

氏 名 (生年月日)	おか 岡	ますみ 真純	(1995 年 10 月 25 日)
学 位 の 種 類	博 士 ( 薬 学 )		
学 位 記 番 号	博 薬 第 231 号		
学位授与の日付	2024 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学 位 論 文 題 目	マスト細胞安定化剤による GPR35 を介した脱顆粒応答抑制		
論 文 審 査 委 員	(主査)	教 授	田 中 智 之
	(副査)	教 授	秋 葉 聡
	(副査)	教 授	中 山 祐 治

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序論

マスト細胞は、全身の様々な組織に分布し、アレルギー性喘息や花粉症をはじめとする IgE を介する即時型アレルギー応答において重要な役割を担う。マスト細胞の細胞質には様々な炎症性メディエーターを含む分泌顆粒が多数存在し、IgE を介した抗原刺激により活性化されたマスト細胞は、エキソサイトーシスにより顆粒内容物を細胞外へ放出（脱顆粒応答）することにより種々のアレルギー反応を惹起する。

クロモグリク酸ナトリウム(DSCG)はアレルギー性喘息やアレルギー性鼻炎などの予防および治療に用いられる抗アレルギー薬であるが、その作用機序はマスト細胞の脱顆粒応答を抑制することと考えられている。DSCG を始めとするマスト細胞安定化剤は、副作用の頻度や程度が極めて低い優れた抗アレルギー薬であるが、その標的分子が長らく不明であったことから、治療効果の高い類似化合物を開発することが困難であった。近年、HEK293 細胞を用いた強制発現系による解析から、DSCG を含むマスト細胞安定化剤は GPR35 のアゴニスト活性を持つことが報告された。GPR35 は内在性リガンドが不明なオーファン G タンパク質共役型受容体のひとつであり、ゲノムワイド相関解析から炎症性腸疾患や 2 型糖尿病との強い相関が報告されている。これまでに造血幹細胞由来のヒト初代培養マスト細胞に発現することは報告されているものの、マスト細胞における GPR35 の役割は不明であった。そこで、本研究では、DSCG によるマスト細胞の脱顆粒応答の抑制には GPR35 が関与するという仮説を立て、これを検証することを目的として検討を行った。

### 第 1 章 抗原抗体反応による脱顆粒応答の抑制

DSCG を含む既報の GPR35 アゴニストを、IgE で感作した精製ラット腹腔マスト細胞に抗

原と同時に処理したところ、脱顆粒応答が有意に抑制された。既存の GPR35 アゴニストの多くはヒトやげっ歯類の GPR35 に対するアゴニスト活性において種差を示す。そこで、種差が小さく高親和性のアゴニストを目指して新たに設計、合成した化合物について HEK293 細胞を用いた TGF- $\alpha$  shedding assay を行い、ヒト、ラット、マウスいずれの種においても nM オーダーの EC<sub>50</sub> を示す新規 GPR35 アゴニストであることを確認した（表）。新規 GPR35 アゴニストは、精製ラット腹腔マスト細胞における IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を有意に抑制した。マウス骨髓由来培養マスト細胞のモデルでは、未成熟な段階では GPR35 の発現は低く、組織結合型へと成熟した際に誘導されることが分かった。成熟培養マスト細胞では GPR35 の標準的なアゴニストであるザプリナスト、および新規 GPR35 アゴニストにより IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答が有意に抑制された。一方、GPR35 遺伝子欠損マウス骨髓より調製した成熟マスト細胞では、GPR35 アゴニストの作用は完全に消失した。野生型マウスにおける IgE 依存性受身皮膚アナフィラキシー応答は DSCG および新規 GPR35 アゴニストにより有意に抑制され、GPR35 アゴニストによる抑制効果は GPR35 遺伝子欠損型マウスにおいて認められなかった。以上の結果から、DSCG を含む様々な GPR35 アゴニストは、マスト細胞に発現する GPR35 を介し、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を抑制することが明らかとなった。

	ラット	ヒト	マウス
ザプリナスト	5.9	1,100	120
KGP-7	3.7	11	5.5
KGP-18	7.0	13	51
KGP-27	5.2	3.5	52

