

論文の内容の要旨および論文審査の結果の要旨

学位申請者氏名：吉田 一貴

学位の種類：博士（薬学）

学位記番号：博（薬）甲第一号

学位授与年月日：平成 29 年 3 月 7 日

審査委員

主査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 吉田 真

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 八田 慎一

副査 高崎健康福祉大学大学院薬学研究科教授 大根田 絹子

論文題目

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

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

【論文の内容の要旨】

アデノシン三リン酸（ATP）は細胞内における重要なエネルギー物質であるが、様々な刺激に応じて細胞外に放出され、細胞間情報伝達物質としても働く。細胞外に放出された ATP は細胞膜に存在する P2 受容体に認識され、様々な生命現象を引き起こすことが知られている。P2 受容体は全身に普遍的な発現が認められ、神経伝達、免疫反応、炎症反応、循環機能調節など広い分野で研究が行われ、プリン作動性シグナルとして重要性が認識されている。一方、マスト細胞は I 型アレルギー反応で重要な役割を担っている免疫細胞で、細胞膜に結合した IgE と特異的抗原（Ag）の結合により活性化し、脱顆粒することが知られている。興味深いことに、アレルギー性炎症性腸疾患モデルの症状を改善する抗マスト細胞抗体の標的分子が、P2X7 受容体であることが報告された。マスト細胞には P2X7 受容体のみならず複数の P2 受容体サブタイプが発現しているが、その役割は十分に解明されていない。そこで、本研究ではマスト細胞におけるプリン作動性シグナルに関与する受容体、細胞外 ATP 分解酵素の発現を調べ、その機能的な役割を解析した。また、ドラッグリポジショニングの観点から、既存のアレルギー性疾患治療薬についてプリン作動性シグナル伝達機構への効果を検討した。

マウス骨髓細胞由来マスト細胞(BMMC)には、複数の P2 受容体の発現が認められ、P2X1、P2X4、P2X7、P2Y₁、P2Y₂ および P2Y₁₄ 受容体の発現が顕著であった。加えて、アデノシンの受容体である P1 受容体は A_{2A}、A_{2B}、A₃ 受容体が発現していた。細胞内 Ca²⁺濃度の変化を指標にすると、これらの受容体は機能的にもマスト細胞に発現していると考えられたが、受容体刺激が直接脱顆粒反応を引き起こしたのは高濃度の ATP に応答する P2X7 受容体のみであった。一方、より低濃度の ATP やアデノシンは、自身では脱顆粒反応を示さないが、

抗原刺激による脱顆粒反応を著しく増強した。この ATP およびアデノシンの作用を媒介する受容体の同定を試み、それぞれ P2X4 受容体および A₃ 受容体が関与することを明らかにした。さらに、ATP とアデノシンを同時に作用させると著明な脱顆粒反応が認められた。細胞外 ATP は細胞外 ATP 分解酵素によってアデノシンに分解されることが知られているが、BMMC には ATP を AMP に分解する CD39 を高発現しているものの、AMP をアデノシンに分解する CD73 またはアルカリフォスファターゼは発現していなかった。生体内では近傍のアデノシン産生酵素を発現する細胞によりマスト細胞にアデノシンが供給される可能性がある。そこで、CD73 を発現させた HEK293 細胞と BMMC を共培養し、低濃度の ATP で刺激すると、CD73 依存的に ATP 処置で脱顆粒反応を引き起こすことを見出した。これらの結果から、マスト細胞は多様なメカニズムにより細胞外 ATP とその分解物に応答し、脱顆粒反応を起こすことが示唆された。このため、P2X7 受容体や P2X4 受容体のようなプリン作動性シグナルを標的にした薬物はアレルギー性炎症疾患の治療薬として有用であると考えられた。

現在、臨床ではヒスタミン H₁ 受容体阻害薬、ケミカルメディエーター阻害薬およびステロイド性抗炎症薬等がアレルギー疾患に使用されている。このような薬物は、ヒスタミン H₁ 受容体阻害薬の抗コリン作用のように、目的とする標的以外にも多様な作用点を持つことが示唆されているが、プリン作動性シグナルに対する影響は知られていない。そこで、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、P2X4 および P2X7 受容体を阻害する既存薬がないか探索を行った。その結果、抗ヒスタミン薬であるオキサトミドがヒト、マウス P2X7 受容体阻害作用を有しており、特にヒト P2X7 受容体に対する阻害作用が強いことを見出した。オキサトミドは P2X7 受容体を介した細胞死や炎症性サイトカインの産生などを抑制し、ATP による P2X7 受容体を介したマスト細胞の脱顆粒反応を阻害した。一方、生体内における作用については、P2X7 受容体阻害薬が腫瘍増殖を抑制することが報告されている B16 細胞を用いた担癌モデルマウスにおいて検討した。P2X7 受容体阻害薬である AZ10606120 とオキサトミドを B16 細胞担癌モデルマウスに投与すると、腫瘍の増殖抑制が認められ、この作用は P2X7 受容体阻害作用を持たない抗ヒスタミン薬であるクレマスチンでは認められなかった。オキサトミドはマウスよりヒトの P2X7 受容体に対してより強力な阻害作用を示したことから、オキサトミドは 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。

