagaya Y, et al (2003) Generation of a large number of connective tissue type mast cells by culture of murine fetal skin cells. *J Invest Dermatol* 121:1425–1432. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12613.x
53. Wilson CN, Nadeem A, Spina D, et al (2009) Adenosine Receptors and asthma. *handb exp pharmacol*. doi: 10.1007/978-3-540-89615-9_11
54. Braun N, Lenz C, Gillardon F, et al (1997) Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res* 766:213–226. doi: 10.1016/S0006-8993(97)00559-3
55. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ (2012) CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol* 33:231–237. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.02.009>
56. Murata T, Aritake K, Matsumoto S, et al (2011) Prostaglandin D2 is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 108:19802–19807. doi: 10.1073/pnas.1110011108
57. Teshima R, Saito Y, Ikebuchi H, et al (1997) Effect of an ectokinase inhibitor, K252b, on degranulation and Ca²⁺ signals of RBL-2H3 cells and human basophils. *J Immunol* 159:964–969.
58. Leslie TA, Greaves MW, Yosipovitch G (2015) Current topical and systemic therapies for itch. in: cowan A, Yosipovitch G (eds) *Pharmacol. Itch*. Springer Berlin Heidelberg, pp 337–356
59. Ohara H, Saito R, Hirakawa S, et al (2010) Gene expression profiling defines the role of ATP-exposed keratinocytes in skin inflammation. *J Dermatol Sci* 58:143–151. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.02.007
60. Inoue K, Komatsu R, Imura Y, et al (2014) Mechanism underlying ATP release in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 134:1465–1468. doi: 10.1038/jid.2013.516
61. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, et al (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735–738. doi: 10.1126/science.272.5262.735
62. Kim M, Jiang L-H, Wilson HL, et al (2001) Proteomic and functional evidence for a

- P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20:6347–6358. doi: 10.1093/emboj/20.22.6347
63. Müller T, Vieira RP, Grimm M, et al (2011) A potential role for P2X7R in allergic airway inflammation in mice and humans. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44:456–464. doi: 10.1165/rcmb.2010-0129OC
 64. Weber FC, Esser PR, Müller T, et al (2010) Lack of the purinergic receptor P2X7 results in resistance to contact hypersensitivity. *J Exp Med* 207:2609–2619. doi: 10.1084/jem.20092489
 65. Sorge RE, Trang T, Dorfman R, et al (2012) Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med* 18:595–599. doi: 10.1038/nm.2710
 66. Keystone EC, Wang MM, Layton M, et al (2012) Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann Rheum Dis* 71:1630–1635. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-143578
 67. Stock TC, Bloom BJ, Wei N, et al (2012) Efficacy and safety of CE-224,535, an antagonist of P2X7 receptor, in treatment of patients with rheumatoid arthritis inadequately controlled by methotrexate. *J Rheumatol* 39:720–727. doi: 10.3899/jrheum.110874
 68. Matsumura Y, Yamashita T, Sasaki A, et al (2016) A novel P2X4 receptor-selective antagonist produces anti-allodynic effect in a mouse model of herpetic pain. *Sci Rep* 6:32461. doi: 10.1038/srep32461
 69. Nagata K, Imai T, Yamashita T, et al (2009) Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain* 5:20. doi: 10.1186/1744-8069-5-20
 70. Yamashita T, Yamamoto S, Zhang J, et al (2016) Duloxetine inhibits microglial P2X4 receptor function and alleviates neuropathic pain after peripheral nerve injury. *PLOS ONE* 11: e0165189. doi: 10.1371/journal.pone.0165189
 71. Okayama Y, Benyon RC, Lowman MA, Church MK (1994) In vitro effects of H1-

- antihistamines on histamine and PGD2 release from mast cells of human lung, tonsil, and skin. *Allergy* 49:246–253. doi: 10.1111/j.1398-9995.1994.tb02657.x
72. Watano T, Matsuoka I, Kimura J (2002) Characteristics of ATP-induced current through P2X₇ receptor in NG108-15 cells: Unique Antagonist Sensitivity and Lack of Pore Formation. *Jpn J Pharmacol* 88:428–435. doi: 10.1254/jjp.88.428
73. Kaiho H, Matsuoka I, Kimura J, Nakanishi H (1998) Identification of P2X₇ (P2Z) receptor in N18TG-2 cells and NG108-15 cells. *J Neurochem* 70:951–957. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70030951.x
74. Ito M, Matsuoka I (2008) Regulation of purinergic signaling by prostaglandin E₂ in murine macrophages. *J Pharmacol Sci* 107:443–450. doi: 10.1254/jphs.08087FP
75. Nörenberg W, Hempel C, Urban N, et al (2011) Clemastine potentiates the human P2X₇ receptor by sensitizing it to lower ATP concentrations. *J Biol Chem* 286:11067–11081. doi: 10.1074/jbc.M110.198879
76. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, Jarvis MF (2009) Mammalian P2X₇ receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X₇ receptors. *Br J Pharmacol* 157:1203–1214. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00233.x
77. Farrell AW, Gadeock S, Pupovac A, et al (2010) P2X₇ receptor activation induces cell death and CD23 shedding in human RPMI 8226 multiple myeloma cells. *Biochim Biophys Acta* 1800:1173–1182. doi: 10.1016/j.bbagen.2010.07.001
78. Gadeock S, Pupovac A, Sluyter V, et al (2012) P2X₇ receptor activation mediates organic cation uptake into human myeloid leukaemic KG-1 cells. *Purinergic Signal* 8:669–676. doi: 10.1007/s11302-012-9320-9
79. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, et al (2008) Increased level of extracellular ATP at tumor sites: In vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0002599
80. Hattori F, Ohshima Y, Seki S, et al (2012) Feasibility study of B16 melanoma therapy using oxidized ATP to target purinergic receptor P2X₇. *Eur J Pharmacol* 695:20–26. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.09.001
81. Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, et al (2012) Expression of P2X₇ receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res* 72:2957–2969. doi: 10.1158/0008-

