

ドーパミン受容体シグナルを介した好中球性炎症の制御 —マウス乾癬モデルを用いて—

1. 研究の目的

(1) 本研究では、ドーパミンとその関連因子によるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、皮膚炎、乾癬、歯肉炎などの、好中球性の炎症性自己免疫疾患に効能のある新規治療薬を提供することを目的としている。炎症性自己免疫疾患は、免疫システムが免疫賦活物質（アジュバント）に応答する際に、自己に対して免疫活性化し、自然免疫応答および獲得免疫応答を誘導することで誘発される。自然免疫応答においてアジュバントは、マクロファージや顆粒球に直接作用し、炎症性サイトカインを分泌させることで炎症反応を誘発させる。一方、獲得免疫応答においてアジュバントは、その種類によって未熟 T 細胞を、T helper (Th) 1（細胞内寄生細菌、ウイルス感染に対処）、Th2（抗体産生、寄生虫に対処）、Th17（細胞外細菌、真菌に対処）に分化させる。しかしながら一方で、炎症性自己免疫疾患においてはこれらの Th は炎症性疾患、アレルギー、喘息、好酸球炎症、自己免疫疾患、および、好中球性炎症を誘発する。このことから Th の分化を制御することで、これらの疾患を抑制できると考えられる。

そこで我々は、獲得免疫応答において、未熟 T 細胞が成熟 T 細胞に分化する際に、Th1, Th2, または Th17 に選択的に分化誘導させる物質をスクリーニングする系を構築した (BBRC, 2008)。この系を利用して、複数の試薬や上市薬をスクリーニングした結果、免疫活性化の際に Th2 および Th17 を誘導する物質としてドーパミンを同定し (Int. Immunol., 2009, J. Immunol., 2011)、Th2 および Th17 を顕著抑制する物質として、ドーパミン D1 受容体アンタゴニストを同定した (J. Immunol., 2011)。Th2 および Th17 が、アレルギー、喘息、自己免疫疾患に関与していることから、ドーパミン D1 受容体アンタゴニストがこれらの疾患の発症を抑制する予防的効果があると期待された。実際、種々の自己免疫病マウスモデルにパーキンソン病の治療薬を予防的に投与すると、病勢を抑制した。

(2) さらに御事業団の第 43, 44 回学術研究振興資金による援助により、ドーパミン D2 受容体アンタゴニストとして新規にタンニン酸を同定し、期待したとおりタンニン酸は、サイトカイン分泌を転調し、大腸炎、乾癬、歯周病の病態を著しく改善させるという結果を取得した (Int. Immunol., in revision) (特許第 6562332 号 (2019 年 8 月 2 日登録))。また、ドーパミン受容体シグナルによる抗炎症作用のメカニズムを解明した (Int. Immunol., 2018)。加えて、アデノシンが高選択的に Th17 への分化を強力に誘導し、アデノシン受容体アンタゴニストがこの分化を抑制することを世界に先駆けて発見した。この効果はマウス乾癬モデルで証明された。アデノシンの原料であるアデノシン 3 リン酸は、ドーパミンを含む分泌小胞と同じ小胞内に大量に含まれていることから、ドーパミンによる Th17 誘導とアデノシンとの関連が示唆される。

(3) 本研究では、共に G タンパク質共役受容体であるドーパミン受容体とアデノシン受容体のシグナル伝達を解析し、ドーパミンおよびアデノシンが好中球性炎症を誘導するメカニズムを解析する。また、これらの受容体を介した好中球性の炎症性自己免疫疾患に対する効能を解析する。これらの解析により、ドーパミンやアデノシンを介した好中球性炎症の新規誘導メカニズムが明らかになると期待される。また、既存のアデノシン受容体アンタゴニストが好中球性自己炎症疾患へ効能があることを示すことで、アデノシン受容体アンタゴニストの用途拡大に繋がり、好中球性自己免疫疾患に対する治療方法が広がることから、社会的にも有益であると考えられる。

2. 研究の計画

(1) アデノシン受容体アンタゴニストによる Th17 抑制機構の解析

ドーパミンは Th2 と Th17、アデノシンは Th17 の分化を誘導し、それらのアンタゴニストは、それらの誘導を抑制することが明らかになっている。しかしながら、分化した Th 細胞からのサイトカイン分泌をこれらのアンタゴニストが抑制するという直接的なデータは得られていない。そこで、マウス混合リンパ球反応中に、これらのアンタゴニストを加えると各 Th 細胞

