

PRESS RELEASE (2023/02/22)

薬剤性アナフィラキシー制圧の鍵となる新しいシグナル経路を発見

～ MRGPRX2 受容体に関わる様々なアレルギー疾患の制御に期待 ～

ポイント

- ① MRGPRX2 受容体を介したマスト細胞の脱顆粒は薬剤性アナフィラキシーと密接に関与するが、この受容体の下流のシグナル経路はほとんど分かっていなかった。
- ② 本研究ではマスト細胞の機能解析を行い、DOCK2 を介した Rac 活性化および PAK1 分子のリン酸化が薬剤による脱顆粒を制御していることを突き止めた。
- ③ 本経路は薬剤性アナフィラキシーを含め、MRGPRX2 受容体に関わるとされる様々なアレルギー疾患を制御するための新規ターゲットとなる可能性がある。

概要

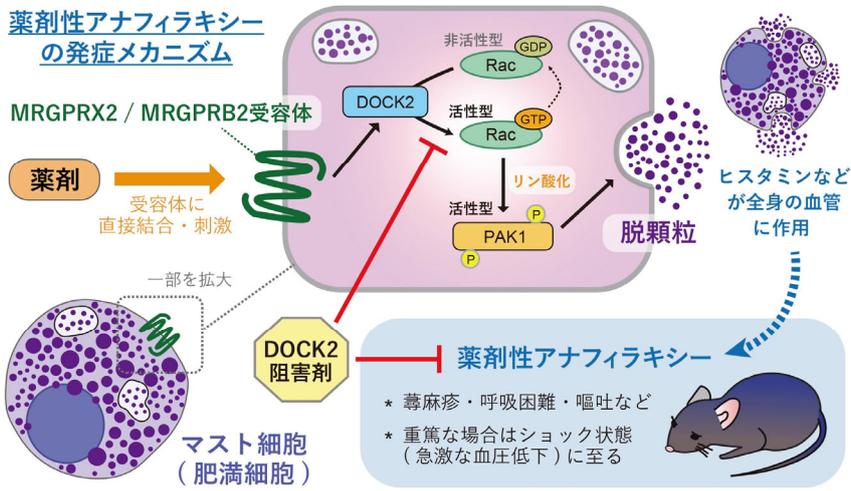
薬剤に起因するアナフィラキシー（※1）は、医療安全の観点から頻繁に問題となっています。近年、マスト細胞（※2）に発現する Mas 関連 G タンパク質共役型受容体（MRGPRX2、※3）を介して薬剤が直接マスト細胞を刺激することでヒスタミン等の脱顆粒を誘導し、薬剤性アナフィラキシーを招くことが分かってきました。しかし、MRGPRX2 受容体と脱顆粒を繋ぐ分子シグナル経路については不明な点が多く、本病態の発症を効果的に抑える予防法や治療法は確立されていません。

今回、九州大学生体防御医学研究所の福井宣規 主幹教授、國村和史 助教、秋好紗弥香 助教らの研究グループは、細胞骨格制御因子である DOCK2（※4）に着目することで、薬剤性アナフィラキシーに関わるマスト細胞の脱顆粒メカニズムの一端を解明しました。

研究グループはこれまで、DOCK2 が免疫細胞において Rac（※5）を活性化し種々の免疫応答に関与することを報告してきましたが、マスト細胞における役割はよく分かっていませんでした。そこで私達は、DOCK2 を欠損したマスト細胞やマウス個体を解析したところ、薬剤誘導性の脱顆粒反応やアナフィラキシー症状が著しく減弱することを見出しました。DOCK2 を欠損してもマスト細胞の Ca^{2+} 流入や幾つかのシグナル伝達分子のリン酸化に影響は見られませんでした。Rac 活性化および PAK1 のリン酸化が障害されていました。さらに、野生型マウスや健常人由来のマスト細胞を DOCK2 阻害剤や PAK1 阻害剤で処理すると、薬剤による脱顆粒が濃度依存的に抑制されました。