5472.CAN-11-1947

82. Michel AD, Clay WC, Ng SW, et al (2008) Identification of regions of the P2X7 receptor that contribute to human and rat species differences in antagonist effects. *Br J Pharmacol* 155:738–751. doi: 10.1038/bjp.2008.306
83. Michel AD, Chambers LJ, Clay WC, et al (2007) Direct labelling of the human P2X7 receptor and identification of positive and negative cooperativity of binding. *Br J Pharmacol* 151:84–95. doi: 10.1038/sj.bjp.0707196
84. Bian S, Sun X, Bai A, et al (2013) P2X7 integrates PI3K/AKT and AMPK-PRAS40-mTOR signaling pathways to mediate tumor cell death. *PLoS ONE* 8: e60184. doi: 10.1371/journal.pone.0060184
85. Hofman P, Cherfils-Vicini J, Bazin M, et al (2015) Genetic and pharmacological inactivation of the purinergic P2RX7 receptor dampens inflammation but increases tumor incidence in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cancer Res* 75:835–845. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1778
86. Adinolfi E, Capece M, Franceschini A, et al (2015) Accelerated tumor progression in mice lacking the ATP receptor P2X7. *Cancer Res* 75:635–644. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1259
87. Awouters F, Niemegeers CJE, Berk JV den, et al (1977) Oxatomide, a new orally active drug which inhibits both the release and the effects of allergic mediators. *Experientia* 33:1657–1659. doi: 10.1007/BF01934056
88. Patella V, de Crescenzo G, Marino O, et al (1996) Oxatomide inhibits the release of proinflammatory mediators from human basophils and mast cells. *Int Arch Allergy Immunol* 111:23–29.
89. Davies BH, Rocchiccioli K (1983) Oxatomide plasma levels in man during chronic dosing. *Pharmatherapeutica* 3:365–369.
90. Buttgereit F, Burmester G-R, Lipworth BJ (2005) Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear. *The Lancet* 365:801–803. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17989-6
91. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, et al (2000) Glucocorticoids repress NF- κ B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal

transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3919–3924.

92. Nissen RM, Yamamoto KR (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 14:2314–2329.
93. Wallner BP, Mattaliano RJ, Hession C, et al (1986) Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature* 320:77–81. doi: 10.1038/320077a0
94. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: Molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24:488–522. doi: 10.1210/er.2002-0006
95. Lösel R, Wehling M (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:46–55. doi: 10.1038/nrm1009
96. Stahn C, Buttgereit F (2008) Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:525–533. doi: 10.1038/ncprheum0898
97. Yamaguchi M, Hirai K, Komiya A, et al (2001) Regulation of mouse mast cell surface Fc ϵ RI expression by dexamethasone. *Int Immunol* 13:843–851. doi: 10.1093/intimm/13.7.843
98. Marchetti MC (2003) Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood* 101:585–593. doi: 10.1182/blood-2002-06-1779
99. Löwenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, et al (2006) Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T - cell - receptor - associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep* 7:1023–1029. doi: 10.1038/sj.embor.7400775
100. Gurish MF, Austen KF (2012) Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity* 37:25–33. doi: 10.1016/j.immuni.2012.07.003
101. Silwal P, Lee M-N, Lee C-J, et al (2012) Dexamethasone induces Fc γ RIIb expression in RBL-2H3 cells. *Korean J Physiol Pharmacol* 16:393–398. doi: 10.4196/kjpp.2012.16.6.393

102. Hiragun T, Peng Z, Beaven MA (2006) Cutting Edge: dexamethasone negatively regulates Syk in mast cells by up-regulating Src-like adaptor protein. *J Immunol* 177:2047–2050. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2047
103. Bhattacharyya S, Brown DE, Brewer JA, et al (2007) Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood* 109:4313–4319. doi: 10.1182/blood-2006-10-048215
104. Liu X-H, Zeng J-W, Zhao Y-D, et al (2008) Rapid inhibition of ATP-induced currents by corticosterone in rat dorsal root ganglion Neurons. *Pharmacology* 82:164–170. doi: 10.1159/000149582
105. Urbach V, Walsh DE, Mainprice B, et al (2002) Rapid non-genomic inhibition of ATP-induced Cl⁻ secretion by dexamethasone in human bronchial epithelium. *J Physiol* 545:869–878. doi: 10.1113/jphysiol.2002.028183
106. Ding Y, Gao Z-G, Jacobson KA, Suffredini AF (2010) Dexamethasone enhances ATP-induced inflammatory responses in endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 335:693–702. doi: 10.1124/jpet.110.171975
107. Tsai SH, Kinoshita M, Kusu T, et al (2015) The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. *Immunity* 42:279–293. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.015