

東北大学第65号

博士論文内容の要旨及び 審査結果の要旨

生命科学第18集（論文博士）

（令和2年度授与）

東 北 大 学

令 和 2 年 度

おがさわら ひろゆき
氏名（本籍地） 小笠原 宏幸
学位の種類 博士（生命科学）
学位記番号 生第 34号
学位授与年月日 令和2年10月7日
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

論文題目 新規低分子創薬ターゲットの創出-MPGPRX2-
博士論文審査委員 (主査) 教授 田中 良和
教授 有本 博一
教授 大橋 一正

論文内容の要旨

低分子化合物が作用することによって治療効果が期待できる新規分子(新規低分子創薬ターゲット)を見出すことを目的として、オーファン G タンパク質共役受容体(GPCR)であった mas-related G protein-coupled receptor X2(MRGPRX2)に着目して研究を行った。MRGPRX2は神経細胞由来ペプチド corstatin-14 や substance P(SP)をリガンドとする生理機能が不明な GPCR とされていた。しかし、2006年、MRGPRX2が結合組織型肥満細胞を活性化する basic secretagogue 群(塩基性ペプチド類を多く含む)をリガンドとする Gαi 共役 GPCR であり、結合組織型肥満細胞が有するヒスタミンやトリプターゼ等の放出機能(脱顆粒)に関与することを報告した(Tatemoto et al., 2006)。本研究では、MRGPRX2の新規のリガンドを探索して MRGPRX2 の特徴を把握し、低分子 MRGPRX2 アンタゴニストの探索およびそのアンタゴニストによる結合組織型肥満細胞の活性化(IgE 非依存的な脱顆粒誘導とエイコサノイド産生)抑制と MRGPRX2 下流シグナルの解析を検討した。また、肥満細胞と好酸球との相互作用に MRGPRX2 が関与すると仮説を立て、好酸球放出タンパク質のペプチド断片によるヒト結合組織型肥満細胞の活性化を検討した。

2006年に報告した MRGPRX2 リガンドは塩基性および疎水性アミノ酸を含む複数のペプチドであり、MRGPRX2 リガンド間には配列相同性やモチーフはなく、分子量が 1000-4000 Da(10~40 アミノ酸残基)の塩基性および疎水性アミノ酸を含むという共通性があるのみであった。また、MRGPRX2 リガンドとして報告した SP の高親和性受容体 neurokinin-1 receptor(NK1R)のアンタゴニストが SP による肥満細胞脱顆粒誘導を抑制する報告があったことから(Ogawa et al., 1999)、配列が類似する塩基性ペプチド性 NK1R アンタゴニスト間で MRGPRX2 遺伝子導入 HEK293 細胞(MRGPRX2/HEK293 細胞)の細胞内 Ca²⁺誘導および結合組織型肥満細胞の脱顆粒誘導活性を比較した。その結果、NK1R アンタゴニスト間で MRGPRX2/HEK293 細胞内 Ca²⁺誘導および結合組織型肥満細胞の脱顆粒誘導に対する活性に明確な差があることを見出した。この結果は、MRGPRX2 は広範囲な塩基性ペプチドを認識するが、無差別に認識する受容体(promiscuous 受容体)ではなく、類似塩基性ペプチド間の違いを識別する GPCR であることが判明した。このような性質を有する MRGPRX2 は神経ペプチド受容体などに発現している典型的な GPCR とは異なる新しいタイプの GPCR であることを示唆する。

MRGPRX2 が肥満細胞の脱顆粒誘導に関与することから、肥満細胞の活性化が引き金となる炎症に関与すると考えられる。MRGPRX2 の活性を低分子化合物で阻害して肥満細胞の活性化を抑制できるか、即ち、MRGPRX2 が炎症治療薬を目的とする低分子創薬ターゲットであるかを判断するためには、

MRGPRX2 に対するアンタゴニストを見出し、そのアンタゴニストを用いて肥満細胞における MRGPRX2 の生理的機能を解析することが必要である。そこで、低分子化合物ライブラリー(約 12,000 化合物)を、SP 刺激による MRGPRX2/HEK293 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇(MRGPRX2 活性)に対する阻害活性を指標にスクリーニングした。なお、陰性対照試験として、SP の高親和性受容体である *NK1R* 遺伝子および $G\alpha i$ 共役 GPCR である *muscarinic acetylcholine receptor 2 (M2R)* 遺伝子を導入した HEK293 細胞(NK1R/HEK293 細胞および M2R/HEK293 細胞)の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する阻害活性を評価した。その結果、骨格構造の異なる 2 つの低分子 MRGPRX2 活性阻害化合物を見出した。両低分子化合物は複数の MRGPRX2 リガンド刺激による MRGPRX2 活性を阻害するが、NK1R/HEK293 細胞および M2R/HEK293 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は阻害しなかった。また、両化合物は複数の MRGPRX2 リガンドによる MRGPRX2 活性を阻害した。さらに、両低分子化合物は MRGPRX2/HEK293 細胞への SP 結合を阻害し、SP 刺激による MRGPRX2/HEK293 細胞膜の $G\alpha$ の活性化を阻害したことより、両化合物は MRGPRX2 アンタゴニストであると判断した。MRGPRX2 アンタゴニストは MRGPRX2 リガンドおよび薬物誘発偽アレルギー反応を誘導することで知られる *icatibant* 刺激によるヒト結合組織型肥満細胞の脱顆粒誘導を阻害するが、 Ca^{2+} イオノフォアや Immunoglobulin E (IgE) 架橋による脱顆粒誘導は阻害しなかった。また、活性化肥満細胞は prostaglandin D2 (PGD₂) などのエイコサノイドを *de novo* 産生することが知られていることより、SP 刺激による結合組織型肥満細胞からの PGD₂ *de novo* 産生に対する MRGPRX2 アンタゴニストの阻害作用を評価した。その結果、MRGPRX2 アンタゴニストは SP 刺激による結合組織型肥満細胞の PGD₂ *de novo* 産生を阻害した。以上の結果より、MRGPRX2 は薬物誘発偽アレルギー反応を含む IgE 非依存性の結合組織型肥満細胞の活性化に関与する低分子創薬可能な受容体であることが明確になった。肥満細胞におけるエイコサノイド産生には p42/44 MAP kinase が関与することが知られている。MRGPRX2 リガンド刺激による p42/44 MAP kinase 活性化と MRGPRX2 アンタゴニストによる p42/44 MAP kinase 活性化に対する阻害作用が確認されたことより、MRGPRX2 活性化による結合組織型肥満細胞の PGD₂ *de novo* 産生に MRGPRX2 の下流シグナルの p42/44 MAP kinase が関与する可能性が示唆された。