の分化が抑制されること、および、分化した Th 細胞からのサイトカイン分泌をこれらのアンタゴニストが抑制することを示すために以下の実験を行う。

- ① マウス混合リンパ球反応に、各アンタゴニストを加え、アデノシン受容体アンタゴニストが IL-17 の分泌を抑制することを ELISA 法で解析する。
- ② マウス未熟 T 細胞から、Th17 細胞を誘導し、アデノシン受容体アンタゴニスト存在下、CD3/28 抗体で刺激して、Th17 細胞に特徴的な IL-17 の分泌を ELISA 法で解析する。

(2) アデノシン受容体アンタゴニストの好中球性炎症抑制機構の解析

本研究で、ドーパミン受容体アンタゴニスト、および、アデノシン受容体アンタゴニストが抗原提示細胞からの、アデノシン放出を抑制し、このことが Th17 誘導を抑制するというモデルが示されると期待される。また、これらのアンタゴニストは、既に誘導された Th17 の活性化も抑制するというモデルが示されると期待される。このモデルから、これらのアンタゴニストが好中球性炎症を顕著に抑制する可能性が示唆される。ここでは本研究のまとめとして、好中球性炎症モデルとしてモデル動物を用いて、自己免疫性脳脊髄炎、好中球性気道炎症、乾癬、に対する、これらのアンタゴニストの効能を解析する。このために以下の実験を行う。

- ① 好中球性炎症モデル動物に、アデノシン受容体アンタゴニストを投与し、これらのモデル動物の病態の改善を解析する。
- ② モデル動物の疾患部位の組織切片を作製し、組織染色して、各アンタゴニスト投与により免疫細胞の浸潤が抑制され、好中球性炎症が抑制されることを解析する。

3. 研究の成果

(1) アデノシン受容体アンタゴニストによる Th17 抑制機構の解析、を行い、以下の成果を得た。

- ① マウス混合リンパ球反応にアデノシンを添加すると添加量依存的に IL-17 の分泌が増大することを明らかにした。この増大は 600 μ M のアデノシンを添加した場合に最大となった。
- ② マウス混合リンパ球反応におけるアデノシン依存的 IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体作動薬の添加によっても誘導されることを明らかにした。
- ③ マウス混合リンパ球反応におけるアデノシン依存的 IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体拮抗薬の添加によって抑制されることを明らかにした。
- ④ マウス CD4 陽性 T 細胞をアデノシン存在下で抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激するとマウス混合リンパ球反応と同様に IL-17 の分泌が誘導されることを明らかにした。
- ⑤ 抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激したマウス CD4 陽性 T 細胞におけるアデノシン依存的な IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体作動薬の添加によっても誘導されることを明らかにした。
- ⑥ 抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激したマウス CD4 陽性 T 細胞におけるアデノシン依存的な IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体拮抗薬の添加によって抑制されることを明らかにした。
- ⑦ Th17 細胞のマーカーである CCR6 を指標に単離した CD4 陽性 T 細胞をアデノシン存在下で抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激するとマウス混合リンパ球反応と同様に IL-17 の分泌が誘導されることを明らかにした。その一方で Th1 のマーカーである CCR3、および、Th2 のマーカーである CCR4 を指標に単離した CD4 陽性 T 細胞をアデノシン存在下で抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激すると IL-17 の分泌は誘導されなかった。
- ⑧ マウス未熟 T 細胞から Th17 細胞を誘導した後、抗 CD3/CD28 アゴニスト抗体で刺激すると IL-17 の分泌はアデノシンの添加によってさらに上昇した。

(2) アデノシン受容体アンタゴニストの好中球性炎症抑制機構の解析、を行い、以下の成果を得た。

- ① アデノシン A2a 受容体拮抗薬の経口投与は、実験的マウス脳脊髄炎の症状を改善させた。
- ② アデノシン A2a 受容体拮抗薬の塗布は、マウス乾癬モデルにおける症状を改善させた。
- ③ アデノシン A2a 受容体拮抗薬の経口投与は、マウス好中球性気道炎症モデルにおける症状を改善させた。

④ アデノシンA2a受容体拮抗薬の経口投与による実験的マウス脳脊髄炎の症状の改善において、アデノシンA2a受容体拮抗薬の経口投与はマウス脊髄におけるリンパ球の浸潤が抑制されることを、モデル動物の疾患部位の組織切片を作製し、組織染色することによって解析した。

4. 研究の反省・考察

(1) 本研究では、ドーパミンとその関連因子によるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、脳脊髄炎、乾癬、好中球性気道炎症、アトピー性皮膚炎などの、好中球性の炎症疾患および自己免疫疾患に効果のある新規治療薬を提供することを目的とした。実際、ドーパミンと同様に神経伝達物質であるアデノシンの免疫学的機能を詳細に解析し、アデノシンが CD4 陽性ヘルパーT 細胞に作用し、IL-17 の分泌を誘導することを明らかにした。