以上のことから、DOCK2-Rac-PAK1 経路は薬剤誘導性の脱顆粒反応に重要な経路であり、薬剤性アナフィラキシー制圧の鍵となる可能性が示唆されました。また、マスト細胞の MRGPRX2 受容体を介した反応は慢性蕁麻疹や接触性皮膚炎などとの関連も指摘されていることから、各種アレルギー疾患制御への応用も期待されます。本研究成果は、2023 年 2 月 16 日（木）に米国の雑誌「The Journal of Allergy and Clinical Immunology」のオンラインサイトに掲載されました。

薬剤性アナフィラキシーの発症メカニズム



研究成果の概要図

薬剤がマスト細胞上のMRGPRX2/MRGPRB2受容体に結合すると、その下流でDOCK2によるRac活性化、PAK1リン酸化を経てヒスタミン等の脱顆粒が起き、薬剤性アナフィラキシーを引き起こす。

この脱顆粒とアナフィラキシーはDOCK2阻害剤によって抑制できる。

【研究の背景と経緯】

アナフィラキシー（※1）は様々な原因物質（アレルゲン）の侵入に対して全身的に引き起こされる即時型の過敏反応であり、重篤になると血圧低下・意識障害を招きます（アナフィラキシーショック）。アナフィラキシーによる国内の死亡者数は薬剤に起因するものが最多であり、その原因薬剤も抗生剤・造影剤・筋弛緩剤・麻酔薬など医療現場で頻用されるものが含まれることから、医療安全を確保する上で問題となっています。しかし、その発症機序については分かっていないことが多いため積極的な予防法や治療法は確立されておらず、発症後の早期発見・アドレナリン投与に頼っているのが現状です。

薬剤性アナフィラキシーは、薬剤の刺激によってマスト細胞（※2）からヒスタミンなどの血管に作用する物質が“脱顆粒”によって細胞外に放出されることが主な原因とされています。従来、アレルゲンの感作により誘導された免疫グロブリンE（IgE）抗体とFcεRI受容体を介した刺激が脱顆粒反応の入り口と考えられ、世界的に研究がなされてきました。その一方で近年、マスト細胞に発現するMas関連Gタンパク質共役型受容体（※3、ヒトではMRGPRX2、マウスではMRGPRB2）に薬剤が直接結合して脱顆粒を誘導する経路が発見され、注目を集めています。しかしながら、MRGPRX2受容体の下流で脱顆粒に至るまでの分子シグナル経路はほとんど不明なままです。

福井宣規 主幹教授らはこれまで、DOCK2（※4）がRac（※5）の活性化を介して様々な免疫細胞の細胞骨格を制御することを見出してきました。マスト細胞が秒～分単位で迅速に脱顆粒を引き起こすまでには細胞骨格系の再編成を伴う精緻なメカニズムが必要と考えられますが、その脱顆粒現象にDOCK2が関与するのかどうか、関わりとしたらどのような役割を担っているかは解明されていませんでした。そこで私達は、DOCK2を遺伝的に欠損したマウスやマスト細胞を解析することで、薬剤性アナフィラキシーに関わるマスト細胞の脱顆粒誘導機構を検証しました。

【研究の内容と成果】

本研究ではまず、野生型マウスとDOCK2欠損マウス、そしてDOCK2と同じサブファミリーに属するDOCK5の欠損マウスに対して、マスト細胞のMRGPRX2/MRGPRB2受容体に結合することが知られる化合物48/80という化合物を静脈内に投与し、その後の体温変化をモニタリングしました。その結果、野生型マウスとDOCK5欠損マウスでは速やかにアナフィラキシーショック状態に至りましたが、DOCK2欠損マウスでは体温はあまり低下しませんでした（図1：A）。これは、抗生剤の一種であるシプロフロキサシンの投与によってアナフィラキシーを誘導しても同様の結果でした。また、薬剤投与後30分時点の血中ヒスタミン濃度を解析したところ、野生型マウスとDOCK5欠損マウスに比べてDOCK2欠損マウスではあまり上昇しませんでした（図1：B）。さらに、皮膚のアナフィラキシー症

状を解析した場合においても、DOCK2 欠損マウスは薬剤投与に対して抵抗性を示しました。これらのことから、DOCK2 は薬剤性アナフィラキシーの発症を規定する分子であることが示唆されました。