また、肥満細胞と好酸球間の液性因子を介したクロストークにおける MRGPRX2 の役割を解明することを目的として、塩基性の好酸球顆粒タンパク質である major basic protein (MBP) および eosinophil cationic protein (ECP) による肥満細胞活性化への MRGPRX2 の関与を検討した。MBP および ECP は慢性炎症時に好酸球より放出され、肥満細胞を活性化するが、その活性化メカニズムは十分に解析されていない。

MRGPRX2 が塩基性ペプチドをリガンドとすることより, MBP および ECP を理論的トリプターゼ消化サイトで断片化したペプチドを合成してヒト結合組織型肥満細胞の脱顆粒誘導能を評価した。その結果, ヒト結合組織型肥満細胞の脱顆粒を誘導する MBP および ECP 由来のペプチドを見出した。見出した MBP および ECP 由来のペプチドによるヒト結合組織型肥満細胞の脱顆粒誘導活性と MRGPRX2/HEK293 細胞内 Ca^{2+} 上昇活性が一致することを確認した。MBP および ECP 由来ペプチド中で最も活性の強かったペプチド (MBP (99-110) および ECP (29-45)) は用量依存的にヒト結合組織型肥満細胞の脱顆粒を誘導し, MRGPRX2 アンタゴニストによって阻害された。また, MRGPRX2 アンタゴニストによって MBP (99-110) および ECP (29-45) によるヒト結合組織型肥満細胞の PGD_2 産生が阻害されることを確認した。これらの結果より, MRGPRX2 を介した MBP および ECP 断片化ペプチドによる肥満細胞活性化機構は肥満細胞/好酸球間のコミュニケーションの一部である可能性が示唆された。

以上のことから, MRGPRX2 は IgE 非依存的に肥満細胞を活性化する GPCR であり, MRGPRX2 アンタゴニストは神経ペプチド誘発肥満細胞活性化によって引き起こされる気管支喘息の気道炎等の神経原性炎症や薬物誘発偽アレルギー反応のみならず, 慢性炎症時の好酸球と肥満細胞の相互作用による過剰炎症反応に有効な治療薬となる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究では、新規低分子創薬ターゲットとなるタンパク質を見出すことを目的としてオーファン G タンパク質共役受容体 (GPCR) の一つである mas-related G protein-coupled receptor X2 (MRGPRX2) に着目し、その機能解析が行われた。MRGPRX2 のリガンドとして塩基性および疎水性アミノ酸を含む複数のペプチドが知られていたため MRGPRX2 は広範囲な塩基性ペプチドを無差別に認識する受容体 (promiscuous 受容体) であると考えられていたが、既知のリガンドペプチドの類縁体を用いた解析から MRGPRX2 は promiscuous 受容体ではなく、類似塩基性ペプチド間の違いを識別する GPCR であることが示され、神経ペプチド受容体などに発現している典型的な GPCR とは異なる新しいタイプの GPCR であることが明らかになった。さらに、阻害剤スクリーニングにより 2 種類のアンタゴニスト化合物を取得することに成功し、これらを用いた試験により、MRGPRX2 が IgE 非依存性の結合組織型肥満細胞の活性化に関与する受容体であることが明らかになった。さらに、塩基性の好酸球顆粒タンパク質 major basic protein および eosinophil cationic protein に由来するペプチドが MRGPRX2 の活性化を誘導することを突き止め、これらのペプチドによる MRGPRX2 の活性化とそれにより引き起こされる肥満細胞の活性化が肥満細胞と好酸球間のコミュニケーションの一部である可能性が示唆された。これらの結果を総括し、MRGPRX2 が薬物誘発偽アレルギー反応を含む IgE 非依存性の結合組織型肥満細胞の活性化に関与する低分子創薬可能な受容体であることが示された。

以上のように、本研究では分子特性やアンタゴニスト化合物の取得、シグナル伝達機構の解明、細胞間クロストークにおける役割など、新規 GPCR の一つである MRGPRX2 に関する広範な研究が行われ、創薬展開する上で有用な様々な知見が得られた。これらの研究成果は、小笠原宏幸が自立して研究活動を行うに必要な高度な研究能力と学識を有することを示している。したがって、小笠原宏幸が提出した論文は、博士 (生命科学) の博士論文として合格と認める。