(2) 本研究ではさらに、免疫活性化の刺激によって様々な免疫細胞から細胞外にアデノシンが放出されること、また、細胞外アデノシンはアデノシン A2a 受容体を介して CD4 陽性ヘルパーT 細胞に作用し、IL-17 の分泌を誘導することを示した。さらに、このアデノシン特異的 IL-17 の分泌はアデノシン A2a 受容体拮抗薬、および、A2a 受容体シグナルの下流に位置するアデニル酸シクラーゼおよびプロテインキナーゼ A の阻害剤の投与によっても阻害された。CD4 陽性ヘルパーT 細胞の小集団の解析によって、アデノシン特異的な IL-17 の分泌を誘導している細胞は、表面に CCR6 を発現している Th17 細胞であることが示唆された。一方、IL-17 は好中球性炎症の主体であり、自己免疫疾患の誘導にも関与していることから、アデノシン特異的 IL-17 の分泌を抑制するアデノシン A2a 受容体の拮抗薬は、自己免疫疾患の抑制に効果がある可能性が示唆された。実際、我々の解析によって、アデノシン A2a 受容体の拮抗薬であるイストラデフィリンの投与により、マウスモデルにおいて、脳脊髄炎、乾癬、好中球性気道炎症、アトピー性皮膚炎の病態が改善することが示唆された。

(3) 一方、アデノシンのアデノシン A2a 受容体へのアゴニスト作用がどのような分子メカニズムで IL-17 の産生・分泌を誘導しているのかは今回の研究では明らかにできなかった。この分子メカニズムを解明することで、好中球性炎症疾患および自己免疫疾患の抑制剤の標的となる新規の分子も明らかになるものと期待されるので、アデノシン A2a 受容体シグナルの活性化による IL-17 の分泌制御の詳細なメカニズムの解析が待たれる。

(4) また、本研究では、生体外からアデノシンやアデノシン A2a 受容体の作動薬である PSB0777 が、アデノシン A2a 受容体を介して Th17 からの IL-17 分泌を誘導し、この分泌をアデノシン A2a 受容体の拮抗薬であるイストラデフィリンの添加で抑制すると、好中球性の自己免疫疾患を含む炎症性疾患に有効であることを解析したが、生体内でも内在性の細胞外放出アデノシンが Th17 に発現しているアデノシン A2a 受容体に作用することで IL-17 の分泌を誘導していることを解析する必要があると思われる。生体内で細胞外にアデノシンを産生する細胞としては、免疫細胞の他に CD39 および CD73 を発現している内皮細胞が候補に挙げられる。細胞外アデノシンの産生は、細胞外に放出された ATP が細胞膜表面に局在する修飾酵素である CD39 と CD73 の働きによってアデノシンに変換される経路が主体であると考えられている。生体内では、Th17 細胞が内皮細胞と相互作用し、その際にアデノシン A2a 受容体を介して内皮細胞から放出されるアデノシンを受容し、これによって Th17 からの IL-17 分泌が誘導される可能性が考えられる。この可能性を示すためには、内皮細胞と Th17 細胞との間の相互作用を解析するための系を構築し、内皮細胞からのアデノシン分泌が Th17 細胞からの IL-17 分泌に利用されていることを解析することが必要だと考えられる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Istradefylline, an adenosine A2a receptor antagonist, ameliorates neutrophilic airway inflammation and psoriasis in mice. M. Tokano, M. Kawano, R. Takagi, S. Matsushita. 2021, biorxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.21.445220>

- ② Extracellular adenosine induces hypersecretion of IL-17A by T-helper 17 cells through the adenosine A2a receptor to promote neutrophilic inflammation. M. Tokano, S. Matsushita, R. Takagi, T. Yamamoto, M Kawano. 2021, biorxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2021.04.29.441713>.
- ③ Tannic acid, a dopamine receptor agonist, ameliorates periodontitis, atopic dermatitis and psoriasis in animal models. R. Takagi, M. Kawano, T. Sato, S. Matsushita. Current Trends in Immunology 22:11-17, 2021.
- ④ 特願2020-148336、発明の名称：アデノシンA2A受容体の活性化を抑制する組成物 発明者：川野雅章、松下祥、高木理英、戸叶美枝子
- ⑤ 特願2020-109854、PCT/JP2020/43886、発明の名称：アデノシン産生酵素を標的とする組成物 発明者：川野雅章、松下祥、高木理英、戸叶美枝子
- ⑥ 特願2019-195478、PCT/JP2020/24876、発明の名称：アデノシンA2A受容体を標的とする組成物 発明者：松下祥、川野雅章、高木理英、戸叶美枝子

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし