

マスト細胞安定化剤による GPR35 を介した脱顆粒応答抑制

2023 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】薬理学分野

岡 真純

目次

序論.....	1
第1章 抗原抗体反応による脱顆粒応答の抑制	5
第1節 緒言	5
第2節 実験材料及び方法	6
第3節 結果	10
第4節 考察	23
第2章 GPR35 によるアクチン骨格の制御	27
第1節 緒言	27
第2節 実験材料及び方法	28
第3節 結果	32
第4節 考察	41
総括	45
引用文献	47
謝辞	54

略語表

本研究で使⽤した略語は以下のとおりである。

5-HIAA	5-hydroxyindole-3-acetic acid
Actb	Actin beta
AP	Alkaline phosphatase
BMMCs	Bone marrow-derived cultured mast cells
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CTMCs	Connective tissue-type mast cell-like cultured mast cells
DNP-HSA	Dinitrophenyl human serum albumin
DSCG	Disodium cromoglycate
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPCR	G protein-coupled receptor
HA	Hemagglutinin
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethane sulfonic acid
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
LPA	Lysophosphatidic acid
Mrgpr	Mas-related G protein-coupled receptor
mRNA	Messenger ribonucleic acid
PC	Peritoneal cell
PCA	Passive cutaneous anaphylaxis
PE	Phycoerythrin
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SCF	Stem cell factor
TGF	Transforming growth factor
TNP-BSA	Trinitrophenyl bovine serum albumin

序論

1. マスト細胞の機能

マスト細胞は血管の分布するほぼすべての組織に存在する血球系細胞であり、幹細胞因子(SCF)の受容体である c-kit および IgE の高親和性受容体である FcεRI を発現する細胞として定義されている[1]。マスト細胞の細胞質には多数の分泌顆粒が存在しており、顆粒内にはヒスタミンやセロトニンなどのアミン、β-ヘキソサミニダーゼなどのリソソーム酵素、ヘパリンやコンドロイチン硫酸など負に帯電したプロテオグリカン、トリプターゼやキマーゼなどのプロテアーゼなど様々な生理活性物質が含まれる[2]。活性化されたマスト細胞は、これらの顆粒内容物をエキソサイトーシスにより細胞外へ放出（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[2, 3]。例えば、脱顆粒応答により放出されたヒスタミンは、血管内皮細胞のヒスタミン H₁ 受容体を刺激することにより血管拡張作用や血管透過性亢進作用を示し、脱顆粒応答により放出された様々なサイトカインは T 細胞やマクロファージ、好中球のような免疫細胞の動員を促進する。マスト細胞の脱顆粒応答を誘導する経路は大きく 2 つに分けられ、IgE 依存的な経路と IgE 非依存的な経路があると考えられている。IgE 依存的な経路では、抗原が IgE を介して FcεRI を架橋することにより、細胞内のチロシンリン酸化カスケードが促進されマスト細胞が活性化される[4]。IgE 非依存的な経路では、Mas 関連 G タンパク質共役型受容体(Mrgpr)ファミリーや ATP 受容体などが刺激されることによりマスト細胞が活性化される[5, 6]。Mrgpr ファミリーはカチオン性脱顆粒応答誘導剤として知られる compound 48/80 やサブスタンス P などにより活性化され、三量体型 G タンパク質 G_i と共役し、細胞質内 Ca²⁺濃度を増加させることを通じて脱顆粒応答を誘導する[5]。マスト細胞はアレルギー性喘息やアレルギー性鼻炎、結膜炎など IgE を介する即時型アレルギー反応において重要な役割を担うことが知られており[2, 7-9]、喘息患者の気管支平滑筋では健常者に比べ有意なマスト細胞の増加が見られ[10]、抗原刺激により喘息患者の肺胞洗浄液中ヒスタミン量が増加することが報告されている[11]。

2. クロモグリク酸ナトリウムによるマスト細胞活性化の抑制

1960 年代、それまでの気管支拡張薬や抗炎症薬とは異なる、新たな喘息治療薬として Altounyan らによりクロモグリク酸ナトリウム(DSCG)が開発された[12]。DSCG はエジプトの薬草 *Ammi visnaga* の種子に含まれる Khellin を由来とした抗アレルギー薬であり[13]、現在はアレルギー性喘息やアレルギー性鼻炎、結膜炎などの予防および治療に使用されている[8, 9, 14]。これまでの研究において DSCG は様々な抗炎症作用をもつことが報告されているが、主な作用機序はマスト細胞における脱顆粒応答を抑制することと考えられている。DSCG と同様の作用を持つ化合物はマスト細胞安定化剤と呼ばれ、他にネドクロミルやロドキサミドなどが挙げられる。Leung らはヒト肺組織から採取したマスト細胞を用いて検討を行い、抗原と同時に DSCG あるいはネドクロミルを処理した結果、IgE を介した抗原刺激によるヒスタミンの遊離は用量依存的に抑制されることを示した[15]。ヒト臍帯血由来培養マスト細胞を用いた検討では、IgE を介した抗原刺激によるヒスタミンの遊離およびプロスタグランジン D₂

(PGD₂)の産生が DSCG により有意に抑制されることも報告されている[16]。マスト細胞安定化剤は IgE を介した抗原刺激により誘発される脱顆粒応答だけでなく、compound 48/80 により誘発される脱顆粒応答も抑制する可能性があることが報告されている[17]。ヒト臍帯血由来培養マスト細胞およびマウス骨髄由来成熟培養マスト細胞を用いた検討では、ネドクロミルによる前処理が、compound 48/80 により誘発されるヒスタミンや PGD₂、 β -ヘキソサミニダーゼの遊離を有意に抑制した[18]。一方、DSCG の感受性は動物種に応じて違いがあることが報告されている[19, 20]。Oka らはラットおよびマウスを用い IgE 依存性受身皮膚アナフィラキシー(PCA)応答を検討した結果、抗原と同時に投与された DSCG は、ラットにおける IgE を介した即時型アレルギー応答を有意に抑制したが、マウスにおいてはほとんど抑制効果を示さないことを見出した。ラットおよびマウス腹腔由来マスト細胞を精製し IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答に対する DSCG の抑制効果を検討したところ、ラット腹腔マスト細胞においてのみ有意な抑制効果が見られたことから、この脱顆粒応答に対する DSCG の抑制効果には動物種の間で差がある可能性を示唆した[19]。DSCG は副作用の頻度や程度が極めて低い優れた治療薬であり臨床上重要な位置を占めているが、マスト細胞活性化に対する抑制効果に種差があることや DSCG の標的分子が長らく不明なままであったことから、類似化合物を開発することが困難とされていた。DSCG は消化管からの吸収が悪く投与方法が限定されることや半減期が短く頻繁な投与が必要とされるという欠点も知られており[13, 14]、マスト細胞における DSCG の標的分子を明らかにし、より優れた抗アレルギー薬を開発することが望まれている。

3. クロモグリク酸ナトリウムの標的分子の候補：GPR35

2010 年、強制発現系を用いた検討から、DSCG を含むマスト細胞安定化剤は GPR35 のアゴニストであることが明らかにされた[21, 22]。Jenkins らはヒトまたはラット GPR35 を発現させた野生型 HEK293 細胞を用いて β -アレスチン 2 相互作用アッセイによる検討を行い、DSCG は数 μ M オーダーの EC₅₀ 値を示した。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(GPCR)のひとつであり、ヒトやげっ歯類において腸管組織に高発現することが知られている[23-25]。また、ゲノムワイド相関解析(GWAS)により、GPR35 は炎症性腸疾患や 2 型糖尿病との強い相関が報告されている[26-28]。Farooq らは野生型マウスおよび全身性 GPR35 遺伝子欠損型マウスを用いて、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性大腸炎モデルを作製し病態を比較した[29]。GPR35 遺伝子欠損型マウスでは、野生型マウスと比較して体重の大幅な減少や結腸組織における損傷の悪化などが見られた。GPR35 遺伝子欠損型マウスの結腸粘膜組織では IL-1 β や CCL2 のような炎症性サイトカインの mRNA 発現が増加しており、GPR35 遺伝子の全身欠損は DSS 誘発性大腸炎モデルの病態を増悪させることが示された。Agudelo らは、全身性 GPR35 遺伝子欠損型マウスが生後 15 週齢頃に耐糖能異常を示し、生後 16 週齢以降は野生型マウスと比較して体重が有意に増加することや、GPR35 遺伝子欠損型マウスの皮下脂肪組織では、野生型マウスに比べ、TNF- α や CCL2 の mRNA 発現が増加していることを報告した[24]。上記を含めたいくつかの報告から、生体内において GPR35 は炎症の抑制に関与する可能性が考えられる[30, 31]。

Yang らは定量 RT-PCR により、GPR35 が造血幹細胞由来のヒトマスト細胞に発現しており、IgE 感作中に GPR35 の mRNA 発現が誘導されることを報告した[21]。GPR35 は主に、三量体型 G タンパク質である $G_{12/13}$ や $G_{i/o}$ と共役すると考えられている[32]。ヒト GPR35 を発現させた野生型 HEK293 細胞を用いた検討では、ロドキサミドにより G_o 、 G_i 、 G_{12} 、 G_{13} との共役は生じるが、 G_s 、 G_z 、 G_{16} との共役は起こらないことが示唆された。いくつかの報告は単球や好中球、好酸球に発現する GPR35 が G_i と共役することにより、細胞の接着および遊走を促進する可能性を示した[33-36]。GPR35 に関する報告は多くあるが、マスト細胞における GPR35 の役割や DSCG による脱顆粒応答抑制への関与は明らかでない。

4. GPR35 の内在性リガンド

現在、GPR35 の内在性リガンドの候補として、トリプトファン代謝産物であるキヌレン酸、セロトニン代謝産物である 5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、およびリゾホスファチジン酸(LPA)などが報告されているが、いずれの生理活性物質も GPR35 の内在性リガンドと見なすことができるだけの十分な実験的証拠は現時点ではない。2006 年、Wang らはキヌレン酸が GPR35 の内在性リガンドである可能性を報告した[37]。ヒト、ラット、マウス GPR35 をそれぞれ発現させた HEK293 細胞における Ca^{2+} /イクオリンアッセイでは、キヌレン酸の EC_{50} 値は数十 μM オーダーであった。Jenkins らが行ったヒトまたはラット GPR35 を導入した HEK293 細胞における β -アレスチン 2 相互作用アッセイによる検討では、キヌレン酸はヒト GPR35 に対し 100 μM 付近でわずかに効果を示し、ラット GPR35 に対する EC_{50} 値は約 66 μM であった[38]。キヌレン酸は GPR35 に対する親和性が非常に低く、GPR35 が最大活性を示すためには比較的高濃度のキヌレン酸が必要であると考えられているが、生体内におけるキヌレン酸の濃度は GPR35 を活性化するためには不十分である可能性が指摘されている[39]。キヌレン酸による GPR35 を介する作用としては、脂肪組織におけるエネルギー代謝の亢進[24]および免疫応答の抑制[40]が報告されている。2010 年、Oka らは新たな GPR35 の内在性リガンドの候補として LPA を報告した[41]。LPA はグリセロール主鎖、脂肪酸鎖、およびリン酸塩から構成されるリン脂質誘導体であり、結合する脂肪酸に応じて様々な種類が存在し、LPA ファミリーの受容体をはじめとして様々な標的分子をもつことが知られている[42]。ヒト GPR35 を安定発現させた HEK293 細胞において、2-oleoyl LPA や 2-linoleoyl LPA を含む様々な LPA により刺激したところ、濃度依存的な細胞質内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた[41]。一方、Southern らはヒト GPR35 遺伝子を導入した CHO-K1 細胞における β -アレスチン 2 相互作用アッセイによる検討を行ったが、LPA は GPR35 アゴニスト活性を示さなかった[43]。LPA の GPR35 アゴニスト活性については、他の実験方法では再現性が見られていないことが指摘されている[31]。2022 年、De Giovanni らは 5-HIAA が GPR35 内在性リガンドである可能性を示唆した[33]。ヒトおよびマウス GPR35 に対する親和性が高い 5-HIAA は、他の化合物に比べより有力な GPR35 内在性リガンド候補であると考えられている[44]。De Giovanni らは活性化されたマスト細胞および血小板において、セロトニンがモノアミンオキシダーゼおよびアルデヒド脱水素酵素により代謝され 5-HIAA が産生される可能性を報告したが[33]、生体内におけるこれらの代謝経路の詳細は不明である[39]。

5. 本研究の構成

本研究では DSCG のマスト細胞脱顆粒応答抑制効果における GPR35 の役割を解明することを目的とした。第 1 章では、成熟マスト細胞における GPR35 の発現を確認し、DSCG による脱顆粒応答抑制効果がマスト細胞に発現する GPR35 に依存するかどうかを検討した。第 2 章では、マスト細胞の脱顆粒応答抑制における GPR35 の下流シグナルについて、RhoA を介したアクチン骨格の制御に焦点を当て検討を行った。

第1章 抗原抗体反応による脱顆粒応答の抑制

第1節 緒言

いくつかの報告から、DSCG は、精製ラット腹腔マスト細胞における IgE を介した抗原刺激誘発性、およびカチオン性分泌促進物質 compound 48/80 誘発性の脱顆粒応答を抑制する可能性が示唆された[17, 19, 45-47]。DSCG の標的分子は長らく不明であったが、強制発現系を用いた解析から GPR35 のアゴニスト活性を有することが明らかにされた[21, 22]。しかしながら、DSCG によるマスト細胞の脱顆粒応答抑制効果に GPR35 が関与するかは不明である。また、ヒトマスト細胞における GPR35 の mRNA 発現は報告されている[21]が、実験モデルとしてよく用いられるラットやマウスのマスト細胞における GPR35 の発現は確認されていない。

GPR35 アゴニスト活性を示す化合物は DSCG やキヌレン酸、LPA、5-HIAA に加え、ザプリナストやパモ酸などが挙げられる。ザプリナストは cGMP 特異的ホスホジエステラーゼ (cGMP-PDE) 阻害剤として知られているが、ヒトまたはラット GPR35 を発現させた野生型 HEK293 細胞にザプリナストを処理したところ、GPR35 の発現に依存し、濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ GPR35 アゴニスト活性を示した[23]。また、ヒト GPR35 を発現させた U2OS 細胞を用いた β -アレスチン 2 相互作用アッセイにおいて、パモ酸は GPR35 の発現に依存して濃度依存的な GPR35 アゴニスト活性を示した[48]。パモ酸は腸管組織における炎症を抑制する可能性が示唆されており、DSS 誘発性大腸炎マウスモデルに対するパモ酸の皮下注射は体重減少や下痢症状、結腸の収縮を改善した[49]。報告されている GPR35 アゴニストのヒト、ラット、マウス GPR35 に対する親和性について様々な検討が行われているが、既報の GPR35 アゴニストの多くは動物種間において親和性に大きな差が見られることが分かっている[50]。GPR35 の内在性リガンド候補であるキヌレン酸や LPA、5-HIAA、および合成 GPR35 アゴニストであるザプリナストは GPR35 以外に標的分子を持つことが知られており、マスト細胞における GPR35 の機能を解析するためには、特異的に GPR35 へ結合し、かつ動物種間における親和性の差が比較的小さいツール化合物が必要である。また、GPR35 の内在性リガンド候補であるキヌレン酸、LPA、5-HIAA について、マスト細胞の脱顆粒応答に対する抑制効果は未だ検討されていない。

本章では、DSCG による脱顆粒応答抑制効果がマスト細胞に発現する GPR35 を介するかどうかを明らかにすることを目的とした。まず、精製ラット腹腔マスト細胞および成熟マウス骨髓由来培養マスト細胞を用い、マスト細胞における GPR35 の mRNA 発現を確認し、主に IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答について DSCG を含む様々な GPR35 アゴニストによる抑制効果を検討した。また、新規 GPR35 アゴニストとして合成した化合物を TGF- α shedding assay により評価し、GPR35 特異的かつ種差の小さい GPR35 アゴニストであることを確認した。さらに、マウスにおける PCA 応答を用い、*in vivo* においてマスト細胞活性化に対する GPR35 アゴニストによる抑制効果を検討した。

第 2 節 実験材料及び方法

1. 試薬

キヌレン酸、ザプリナスト、ケトチフェンフマル酸塩、パモ酸、1-oleoyl-L- α -lysophosphatidic acid (LPA)、5-HIAA、ヒスタミン二塩酸塩、抗ジニトロフェニル(DNP) IgE 抗体(clone SPE-7)、ジニトロフェニル結合人血清アルブミン(DNP-HSA)、compound 48/80、Histodenz、*p*-nitrophenyl- β -D-2-acetoamide-2-deoxyglucopyranoside (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、DSCG、トルイジンブルー、エバンスブルー、サフラニン O、disodium *p*-nitrophenylphosphate hexahydrate、0.5w/v% メチルセルロース 400 溶液、ヨウ化プロピジウム溶液 (富士フイルム和光純薬、大阪、日本)、*B. pertussis* 由来百日咳毒素 (List Biological Laboratories, Campbell, CA)、タプシガージン(Merck Millipore, Billerica, MA)、PEI: Polyethylenimine “Max” (Polysciences, Warrington, PA)、抗トリニトロフェニル(TNP) IgE 抗体(clone IgE-3) (BD Biosciences, San Diego, CA)、トリニトロフェニル結合ウシ血清アルブミン(TNP-BSA) (LSL、東京、日本)、組換えマウス幹細胞因子(mSCF)、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液、抗 HA 抗体(isotype mouse IgG1- κ , clone HA124) (ナカライテスク、京都、日本)、組換えマウス IL-3 (R&D Systems, Minneapolis, MN)、PE 標識抗 mouse IgG (H+L) 抗体(Cat. 12-4010-82) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine (リゾホスファチジルセリン) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)、QIAGEN RNeasy Plus Universal Mini Kit, QIAGEN RNeasy kit (QIAGEN, Hilden, Germany)、TaKaRa Bio Prime Script RT reagent Kit (タカラバイオ、滋賀、日本)、KOD SYBR qPCR Mix (東洋紡、大阪、日本) を使用した。また KGP-7、18、20、27 は安田女子大学の松野研司教授よりご供与いただいた。

2. 実験動物

8 週齢の雄性 BALB/c マウス、8 週齢の雄性 C57BL/6N マウス、および 8-10 週齢の雄性 Wistar ラット (日本エスエルシー、静岡、日本) を使用した。また、GPR35 遺伝子欠損マウスは京都薬科大学の加藤伸一教授および斉藤美知子准教授よりご供与いただいた。本研究における動物実験は、岡山大学実験動物委員会(OKU-2018178, OKU-2018274)および京都薬科大学実験動物委員会(A22-034, PCOL-20-007)より承認を受け、岡山大学動物実験規則および京都薬科大学動物実験実施規程に従い実施した。

3. ラット腹腔マスト細胞精製

Wistar ラットの腹腔内に 1 匹あたり 20 ml の Tyrode-HEPES-gelatin(THG)緩衝液[10 mM HEPES-NaOH (pH 7.3), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.41 mM NaH₂PO₄, 1.6 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose, 0.05% gelatin]を注入し回収した。腹腔洗浄液から腹腔細胞を収集し THG 緩衝液に再懸濁した。細胞懸濁液を 22.5% Histodenz 溶液[10 mM HEPES-NaOH (pH 7.3), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.41 mM NaH₂PO₄, 1.6 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose, 1% gelatin, 0.29 g/ml Histodenz]に重層し室温にて 45 x g で 15 分間遠心分離した。上層を丁寧に吸引した後、沈殿した細胞を回収し PIPES 緩衝液[25 mM PIPES-NaOH (pH 7.4), 125 mM NaCl, 2.7 mM

KCl, 1 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA]に再懸濁した。90-95%の細胞がサフラニン染色にて陽性であることを確認した。

4. BMMCs および CTMCs 作製

IL-3 依存性マウス骨髄由来培養マスト細胞(BMMCs)は、マウス脛骨から採取した骨髄細胞を 10 ng/ml IL-3 を含む RPMI-1640 培地(10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid)を用い、1 か月間 37°C および 5% CO₂ 条件下において培養し作製した[51]。95%以上の細胞が単一の c-kit⁺ FcεRI⁺ 集団内にありトルイジンブルー染色にて陽性であることを確認した。結合組織型マスト細胞様培養マスト細胞(CTMCs)は、100 ng/ml mSCF を含む RPMI-1640 培地(10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid)を用い、BMMCs を Swiss 3T3 線維芽細胞と 16 日間 37°C および 5% CO₂ 条件下において共培養し作製した[52]。95%以上の細胞がサフラニン染色にて陽性であることを確認した。

5. 細胞培養

ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞 (JCRB 細胞バンク、大阪、日本) は、D-MEM 培地(10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin)を用い、37°C および 5% CO₂ 条件下において培養した。

6. HEK293/HA-rGPR35 細胞の細胞表面上 HA-rGPR35 発現解析

HEK293/HA-rGPR35 細胞を PIPES 緩衝液中において 100 µM DSCG または 10 µM ザブリナストにより 37°C で 0、5、15、60 分間処理した。5% FBS を含む PBS で洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で懸濁し、室温で 15 分間静置することで細胞を固定した。緩衝液により洗浄後、抗 HA 抗体(isotype mouse IgG1-κ, clone HA124) (dilution 1:1600)を添加し氷上で 30 分間反応させた。余分な 1 次抗体を除去し、緩衝液中において PE 標識抗 mouse IgG (H+L)抗体(dilution 1:100)を氷上で 30 分間反応させた。解析を行う直前に 20 µg/mL ヨウ化プロピジウム溶液を加え、FACS Calibur (BD Biosciences)を用い解析した。

7. β-ヘキソサミニダーゼ活性による脱顆粒応答評価

ラット腹腔マスト細胞における IgE を介した抗原刺激では、Tyrode-HEPES 緩衝液[10 mM HEPES-NaOH (pH 7.3), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.41 mM NaH₂PO₄, 1.6 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA]中において、ラット腹腔マスト細胞を 10 µg/ml 抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7)に 37°C で 3 時間感作した。PIPES 緩衝液で洗浄し余分な IgE を除去した後、PIPES 緩衝液中において抗原である 100 ng/ml DNP-HSA および 2 µM リゾホスファチジルセリンにより 37°C で 30 分間刺激した。また、PIPES 緩衝液中において 100 ng/ml compound 48/80 または 1 µM タブシガージンにより 37°C で 30 分間刺激した。BMMCs および CTMCs は、RPMI-1640 培地(10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid)中において、1 µg/ml 抗 TNF-IgE 抗体(clone