次に、強力な抗アレルギー作用を持つグルココルチコイド (GC) が BMMC のプリン作動性シグナルに影響するかを検討した。その結果、代表的な GC であるデキサメタゾンやプレドニゾロンが、BMMC の P2X7 受容体発現を抑制することを見出した。さらに、C57BL/6 マウスにデキサメタゾンを経口投与した後に回収した腹腔マスト細胞の P2X7 受容体の発現量は、対照に比べ有意に減少していた。これらの結果から、GC の抗炎症・抗アレルギー作用の一部にマスト細胞の P2X7 受容体発現低下が寄与している可能性が示唆された。

以上、本研究により、1) P2X4 受容体および P2X7 受容体がマスト細胞の脱顆粒反応を正に制御していること、2) 細胞外 ATP 分解酵素の分布によっては低濃度の ATP でもマスト

細胞が活性化する可能性があること、3) 抗アレルギー薬であるオキサトミドが P2X7 受容体阻害作用を有すること、4) GC がマスト細胞の P2X7 受容体発現を負に制御することが明らかとなった。本研究成果は、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新規医薬品の開発や、既存薬の薬効再評価が臨床応用につながる可能性を示唆するもので、今後の進展が期待できると考えられた。

【論文審査の結果の要旨】

論文の審査は、主査と副査 2 名による予備審査と公開発表の場における最終試験とにより行われた。本論文は、序論、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」、第 3 章「P2X 受容体阻害薬の探索」、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の効果」および総括からなっている。

予備審査はあらかじめ提出された論文に基づき、その全ての図表と追加資料に基づくプレゼンテーションに対して質疑応答を行う形で実施された。第 2 章では、用いた試薬の用量と選択性の考え方、CD73 発現 HEK 細胞の基礎機能発現の有無などが確認され、ATP の脱顆粒促進作用機序に関するより深い考察が求められた。第 3 章では、担癌モデルマウスの結果について、P2X7 受容体を介していると結論づけるには根拠が不十分ではないかという意見が出た。また、P2X7 受容体のスプライシングバリエーションと種差の関係を検討すると良いのではとの助言もあった。第 4 章では、引用文献として用いている皮膚炎について正確に把握して適切に引用すべきというコメントのほか、得られたデータを投稿論文にする際の方向性についての助言もあった。総括および要旨について、6 年制薬学部の上に立つ大学院であることを踏まえて、臨床への貢献や重要性について強調してほしいという要望もあった。また全体を通じて、変換ミスや英単語の綴りミス、用語の統一性などについて、再度注意して修正するように助言された。

この予備審査における指摘事項を修正したのちに行われた最終試験は、論文の主要な部位についての公開プレゼンテーションに対する質疑応答で実施された。第 2 章では、P2X4 受容体と P2X7 受容体の脱顆粒反応に対する細胞内シグナルの違いや CD73 発現細胞の生体での局在、ATP 分解物を含む炎症促進要素を終焉に向かわせる制御機構などについての知見や考察が求められた。第 3 章では、担癌モデルマウスの実験について、P2X7 受容体ノックアウトマウスもしくは P2X7 受容体ノックアウト癌細胞を用いるとオキサトミドの作用機序に迫れるのではないかというコメントがあった。また、P2X7 受容体の種差に関して SNP との関連性などが問われた。第 4 章では、デキサメタゾンの作用が全身性なのか、直接作用なのか、P2X7 受容体遺伝子のプロモーター領域に反応性エレメントがあるのか、他のプリン受容体に対する影響はあるのかなど、作用機序についての考察が求められた。また、デキサメタゾンの P2X7 受容体の発現低下効果は実際にはどのくらい炎症に影響しているのかという臨床面での検討を期待するコメントもあった。その他、全般的なものとして、細胞外 ATP 濃度の調節機構や生理的・病的状態での変化、プリン受容体の生体内・細胞レベルでの局在や作用などの様々な質疑に対し、学位申請者である吉田一貴氏は自身の知見を

丁寧に回答し、質問者も納得していた。

本論文は、マスト細胞の関与するアレルギー過程におけるプリン受容体の役割について、抗原刺激との相乗作用があること、既存薬のドラッグリポジショニングによる応用の可能性、副腎皮質ステロイド薬との関連性などの点で注目すべき新知見を有するものである。その主たる3つの章のうち2つの章の内容は既に査読のある原著論文として発表されて認められている。また、残る1つの章の内容も、より詳細な作用機序などへの検討を加えることで優れた学術論文として発表できると考えられる。本論文は臨床現場の薬剤師のニーズを意識した視点から科学的思考に基づいて行われたものであり、本研究科博士課程に相応しい内容であるといえる。

以上により、論文審査および最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が博士（薬学）の学位に十分値するものであると判断した。