新規 GPR35 アゴニストの EC<sub>50</sub> (nM) : TGF- $\alpha$  shedding assay により決定した。

## 第 2 章 GPR35 によるアクチン骨格の制御

これまでの研究では、GPR35 は主に三量体型 G タンパク質 G<sub>i/o</sub> や G<sub>12/13</sub> と共役することが示唆されている。本研究では、精製ラット腹腔マスト細胞における DSCG の抑制効果が G<sub>i/o</sub> の  $\alpha$  サブユニットを不活性化する百日咳毒素の処理により影響されなかったことから、マスト細胞における共役 G タンパク質の候補として G<sub>12/13</sub> に着目した。G<sub>12/13</sub> は低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの上流にあることが知られており、Rho ファミリーはアクチン骨格の再構成に関与する。脱顆粒応答では形質膜直下のアクチン骨格の脱重合が必要であると考えられていることから、マスト細胞に発現する GPR35 は G<sub>12/13</sub> と共役し RhoA を活性化させ、アクチン骨格の形成を促進させることにより脱顆粒応答を抑制するという仮説を立てた。GPR35 の発現が認められないラットマスト細胞株にラット GPR35 を強制発現させたところ、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答は、対照細胞株に比べ有意に減弱した。いずれの細胞株においても抗原刺激に応じ線維型アクチン量は減少傾向を示したが、ラット GPR35 発現細胞株は対照細胞株に比べ常に高い線維型アクチン量を維持していた。無刺激時におけるラット GPR35 発現細胞株の RhoA 活性レベルおよび線維型アクチン量は、対照細胞株に比べいずれも増大していた。TGF- $\alpha$  shedding assay では、アゴニスト非存在下において G<sub>12/13</sub> 依存的に shedding 反応が認められたことから、GPR35 は構成的活性を有すると考えられた。ザプリナ

ストをラット GPR35 発現細胞株に処理したところ、一過性の RhoA 活性レベルの上昇および線維型アクチン量の減少、速やかな細胞表面上 GPR35 の内在化が誘導された。以上の結果から、マスト細胞に発現する GPR35 は RhoA の活性化を介しアクチン骨格を再構成することにより、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答に対し抵抗性を与える可能性が示唆された。

## 総括

本研究を通じて、抗アレルギー薬である DSCG の脱顆粒応答抑制作用はマスト細胞に発現する GPR35 に依存することが強く示唆された。DSCG は安全性の高い優れた抗アレルギー薬であるが、消化管からの吸収が悪いことや半減期が短いという欠点が知られている。本研究は、マスト細胞に発現する GPR35 を標的とした新たな抗アレルギー薬の開発に貢献する基礎的な知見を与えるものである。

## 審査の結果の要旨

### 【緒言】

クロモグリク酸ナトリウムを含むマスト細胞安定化剤は、副作用の頻度や程度が小さい抗アレルギー薬として長い歴史を有している。一方、これらの医薬品の標的分子は不明であったことから、マスト細胞の脱顆粒応答を抑制するという作用機序をもつ新たな医薬品の開発は停滞している。近年、オーファン G タンパク質共役型受容体のひとつである GPR35 のリガンドスクリーニングの過程で、マスト細胞安定化剤が GPR35 アゴニストとして作用することが見出された。そこで、本研究では、GPR35 がマスト細胞に発現しているかを検討し、その活性化が IgE を介する抗原刺激による脱顆粒応答を抑制する機序について検討を行った。

### 【審査結果】

第 1 章では、まずラット腹腔マスト細胞において GPR35 アゴニストが IgE を介する抗原刺激による脱顆粒応答を抑制することを確認した。GPR35 を発現していないラットマスト細胞株にラット GPR35 遺伝子を導入した系では、抗原刺激による脱顆粒応答が低下することを見出し、GPR35 の構成的活性が脱顆粒応答を抑制している可能性が推察された。GPCR 評価系を用いることにより、GPR35 は測定可能なレベルの構成的活性をもつことを確認した。IgE を介する受身皮膚アナフィラキシー応答を検討し、GPR35 遺伝子欠損マウスの応答自体は野生型と同等であるが、GPR35 アゴニストによる応答の抑制は野生型では認められるが、欠損マウスでは消失することを見出した。さらに、GPR35 に対しては薬理的ツールの不足していることから、新たにアゴニストを開発し、これが既報の GPR35 アゴニストと比較して種差が小さく、親和性が高い化合物であることを確認した。

第 2 章では、GPR35 の作用機序に着目し、GPR35 発現ラットマスト細胞株では、線維状アクチン量が増大しており、抗原刺激の際にも対照株と比べて高いレベルを維持することを見出した。

GPR35 アゴニストによる刺激は、線維状アクチン量を一旦減少させ、再び回復させるという経過を示し、アクチン骨格の再構成が誘導されていることが明らかとなった。また、GPR35 アゴニストは GTP 型の RhoA の量を一過性に増大することを見出した。アクチン骨格の再構成は抗原刺激の際にも誘導されるが、GPR35 を介した再構成は抗原刺激の際の再構成とは異なるリモデリングを誘導することにより、抗原刺激による脱顆粒応答のプロセスを阻害すると考えられた。

審査では、研究の主要な目的に関する再考が副査により促され、また細胞レベルにおける GPR35 アゴニストの作用についてのより丁寧な考察が求められた。申請者はそれらを含む副査からの指摘について適切に対応した。

#### 【結論】

本研究の新規性は、マスト細胞における GPR35 の発現、および機能を調べることを通じて、マスト細胞安定化剤の薬理作用が GPR35 を介することを明らかにしたことにある。細胞生物学のレベルにおける作用機序の解明は今後の研究の展開に委ねられたが、その端緒を開く知見を得た。クロモグリク酸ナトリウムは消化管吸収が悪いために投与経路が限定されているが、本研究におけるマスト細胞安定化剤の標的分子の同定は、より優れた抗アレルギー薬を開発するための強い動機づけとなるものであり、薬学研究として意義ある研究成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。