IgE-3)に 37°Cで 3 時間感作した。PIPES 緩衝液で洗浄し余分な IgE を除去した後、PIPES 緩衝液中において抗原である 10 ng/ml TNP-BSA により 37°Cで 30 分間刺激した。刺激後、800 x g、4°Cで 10 分間遠心分離し上清画分を回収した。細胞は 0.5% Triton X-100 を含む PIPES 緩衝液を用い懸濁した後、15,000 x g、4°Cで 10 分間遠心分離することにより上清を回収し細胞内画分とした。脱顆粒応答は顆粒に含まれる酵素 (β -ヘキソサミニダーゼ) の活性を測定し評価した。 β -ヘキソサミニダーゼの基質である 3.3 mM *p*-nitrophenyl- β -D-2-acetoamide-2-deoxyglucopyranoside を含む 67 mM クエン酸緩衝液(pH 4.5)中において試料を 37°Cで 30 分間インキュベートした。250 mM glycine-NaOH (pH 10.7)を加え酵素反応を停止させた後、波長 405 nm における吸光度を測定し遊離した *p*-nitrophenol の量を算出した。総酵素活性 (上清画分と細胞内画分の酵素活性の合計) に対する上清画分の酵素活性の割合を求め、脱顆粒率(%)とした。その際、サンプルごとの総酵素活性は一定であることを確認した。

8. TGF- α shedding assay

GPCR の活性は Inoue らにより開発された TGF- α shedding assay を行い評価した[53]。野生型 HEK293 細胞に、GPR35 (ヒト、ラットおよびマウス)、様々なキメラ G タンパク質($G_{\alpha_{q11}}$, $G_{\alpha_{i3}}$, $G_{\alpha_{o}}$, $G_{\alpha_{s}}$, $G_{\alpha_{z}}$, $G_{\alpha_{12}}$, $G_{\alpha_{13}}$)および $G_{\alpha_{16}}$ 、アルカリホスファターゼ(AP)融合 TGF- α の遺伝子配列がそれぞれ組み込まれたプラスミドベクターpCAGGS を PEI: Polyethylenimine “Max” により一過性に導入した。トランスフェクション後、細胞を Hank's 緩衝液[5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 137 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.26 mM $CaCl_2$, 0.44 mM KH_2PO_4 , 0.34 mM Na_2HPO_4 , 0.49 mM $MgCl_2$, 0.41 mM $MgSO_4$, 5.6 mM glucose]中において種々の化合物により 37°Cで 1 時間刺激した。刺激後、160 x g、室温で 3 分間遠心分離し細胞 (沈殿) と細胞外面分 (上清) に分けた。細胞画分と細胞外面分のそれぞれに AP の基質である 10 mM *p*-nitrophenylphosphate 溶液[40 mM Tris-HCl (pH 9.5), 40 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$]を添加し 37°Cで 1 時間インキュベートした。波長 405 nm における吸光度を測定し AP の活性を算出した。AP の総活性 (細胞画分と細胞外面分における AP 活性の合計) に対する細胞外面分の AP 活性の割合を求め、shedding 率(%)とした。その際、サンプルごとの AP の総活性は一定であることを確認した。

9. 定量 RT-PCR

マウス小腸、耳および背部の皮膚組織は 8 週齢の雄性 C57BL/6N マウスから採取した。マウス腹腔細胞は 8 週齢の雄性 C57BL/6N マウスの腹腔内に Tyrode-HEPES 緩衝液[10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 5.6 mM glucose]を注入し回収した。動物組織は QIAGEN RNeasy Plus Universal Mini Kit、細胞は QIAGEN RNeasy kit で total RNA を抽出した。TaKaRa Bio Prime Script RT reagent Kit で total RNA を逆転写し cDNA を作製した。PCR は StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific)を使用し、KOD SYBR qPCR Mix で反応を行った。用いたプライマーの配列と PCR 条件を以下に示す。

マウス Gpr35 [24]

Forward primer: 5'-ACA ACC TGT AAC AGC ACC CTC-3'

Reverse primer: 5'-GCG ATA GCA GAA TAC CCA GAG T-3'

PCR 条件 : 98°C for 2 min → 40 cycles of 10 s at 98°C, 10 s at 60°C and 1 min at 68°C

PCR product: 126 bp

マウス Actb [54]

Forward primer: 5'-CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3'

Reverse primer: 5'-ATG GAG CCA CCG ATC CAC A-3'

PCR 条件 : 95°C for 10 s → 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60°C

PCR product: 171 bp

10. 皮膚組織における血管透過性の評価

BALB/c マウスを用いた検討では、まずマウス耳介組織に抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7) 30 ng/site を皮内投与した。感作から 24 時間後、抗原である DNP-HSA 60 µg およびエバンスブルー 1 mg を含む生理食塩水 0.2 ml を尾静脈内投与した。GPR35 アゴニストであるザプリナスト (10 mg/kg, 溶媒 : 生理食塩水)、KGP-18 (10 mg/kg, 溶媒 : 0.5w/v% メチルセルロース 400 溶液)、KGP-27 (10 mg/kg, 溶媒 : 0.5w/v% メチルセルロース 400 溶液)、ヒスタミン H1 受容体アンタゴニストであるケトチフェン (10 mg/kg, 溶媒 : 生理食塩水) は抗原を投与する 30 分前に腹腔内投与した。C57BL/6N を遺伝的背景とした野生型マウスあるいは GPR35 遺伝子欠損型マウスを用いた検討では、まずマウス耳介組織に抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7) 30 ng/site を皮内投与した。感作から 24 時間後、抗原である DNP-HSA 90 µg およびエバンスブルー 1.5 mg を含む生理食塩水 0.3 ml を尾静脈内投与した。GPR35 アゴニストである DSCG (100 mg/kg, 溶媒 : 生理食塩水)、KGP-27 (10 mg/kg, 溶媒 : 0.5w/v% メチルセルロース 400 溶液) は抗原を投与する 1 時間前に腹腔内投与した。ヒスタミンは、野生型マウスあるいは GPR35 遺伝子欠損型マウスにエバンスブルー 1.5 mg を含む生理食塩水 0.3 ml を尾静脈内投与した後、耳介組織に皮内投与(1 µg/site)した。抗原あるいはヒスタミン投与から 30 分後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ耳介組織を回収した。耳介組織中に漏出したエバンスブルー量は吸光度に基づいて定量化した。まず回収した耳介組織を 3M KOH 中にて溶解した。組織溶解液に 1.24 M H₃PO₄ を加え中和し、アセトンによりエバンスブルーを抽出した。波長 620 nm における吸光度を測定し耳介組織中エバンスブルー量を算出した。

11. 統計解析

データは独立した値または平均値±標準誤差で示す。独立した 2 群間の比較には two-tailed unpaired Student's *t* test を用いた。多群間の比較は one-way ANOVA により有意差を検定し、対照群との比較は Dunnett multiple comparison test、全ての群間比較は Tukey-Kramer multiple comparison test を用いた。また、two-way ANOVA により有意差を検定した多群間の比較は Holm-Sidak multiple comparison test を用いた。

第3節 結果

1. 既報の GPR35 アゴニストによる精製ラット腹腔マスト細胞の脱顆粒応答抑制

過去の報告では、DSCG による作用はラット腹腔マスト細胞を用い検証されていた[17, 19, 45-47]。そこで Wistar ラットの腹腔細胞からマスト細胞を精製し、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答に対する既報の GPR35 アゴニストによる抑制効果を検討した。DSCG を抗原と同時に処理したところ、脱顆粒応答は有意に抑制された(Fig. 1A)。一方、DSCG を 37°C で 5 分前処理したところ、DSCG による脱顆粒応答の抑制効果は消失し、前処理を 4°C で行ったところ抑制効果に変化はなかった(Fig. 1A)。DSCG 以外の既報の GPR35 アゴニストとしてキヌレン酸やザプリナストを抗原と同時に処理したところ、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答は有意に抑制された(Fig. 1B)。また DSCG を 37°C で 5 分前処理した後、既報の GPR35 アゴニストを抗原と同時に添加したところ、キヌレン酸やザプリナストによる脱顆粒応答の抑制効果は減弱した(Fig. 1B)ことから、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答の抑制において、キヌレン酸およびザプリナストの標的分子は DSCG と同一であると考えられた。次に、アミノ末端にヘマグルチニン(HA)タグが付加されたラット GPR35 を安定発現する HEK293 細胞を用い、既報の GPR35 アゴニストによるラット GPR35 の内在化を検討した。細胞を DSCG またはザプリナストで刺激したところ、細胞表面上のラット GPR35 発現レベルは急速に減少した(Fig. 1C)。GPR35 は複数の三量体型 G タンパク質と共役することが *in vitro* では示唆されているが、好中球や好酸球の走化性を誘導する際にはケモカイン受容体と同様に G_i と共役する可能性が示唆されている[33, 36]。しかしながら、精製ラット腹腔マスト細胞を百日咳毒素(PT)存在下において IgE 感作した後、DSCG を抗原と同時に処理した結果、DSCG による脱顆粒応答の抑制効果は変化せず、 G_i が関与する可能性は低いことが示唆された(Fig. 1D)。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について、抗原と同時に DSCG およびザプリナストを処置した結果、算出された IC_{50} 値はそれぞれ 0.425 μ M、14.8 nM であった。ザプリナストは、DSCG に比べ、より強い脱顆粒応答抑制効果を示し、優れた GPR35 アゴニストであることが分かった(Fig. 1E)。

2. 既報および新規 GPR35 アゴニストの活性評価

野生型 HEK293 細胞にヒト、ラットおよびマウス GPR35 をそれぞれ一過性に発現させ、TGF- α shedding assay を行い、既報の GPR35 アゴニストである DSCG、ザプリナスト、キヌレン酸、パモ酸の GPR35 アゴニスト活性を評価した(Fig. 2A)。その結果、既報の GPR35 アゴニストが示す親和性には種差が認められた(Fig. 2B)。DSCG はすべての種の GPR35 に対しアゴニスト活性を示したが、ヒト GPR35 やラット GPR35 に比べマウス GPR35 に対する親和性は低かった。ザプリナストもすべての種の GPR35 に対しアゴニスト活性を示したが、ヒト GPR35 に比べラット GPR35 やマウス GPR35 に対する親和性の方が高かった。内因性アゴニストの候補として報告されているキヌレン酸は高濃度においてのみすべての種の GPR35 に対しアゴニスト活性が認められ、パモ酸はヒト GPR35 のみに対しアゴニスト活性が観察された。

次に共同研究を通じて GPR35 を標的とした新規化合物を設計し合成した(Fig. 3A, 4A)。新規化合物の設計では、GPR35 選択的でありヒト GPR35 に対し高い親和性を示すことが報告されている 8-amido-chromen-4-one-2-carboxylic acid [55]や、DSCG と同じマスト細胞安定剤でありヒト GPR35 およびラット GPR35 に対し高い親和性を示すことが報告されているロドキシサミドおよびブフロリン[56]の構造を参照した。新規化合物 KGP-7、18、20、27 についてザプリナストを比較対照とした TGF- α shedding assay を行い、ヒト、ラットおよびマウス GPR35 に対するアゴニスト活性を評価した。KGP-18 および KGP-27 は、ラット GPR35 またはマウス GPR35 に対しザプリナストと同等以上の親和性を示し、ヒト GPR35 に対してザプリナストよりも高い親和性を示した(Fig. 3B, Table 1)。KGP-7 は、ヒト GPR35 またはラット GPR35 に対しザプリナストと同等以上の親和性を示したが、マウス GPR35 に対しては部分アゴニストであると考えられた。KGP-7 と構造が類似した化合物である KGP-20 は、ラット GPR35 またはマウス GPR35 に対して弱い親和性を示し、ヒト GPR35 においてはアゴニスト活性を示さなかった(Fig. 4B)。

3. 新規 GPR35 アゴニストによる精製ラット腹腔マスト細胞の脱顆粒応答抑制

新たに合成した GPR35 アゴニストについて、精製ラット腹腔マスト細胞を用い IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答に対する抑制効果を検討した。KGP-7 または KGP-18 を抗原と同時に添加したところ、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答に対し、濃度依存的かつ有意な抑制効果を示した(Fig. 5A, 5B)。KGP-7 と構造的に類似する化合物 KGP-20 を抗原と同時に処理したところ、脱顆粒応答は抑制されなかった(Fig. 5C)。次に、IgE 非依存的な脱顆粒応答の標的分子として報告されている GPCR である MRGPRX2 や Mrgprb2 のアゴニストであるカチオン性分泌促進物質 compound 48/80 や、小胞体膜上の Ca²⁺-ATPase 阻害剤であるタプシガージンにより誘発される脱顆粒応答について GPR35 アゴニストによる抑制効果を検討した。刺激と同時に DSCG、ザプリナスト、KGP-18 をそれぞれ添加したところ、compound 48/80 により誘発される脱顆粒応答は有意に抑制されたが、その効果は部分的であった(Fig. 5D)。KGP-20 は compound 48/80 により誘発される脱顆粒応答においても抑制効果を示さなかった。また、タプシガージンにより誘発される脱顆粒応答に対し、DSCG、ザプリナスト、KGP-18、KGP-20 はいずれも有意な抑制効果を示さなかった(Fig. 5E)。よって GPR35 アゴニストは、特に IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を抑制すると考えられる。

4. GPR35 アゴニストによる成熟骨髄由来培養マスト細胞の脱顆粒応答抑制

IL-3 依存性マウス骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)は、初代培養モデルとしてマスト細胞の研究ではよく用いられるが、これは寄生虫感染時に誘導される腸管マスト細胞と類似しており、未成熟なマスト細胞のモデルである。そのため、幹細胞因子(SCF)存在下において BMMCs とマウス線維芽細胞株をさらに共培養することにより、結合組織型マスト細胞を模倣した、より成熟した培養モデル(CTMCs)を得ることができる。まず C57BL/6N マウスより採取した骨髄細胞から BMMCs および CTMCs を作製し、GPR35 の mRNA 発現レベルを測定した。その結果、GPR35 の mRNA 発現は BMMCs ではほとんど検出されなかった。一方、CTMCs では

GPR35 の mRNA 発現が検出された(Fig. 6A)。よって、マスト細胞の成熟過程において GPR35 の mRNA 発現が誘導されると考えられる。次に、同じ C57BL/6N の遺伝的背景を有する野生型あるいは GPR35 欠損型マウスより採取した骨髓細胞から BMMCs および CTMCs を作製し、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答に対する様々な GPR35 アゴニストの効果を検討した。GPR35 アゴニストは、既報の GPR35 アゴニストであるザプリナスト、DSCG、新規 GPR35 アゴニストである KGP-18、KGP-27、GPR35 の内在性アゴニストとして報告されているキヌレン酸、LPA および 5-HIAA を用いた。GPR35 アゴニストを抗原と同時にそれぞれ処理したところ、野生型 BMMCs では LPA および 5-HIAA によりわずかに脱顆粒応答は増強されたが、いずれの GPR35 アゴニストにおいても有意な脱顆粒応答の抑制効果は観察されず、GPR35 欠損型 BMMCs においても同様だった(Fig. 6B)。一方、野生型 CTMCs におけるザプリナスト、KGP-18、KGP-27 の処理は IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を有意に抑制し、GPR35 欠損によりその抑制効果が消失した。DSCG、キヌレン酸、LPA、5-HIAA は、野生型 CTMCs および GPR35 欠損型 CTMCs のいずれにおいても、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答に対し有意な抑制効果を示さなかった(Fig. 6C)。したがって、成熟マスト細胞には GPR35 が発現しており、ザプリナストや KGP-18、KGP-27 による IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答の抑制は GPR35 の発現に依存すると考えられる。

5. GPR35 アゴニストによる IgE 依存性即時型アレルギー応答の抑制

これまでの結果から、*in vitro* において、マスト細胞に発現する GPR35 は IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答の抑制に関与する可能性が示唆された。*In vivo* においても GPR35 アゴニストがマスト細胞の脱顆粒応答を抑制するのかを明らかにするため、PCA 反応に対する GPR35 アゴニストの抑制効果を検討した。PCA 反応は、皮膚マスト細胞の脱顆粒応答に依存した血管透過性の増大を評価する即時型アレルギーモデルであり、その反応はケトチフェンなどのヒスタミン H₁ 受容体アンタゴニストにより抑制されることが知られている。BALB/c マウスを用い抗原投与 30 分前に GPR35 アゴニストを腹腔内投与したところ、ザプリナストや KGP-27 は BALB/c マウスにおける PCA 反応を有意に抑制したが、KGP-18 はわずかな抑制効果を示した(Fig. 7A, 7B)。次に、同じ C57BL/6N の遺伝的背景を有する野生型マウスと GPR35 欠損型マウスを用い PCA 反応を検討した。野生型マウスの背部および耳の皮膚組織において GPR35 が mRNA レベルで発現していることを確認し、皮膚組織に分布するマスト細胞に GPR35 が発現することが観察された(Fig. 7C)。ヒスタミンの皮内投与により誘発されるエバンスブルーの血管外漏出は、野生型マウスと GPR35 欠損型マウスの間において有意な差は観察されなかった(Fig. 7D)。PCA 反応によるエバンスブルーの血管外漏出も、野生型マウスと GPR35 欠損型マウスの間において有意な差は見られず同程度であった(Fig. 7E)。抗原投与 1 時間前に GPR35 アゴニストを腹腔内投与したところ、DSCG や KGP-27 は野生型マウスにおける PCA 反応を有意に抑制したが、GPR35 欠損型マウスでは抑制しなかった(Fig. 7F, 7G)。よって、DSCG および KGP-27 は GPR35 を介し IgE を介した即時型アレルギー応答を抑制する可能性が示唆された。

Table 1 新規 GPR35 アゴニストの各種 GPR35 に対する EC₅₀ 値

	ラット GPR35	ヒト GPR35	マウス GPR35
ザプリナスト	5.9	1100	120
KGP-7	3.7	11	5.5
KGP-18	7.0	13	51
KGP-27	5.2	3.5	52

TGF- α shedding assay を用い、KGP-7、18、27 のヒト、ラットおよびマウス GPR35 に対するアゴニスト活性を評価した。Fig.3B、4B に示したグラフより EC₅₀ 値(nM)を算出した。

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

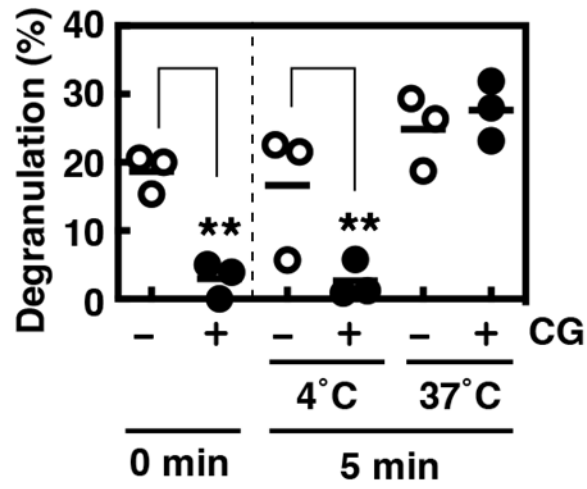
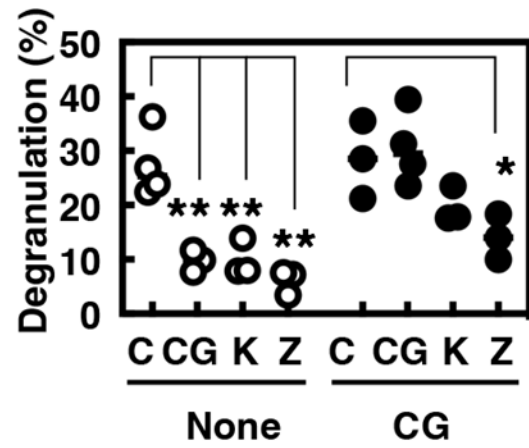
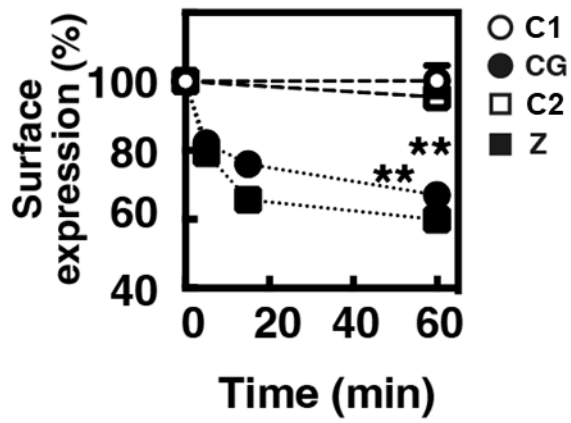
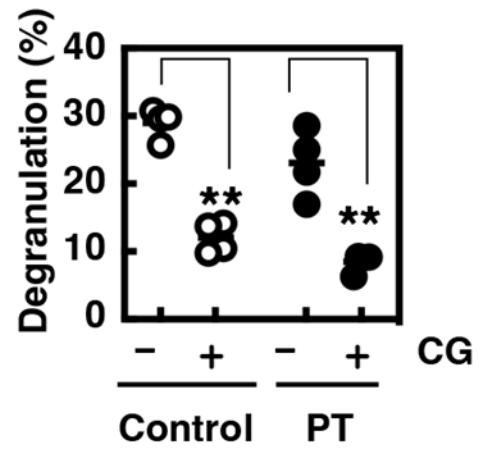
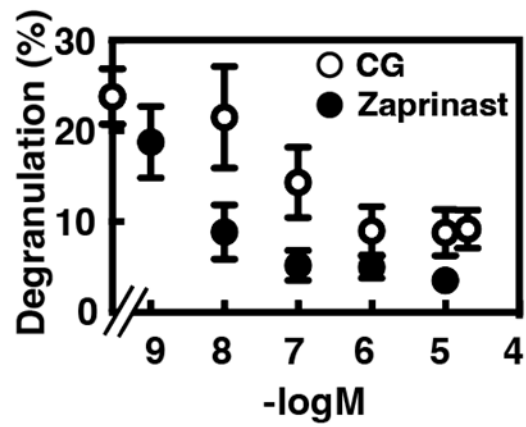
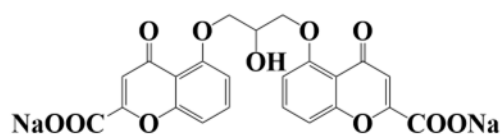
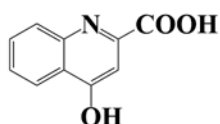
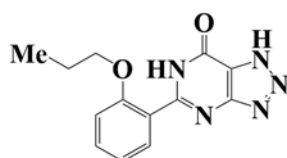
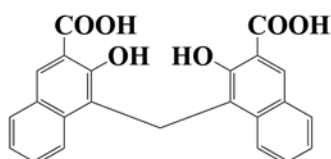
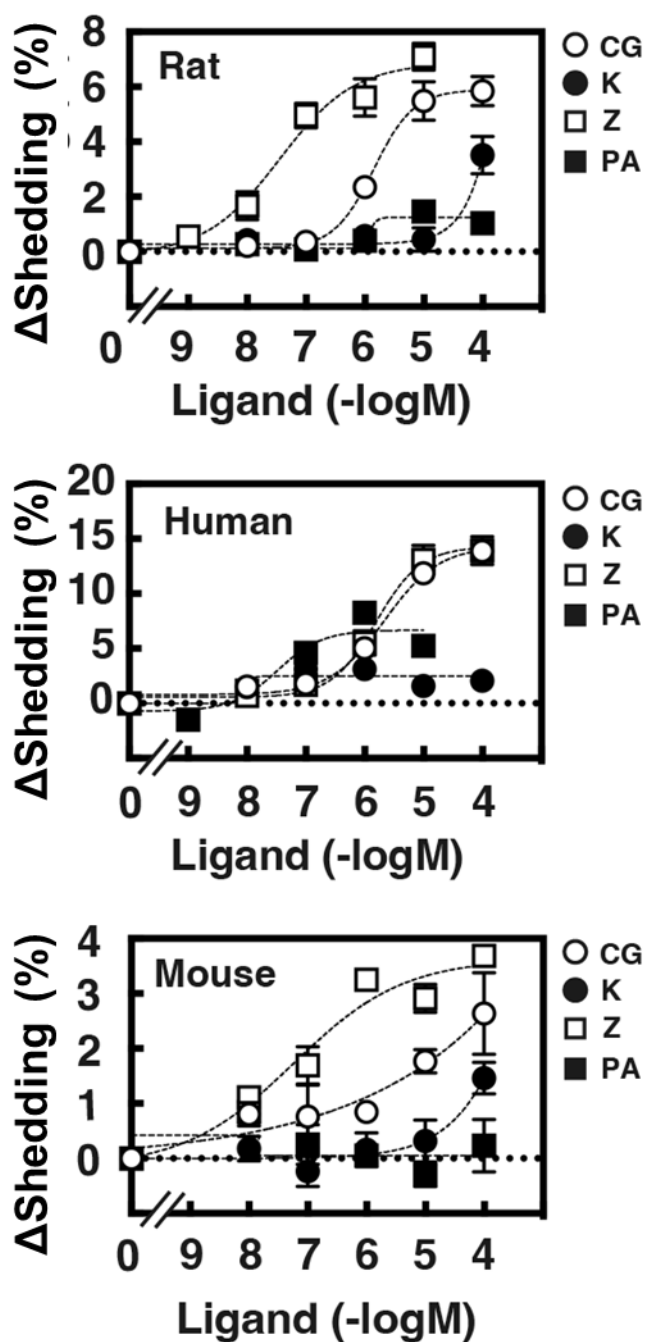
A**B****C****D****E**

Figure 1 既報の GPR35 アゴニストによる精製ラット腹腔マスト細胞の IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答の抑制

(A, B, D, E) 精製ラット腹腔マスト細胞を 10 $\mu\text{g/ml}$ 抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7)で 3 時間感作し、抗原である 100 ng/ml DNP-HSA および 2 μM リゾホスファチジルセリンにより刺激した。(A) 200 μM DSCG (CG)を抗原と同時(0 min)あるいは抗原刺激の 5 分前(5 min)に添加した。200 μM DSCG の 5 分前処理は 4°Cまたは 37°Cで行った。脱顆粒率は β -ヘキソサミニダーゼ酵素活性を測定し算出した。(B) 200 μM DSCG 無し(None)あるいは有り(CG)を抗原刺激の 5 分前に 37°Cで添加した。その後、200 μM DSCG (CG)、300 μM キヌレン酸(K)、100 μM ザプリナスト(Z)をそれぞれ抗原と同時に添加した。また陰性対照として溶媒のみ(C)を添加した。脱顆粒率(%)は β -ヘキソサミニダーゼ酵素活性を測定し算出した。(C) アミノ末端に HA タグが付加されたラット GPR35 (HA-rGPR35)を安定発現する HEK293 細胞を、100 μM DSCG (CG)または 10 μM ザプリナスト(Z)により 0、5、15、60 分間処理した。また DSCG およびザプリナストの陰性対照としてそれぞれの溶媒のみ(C1, C2)を添加した。細胞表面上 HA-rGPR35 発現レベルは PE 標識抗 HA 抗体を用いフローサイトメトリーにより測定した。値は平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(D) 精製ラット腹腔マスト細胞を 100 ng/ml 百日咳毒素の非存在下(Control)または存在下(PT)において IgE 感作し、100 μM DSCG を抗原と同時に添加した。脱顆粒率(%)は β -ヘキソサミニダーゼ酵素活性を測定し算出した。(E) 抗原と同時に様々な濃度の DSCG (CG)またはザプリナスト(Z)を添加した。脱顆粒率(%)は β -ヘキソサミニダーゼ酵素活性を測定し算出した。値は平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

A**DSCG****Kynurenic acid****Zaprinast****Pamoic acid****B****Figure 2** 既報の GPR35 アゴニストによる各種 GPR35 に対するアゴニスト活性

(A) DSCG、キヌレン酸、ザプリナスト、パモ酸の構造式を示した。(B) 野生型 HEK293 細胞に、各種 GPR35 (ラット、ヒト、マウス)、キメラ G タンパク質($G\alpha_{q/11, 13, o, s, z, 12, 13}$, $G\alpha_{16}$)、AP 融合 TGF- α の遺伝子がそれぞれ組み込まれたプラスミドベクターを一過性に導入した。細胞を様々な濃度の DSCG (CG)、キヌレン酸(K)、ザプリナスト(Z)、パモ酸(PA)で刺激した。Shedding 率(%)は AP 酵素活性を測定し算出した。値はアゴニスト非存在下における shedding 率(%)を差し引き、平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

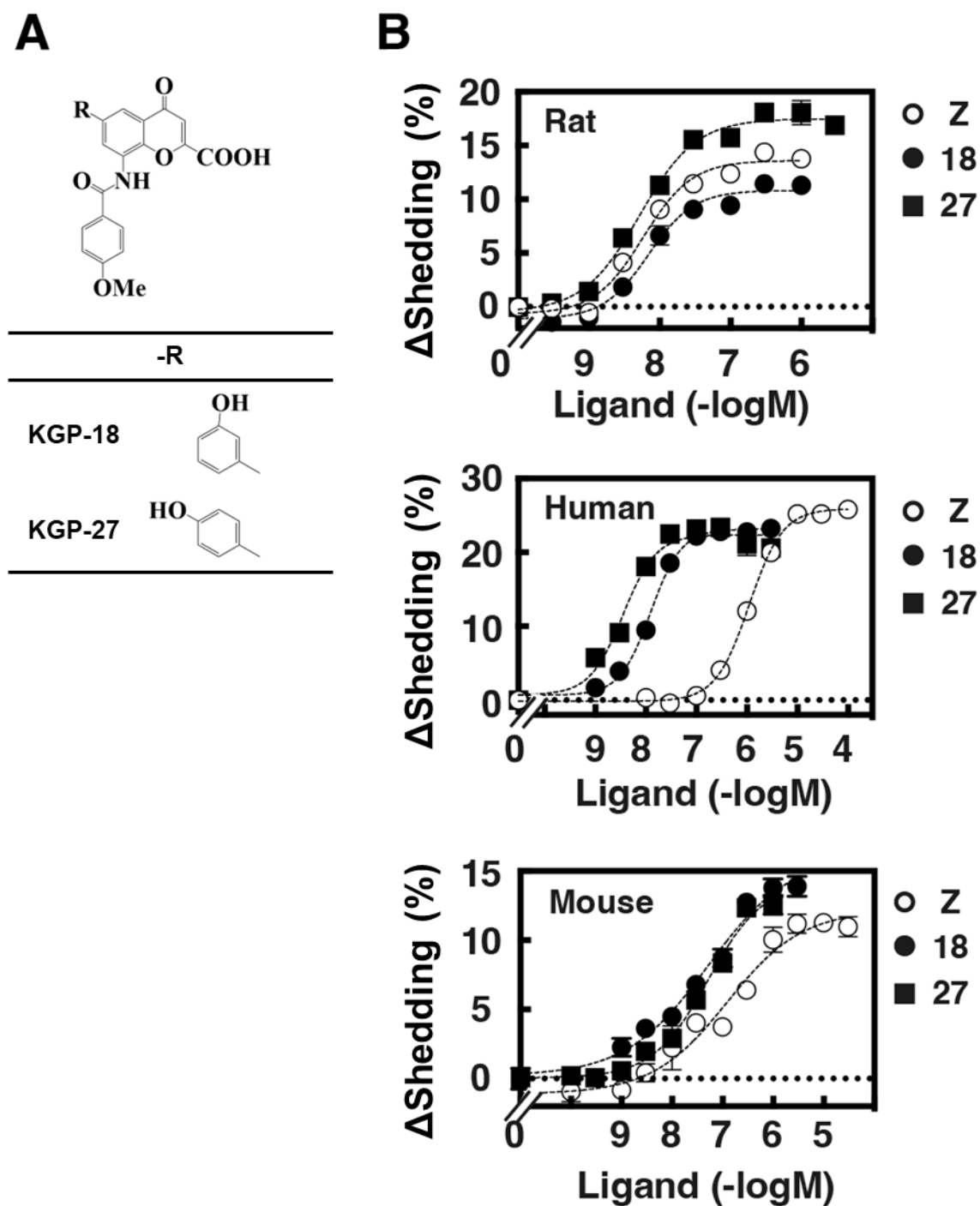


Figure 3 新規 GPR35 アゴニスト KGP-18、27 による各種 GPR35 に対するアゴニスト活性
(A) 新規化合物 KGP-18、27 の構造式を示した。(B) 野生型 HEK293 細胞に、各種 GPR35 (ラット、ヒト、マウス)、キメラ G タンパク質($G\alpha_{q11}$, $i3$, o , s , z , 12 , 13 , $G\alpha_{16}$)、AP 融合 TGF- α の遺伝子がそれぞれ組み込まれたプラスミドベクターを一過性に導入した。細胞を様々な濃度のザプリナスト(Z)、KGP-18 (18)、KGP-27 (27)で刺激した。Shedding 率(%)は AP 酵素活性を測定し算出した。値はアゴニスト非存在下における shedding 率(%)を差し引き、平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

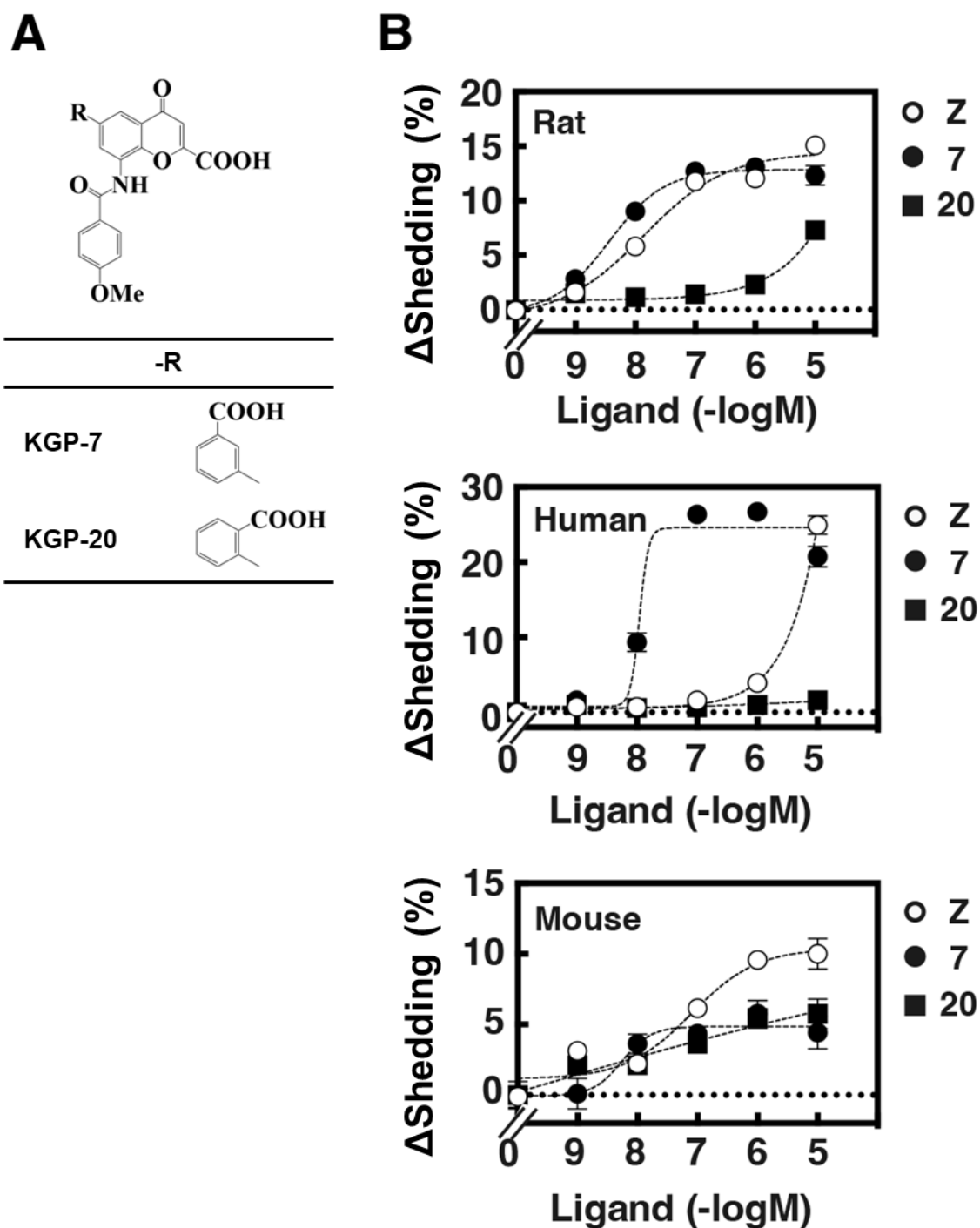


Figure 4 新規 GPR35 アゴニスト KGP-7、20 による各種 GPR35 に対するアゴニスト活性
 (A) 新規化合物 KGP-7、20 の構造式を示した。(B) 野生型 HEK293 細胞に、各種 GPR35 (ラット、ヒト、マウス)、キメラ G タンパク質($G\alpha_{q/i1, i3, o, s, z, 12, 13}, G\alpha_{16}$)、AP 融合 TGF- α の遺伝子がそれぞれ組み込まれたプラスミドベクターを一過性に導入した。細胞を様々な濃度のザブリナスト(Z)、KGP-7 (7)、KGP-20 (20)で刺激した。Shedding 率(%)は AP 酵素活性を測定し算出した。値はアゴニスト非存在下における shedding 率(%)を差し引き、平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

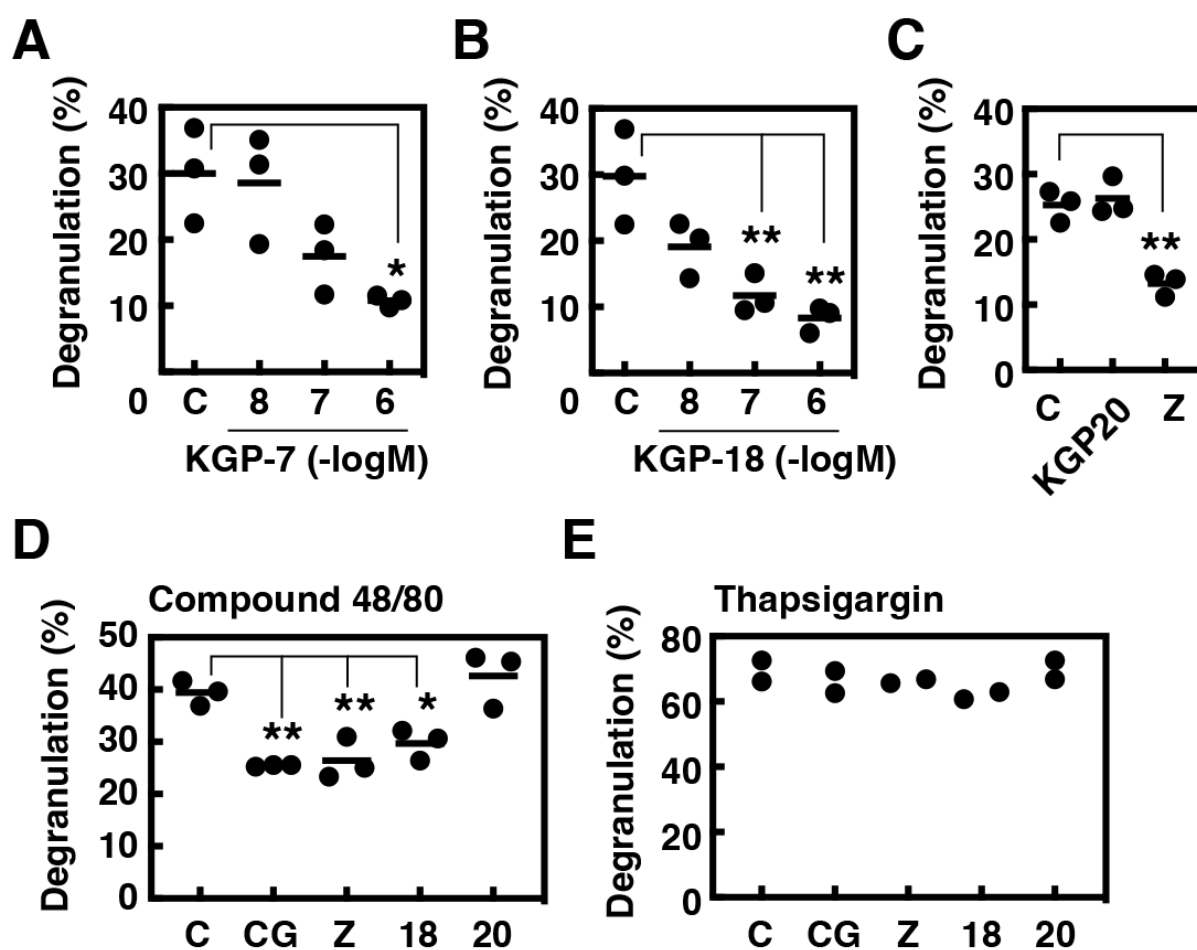


Figure 5 新規 GPR35 アゴニストによる精製ラット腹腔マスト細胞の脱顆粒応答抑制
 (A-C) 精製ラット腹腔マスト細胞を 10 μ g/ml 抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7)で 3 時間感作し、抗原である 100 ng/ml DNP-HSA および 2 μ M リゾホスファチジルセリンで刺激した。(A, B) 抗原と同時に様々な濃度の KGP-7 (A)または KGP-18 (B)で処理した。また陰性対照として溶媒のみ(C)を添加した。(C) 抗原と同時に 1 μ M KGP-20 (20)または 1 μ M ザプリナスト(Z)で処理した。また陰性対照として溶媒のみ(C)を添加した。(D, E) 精製ラット腹膜マスト細胞を 100 ng/ml compound 48/80 (D)、1 μ M タプシガージン(E)で刺激した。刺激と同時に、100 μ M (D)あるいは 200 μ M DSCG (CG)、1 μ M ザプリナスト(Z)、1 μ M KGP-18 (18)、1 μ M KGP-20 (20)を添加した。また陰性対照として溶媒のみ(C)を添加した。脱顆粒率(%)は β -ヘキソサミニダーゼ酵素活性を測定し算出した。(* p <0.05, ** p <0.01)

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

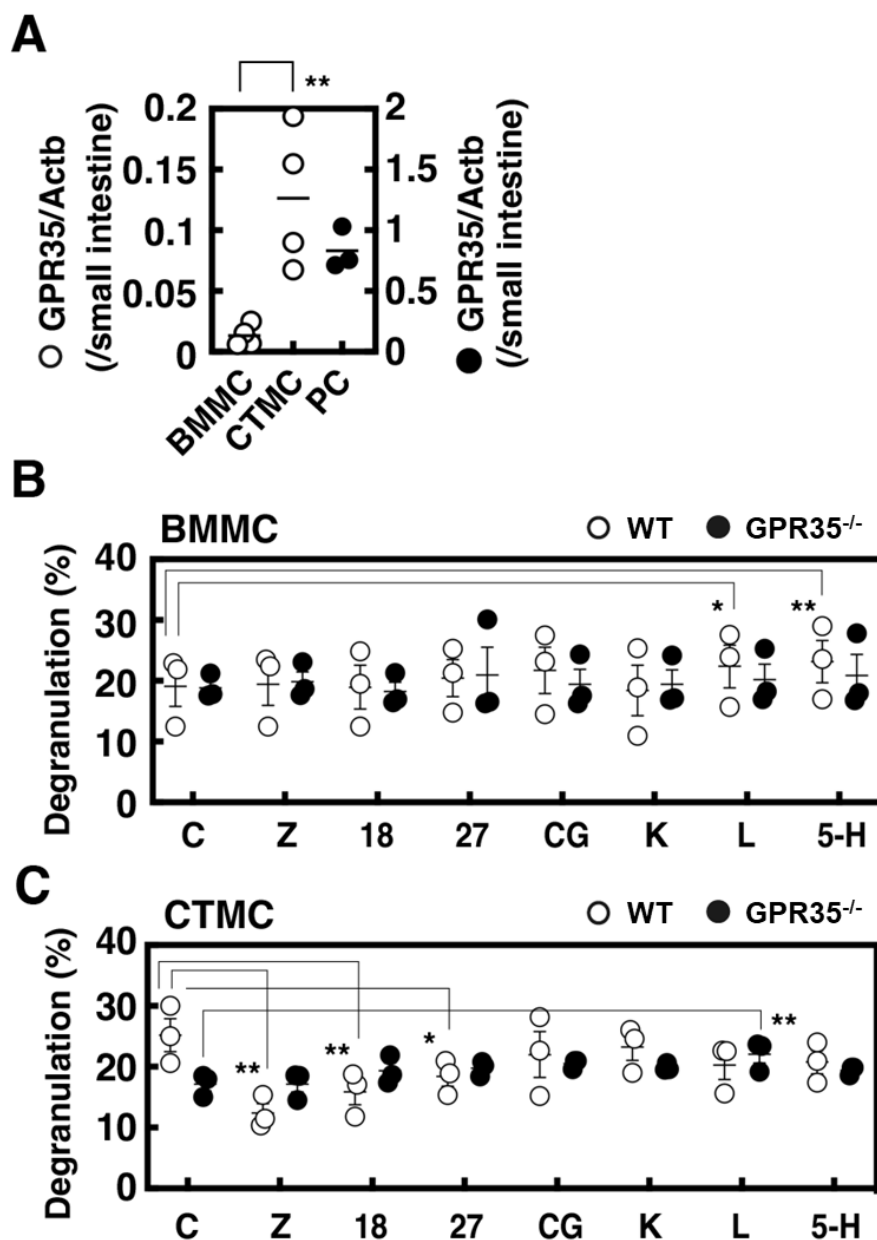


Figure 6 成熟骨髄由来培養マスト細胞における GPR35 の発現

(A) 野生型マウス由来骨髄細胞から作製した BMMCs および CTMCs、野生型マウス由来腹腔細胞(PCs)より total RNA を抽出した。Total RNA を逆転写し cDNA を作製した後、定量的 RT-PCR により mouse GPR35 の mRNA 発現レベルを定量した。マウス小腸における GPR35 の mRNA 発現レベルを 1 として表した。(B, C) 野生型マウス(WT)および GPR35 欠損型マウス(GPR35^{-/-})から採取した骨髄細胞を用い BMMCs(B)および CTMCs(C)を作製した。それぞれの細胞を 1 μ g/ml 抗 TNP-IgE 抗体(clone IgE-3)で 3 時間感作し、抗原である 10 ng/ml TNP-BSA で刺激した。抗原と同時に、1 μ M ザプリナスト(Z)、1 μ M KGP-18 (18)、1 μ M KGP-27 (27)、100 μ M DSCG (CG)、1 mM キヌレン酸(K)、1 μ M LPA (L)、10 μ M 5-HIAA (5-H)をそれぞれ添加した。また陰性対照として溶媒のみ(C)を添加した。脱顆粒率(%)は β -ヘキソサミニダーゼ酵素活性を測定し算出した。(* p <0.05, ** p <0.01)

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

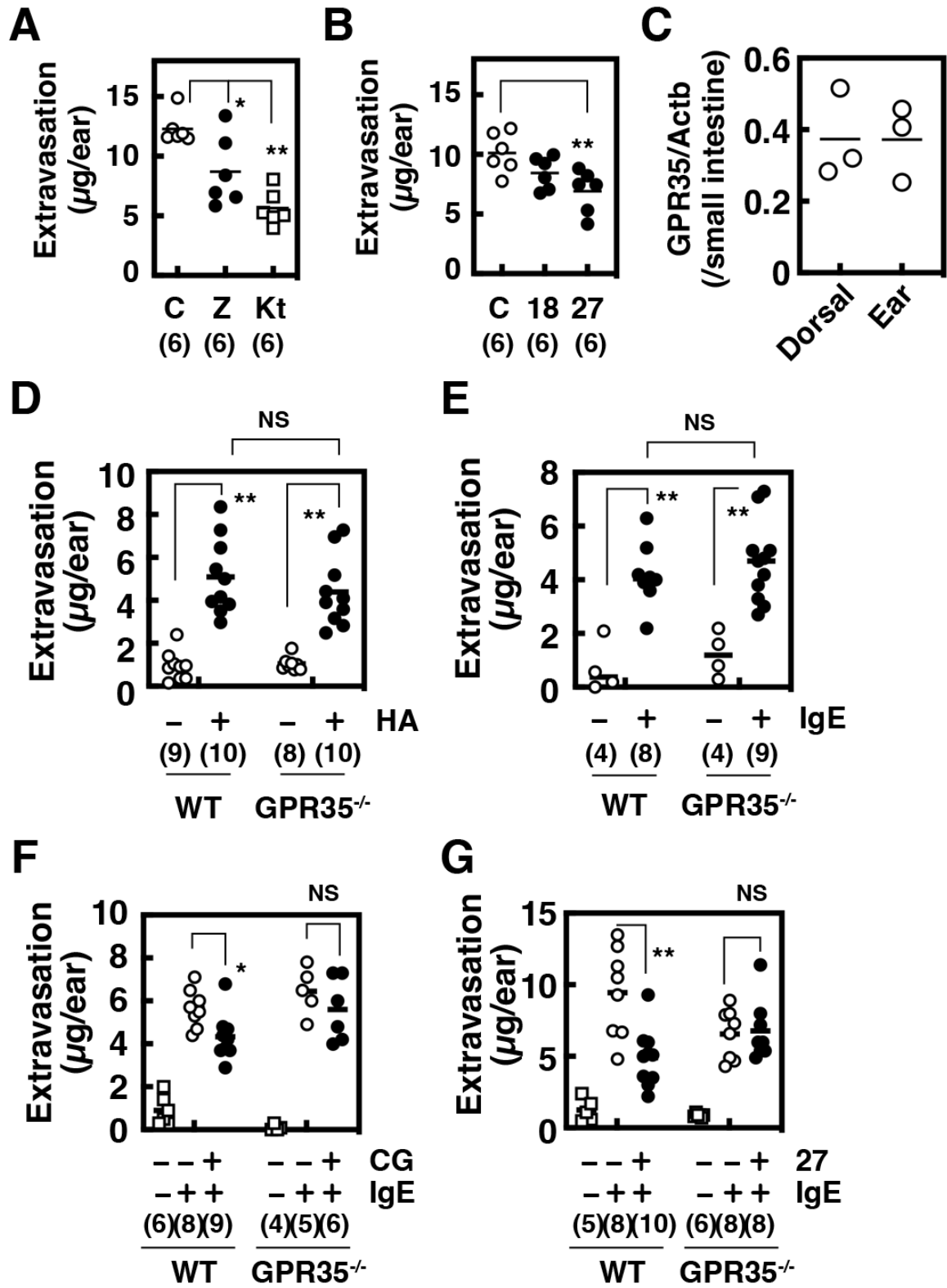


Figure 7 GPR35 を介した IgE 依存性受身皮膚アナフィラキシー応答の抑制

(A, B) BALB/c マウスの耳介組織に抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7, 30 ng/site)を皮内投与した。IgE 感作後、抗原である DNP-HSA 60 μ g およびエバンスブルー 1 mg を含む生理食塩水 0.2 ml を尾静脈内投与した。耳介組織中に漏出したエバンスブルーは吸光度に基づいて定量化した。(A) 抗原投与 30 分前にザプリナスト(Z, 10 mg/kg)またはケトチフェン(Kt, 10 mg/kg)を含む生理食塩水を腹腔内投与した。また陰性対照として溶媒のみ(C)を腹腔内投与した。(B) 抗原投与 30 分前に KGP-18 (18, 10 mg/kg)または KGP-27 (27, 10 mg/kg)を含む 0.5w/v% メチルセルロース 400 溶液を腹腔内投与した。また陰性対照として溶媒のみ(C)を腹腔内投与した。(C) C57BL/6N マウスの背部および耳の皮膚組織から total RNA を抽出した。Total RNA を逆転写し cDNA を作製した後、定量的 RT-PCR によりマウス GPR35 の mRNA 発現レベルを定量化した。マウス小腸における GPR35 の mRNA 発現レベルを 1 として表した。(D) C57BL/6N を遺伝的背景とした野生型マウス(WT)および GPR35 欠損型マウス(GPR35^{-/-})の耳介組織にヒスタミン(HA, 1 μ g/site) を皮内投与した。耳介組織中に漏出したエバンスブルーは吸光度に基づいて定量化した。(E-G) C57BL/6N を遺伝的背景とした野生型マウス(WT)および GPR35 欠損型マウス(GPR35^{-/-})の耳介組織に抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7, 30 ng/site)を皮内投与した。IgE 感作後、抗原である DNP-HSA 90 μ g およびエバンスブルー 1.5 mg を含む生理食塩水 0.3 ml を尾静脈内投与した。耳介組織中に漏出したエバンスブルーは吸光度に基づいて定量化した。(F) 抗原投与 1 時間前に DSCG (CG, 100 mg/kg)を含む生理食塩水を腹腔内投与した。(G) 抗原投与 1 時間前に KGP-27 を含む 0.5w/v% メチルセルロース 400 溶液(27, 10 mg/kg)を腹腔内投与した。各検討において使用したグループ毎のマウスの匹数を括弧内に示した。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

第 4 節 考察

DSCG は精製ラット腹腔マスト細胞における IgE を介した抗原刺激誘発性の脱顆粒応答、およびカチオン性分泌促進物質 compound 48/80 刺激誘発性の脱顆粒応答に対し有意な抑制効果を示し、過去の報告が再現された[17, 19, 45-47]。キヌレン酸[37]およびザプリナスト[23]は強制発現系を用いた解析から GPR35 アゴニスト活性を持つことが報告されており、DSCG と同様に、精製ラット腹腔マスト細胞における IgE を介した抗原誘発性の脱顆粒応答を有意に抑制し、その抑制効果は DSCG の前処理により減弱された(Fig. 1B)。これらの結果は、DSCG、キヌレン酸、ザプリナストはいずれも共通の標的分子、即ち 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可能性を示唆するものである。

生体内のマスト細胞は染色性や刺激応答性に基づいて 2 種類に大別することができるが、マウスおよびラットでは、皮膚や腹腔などに分布する結合組織型マスト細胞(connective tissue-type mast cell, CTMC)と、寄生虫感染の際に消化管粘膜に誘導される粘膜型マスト細胞(mucosal mast cell, MMC)の二つに分類される[57]。CTMC は顆粒内にサフラニン染色陽性のヘパリンを多く含み、高いヒスタミン含量を示すことが特徴である。また CTMC はカチオン性分泌促進物質 compound 48/80 刺激により脱顆粒応答を起こす。一方、MMC は顆粒内のプロテオグリカンの硫酸化レベルやヒスタミン含量が低く、カチオン性分泌促進物質 compound 48/80 による刺激に対し応答性を示さない。本研究では、CTMC を模倣し作製した結合組織型マスト細胞様マスト細胞(CTMCs)において、GPR35 が mRNA レベルで発現しており、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答がザプリナストや新規 GPR35 アゴニストにより有意に抑制された(Fig. 6C)。また、MMC と特徴が類似するマウス骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)では GPR35 がほとんど発現しておらず、GPR35 アゴニストによる脱顆粒応答は抑制されなかった。CTMC に分類される精製ラット腹腔マスト細胞では GPR35 が発現しており、GPR35 アゴニストによる脱顆粒応答は抑制されたことから、GPR35 は主に皮膚組織や腹腔内に存在する成熟マスト細胞に発現する可能性が考えられる。

野生型 CTMCs において観察されたザプリナストおよび新規 GPR35 アゴニストによる IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答の抑制効果は、GPR35 遺伝子の欠損により消失した(Fig. 6C)。In vivo における検討では、DSCG および新規 GPR35 アゴニストは野生型マウスにおける PCA 応答を抑制したが、GPR35 欠損型マウスでは PCA 応答に対する抑制効果を示さなかった(Fig. 7F, 7G)。GPR35 欠損型マウスにおけるヒスタミン応答性は野生型マウスと同程度であり、GPR35 遺伝子欠損はヒスタミンによる血管透過性の亢進に影響しないと考えられた。PCA 応答性も両マウスにおいて同程度であることから、IgE を介する抗原刺激の際に内在性の GPR35 アゴニストがマスト細胞の過剰な活性化を抑制するといった制御機構が存在する可能性は低いと考えられる。野生型マウスから採取した耳の皮膚組織では mRNA レベルで GPR35 の発現が検出された(Fig. 7C)ことから、腹腔内投与した DSCG および新規 GPR35 アゴニストは皮膚マスト細胞に発現する GPR35 に作用し PCA 応答を抑制した可能性を考えた。しかしながら、耳介組織中のマスト細胞における GPR35 の発現は直接確認できていないため、今後皮膚マスト細胞を単離し GPR35 の発現を検討する必要がある。In vitro および in vivo に

における GPR35 欠損型マウスを用いた検討から、DSCG を含む 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可能性が示唆された。

5-HIAA はセロトニン代謝産物であり、GPR35 の内在性リガンド候補として報告されている[33]。ヒトあるいはマウス GPR35 を安定発現させた WEHI-231 細胞を用いた検討では、5-HIAA の処理は細胞表面上の GPR35 を内在化させた[33]。しかし TGF- α shedding assay を用いた検討では、shedding 反応に参与する G タンパク質 $G_{q,11,12,13}$ の α サブユニットを遺伝的に欠損させた HEK293 細胞にマウス GPR35 を強制発現させ、8 種類のキメラ G タンパク質 ($G_{\alpha_{q/5,11,13,15,16}}$ あるいは $G_{\alpha_{q/11,12,13,15,16}}$) あるいは $G_{\alpha_{q/5}}, G_{\alpha_{q/11}}, G_{\alpha_{q/13}}$ をそれぞれ発現させた系において、5-HIAA は比較対象のロドキサミドに比べほとんど shedding 反応を示さなかった[39]。De Giovanni らは、マスト細胞は顆粒内にセロトニンを含むため、活性化されたマスト細胞がセロトニンから 5-HIAA を合成することにより、GPR35 を介した好中球の遊走を促進する可能性について示唆した[33, 39]。De Giovanni らの報告に基づき 5-HIAA がマスト細胞から供給される GPR35 アゴニストであることを考慮すると、脱顆粒応答によって遊離した 5-HIAA は、マスト細胞に発現する GPR35 にも作用し脱顆粒応答の抑制を引き起こす負のフィードバック調節因子として機能する可能性が考えられる。しかし、GPR35 欠損型 CTMCs における IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答は、野生型 CTMCs に比べ増大することはなかった(Fig. 6C)。また GPR35 欠損型マウスにおける IgE を介した即時型アレルギー応答も、野生型マウスに比べ増強されることはなかった(Fig 7E)。ザプリナストおよび新規 GPR35 アゴニストは野生型 CTMCs の 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が、5-HIAA はほとんど抑制効果を示さなかった(Fig. 6C)。活性化されたマスト細胞においてセロトニンがどのように代謝されているかは不明だが、5-HIAA はマスト細胞における負のフィードバック調節因子ではない可能性が考えられた。

臨床現場では、DSCG に対するタキフィラキシーが報告されている[59,60]。In vitro および in vivo の検討において、DSCG をどのタイミングで投与、あるいは添加するかによってその抑制効果に変動した[45,47]。ラットを用いた PCA 応答に関する検討において、抗原と同時に DSCG を静脈内投与した場合、IgE を介した抗原刺激による即時型アレルギー応答は抑制されたが、その抑制効果は DSCG を事前に投与することにより減弱した[45]。本研究においても同様の傾向が見られ、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答の DSCG による抑制効果は、DSCG を 5 分間前処理することにより消失した。また発現系を用いた解析から、キヌレン酸やパモ酸の処理により細胞表面上の GPR35 が速やかに内部へ移行することが報告されている[37,48]。Wyant らは GPR35 を発現するマウス新生児心筋細胞を用いた検討から、細胞表面上に発現する GPR35 はキヌレン酸処理により内部移行されミトコンドリア外膜へ輸送されることを示した[61]。本研究では、DSCG あるいはザプリナストの処理はラット GPR35 を強制発現させた HEK293 細胞において速やかに GPR35 を内在化させた(Fig. 1C)。こうした速やかな内在化が、DSCG の前処理により GPR35 を介した抑制効果が減弱する要因と考えられる。また本研究では DSCG の前投与により、マウスにおける PCA 応答は有意に抑制された(Fig. 7F)が、投与するタイミングによる抑制効果の減弱についてはさらに検討が必要である。

本研究において GPR35 アゴニストによるマスト細胞活性化の抑制効果は、ラットとマウスの間で相違が認められた。ザプリナストおよび新規 GPR35 アゴニストは、精製ラット腹腔マスト細胞において IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を強く抑制した(Fig. 5A-C)が、マウス CTMCs における脱顆粒応答に対しては部分的な抑制効果しか見られなかった(Fig. 6C)。さらに精製ラット腹腔マスト細胞において有意な抑制効果を示した DSCG およびキヌレン酸(Fig. 1B)は、マウス CTMCs において有意な抑制効果を示さなかった(Fig. 6C)。精製ラット腹腔マスト細胞では、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を誘導するためには抗原に加えリゾホスファチジルセリンによる共刺激が必要であるが、CTMCs は抗原刺激のみで脱顆粒応答を誘導できる。リゾホスファチジルセリンの作用機序は不明であるが、GPR35 による抑制作用には抗原とリゾホスファチジルセリンの共刺激に対する作用も影響する可能性があり、この違いにより *in vitro* においてラットとマウスの間に相違が生じたと考えられる。

LPA は付加された脂肪酸の相違に基づき様々な種類が存在し、結合する標的分子も複数存在する[42]。LPA 存在下においてヒト臍帯血由来培養マスト細胞を培養することにより、LPA 受容体である LPA₁、LPA₂、LPA₃ の細胞表面発現量が増加する[62]。また Lundequist らはヒトマスト細胞株 LAD2 およびヒト臍帯血由来培養マスト細胞において LPA₅ が高発現していることを示した[63]。LPA での処理はヒト臍帯血由来培養マスト細胞の増殖および分化を促進させ、その作用は LPA₁ および LPA₃ の競合的アンタゴニストである VPC-32179 あるいは Gα_{i/o} を不活性化する百日咳毒素の処理により抑制される[64]。Bot らはマウス骨髓由来培養マスト細胞(BMMC)やマウス腹腔由来マスト細胞、マウスマスト細胞株 MC/9 を用いて検討を行い、LPA による刺激はマスト細胞における脱顆粒応答を誘発することを報告した[65]。本研究では、野生型 CTMCs における IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答に対し LPA の同時処理はほとんど抑制効果を示さなかった。一方、LPA は野生型 BMMCs における IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を促進した(Fig. 6B)。BMMC および CTMC に発現する LPA 受容体のサブタイプは不明であるが、LPA は GPR35 以外の受容体に作用し脱顆粒応答を増強させている可能性が考えられる。GPR35 依存的な LPA によるマスト細胞に対する反応を確認するためには、GPR35 以外の LPA 受容体を欠損あるいは阻害し検討する必要がある。

GPR35 アゴニスト活性を持つ化合物の多くは、ヒトやラット、マウスの GPR35 に対する親和性に種差を示すことが知られている[50]。本検討では DSCG やキヌレン酸、ザプリナスト、パモ酸について TGF-α shedding assay を行ったが、いずれの GPR35 アゴニストも種差を示した。またほとんどの GPR35 アゴニストは GPR35 以外に標的分子を持つことが報告されており、GPR35 アゴニストとして多くの研究で用いられているザプリナストは元々 cGMP 特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤として開発された化合物である[23]。GPR35 に特異的に結合し、ヒト、ラットおよびマウスの全ての種の GPR35 について高い親和性を示すような化合物は未だ開発されていない。本研究では、GPR35 を標的として開発した新規化合物を TGF-α shedding assay により解析し、これらの一部がヒト、ラットおよびマウスのいずれの GPR35 に対しても親和性を示す新規 GPR35 アゴニストであることを明らかにした。新規 GPR35 アゴニストは *in vitro* および *in vivo* の検討において、DSCG やザプリナストと同様にマスト細胞の脱顆粒応答に対し有意な抑制効果を示した。ゲノムワイド相関解析(GWAS)により、GPR35 は炎症性

腸疾患や2型糖尿病との強い相関が報告されている[26-28]。本研究において新たに GPR35 アゴニストとして開発した化合物は、生体内における GPR35 の機能を解析する際に有用であると考えられる。

本章では、成熟マスト細胞には GPR35 が発現しており、DSCG を含む GPR35 アゴニストはマスト細胞に発現する GPR35 に依存して、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を抑制することを明らかにした。

第2章 GPR35によるアクチン骨格の制御

第1節 緒言

成熟マウス骨髄由来培養マスト細胞には GPR35 が発現しており、GPR35 欠損型マウスを用いた検討から、DSCG を含む様々な GPR35 アゴニストは GPR35 を介しマスト細胞の活性化を抑制する可能性が示唆された。しかし、マスト細胞に発現する GPR35 の活性化に伴う細胞内情報伝達の詳細は未だ不明であり、脱顆粒応答抑制がどのような分子メカニズムで起こるかは明らかではない。

GPR35 は様々な三量体型 G タンパク質と共役することが示唆されているが[32, 37, 66]、三量体型 G タンパク質である $G_{i/o}$ の α サブユニットを不活性化する百日咳毒素を処置しても、精製ラット腹腔マスト細胞における DSCG による脱顆粒応答の抑制作用に影響はなかったことから、 $G_{i/o}$ 以外の三量体型 G タンパク質 (G_s や $G_{12/13}$) と共役する可能性が示唆された。三量体型 G タンパク質 $G_{12/13}$ は、RhoA、Rac1、Cdc42 などに代表される低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーを活性化することが知られている[67]。Rho ファミリーはアクチン骨格の再構成に関わっており、Rho ファミリーの下流に存在する Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) タンパク質を活性化する[68]。ERM タンパク質はエズリン、ラディキシン、モエシンからなり、アクチン細胞骨格と細胞膜の間の結合を部分的に調節することにより、細胞内シグナル伝達や形態形成、運動性の制御において重要な役割を担う[69]。各 ERM タンパク質の発現レベルは細胞や組織によって異なるが、白血球ではモエシンが豊富に発現し、エズリンの発現量は少なく、ラディキシンはほとんど存在しない[70]。Theoharides らは精製ラット腹腔マスト細胞を用いて検討を行い、DSCG 処理により ERM タンパク質のひとつであるモエシンのリン酸化が促進されることを報告した[71]。一方、マスト細胞の脱顆粒応答ではアクチン骨格の脱重合が必要と考えられている[4, 72]。ラットマスト細胞株 RBL-2H3 細胞にアクチン重合促進剤であるジャスプラキノリドを処理した場合、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答は抑制され[73]、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D を処理した場合、RBL-2H3 細胞における脱顆粒応答は濃度依存的に増強された[74]。以上の報告からは、DSCG によるマスト細胞の脱顆粒応答抑制作用は、ERM タンパク質であるモエシンの活性化を介したアクチン皮質の形成促進によるという仮説が立てられる。本研究では、GPR35 がマスト細胞において $G_{12/13}$ と共役し Rho ファミリーを活性化させるかどうかについて検討を行った。

本章では、RhoA を介したアクチン骨格の制御に焦点を当て、マスト細胞における GPR35 の機能を明らかにすることを目的とした。ラット GPR35 を安定発現するラットマスト細胞株を作製し、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答時に引き起こされる線維型アクチン量の変化について、GPR35 の強制発現による影響を検討した。また TGF- α shedding assay を用いて GPR35 が共役する三量体型 G タンパク質を検討した。さらに、GPR35 発現ラットマスト細胞株を用い、線維型アクチン量および RhoA 活性に対する GPR35 アゴニスト処理による影響を検討した。

第 2 節 実験材料及び方法

1. 試薬

ザプリナスト、抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7)、DNP-HSA、*p*-nitrophenyl- β -D-2-acetoamide-2-deoxyglucopyranoside (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、disodium *p*-nitrophenylphosphate hexahydrate、ヨウ化プロピジウム溶液（富士フイルム和光純薬、大阪、日本）、タブシガージン(Merck Millipore, Billerica, MA)、PEI: Polyethylenimine “Max” (Polysciences, Warrington, PA)、抗 mouse CD16/CD32 抗体(clone 2.4G2)、FITC 標識抗 mouse IgE 抗体(Cat. 553415) (BD Biosciences, San Diego, CA)、抗 HA 抗体(isotype mouse IgG1- κ , clone HA124)、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液、Hoechst 33342 水溶液（ナカライテスク、京都、日本）、PE 標識抗 mouse IgG (H+L) 抗体(Cat. 12-4010-82) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、QIAGEN RNeasy Plus Universal Mini Kit, QIAGEN RNeasy kit (QIAGEN, Hilden, Germany)、TaKaRa Bio Prime Script RT reagent Kit（タカラバイオ、滋賀、日本）、KOD SYBR qPCR Mix（東洋紡、大阪、日本）、phalloidin-iFluor 488 reagent (abcam, Cambridge, UK)、G-LISA RhoA activation assay biochem kit (absorbance based) (Cytoskeleton, Denver, CO)を使用した。また KGP-18 は安田女子大学の松野研司教授よりご供与いただいた。

2. 定量 RT-PCR

ラット小腸は 8-10 週齢の雄性 Wistar ラット（日本エスエルシー、静岡、日本）から採取した。動物組織は QIAGEN RNeasy Plus Universal Mini Kit、細胞は QIAGEN RNeasy kit で total RNA を抽出した。TaKaRa Bio Prime Script RT reagent Kit で total RNA を逆転写し cDNA を作製した。PCR は StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific)を使用し、KOD SYBR qPCR Mix で反応を行った。用いたプライマーの配列および PCR 条件を以下に示す。

ラット Gpr35

Forward primer: 5'-GGA AAC ATC TTC AGC CGT GC-3'

Reverse primer: 5'-ATC TTG GCT CTT GTG GGG TG-3'

PCR 条件 : 98°C for 2 min → 40 cycles of 10 s at 98°C, 10 s at 60°C and 30 s at 68°C

PCR product: 153 bp

ラット Gapdh

Forward primer: 5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3'

Reverse primer: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

PCR 条件 : 98°C for 2 min → 40 cycles of 10 s at 98°C, 10 s at 60°C and 30 s at 68°C

PCR product: 307 bp

3. GPR35 発現ラットマスト細胞株の作製

アミノ末端に HA タグが付加されたラット GPR35 の遺伝子配列を組み込んだプラスミドベ

クター pApuro (HA-rGPR35/pApuro)をラット好塩基球性白血病/マスト細胞株 RBL-2H3 細胞 (JCRB 細胞バンク、大阪、日本)に導入し、ラット GPR35 を安定発現する細胞株 RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞を作製した。またプラスミドベクター(pApuro)のみを RBL-2H3 細胞に導入し、対照細胞株 RBL-2H3/mock 細胞を作製した。RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞および RBL-2H3/mock 細胞は、RPMI-1640 培地(10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 1 μ g/ml puromycin)を用い、37°Cおよび 5% CO₂ 条件下において培養した。

4. ラットマスト細胞株の IgE 結合能および細胞表面上 HA-rGPR35 発現解析

RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞あるいは RBL-2H3/mock 細胞を、緩衝液(PBS, 2% heat-inactivated FBS, 0.05% NaN₃)中において、抗 mouse CD16/CD32 抗体(dilution 1:30)と氷上で 10 分間反応させた。次いで抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7) (dilution 1:80)を添加し氷上で 20 分間反応させた後、抗 HA 抗体(isotype mouse IgG1- κ , clone HA124) (dilution 1:1600)を添加し氷上で 30 分間反応させた。1 次抗体を除去し、緩衝液中において FITC 標識抗 mouse IgE 抗体(dilution 1:500)および PE 標識抗 mouse IgG (H+L)抗体(dilution 1:100)を氷上で 30 分間反応させた。解析を行う直前に 20 μ g/mL ヨウ化プロピジウム溶液を加え、FACS Calibur (BD Biosciences)を用い解析した。GPR35 アゴニストによる細胞表面上 HA-rGPR35 発現変化を調べる検討では、RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞あるいは RBL-2H3/mock 細胞を、PIPES 緩衝液[25 mM PIPES-NaOH (pH 7.4), 125 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA]中において 1 μ M ザブリナストあるいは 1 μ M KGP-18 を 37°Cで 0、5、30、60 分間処理した。5% FBS を含む PBS で洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液で懸濁し、室温で 15 分間静置することで細胞を固定した。緩衝液により洗浄後、上記と同様に細胞表面上 HA-rGPR35 の発現レベルを FACS Calibur を用い解析した。

5. β -ヘキソサミニダーゼ活性による脱顆粒応答評価

IgE を介した抗原刺激では、RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞あるいは RBL-2H3/mock 細胞を、RPMI-1640 培地中において 50 ng/ml anti-DNP IgE (clone SPE-7)に 37°Cで 3 時間感作した。PIPES 緩衝液で洗浄し余分な IgE を除去した後、PIPES 緩衝液中において抗原である DNP-HSA (3, 10, 30, 100, 300 ng/ml)により 37°Cで 30 分間刺激した。また、タブシガージン(10, 30, 100, 300, 1000 nM)刺激は PIPES 緩衝液中において 37°Cで 30 分間行った。刺激後、160 x g、室温で 3 分間遠心分離し上清画分を回収した。細胞に 0.5% Triton X-100 を含む PIPES 緩衝液を加え透過処理を行い、15,000 x g、4°Cで 10 分間の遠心分離後、上清を回収し細胞内画分とした。脱顆粒応答は顆粒に含まれる酵素 (β -ヘキソサミニダーゼ) の活性を測定し評価した。 β -ヘキソサミニダーゼの基質である 3.3 mM *p*-nitrophenyl- β -D-2-acetoamide-2-deoxyglucopyranoside を含む 67 mM クエン酸緩衝液(pH 4.5)中において試料を 37°Cで 30 分間インキュベートした。250 mM glycine-NaOH (pH 10.7)を加え酵素反応を停止させた後、波長 405 nm における吸光度を測定し遊離した *p*-nitrophenol の量を算出した。総酵素活性 (上清画分と細胞内画分の酵素活性の合計) に対する上清画分の酵素活性の割合を求め、脱顆粒率(%)とした。その際、サンプルごとの総酵素活性は一定であることを確認した。

6. 線維型アクチンの蛍光免疫染色

IgE を介した抗原刺激では、RBL-2H3/HA-rGPPR35 細胞あるいは RBL-2H3/mock 細胞を、RPMI-1640 培地中において 50 ng/ml 抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7)に 37°Cで 3 時間感作した。PIPES 緩衝液で洗浄し余分な IgE を除去した後、PIPES 緩衝液中において抗原である 100 ng/ml DNP-HSA により 37°Cで 0、2、5、30 分間刺激した。300 nM タプシガージン刺激も PIPES 緩衝液中において 37°Cで 0、2、5、30 分間行った。また、1 μ M ザプリナストは PIPES 緩衝液中において 37°Cで 0、2、5、15、30 分間作用させた。細胞を DNP-HSA、タプシガージン、ザプリナストでそれぞれ処理した後、PIPES 緩衝液を除き、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液を添加し、室温で 20 分間静置することで細胞を固定した。PBS で 3 回洗浄し、0.2% Triton X-100 を含む PBS を添加し 10 分間静置して透過処理を行った。さらに PBS 洗浄後、1% BSA を含む PBS を添加し 30 分間静置してブロッキングを行った。1% BSA を含む PBS 中において、phalloidin-iFluor 488 reagent (dilution 1:2000)および 0.2 μ g/ml Hoechst 33342 水溶液を室温で 1 時間反応させ染色した。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM800 (Carl Zeiss AG) により取得し、Image J (version 1.53e)を用い解析した。

7. TGF- α shedding assay

GPCR の活性は Inoue らにより開発された TGF- α shedding assay を行い評価した[53]。内在性 G タンパク質 $G_{q, 11, 12, 13}$ の α サブユニットを遺伝的に欠損させた HEK293 細胞[75] に、GPR35 (ヒト、ラットおよびマウス)、キメラ G タンパク質($G_{\alpha_{q/s, 12, 13}}$)、AP 融合 TGF- α の遺伝子配列がそれぞれ組み込まれたプラスミドベクターpCAGGS を PEI: Polyethylenimine “Max” により一過性に導入した。トランスフェクション後、細胞を Hank's 緩衝液[5 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 137 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.26 mM $CaCl_2$, 0.44 mM KH_2PO_4 , 0.34 mM Na_2HPO_4 , 0.49 mM $MgCl_2$, 0.41 mM $MgSO_4$, 5.6 mM glucose]中において種々の化合物により 37°Cで 1 時間刺激した。刺激後、160 x g、室温で 3 分間遠心分離し細胞 (沈殿) と細胞外画分 (上清) に分けた。細胞画分と細胞外画分のそれぞれに AP の基質である 10 mM *p*-nitrophenylphosphate 溶液[40 mM Tris-HCl (pH 9.5), 40 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$]を添加し 37°Cで 1 時間インキュベートした。波長 405 nm における吸光度を測定し AP の活性を算出した。AP の総活性 (細胞画分と細胞外画分における AP 活性の合計) に対する細胞外画分の AP 活性の割合を求め、shedding 率 (%) とした。その際、サンプルごとの AP の総活性は一定であることを確認した。

8. GTP 型 RhoA 量測定

RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞あるいは RBL-2H3/mock 細胞を PIPES 緩衝液中において 37°Cで 3 時間インキュベートし血清飢餓状態とした。その際、生存率を保つため、50 ng/ml 抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7)を PIPES 緩衝液に添加した。PIPES 緩衝液で洗浄した後、PIPES 緩衝液中において 1 μ M ザプリナストを 37°Cで 0、2、5、10、15、30 分間処理した。また無処理の細胞も回収した。細胞を cell lysis buffer で懸濁し 10,000 x g、4°C で 1 分間遠心することにより細胞溶解液を作製した。GTP 型 RhoA 量は G-LISA RhoA activation assay biochem kit (absorbance based)により測定した。

9. 統計分析

データは独立した値または平均値±標準誤差で示す。独立した 2 群間の比較には two-tailed unpaired Student's *t* test を用いた。多群間の比較は one-way ANOVA により有意差を検定し、対照群との比較は Dunnett multiple comparison test、全ての群間比較は Tukey-Kramer multiple comparison test を用いた。また、two-way ANOVA により有意差を検定した多群間の比較は Holm-Sidak multiple comparison test を用いた。

第3節 結果

1. GPR35 強制発現による IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答の減弱

マスト細胞の研究において広く使用されているラットマスト細胞株 RBL-2H3 細胞について、GPR35 の mRNA 発現レベルを検討したところ、ラット腹腔マスト細胞と比較してほとんど発現が見られなかった(Fig. 8A)。そこで、アミノ末端に HA タグが付加されたラット GPR35 の遺伝子(pApuro/HA-rGPR35)を RBL-2H3 細胞に導入し、ラット GPR35 を安定発現する細胞株 RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞を樹立した。またプラスミドベクター(pApuro)のみを RBL-2H3 細胞に導入し、対照細胞株 RBL-2H3/mock 細胞を樹立した。HA タグに対する抗体および蛍光標識された二次抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行い、RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞の表面上に HA-rGPR35 が発現していることを確認した(Fig. 8B)。あらかじめ IgE を結合させた RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞および RBL-2H3/mock 細胞を IgE に対する蛍光抗体を用いフローサイトメトリー解析したところ、IgE 結合能（細胞表面上 FcεRI 発現レベル）は同程度であった(Fig. 8C)。RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞および RBL-2H3/mock 細胞を用い、タプシガージン刺激あるいは IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を比較した。タプシガージンにより誘発される脱顆粒応答は RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞と RBL-2H3/mock 細胞で同程度であった(Fig. 8D)。一方、RBL-2H3/HA-rGPR35 における IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答は、RBL-2H3/mock 細胞に比べ有意に減弱していた(Fig. 8E)。したがって、ラットマスト細胞株への GPR35 の強制発現は、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を低下させることが示された。マスト細胞に過剰発現した GPR35 は構成的活性を持ち、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ている可能性が考えられた。

2. GPR35 強制発現による定常状態の線維型アクチン量の増加

脱顆粒応答では細胞質の顆粒が形質膜と融合する必要がある、この過程では形質膜直下のアクチン骨格が再構成される[4]。そこで、RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞および RBL-2H3/mock 細胞を用い、脱顆粒応答時における線維型アクチン量を比較した。定常状態（非刺激時）における RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞の線維型アクチン量は、RBL-2H3/mock 細胞に比べ有意に増大していた(Fig. 9C, 9D)。タプシガージンにより誘発される脱顆粒応答では、刺激に応じて RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞の線維型アクチン量は RBL-2H3/mock 細胞と同程度まで速やかに低下した(Fig. 9A, 9C)。IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答では、いずれの細胞株においても抗原刺激により線維型アクチン量は減少傾向を示したが、RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞は RBL-2H3/mock 細胞に対し常に高い線維型アクチン量を維持していた (Fig. 9B, 9D)。マスト細胞に発現する GPR35 は定常状態における線維型アクチン量を増大させ、IgE を介した抗原刺激による一過性の減少に対しても抵抗性を与える可能性が考えられた。

3. ヒト、ラットおよびマウス GPR35 における三量体型 G タンパク質の共役

強制発現系を用いた検討から、GPR35 は様々な三量体型 G タンパク質と共役する可能性が報告されている[32, 37, 66]。マスト細胞における G_q および G_i の活性化はサイトゾルの Ca^{2+} 濃

度変化を引き起こすが、これらはむしろ脱顆粒応答を惹起することがあるものの、脱顆粒応答の抑制に直接関与するという報告はない。一方、 $G_{12/13}$ を介した細胞骨格の再構成が脱顆粒応答を調節する可能性[4]や、細胞質 cAMP レベルの増加が脱顆粒応答を抑制する可能性[76]について示唆する報告があり、本検討では $G_{12/13}$ および G_s との共役に着目した。実験では TGF- α の shedding 反応に関与する内在性の G タンパク質 $G_{q, 11, 12, 13}$ の α サブユニットを遺伝的に欠損させた HEK293 細胞を用いた[75]。 $G_{\alpha_{q, 11, 12, 13}}$ 欠損型 HEK293 細胞に各種 GPR35 (ヒト、ラット、マウス) および各キメラ G タンパク質 ($G_{\alpha_{q/s}}, G_{\alpha_{q/12}}, G_{\alpha_{q/13}}$) を一過性に発現させ、TGF- α shedding assay を用いてザプリナストによる GPR35 アゴニスト活性を評価した。 $G_{\alpha_{q/12}}$ あるいは $G_{\alpha_{q/13}}$ を導入した場合、ヒト、ラットおよびマウス GPR35 においてアゴニスト活性を示した。 $G_{\alpha_{q/s}}$ を導入した場合、マウス GPR35 ではアゴニスト活性を示し、ヒト GPR35 およびラット GPR35 ではほとんどアゴニスト活性を示さなかった(Fig. 10A-C)。

GPR35 を強制発現させたラットマスト細胞株において定常状態 (無刺激時) の線維型アクチン量が増大していた(Fig. 9C, 9D)ことから、GPR35 はアゴニストが存在しない定常状態においても活性を有することが推察された。実際、 $G_{\alpha_{q, 11, 12, 13}}$ 欠損型 HEK293 細胞に各種 GPR35 (ヒト、ラット、マウス) およびキメラ G タンパク質 ($G_{\alpha_{q/12}}, G_{\alpha_{q/13}}$) を一過性に発現させ、TGF- α shedding assay を用いてアゴニスト非存在下における活性を検討した結果、GPR35 と $G_{\alpha_{q/12}}, 13$ を共発現させた場合、GPR35 のみを発現させた場合に比べ、有意に高い shedding 率を示した(Fig. 10D)。さらに、ザプリナストを加えると濃度依存的なアゴニスト活性を示し、GPR35 発現プラスミド非導入条件においては、ザプリナストは全く活性を示さなかった(Fig. 10E)。以上の結果から、ヒト、ラットおよびマウス GPR35 は $G_{12/13}$ と共役し、構成的活性を示す可能性が示唆された。

4. ザプリナストによる RhoA 活性、線維型アクチン量および細胞表面上 GPR35 量の変化

三量体型 G タンパク質 $G_{12/13}$ は Rho ファミリーを活性化することで知られている。RhoA は Rho ファミリーのひとつであり、細胞骨格の制御に関わる低分子量 G タンパク質である。定常状態における GTP 型 RhoA (活性型 RhoA) の量は、RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞において、RBL-2H3/mock 細胞と比較し約 1.4 倍多く(Fig. 11A)、強制発現させた GPR35 は $G_{12/13}$ と共役することで RhoA を活性化し、線維型アクチン量を増大させた可能性が示唆された。次に、RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞および RBL-2H3/mock 細胞を用いザプリナスト処理による RhoA 活性、線維型アクチン量および細胞表面上 GPR35 量の経時的変化を検討した。GTP 型 RhoA 量は、RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞および RBL-2H3/mock 細胞を血清飢餓状態にした後、ザプリナストで処理し測定した。RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞ではザプリナスト処理から 2 分後、一過性の有意な GTP 型 RhoA 量の増加が観察されたが、RBL-2H3/mock 細胞では有意な変化は観察されなかった(Fig. 11B)。RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞ではザプリナスト処理から 2 分後、一過性に線維型アクチン量が有意に減少し、その後は回復し RBL-2H3/mock 細胞に比べ有意に高い線維型アクチン量を維持した。RBL-2H3/mock 細胞では線維型アクチン量の有意な変化は観察されなかった(Fig. 11C)。RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞では、ザプリナストまたは KGP-18 処理

から 5 分後、細胞表面の HA-rGPR35 量は有意に減少し、HEK293/HA-rGPR35 細胞を用いた検討と同様、GPR35 はアゴニスト刺激により速やかに内在化することを確認した(Fig. 1C, 11D)。

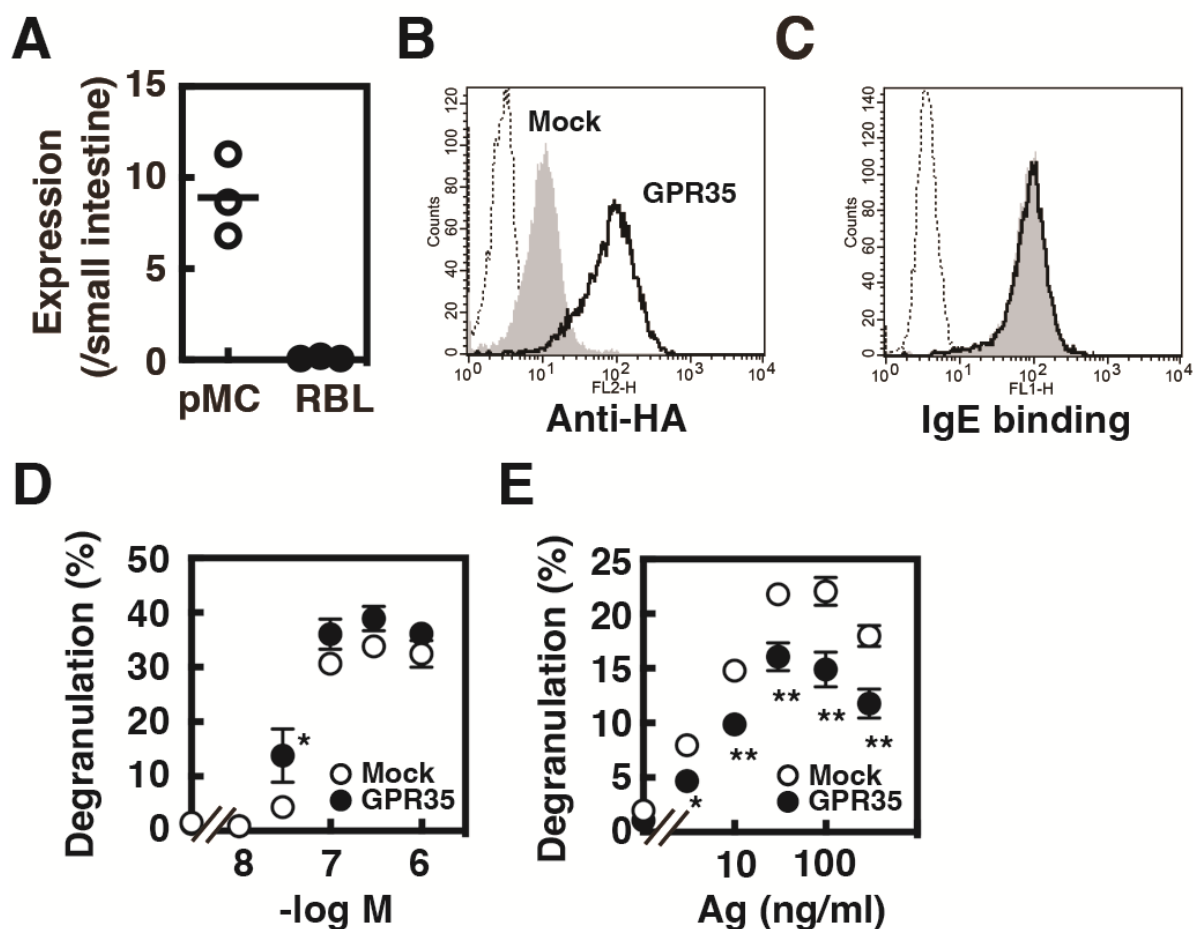


Figure 8 GPR35 発現マスト細胞株における IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答の減弱 (A) 精製ラット腹腔マスト細胞(pMC)および ラットマスト細胞株 RBL-2H3 細胞(RBL)から total RNA を抽出した。Total RNA を逆転写し cDNA を作製した後、定量的 RT-PCR によりラット GPR35 の mRNA 発現レベルを定量した。ラット小腸における GPR35 の mRNA 発現レベルを 1 として表した。(B) アミノ末端に HA タグが付加されたラット GPR35 (HA-rGPR35) を安定発現する細胞株 RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞(GPR35)、および HA-rGPR35 と同じプラスミドベクターのみを導入した対照細胞株 RBL-2H3/mock 細胞(Mock)を樹立した。細胞表面上 HA-rGPR35 発現レベルは抗 HA 抗体(clone HA124)および PE 標識抗 mouse IgG (H+L)抗体を用いフローサイトメトリーにより測定した。(C) 細胞表面上 FcεRI 発現レベル (IgE 結合能) は、RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞(GPR35)および RBL-2H3/mock 細胞(Mock)を IgE で感作した後、FITC 標識抗 mouse IgE 抗体を用いフローサイトメトリーにより測定した。(D) RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞(GPR35)および RBL-2H3/mock 細胞(Mock)を様々な濃度のタブシガージンにより刺激した。脱顆粒率(%)は β -ヘキソサミニダーゼ酵素活性を測定し算出した。値は平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(E) RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞(GPR35)および RBL-2H3/mock 細胞(Mock)を 50 ng/ml 抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7)で 3 時間感作し、抗原(Ag)として様々な濃度の DNP-HSA により刺激した。脱顆粒率(%)は β -ヘキソサミニダーゼ酵素活性を測定し算出した。値は平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(* p <0.05, ** p <0.01)

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

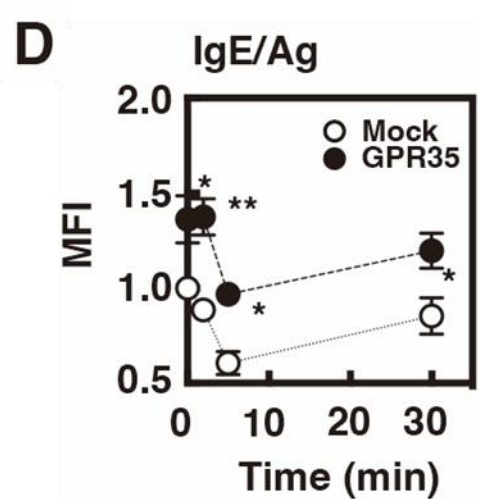
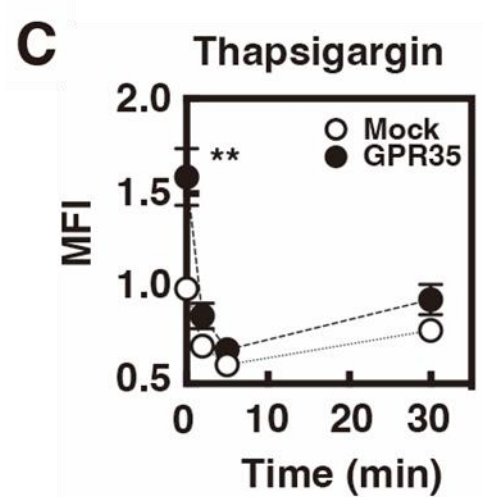
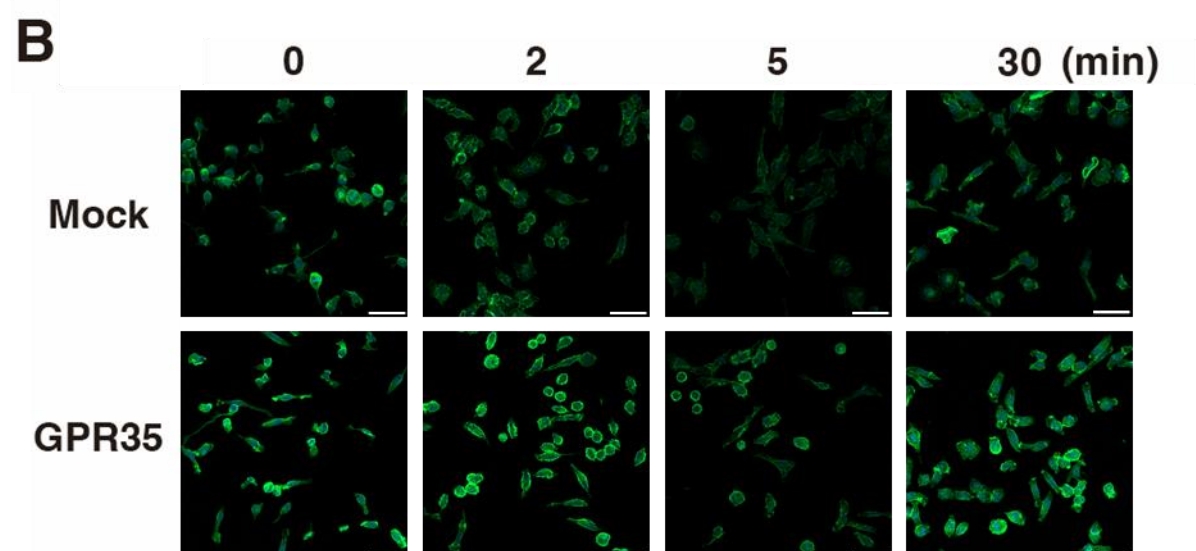
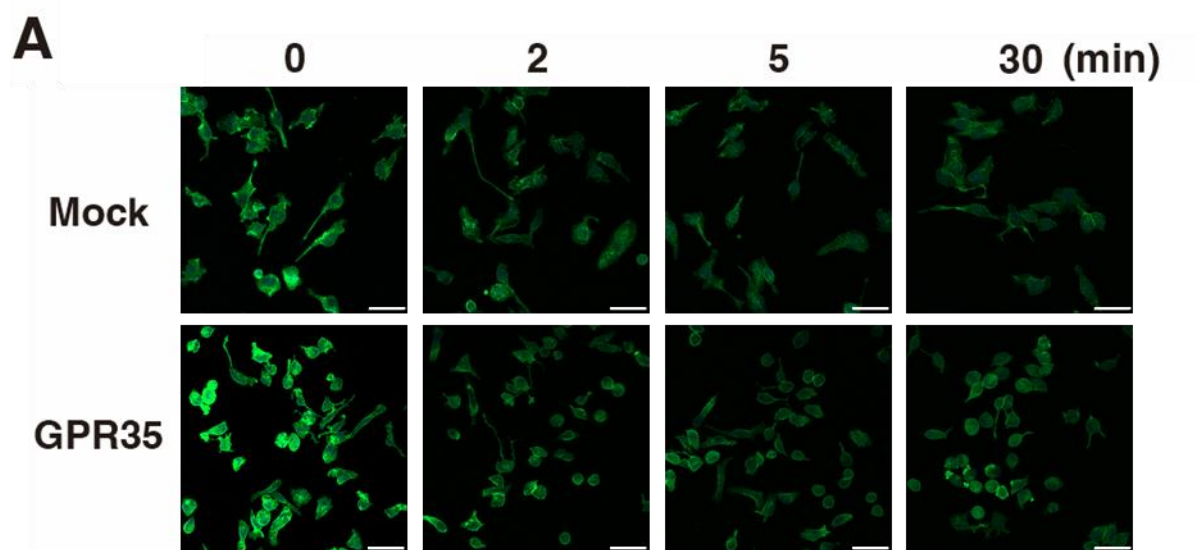


Figure 9 GPR35 過剰発現による定常状態ラットマスト細胞株の線維型アクチン量の増加
(A, C) RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞(GPR35)および RBL-2H3/mock 細胞(Mock)を 300 nM タブシ
ガージンにより 0、2、5、30 分間刺激した。(B, D) RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞(GPR35)および
RBL-2H3/mock 細胞(Mock)を 50 ng/ml 抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7)で 3 時間感作し、抗原で
ある 100 ng/ml DNP-HSA により 0、2、5、30 分間刺激した。(A-D) 線維型アクチンは phalloidin-
iFluor 488 reagent を用い可視化した。(A, B) 共焦点レーザー顕微鏡 LSM800 により蛍光画像
を取得した。スケールバーは 50 μ m を示す。(C, D) Image J により蛍光強度を解析した。グラ
フは RBL-2H3/mock 細胞の定常状態（非刺激時）における蛍光強度を 1 として表した。値は
平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

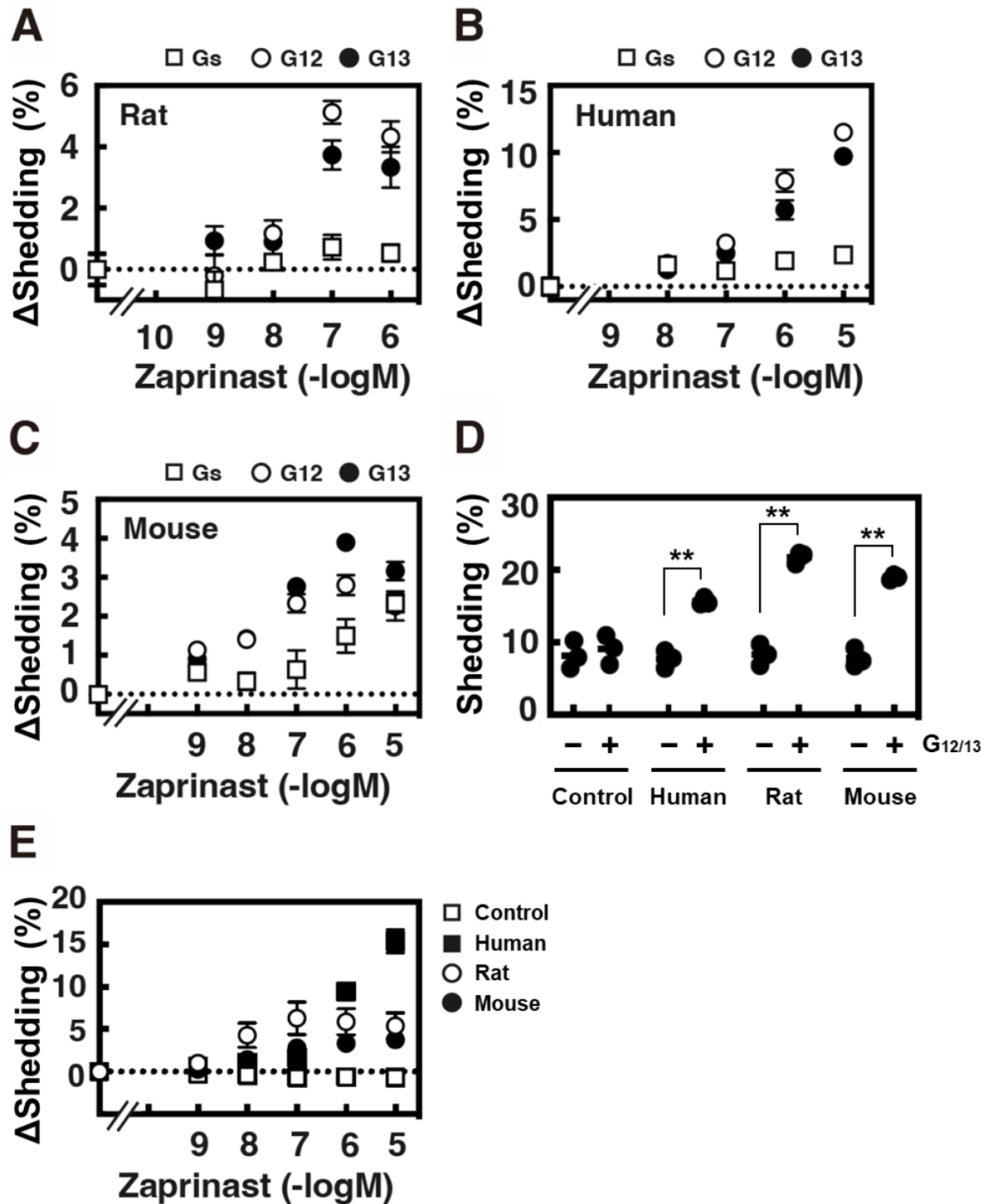


Figure 10 ヒト、ラットおよびマウス GPR35 における三量体型 G タンパク質の共役
 (A-C) $G\alpha_{q, 11, 12, 13}$ 欠損型 HEK293 細胞に、各種 GPR35 (ラット、ヒト、マウス)、各キメラ G タンパク質($G\alpha_{q/s, 12, 13}$)、AP 融合 TGF- α の遺伝子がそれぞれ組み込まれたプラスミドベクターを一過性に導入し、細胞を様々な濃度のザプリナストで刺激した。Shedding 率(%)は AP 酵素活性を測定し算出した。値はアゴニスト非存在下における shedding 率(%)を差し引き、平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(D) $G\alpha_{q, 11, 12, 13}$ 欠損型 HEK293 細胞に、各種 GPR35 (ヒト、ラット、マウス)、キメラ G タンパク質($G\alpha_{q/12, 13}$)、AP 融合 TGF- α の遺伝子がそれぞれ組み込まれたプ

ラスミドベクターを一過性に導入した。各種 GPR35 およびキメラ G タンパク質を導入しない場合、等量のプラスミドベクターのみを導入した。アゴニスト非存在下における shedding 率(%)について AP 酵素活性を測定し算出した。(E) $G\alpha_{q, 11, 12, 13}$ 欠損型 HEK293 細胞に、各種 GPR35 (ヒト、ラット、マウス)、キメラ G タンパク質($G\alpha_{q/12, 13}$)、AP 融合 TGF- α の遺伝子がそれぞれ組み込まれたプラスミドベクターを一過性に導入した。各種 GPR35 を導入しない場合、等量のプラスミドベクターのみを導入した。細胞を様々な濃度のザプリナストで刺激し、AP 酵素活性を測定することにより shedding 率(%)を算出した。値はアゴニスト非存在下における shedding 率(%)を差し引き、平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(**p<0.01)

Fig. 10A-C: Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

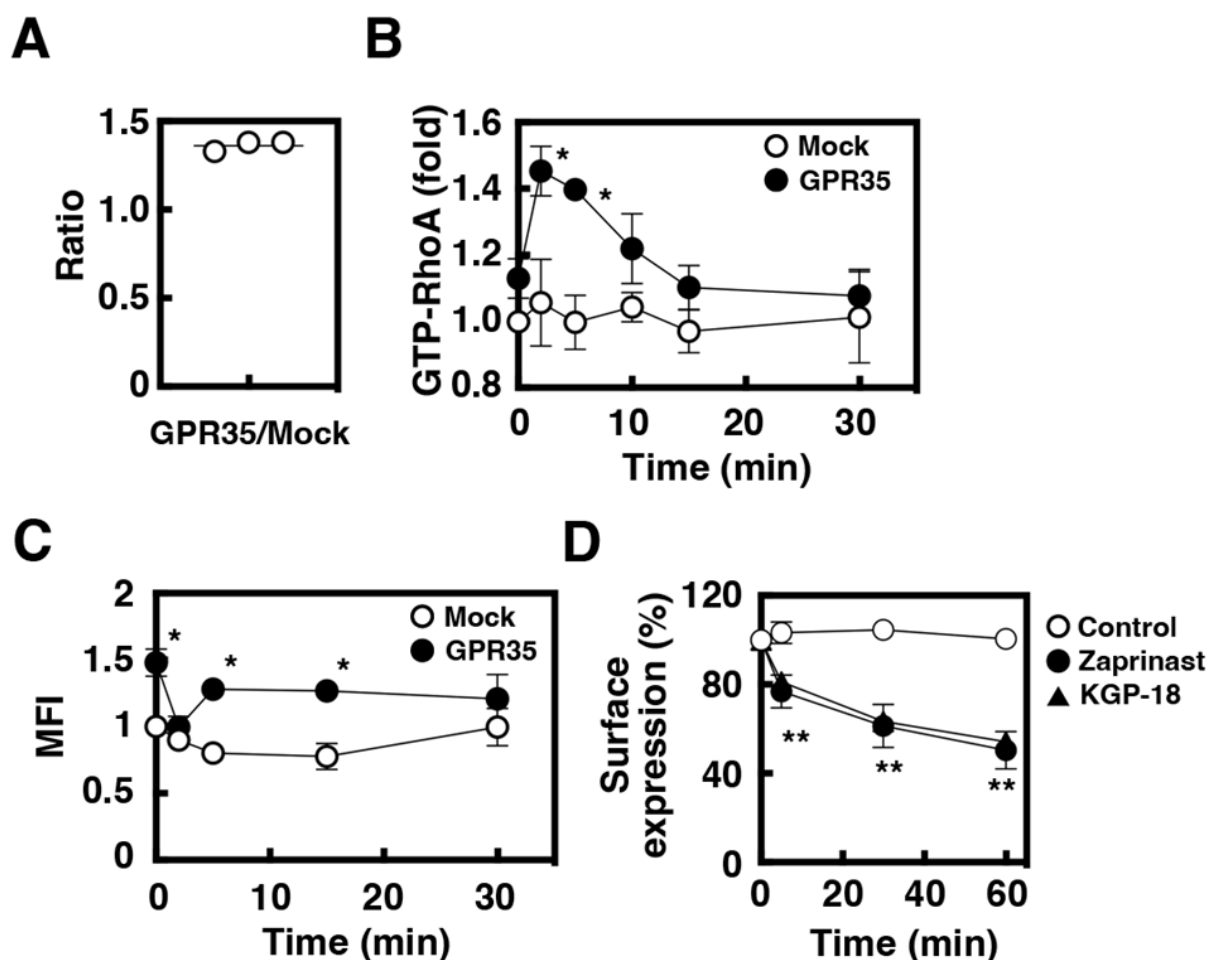


Figure 11 GPR35 下流シグナルとしての RhoA/アクチン経路の関与

(A) RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞および RBL-2H3/mock 細胞について、無刺激条件下における GTP 型 RhoA (活性型 RhoA) の量を測定した。RBL-2H3/mock 細胞の GTP 型 RhoA 量を 1 として表した。(B) RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞(GPR35)および RBL-2H3/mock 細胞(Mock)を、50 ng/ml 抗 DNP-IgE 抗体(clone SPE-7)を含む PIPES 緩衝液中において 3 時間インキュベートした後、1 μ M ザプリナストで 0、2、5、10、15、30 分間処理した。値は平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(C) RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞(GPR35)および RBL-2H3/mock 細胞(Mock)を 1 μ M ザプリナストにより 0、2、5、15、30 分間処理した。線維型アクチンは phalloidin-iFluor 488 reagent を用い可視化した。共焦点レーザー顕微鏡 LSM800 により蛍光画像を取得し、蛍光強度は Image J により解析した。グラフは RBL-2H3/mock 細胞の定常状態 (非刺激時) における蛍光強度を 1 として表した。値は平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(D) RBL-2H3/HA-rGPR35 細胞を 1 μ M ザプリナストあるいは 1 μ M KGP-18 により 0、5、30、60 分間処理した。細胞表面上 HA-rGPR35 発現レベルは抗 HA 抗体(isotype mouse IgG1- κ , clone HA124) および PE 標識抗 mouse IgG (H+L)抗体を用いフローサイトメトリーにより測定した。値は平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。(* p <0.05, ** p <0.01)

Oka et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press

第4節 考察

マスト細胞における脱顆粒応答のプロセスでは、アクチン骨格の脱重合が必要であると考えられている[4, 72]。Pfeiffer らは RBL-2H3 細胞を用いてファロイジンにより線維型アクチンを検出し、IgE を介した抗原刺激はマスト細胞における線維型アクチン量を速やかに減少させることを報告した[77]。本研究においても、GPR35 発現ラットマスト細胞株および対照細胞株のいずれにおいても、IgE を介した抗原刺激により線維型アクチン量の減少が認められた(Fig. 9D)。細胞膜付近に存在するアクチンは皮質アクチン[78]と呼ばれており、皮質アクチンネットワークはマスト細胞における顆粒と細胞膜の結合を妨げており、非リン酸化型コフィリンがアクチンネットワークを切断することにより脱顆粒を促進することが報告されている[79-82]。細胞膜付近には、アクチン骨格の形成を制御するアクチン結合タンパク質のひとつである、ERM タンパク質（エズリン、ラディキシン、モエシン）が存在するが[70]、DSCG によりモエシンのリン酸化が誘導されることが報告されている[71]。したがって、GPR35 は皮質アクチンの形成を促進することにより、マスト細胞の脱顆粒応答を抑制する可能性が考えられた。GPR35 発現ラットマスト細胞株における無刺激時の線維型アクチン量は、対照細胞に比べ有意に増大しており、RhoA 活性レベル（GTP 結合型）は対照細胞の約 1.4 倍であった。TGF- α shedding assay による解析では、ラット GPR35 とキメラ G タンパク質 $G_{q12,13}$ を共発現させることにより、ラット GPR35 のみ発現させた系に比べ、無刺激時における shedding 反応が有意に上昇していた。これらの結果は、マスト細胞に発現する GPR35 が $G_{12/13}$ と共役し RhoA を活性化することにより線維型アクチン量を構成的に増大させている可能性を示唆するものである。ラット GPR35 を強制発現させたラットマスト細胞株 RBL-2H3 細胞では、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答が、対照細胞に比べ有意に低下した(Fig. 8E)。GPR35 発現ラットマスト細胞株の線維型アクチン量は抗原刺激により一過的に減少したが、対照細胞と比較すると常に高い線維型アクチン量を維持していた(Fig. 11C)。このことから、GPR35 発現ラットマスト細胞株において形成されているアクチンネットワークは対照と比較して抗原刺激による変化に抵抗性をもつ可能性が考えられる。

ヒト GPR35 を強制発現させた HEK293 細胞を用いた検討では、ザプリナストによる RhoA の急速な活性化が報告されている[41]。本検討においても、GPR35 発現ラットマスト細胞株におけるザプリナストの処理により、RhoA 活性化レベルが一過性に上昇したが、一方、線維型アクチン量の一過性の減少も誘導された(Fig. 11B, C)。Sheshachalam らはマウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)および RBL-2H3 細胞を用いて、IgE を介した抗原刺激により RhoA の活性化レベルが上昇すること、また RhoA 阻害剤は IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を抑制することを示し、マスト細胞の脱顆粒応答におけるアクチン骨格の再形成において RhoA 活性化が関与することを報告した[83]。したがって、RhoA 活性化を伴う脱顆粒応答に対し、GPR35 シグナルも RhoA 活性化を介して脱顆粒応答を抑制することになり、単純に RhoA 活性化状態の制御では脱顆粒応答抑制効果を説明できない。GPR35 アゴニストにより活性化された GPR35 は、RhoA を介しアクチン骨格の再形成を誘導することにより脱顆粒応答とは異なるアクチンリモデリングを活性化し、同じく RhoA の活性化を伴う抗原刺激による脱顆粒

応答におけるアクチン骨格の再形成プロセスを妨げる可能性が考えられる。Klein らは RBL-2H3 細胞を用いて、RhoA エフェクターの 1 つである mammalian diaphanous-related formin 1 (mDial1) を RNA 干渉により発現抑制したところ、アクチン骨格の再形成およびケモタキシスが阻害されることを示した。逆に活性型 mDial1 の強制発現は、IgE を介した抗原刺激により活性化した RBL-2H3 細胞のケモタキシスを増強し、一方で脱顆粒応答は減弱することを報告した[84]。これは脱顆粒応答とケモタキシスがマスト細胞においてトレードオフの関係にあることを示唆している。mDial1 を含め、GPR35 により活性化された RhoA がどのようなエフェクターに結合するのかについて検討し、RhoA とともにアクチンリモデリングに作用するエフェクターに関して、脱顆粒応答と GPR35 によるアクチンリモデリングの間にどのような違いがあるか検討する必要がある。

ラットマスト細胞株における GPR35 の強制発現は、小胞体膜上の Ca^{2+} -ATPase 阻害剤であるタプシガージンによる脱顆粒応答には影響を与えず、IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答のみ減弱した。無刺激時は GPR35 発現ラットマスト細胞株において線維型アクチン量は有意に増大していたが、タプシガージンにより刺激した際には対照細胞と同程度まで減少した。また、精製ラット腹腔マスト細胞を用いた検討では、GPR35 アゴニストはタプシガージンによる脱顆粒応答に対しほとんど抑制効果を示さなかった。よって、マスト細胞に発現する GPR35 は、FcεRI を介したアクチン骨格の再形成プロセスを特異的に阻害していると考えられた。一方、精製ラット腹腔マスト細胞を用いた検討において、Mrgpr ファミリーのアゴニストであるカチオン性分泌促進物質 compound 48/80 により誘発された脱顆粒応答は GPR35 アゴニストにより部分的に抑制されるのみであった。Gaudenzio らはヒト末梢血由来培養マスト細胞を用いて検討を行い、IgE を介した抗原刺激誘発性脱顆粒応答と、Mrgpr ファミリーアゴニストであるサブスタンス P 誘発性脱顆粒応答の間には、その過程に質的な相違があることを明らかにした[85]。即ち、IgE を介する抗原刺激誘発性脱顆粒応答では、持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が誘導され、形質膜近傍の顆粒が融合するだけでなく、顆粒同士が融合した後に顆粒と形質膜が融合していた。一方で、サブスタンス P 誘発性脱顆粒応答では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は一過性であり、形質膜近傍の顆粒が速やかに形質膜と融合していた。この知見を考慮すると、タプシガージン誘発性脱顆粒応答の詳細なメカニズムは不明だが、GPR35 は IgE を介する脱顆粒応答における顆粒同士が融合するプロセスに対して阻害作用を示しているのかもしれない。本研究では線維型アクチンの量的な評価はしているが、アクチンネットワークの質的相違を検討していないため、さらなるメカニズムの解明のためには、高精細のイメージング等の手法を用いた詳細な形態学的解析が必要である。

GPR35 は主に三量体型 G タンパク質である $G_{12/13}$ や $G_{i/o}$ と共役する可能性が報告されている[32]。Barth らは、ヒト末梢血由来単核細胞に GPR35 が mRNA レベルで高発現しており、細胞接着分子であるフィブロネクチンおよび intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) に対する単核細胞の接着をキヌレン酸処理が増強することを報告した[34]。キヌレン酸処理による接着増強効果は、RNA 干渉による GPR35 発現抑制および百日咳毒素の処理による $G_{\alpha_{i/o}}$ の不活性化により減弱された。よってキヌレン酸は GPR35 を介して $G_{i/o}$ を活性化することにより単核細胞の接着を促進すると考えられた。最近の研究では、微生物叢を介したキヌレン酸産生

は、マウス小腸における GPR35 発現マクロファージの動員と蓄積に関与する可能性があることも報告されている[35]。De Giovanni らは、マウスの血液および腹膜に存在する好中球では腹膜炎の誘発により GPR35 の mRNA 発現が誘導されており、血小板およびマスト細胞から放出されるセロトニン代謝産物 5-HIAA が GPR35 に作用し好中球の遊走を促進することを報告した[33]。好中球特異的に GPR35 を欠損させた骨髄キメラマウスを用いた検討では、野生型マウスに比べ、炎症部位への好中球の動員が減少し、腹膜細菌を除去する効率は低下した。よって、GPR35 を介した 5-HIAA による好中球の遊走促進作用は、好中球を介した細菌の排除において重要な役割を果たしている可能性がある。また、De Giovanni らは真菌感染時の好酸球の動員においても、血小板およびマスト細胞から放出される 5-HIAA が好酸球に発現する GPR35 を活性化することにより促進されることを報告した[36]。これらの報告は GPR35 が G_i と共役することにより、単球、好中球および好酸球の接着と遊走の促進に関与している可能性を示唆している。一方、MRGPRX2 をはじめとするマスト細胞に発現する脱顆粒応答を促進する GPCR は G_i または G_q と共役することが示唆されており、マスト細胞において G_i や G_q の活性化は脱顆粒応答の誘発に関与する可能性が大きいと考えられる[5, 58]。本研究では、精製ラット腹腔マスト細胞に対し $G\alpha_{i/o}$ を不活性化すると考えられている百日咳毒素を前処理したが、DSCG による脱顆粒応答の抑制効果に影響は見られなかった(Fig. 1D)。したがって、DSCG による脱顆粒応答抑制効果においては、GPR35 は $G_{i/o}$ 以外の三量体型 G タンパク質 (G_s や $G_{12/13}$) と共役する可能性が考えられた。

いくつかの強制発現系を用いた解析から、GPR35 は三量体型 G タンパク質 G_{12} および G_{13} と共役することが示されている[22, 38, 66, 86]。Duan らはクライオ電子顕微鏡法を用い、ロドキサミドに結合したヒト GPR35 と G_{13} の複合体の構造を報告した[87]。本研究では、ヒト、ラットおよびマウスの GPR35 を G_{12} あるいは G_{13} と共発現させることにより、ザプリナストによる濃度依存的な shedding 反応を確認した(Fig. 10A-C)。また、ヒト、ラットおよびマウスの GPR35 と $G_{12/13}$ を共発現させた系では、GPR35 のみ発現させた系に比べ、アゴニスト非存在下における shedding 反応（構成的活性）が有意に上昇した(Fig. 10D)。Schihada らは HEK293 細胞にヒト GPR35 遺伝子、およびいずれかの三量体型 G タンパク質 (G_{i1} , G_{i2} , G_{i3} , G_o , G_q , G_s , G_z , G_{15} , G_{12} , G_{13}) を導入し、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)アッセイを用いてアゴニスト非存在下における活性レベルを測定した。その結果、アゴニスト非依存的な活性は G_z , G_{15} , G_{12} および G_{13} を発現させた系において観察され、 G_{12} あるいは G_{13} を発現させた場合に最も大きな活性を示した[86]。本研究では、アゴニスト非存在下において、GPR35 発現ラットマスト細胞株では RhoA 活性化レベルの上昇や線維型アクチン量の増加を見出したことから、マスト細胞に強制発現させた GPR35 はアゴニスト非存在下で活性を有する可能性が示唆された。過去の報告では、新生仔マウス由来心筋細胞に対するヒト GPR35 の強制発現は、アクチンネットワークに作用し、形態学的変化を引き起こした[88]。Guo らは、ラットの交感神経ニューロンに対しヒト GPR35 を過剰発現させることにより、アゴニスト非存在下において Ca^{2+} チャネル活性が阻害されることを報告している[89]。また、GPR35 の遺伝子の欠損が DSS 誘発性腸管炎症の増悪[29]や脂肪組織における炎症性サイトカイン産生の増大[24]を誘発することが報告されている。一方で、本研究では、GPR35 欠損型マウスを用いた検討において、成熟マス

ト細胞における IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答や PCA 応答では、野生型とほとんど相違が認められなかった。生体内の GPR35 の機能発現において、内在性のアゴニストによる反応と、構成的活性、いずれが重要な役割を担っているかを明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

本研究では、ザプリナストの処理がラット GPR35 発現ラットマスト細胞株における RhoA 活性化および線維型アクチン量の減少を誘導したが、その作用は一過性であった。また、ザプリナストおよび新規 GPR35 アゴニストは速やかに細胞表面上 GPR35 を内在化させた。精製ラット腹腔マスト細胞における検討では抗原と GPR35 アゴニストを同時処理することにより抑制効果が認められ、前処理では認められなかった。こうした結果は、GPR35 のアゴニスト依存的な作用が速やか、かつ一過性であることを示唆しているが、一方で *in vivo* における効果はアゴニストを前処理することでも認められており、臨床現場では DSCG は気管支喘息による発作の予防薬として用いられている。この点は一見したところ矛盾しており、アゴニストが長期間存在することによる作用についてはさらに検討を行う必要がある。

本章では、マスト細胞に発現する GPR35 は $G_{12/13}$ と共役し、RhoA を活性化させ、アクチン骨格の再構成を誘導することを明らかにした。また GPR35 により再構成されたアクチンネットワークは、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フォームである可能性が示唆された。

総括

現在も喘息治療薬として使用されている DSCG は、マスト細胞の脱顆粒応答を抑制することにより抗アレルギー作用を示すと考えられている[13]。DSCG の標的分子は長らく不明であったが、強制発現系を用いた解析より GPR35 アゴニスト活性を有することが報告された[21, 22]。そこで本研究では DSCG によるマスト細胞の脱顆粒応答抑制作用には GPR35 が関与するという仮説を立て、これを検証した。

第 1 章では、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を明らかにした。DSCG やキヌレン酸、ザプリナスト、新規 GPR35 アゴニストは GPR35 を発現する精製ラット腹腔マスト細胞において 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。ザプリナストおよび新規 GPR35 アゴニストは野生型成熟マウス骨髓由来培養マスト細胞(CTMCs)において IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答を抑制し、その作用は GPR35 欠損型 CTMCs において消失した。DSCG および新規 GPR35 アゴニストは野生型マウスにおける PCA 応答を抑制し、その効果は GPR35 遺伝子の欠損により消失した。

第 2 章では、マスト細胞に発現する GPR35 は RhoA の活性化を介して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を減弱させる可能性を示唆した。ラット GPR35 を強制発現させたラットマスト細胞株では、対照細胞に比べ無刺激時の RhoA 活性レベルは高い値を示し、線維型アクチン量も有意に増大していた。GPR35 発現細胞株では IgE を介した抗原刺激による脱顆粒応答は有意に減弱しており、抗原刺激に応じて線維型アクチン量は減少したが、常に高い線維型アクチン量を維持していた。ザプリナストは GPR35 を介し一過性の RhoA 活性レベルの上昇と線維型アクチン量の減少を誘導した。

以上より、本研究では DSCG による脱顆粒応答抑制作用はマスト細胞に発現する GPR35 に依存することを明らかにした。またマスト細胞において GPR35 は RhoA を活性化させアクチン骨格の再構成を誘導することにより、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。

DSCG は副作用の頻度や程度が低い優れた抗アレルギー薬であるが、半減期が短いことや消化管での吸収が少ないといった欠点をもつことが知られている[13, 14]。本研究は、マスト細胞に発現する GPR35 を標的とした新たなアレルギー疾患に対する治療薬の開発に資する基礎的知見を与えるものである。炎症性腸疾患(IBD)では消化管粘膜にマスト細胞が集積し、病態の増悪に寄与する可能性が示唆されている[90]。IBD の第一選択治療薬であるアミノサリチル酸およびそのプロドラッグであるオルサラジンは、強制発現系においてヒトおよびマウスの GPR35 に対しアゴニスト活性を示すことが報告された[91]。GPR35 に対する親和性がより高いオルサラジンは、DSS 誘発性大腸炎マウスモデルにおける体重減少や結腸収縮などの症状を緩和し、オルサラジンによる保護効果は GPR35 遺伝子欠損により消失した。肥満被験者の白色脂肪組織には健常者に比べマスト細胞が多く分布し、マスト細胞がエネルギー代謝の抑制に寄与している可能性が報告されている[92]。キヌレン酸は、高脂肪食を摂食させたマウスにおける体重増加や内臓脂肪量の増加などエネルギー代謝異常を改善し、その効果は

GPR35 欠損型マウスにおいて認められなかった[25]。このような疾患においても GPR35 アゴニストがマスト細胞に発現する GPR35 に作用し炎症反応を抑制している可能性があり、マスト細胞における GPR35 は新たな治療標的分子と考えられる。

引用文献

1. Galli, S. J.; Gaudenzio, N.; Tsai, M. Mast Cells in Inflammation and Disease: Recent Progress and Ongoing Concerns. *Annu. Rev. Immunol.* **2020**, *38* (1), 49–77.
2. Galli, S. J.; Tsai, M. IgE and Mast Cells in Allergic Disease. *Nat. Med.* **2012**, *18* (5), 693–704.
3. West, P. W.; Bulfone-Paus, S. Mast Cell Tissue Heterogeneity and Specificity of Immune Cell Recruitment. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 932090.
4. Ménasché, G.; Longé, C.; Bratti, M.; Blank, U. Cytoskeletal Transport, Reorganization, and Fusion Regulation in Mast Cell-Stimulus Secretion Coupling. *Fron. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 652077.
5. Ogasawara, H.; Noguchi, M. Therapeutic Potential of MRGPRX2 Inhibitors on Mast Cells. *Cells* **2021**, *10* (11), 2906.
6. Bulanova, E.; Bulfone-Paus, S. P2 Receptor-Mediated Signaling in Mast Cell Biology. *Purinergic Signal.* **2010**, *6* (1), 3–17.
7. Poto, R.; Criscuolo, G.; Marone, G.; Brightling, C. E.; Varricchi, G. Human Lung Mast Cells: Therapeutic Implications in Asthma. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (22), 14466.
8. De Carli, M.; Capezzali, E.; Tonon, S.; Frossi, B. Mechanism and Clinical Evidence of Immunotherapy in Allergic Rhinitis. *Front. Allergy* **2023**, *4*, 1217388.
9. Elieh Ali Komi, D.; Rambasek, T.; Bielory, L. Clinical Implications of Mast Cell Involvement in Allergic Conjunctivitis. *Allergy* **2018**, *73* (3), 528–539.
10. Brightling, C. E.; Bradding, P.; Symon, F. A.; Holgate, S. T.; Wardlaw, A. J.; Pavord, I. D. Mast-Cell Infiltration of Airway Smooth Muscle in Asthma. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346* (22), 1699–1705.
11. Casale, T. B.; Wood, D.; Richerson, H. B.; Zehr, B.; Zavala, D.; Hunninghake, G. W. Direct Evidence of a Role for Mast Cells in the Pathogenesis of Antigen-Induced Bronchoconstriction. *J. Clin. Invest.* **1987**, *80* (5), 1507–1511.
12. Cox, J. S. G. Disodium Cromoglycate (FPL 670)('Intal'): A Specific Inhibitor of Reaginic Antibody–Antigen Mechanisms. *Nature* **1967**, *216* (5122), 1328–1329.
13. Sinniah, A.; Yazid, S.; Flower, R. J. The Anti-Allergic Cromones: Past, Present, and Future. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 827.
14. Brogden, R. N.; Speight, T. M.; Avery, G. S. Sodium Cromoglycate (Cromolyn Sodium): A Review of Its Mode of Action, Pharmacology, Therapeutic Efficacy and Use. *Drugs* **1974**, *7* (3), 164–282.
15. Leung, K. B.; Flint, K. C.; Brostoff, J.; Hudspeth, B. N.; Johnson, N. M.; Lau, H. Y.; Liu, W. L.; Pearce, F. L. Effects of Sodium Cromoglycate and Nedocromil Sodium on Histamine Secretion from Human Lung Mast Cells. *Thorax* **1988**, *43* (10), 756–761.
16. Shichijo, M.; Inagaki, N.; Nakai, N.; Kimata, M.; Nakahata, T.; Serizawa, I.; Iikura, Y.; Saito, H.; Nagai, H. The Effects of Anti-Asthma Drugs on Mediator Release from Cultured Human Mast Cells. *Clin. Exp. Allergy* **1998**, *28* (10), 1228–1236.

17. Assem, E. S. K.; Richter, A. W. Comparison of in Vivo and in Vitro Inhibition of the Anaphylactic Mechanism by β -Adrenergic Stimulants and Disodium Cromoglycate. *Immunology* **1971**, 21 (5), 729-739.
18. Sinniah, A.; Yazid, S.; Perretti, M.; Solito, E.; Flower, R. J. The Role of the Annexin-A1/FPR2 System in the Regulation of Mast Cell Degranulation Provoked by Compound 48/80 and in the Inhibitory Action of Nedocromil. *Int. immunopharmacol.* **2016**, 32, 87–95.
19. Oka, T.; Kalesnikoff, J.; Starkl, P.; Tsai, M.; Galli, S. J. Evidence Questioning Cromolyn's Effectiveness and Selectivity as a "Mast Cell Stabilizer" in Mice. *Lab. Invest.* **2012**, 92 (10), 1472–1482.
20. Kobayashi, K.; Hiroi, J.; Kishi, S.; Sawase, K.; Hirayama, Y.; Chihara, S.; Imai, T.; Shigi, Y.; Shimomura, K.; Kohsaka, M. Effects of Quinotolast, a New Orally Active Antiallergic Drug, on Experimental Allergic Models. *Jpn. J. Pharmacol.* **1993**, 63 (1), 73–81.
21. Yang, Y.; Lu, J. Y.-L.; Wu, X.; Summer, S.; Whoriskey, J.; Saris, C.; Reagan, J. D. G-Protein-Coupled Receptor 35 Is a Target of the Asthma Drugs Cromolyn Disodium and Nedocromil Sodium. *Pharmacology* **2010**, 86 (1), 1–5.
22. Jenkins, L.; Brea, J.; Smith, N. J.; Hudson, B. D.; Reilly, G.; Bryant, N. J.; Castro, M.; Loza, M.-I.; Milligan, G. Identification of Novel Species-Selective Agonists of the G-Protein-Coupled Receptor GPR35 That Promote Recruitment of β -Arrestin-2 and Activate $G\alpha 13$. *Biochem. J.* **2010**, 432 (3), 451–459.
23. Taniguchi, Y.; Tonai-Kachi, H.; Shinjo, K. Zaprinast, a Well-Known Cyclic Guanosine Monophosphate-Specific Phosphodiesterase Inhibitor, Is an Agonist for GPR35. *FEBS Lett.* **2006**, 580 (21), 5003–5008.
24. Agudelo, L. Z.; Ferreira, D. M.; Cervenka, I.; Bryzgalova, G.; Dadvar, S.; Jannig, P. R.; Pettersson-Klein, A. T.; Lakshmikanth, T.; Sustarsic, E. G.; Porsmyr-Palmertz, M. Kynurenic Acid and Gpr35 Regulate Adipose Tissue Energy Homeostasis and Inflammation. *Cell Metab.* **2018**, 27 (2), 378–392.
25. Wang, D.; Li, D.; Zhang, Y.; Chen, J.; Zhang, Y.; Liao, C.; Qin, S.; Tian, Y.; Zhang, Z.; Xu, F. Functional Metabolomics Reveal the Role of AHR/GPR35 Mediated Kynurenic Acid Gradient Sensing in Chemotherapy-Induced Intestinal Damage. *Acta Pharm. Sin. B* **2021**, 11 (3), 763–780.
26. Horikawa, Y.; Oda, N.; Cox, N. J.; Li, X.; Orho-Melandar, M.; Hara, M.; Hinokio, Y.; Lindner, T. H.; Mashima, H.; Schwarz, P. E. Genetic Variation in the Gene Encoding Calpain-10 Is Associated with Type 2 Diabetes Mellitus. *Nat. Genet.* **2000**, 26 (2), 163–175.
27. Imielinski, M.; Baldassano, R. N.; Griffiths, A.; Russell, R. K.; Annese, V.; Dubinsky, M.; Kugathasan, S.; Bradfield, J. P.; Walters, T. D.; Sleiman, P. Common Variants at Five New Loci Associated with Early-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Genet.* **2009**, 41 (12), 1335–1340.
28. Ellinghaus, D.; Folseraas, T.; Holm, K.; Ellinghaus, E.; Melum, E.; Balschun, T.; Laerdahl, J. K.; Shiryayev, A.; Gotthardt, D. N.; Weismüller, T. J.; Schramm, C.; Wittig, M.; Bergquist, A.; Björnsson, E.; Marschall, H.-U.; Vatn, M.; Teufel, A.; Rust, C.; Gieger, C.; Wichmann, H.-E.; Runz, H.; Sterneck, M.; Rupp, C.; Braun, F.; Weersma, R. K.; Wijmenga, C.; Ponsioen, C. Y.;

- Mathew, C. G.; Rutgeerts, P.; Vermeire, S.; Schrumpf, E.; Hov, J. R.; Manns, M. P.; Boberg, K. M.; Schreiber, S.; Franke, A.; Karlsen, T. H. Genome-Wide Association Analysis in Primary Sclerosing Cholangitis and Ulcerative Colitis Identifies Risk Loci at *GPR35* and *TCF4*. *Hepatology* **2013**, 58 (3), 1074–1083.
29. Farooq, S. M.; Hou, Y.; Li, H.; O'Meara, M.; Wang, Y.; Li, C.; Wang, J.-M. Disruption of *GPR35* Exacerbates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *Dig. Dis. Sci.* **2018**, 63, 2910–2922.
 30. Kaya, B.; Doñas, C.; Wuggenig, P.; Diaz, O. E.; Morales, R. A.; Melhem, H.; Hernández, P. P.; Kaymak, T.; Das, S.; Hruz, P. Lysophosphatidic Acid-Mediated *GPR35* Signaling in CX3CR1+ Macrophages Regulates Intestinal Homeostasis. *Cell Rep.* **2020**, 32 (5), 107979.
 31. Wu, Y.; Zhang, P.; Fan, H.; Zhang, C.; Yu, P.; Liang, X.; Chen, Y. *GPR35* Acts a Dual Role and Therapeutic Target in Inflammation. *Front. Immunol.* **2023**, 14, 1254446.
 32. Park, S.; Lee, S.; Nam, S.; Im, D. *GPR35* Mediates Lodoxamide-induced Migration Inhibitory Response but Not CXCL17-induced Migration Stimulatory Response in THP-1 Cells; Is *GPR35* a Receptor for CXCL17? *Br. J. Pharmacol.* **2018**, 175 (1), 154–161.
 33. De Giovanni, M.; Tam, H.; Valet, C.; Xu, Y.; Looney, M. R.; Cyster, J. G. *GPR35* Promotes Neutrophil Recruitment in Response to Serotonin Metabolite 5-HIAA. *Cell* **2022**, 185 (5), 815–830.
 34. Barth, M. C.; Ahluwalia, N.; Anderson, T. J.; Hardy, G. J.; Sinha, S.; Alvarez-Cardona, J. A.; Pruitt, I. E.; Rhee, E. P.; Colvin, R. A.; Gerszten, R. E. Kynurenic Acid Triggers Firm Arrest of Leukocytes to Vascular Endothelium under Flow Conditions. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284 (29), 19189–19195.
 35. Miyamoto, K.; Sujino, T.; Harada, Y.; Ashida, H.; Yoshimatsu, Y.; Yonemoto, Y.; Nemoto, Y.; Tomura, M.; Melhem, H.; Niess, J. H. The Gut Microbiota-Induced Kynurenic Acid Recruits *GPR35*-Positive Macrophages to Promote Experimental Encephalitis. *Cell Rep.* **2023**, 42 (8), 113005.
 36. De Giovanni, M.; Dang, E. V.; Chen, K. Y.; An, J.; Madhani, H. D.; Cyster, J. G. Platelets and Mast Cells Promote Pathogenic Eosinophil Recruitment during Invasive Fungal Infection via the 5-HIAA-*GPR35* Ligand-Receptor System. *Immunity* **2023**, 56, 1548–1560.
 37. Wang, J.; Simonavicius, N.; Wu, X.; Swaminath, G.; Reagan, J.; Tian, H.; Ling, L. Kynurenic Acid as a Ligand for Orphan G Protein-Coupled Receptor *GPR35*. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281 (31), 22021–22028.
 38. Jenkins, L.; Alvarez-Curto, E.; Campbell, K.; de Munnik, S.; Canals, M.; Schlyer, S.; Milligan, G. Agonist Activation of the G Protein-Coupled Receptor *GPR35* Involves Transmembrane Domain III and Is Transduced via $G\alpha_{13}$ and β -Arrestin-2. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, 162 (3), 733–748.
 39. De Giovanni, M.; Chen, H.; Li, X.; Cyster, J. G. *GPR35* and Mediators from Platelets and Mast Cells in Neutrophil Migration and Inflammation. *Immunol. Rev.* **2023**, 317 (1), 187–202.
 40. Wirthgen, E.; Hoeflich, A.; Rebl, A.; Günther, J. Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions. *Front. Immunol.* **2018**, 8, 1957.

41. Oka, S.; Ota, R.; Shima, M.; Yamashita, A.; Sugiura, T. GPR35 Is a Novel Lysophosphatidic Acid Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 395 (2), 232–237.
42. Lee, J. H.; Kim, D.; Oh, Y. S.; Jun, H.-S. Lysophosphatidic Acid Signaling in Diabetic Nephropathy. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (11), 2850.
43. Southern, C.; Cook, J. M.; Neetoo-Isseljee, Z.; Taylor, D. L.; Kettleborough, C. A.; Merritt, A.; Bassoni, D. L.; Raab, W. J.; Quinn, E.; Wehrman, T. S.; Davenport, A. P.; Brown, A. J.; Green, A.; Wigglesworth, M. J.; Rees, S. Screening β -Arrestin Recruitment for the Identification of Natural Ligands for Orphan G-Protein–Coupled Receptors. *J. Biomol. Screen.* **2013**, 18 (5), 599–609.
44. Milligan, G. GPR35: From Enigma to Therapeutic Target. *Trends Pharmacol. Sci.* **2023**, 44 (5), 263–273.
45. Thomson, D. S.; Evans, D. P. Inhibition of Immediate Hypersensitivity Reactions by Disodium Cromoglycate. Requirements for Activity in Two Laboratory Models. *Clin. Exp. Immunol.* **1973**, 13 (4), 537–544.
46. Marshall, R. Protective Effect of Disodium Cromoglycate on Rat Peritoneal Mast Cells. *Thorax* **1972**, 27 (1), 38–43.
47. Kusner, E. J.; Dubnick, B.; Herzig, D. J. The Inhibition by Disodium Cromoglycate in Vitro of Anaphylactically Induced Histamine Release from Rat Peritoneal Mast Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1973**, 184 (1), 41–46.
48. Zhao, P.; Sharir, H.; Kapur, A.; Cowan, A.; Geller, E. B.; Adler, M. W.; Seltzman, H. H.; Reggio, P. H.; Heynen-Genel, S.; Sauer, M. Targeting of the Orphan Receptor GPR35 by Pamoic Acid: A Potent Activator of Extracellular Signal-Regulated Kinase and β -Arrestin2 with Antinociceptive Activity. *Mol. Pharmacol.* **2010**, 78 (4), 560–568.
49. Tsukahara, T.; Hamouda, N.; Utsumi, D.; Matsumoto, K.; Amagase, K.; Kato, S. G Protein-Coupled Receptor 35 Contributes to Mucosal Repair in Mice via Migration of Colonic Epithelial Cells. *Pharmacol. Res.* **2017**, 123, 27–39.
50. Quon, T.; Lin, L.-C.; Ganguly, A.; Tobin, A. B.; Milligan, G. Therapeutic Opportunities and Challenges in Targeting the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR35. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2020**, 3 (5), 801–812.
51. Tanaka, S.; Takasu, Y.; Mikura, S.; Satoh, N.; Ichikawa, A. Antigen-Independent Induction of Histamine Synthesis by Immunoglobulin E in Mouse Bone Marrow–Derived Mast Cells. *J. Exp. Med.* **2002**, 196 (2), 229–235.
52. Takano, H.; Nakazawa, S.; Okuno, Y.; Shirata, N.; Tsuchiya, S.; Kainoh, T.; Takamatsu, S.; Furuta, K.; Taketomi, Y.; Naito, Y.; Takematsu, H.; Kozutsumi, Y.; Tsujimoto, G.; Murakami, M.; Kudo, I.; Ichikawa, A.; Nakayama, K.; Sugimoto, Y.; Tanaka, S. Establishment of the Culture Model System That Reflects the Process of Terminal Differentiation of Connective Tissue-type Mast Cells. *FEBS Lett.* **2008**, 582 (10), 1444–1450.

53. Inoue, A.; Ishiguro, J.; Kitamura, H.; Arima, N.; Okutani, M.; Shuto, A.; Higashiyama, S.; Ohwada, T.; Arai, H.; Makide, K. TGF α Shedding Assay: An Accurate and Versatile Method for Detecting GPCR Activation. *Nat. Methods* **2012**, 9 (10), 1021–1029.
54. Gong, Z.-K.; Wang, S.-J.; Huang, Y.-Q.; Zhao, R.-Q.; Zhu, Q.-F.; Lin, W.-Z. Identification and Validation of Suitable Reference Genes for RT-qPCR Analysis in Mouse Testis Development. *Mol. Genet. Genomics* **2014**, 289, 1157–1169.
55. Funke, M.; Thimm, D.; Schiedel, A. C.; Müller, C. E. 8-Benzamidochromen-4-One-2-Carboxylic Acids: Potent and Selective Agonists for the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR35. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (12), 5182–5197.
56. MacKenzie, A. E.; Caltabiano, G.; Kent, T. C.; Jenkins, L.; McCallum, J. E.; Hudson, B. D.; Nicklin, S. A.; Fawcett, L.; Markwick, R.; Charlton, S. J. The Antiallergic Mast Cell Stabilizers Lodoxamide and Bufrolin as the First High and Equipotent Agonists of Human and Rat GPR35. *Mol. Pharmacol.* **2014**, 85 (1), 91–104.
57. Metcalfe, D. D.; Baram, D.; Mekori, Y. A. Mast Cells. *Physiol. Rev.* **1997**, 77 (4), 1033–1079.
58. Yu, Y.; Blokhuis, B. R.; Garssen, J.; Redegeld, F. A. Non-IgE Mediated Mast Cell Activation. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, 778, 33–43.
59. Sung, C.; Saunders, H. L.; Krell, R. D.; Chakrin, L. W. Studies on the Mechanism of Tachyphylaxis to Disodium Cromoglycate. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1977**, 55 (1–6), 374–384.
60. Church, M. K.; Hiroi, J. Inhibition of IgE-Dependent Histamine Release from Human Dispersed Lung Mast Cells by Anti-Allergic Drugs and Salbutamol. *Br. J. Pharmacol.* **1987**, 90 (2), 421–429.
61. Wyant, G. A.; Yu, W.; Doulamis, I. P.; Nomoto, R. S.; Saeed, M. Y.; Duignan, T.; McCully, J. D.; Kaelin, W. G. Mitochondrial Remodeling and Ischemic Protection by G Protein-Coupled Receptor 35 Agonists. *Science* **2022**, 377 (6606), 621–629.
62. Lin, D. A.; Boyce, J. A. IL-4 Regulates MEK Expression Required for Lysophosphatidic Acid-Mediated Chemokine Generation by Human Mast Cells. *J. Immunol.* **2005**, 175 (8), 5430–5438.
63. Lundequist, A.; Boyce, J. A. LPA5 Is Abundantly Expressed by Human Mast Cells and Important for Lysophosphatidic Acid Induced MIP-1 β Release. *PLOS One* **2011**, 6 (3), e18192.
64. Bagga, S.; Price, K. S.; Lin, D. A.; Friend, D. S.; Austen, K. F.; Boyce, J. A. Lysophosphatidic Acid Accelerates the Development of Human Mast Cells. *Blood* **2004**, 104 (13), 4080–4087.
65. Bot, M.; de Jager, S. C.; MacAleese, L.; Lagraauw, H. M.; van Berkel, T. J.; Quax, P. H.; Kuiper, J.; Heeren, R. M.; Biessen, E. A.; Bot, I. Lysophosphatidic Acid Triggers Mast Cell-Driven Atherosclerotic Plaque Destabilization by Increasing Vascular Inflammation [S]. *J. Lipid. Res.* **2013**, 54 (5), 1265–1274.
66. Mackenzie, A. E.; Quon, T.; Lin, L.-C.; Hauser, A. S.; Jenkins, L.; Inoue, A.; Tobin, A. B.; Gloriam, D. E.; Hudson, B. D.; Milligan, G. Receptor Selectivity between the G Proteins G α 12 and G α 13 Is Defined by a Single Leucine-to-Isoleucine Variation. *FASEB J.* **2019**, 33 (4), 5005–5017.
67. Siehler, S. Regulation of RhoGEF Proteins by G12/13-Coupled Receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 158 (1), 41–49.

68. Theoharides, T. C.; Kempuraj, D. Potential Role of Moesin in Regulating Mast Cell Secretion. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24 (15), 12081.
69. Senju, Y.; Tsai, F.-C. A Biophysical Perspective of the Regulatory Mechanisms of Ezrin/Radixin/Moesin Proteins. *Biophys. Rev.* **2022**, 14 (1), 199–208.
70. García-Ortiz, A.; Serrador, J. M. ERM Proteins at the Crossroad of Leukocyte Polarization, Migration and Intercellular Adhesion. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21 (4), 1502.
71. Theoharides, T. C.; Wang, L.; Pang, X.; Letourneau, R.; Culm, K. E.; Basu, S.; Wang, Y.; Correia, I. Cloning and Cellular Localization of the Rat Mast Cell 78-kDa Protein Phosphorylated in Response to the Mast Cell “Stabilizer” Cromolyn. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 294 (3), 810–821.
72. Lazki-Hagenbach, P.; Klein, O.; Sagi-Eisenberg, R. The Actin Cytoskeleton and Mast Cell Function. *Curr. Opin. Immunol.* **2021**, 72, 27–33.
73. Wilson, J. D.; Shelby, S. A.; Holowka, D.; Baird, B. Rab11 Regulates the Mast Cell Exocytic Response. *Traffic* **2016**, 17 (9), 1027–1041.
74. Martin-Verdeaux, S.; Pombo, I.; Iannascoli, B.; Roa, M.; Varin-Blank, N.; Rivera, J.; Blank, U. Evidence of a Role for Munc18-2 and Microtubules in Mast Cell Granule Exocytosis. *J. Cell. Sci.* **2003**, 116 (2), 325–334.
75. Devost, D.; Sleno, R.; Pétrin, D.; Zhang, A.; Shinjo, Y.; Okde, R.; Aoki, J.; Inoue, A.; Hébert, T. E. Conformational Profiling of the AT1 Angiotensin II Receptor Reflects Biased Agonism, G Protein Coupling, and Cellular Context. *J. Biol. Chem.* **2017**, 292 (13), 5443–5456.
76. Peachell, P. Regulation of Mast Cells by Beta-Agonists. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2006**, 31 (2–3), 131–142.
77. Pfeiffer, J. R.; Seagrave, J. C.; Davis, B. H.; Deanin, G. G.; Oliver, J. M. Membrane and Cytoskeletal Changes Associated with IgE-Mediated Serotonin Release from Rat Basophilic Leukemia Cells. *J. Cell Biol.* **1985**, 101 (6), 2145–2155.
78. Svitkina, T. M. Actin Cell Cortex: Structure and Molecular Organization. *Trends Cell Biol.* **2020**, 30 (7), 556–565.
79. Koffer, A.; Tatham, P. E.; Gomperts, B. D. Changes in the State of Actin during the Exocytotic Reaction of Permeabilized Rat Mast Cells. *J. Cell Biol.* **1990**, 111 (3), 919–927.
80. Nishida, K.; Yamasaki, S.; Ito, Y.; Kabu, K.; Hattori, K.; Tezuka, T.; Nishizumi, H.; Kitamura, D.; Goitsuka, R.; Geha, R. S.; Yamamoto, T.; Yagi, T.; Hirano, T. FcεRI-Mediated Mast Cell Degranulation Requires Calcium-Independent Microtubule-Dependent Translocation of Granules to the Plasma Membrane. *J. Cell Biol.* **2005**, 170 (1), 115–126.
81. Sakuma, M.; Shirai, Y.; Yoshino, K.; Kuramasu, M.; Nakamura, T.; Yanagita, T.; Mizuno, K.; Hide, I.; Nakata, Y.; Saito, N. Novel PKCα-Mediated Phosphorylation Site(s) on Cofilin and Their Potential Role in Terminating Histamine Release. *Mol. Biol. Cell* **2012**, 23 (18), 3707–3721.
82. Ang, W. G.; Church, A. M.; Kulis, M.; Choi, H. W.; Burks, A. W.; Abraham, S. N. Mast Cell Desensitization Inhibits Calcium Flux and Aberrantly Remodels Actin. *J. Clin. Invest.* **2016**, 126 (11), 4103–4118.

83. Sheshachalam, A.; Baier, A.; Eitzen, G. The Effect of Rho Drugs on Mast Cell Activation and Degranulation. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, 102 (1), 71–81.
84. Klein, O.; Krier-Burris, R. A.; Lazki-Hagenbach, P.; Gorzalczy, Y.; Mei, Y.; Ji, P.; Bochner, B. S.; Sagi-Eisenberg, R. Mammalian Diaphanous-Related Formin 1 (mDia1) Coordinates Mast Cell Migration and Secretion through Its Actin-Nucleating Activity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2019**, 144 (4), 1074–1090.
85. Gaudenzio, N.; Sibilano, R.; Marichal, T.; Starkl, P.; Reber, L. L.; Cenac, N.; McNeil, B. D.; Dong, X.; Hernandez, J. D.; Sagi-Eisenberg, R. Different Activation Signals Induce Distinct Mast Cell Degranulation Strategies. *J. Clin. Invest.* **2016**, 126 (10), 3981–3998.
86. Schihada, H.; Klompstra, T. M.; Humphrys, L. J.; Cervenka, I.; Dadvar, S.; Kolb, P.; Ruas, J. L.; Schulte, G. Isoforms of GPR35 Have Distinct Extracellular N-Termini That Allosterically Modify Receptor-Transducer Coupling and Mediate Intracellular Pathway Bias. *J. Biol. Chem.* **2022**, 298 (9), 102328.
87. Duan, J.; Liu, Q.; Yuan, Q.; Ji, Y.; Zhu, S.; Tan, Y.; He, X.; Xu, Y.; Shi, J.; Cheng, X. Insights into Divalent Cation Regulation and G13-Coupling of Orphan Receptor GPR35. *Cell Discov.* **2022**, 8 (1), 135.
88. Ronkainen, V.-P.; Tuomainen, T.; Huusko, J.; Laidinen, S.; Malinen, M.; Palvimo, J. J.; Ylä-Herttuala, S.; Vuolteenaho, O.; Tavi, P. Hypoxia-Inducible Factor 1-Induced G Protein-Coupled Receptor 35 Expression Is an Early Marker of Progressive Cardiac Remodelling. *Cardiovasc. Res.* **2014**, 101 (1), 69–77.
89. Guo, J.; Williams, D. J.; Puhl, H. L.; Ikeda, S. R. Inhibition of N-Type Calcium Channels by Activation of GPR35, an Orphan Receptor, Heterologously Expressed in Rat Sympathetic Neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 324 (1), 342–351.
90. Wouters, M. M.; Vicario, M.; Santos, J. The Role of Mast Cells in Functional GI Disorders. *Gut* **2016**, 65, 155–168.
91. Otkur, W.; Wang, J.; Hou, T.; Liu, F.; Yang, R.; Li, Y.; Xiang, K.; Pei, S.; Qi, H.; Lin, H. Aminosalicylates Target GPR35, Partly Contributing to the Prevention of DSS-Induced Colitis. *Eur. J. Pharmacol.* **2023**, 949, 175719.
92. Liu, J.; Divoux, A.; Sun, J.; Zhang, J.; Clément, K.; Glickman, J. N.; Sukhova, G. K.; Wolters, P. J.; Du, J.; Gorgun, C. Z. Genetic Deficiency and Pharmacological Stabilization of Mast Cells Reduce Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Nat. Med.* **2009**, 15 (8), 940–945.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました京都薬科大学薬理学分野 田中智之教授、藤井正徳准教授、田村裕穂先生、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科分子生物学分野 古田和幸准教授に深く感謝いたします。

GPR35 を標的とする新規化合物をご供与いただきました安田女子大学薬学部 松野研司教授、工学院大学先進工学部天然物医薬化学研究室 大野修准教授、GPR35 遺伝子欠損マウスをご供与いただきました京都薬科大学薬物治療学分野 加藤伸一教授、および同バイオサイエンス研究センター 斉藤美知子准教授に深く感謝いたします。

G タンパク質共役型受容体の評価法についてご協力を賜りました東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室 青木淳賢教授、東北大学大学院薬学研究科分子細胞生化学分野 井上飛鳥教授に深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり、ご助言、ご指導を賜りました京都薬科大学病態生化学分野 秋葉聡教授ならびに同生化学分野 中山祐治教授に厚く御礼申し上げます。

末筆ながら、実験にご協力いただいた岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 赤木荘太修士、京都薬科大学薬理学分野 寺崎真帆学士の諸氏をはじめとした研究室員の皆さまに心より御礼申し上げます。