そこで、アナフィラキシーに大きく関わりとされるマスト細胞に着目し、DOCK2 との関連性を調べました。従来研究で頻用されてきた骨髄由来マスト細胞は MRGPRB2 受容体を発現しないことから、この受容体を発現する結合組織型マスト細胞を培養し、野生型と DOCK2 欠損マスト細胞間における薬剤誘導性の脱顆粒を比較しました。その結果、野生型マスト細胞に比べて DOCK2 欠損マスト細胞ではコンパウンド 48/80、シプロフロキサシン、アトラクリウム（筋弛緩剤の一種）といった薬剤に対する脱顆粒が顕著に障害されていました（図 1：C）。

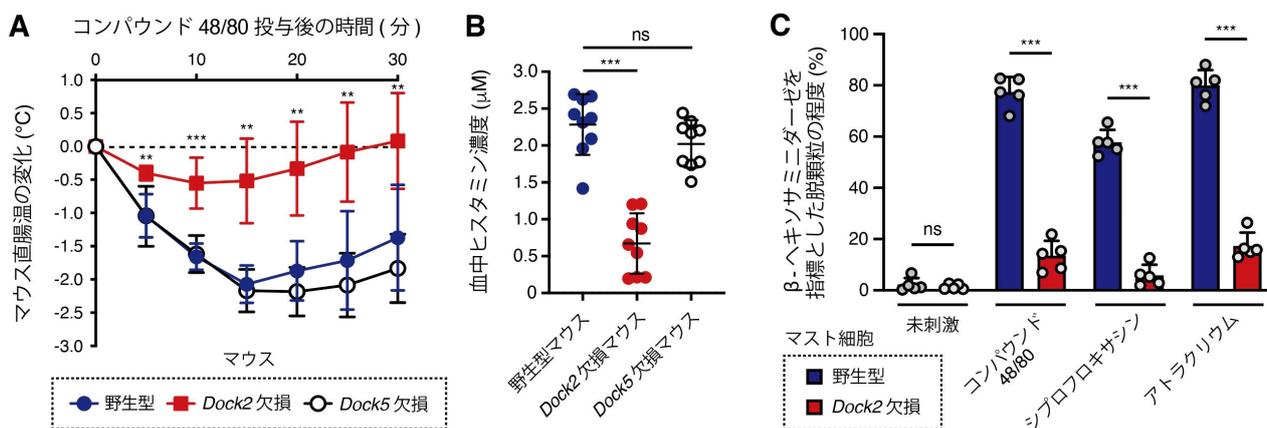


図 1 DOCK2 を欠損したマウスやマスト細胞は、MRGPRB2 受容体を介した薬剤性アナフィラキシーおよび脱顆粒反応に抵抗性を示す

- (A) 薬剤投与後の体温低下の幅は、野生型・DOCK5 欠損マウスに比べて DOCK2 欠損マウスは少ない。
- (B) 血管拡張作用を持つヒスタミンの血中濃度は、薬剤投与後 30 分時点において野生型・DOCK5 欠損マウスに比べて DOCK2 欠損マウスで低い。
- (C) マスト細胞に薬剤を添加して 30 分後の脱顆粒反応（培養液中のβ-ヘキソサミニダーゼと呼ばれる酵素を指標に判定）は、野生型に対して DOCK2 欠損マスト細胞で顕著に障害される。

次に、マスト細胞による薬剤誘導性の脱顆粒を DOCK2 がどのように制御しているのか調べました。まず、薬剤刺激後のカルシウムイオンの流入や Akt・ERK1/2 などのシグナル分子のリン酸化に差はありませんでした。しかし、DOCK2 欠損マスト細胞では薬剤刺激後の Rac 活性化が障害される一方、DOCK2 阻害剤として機能するコレステロール硫酸（※6）を野生型マスト細胞に添加すると Rac 活性化（図 2：A）および脱顆粒反応（図 2：B）が低下することを見出しました。さらに、コレステロール硫酸をマウスに投与すると、薬剤性アナフィラキシー反応は顕著に減弱しました（図 2：C）。

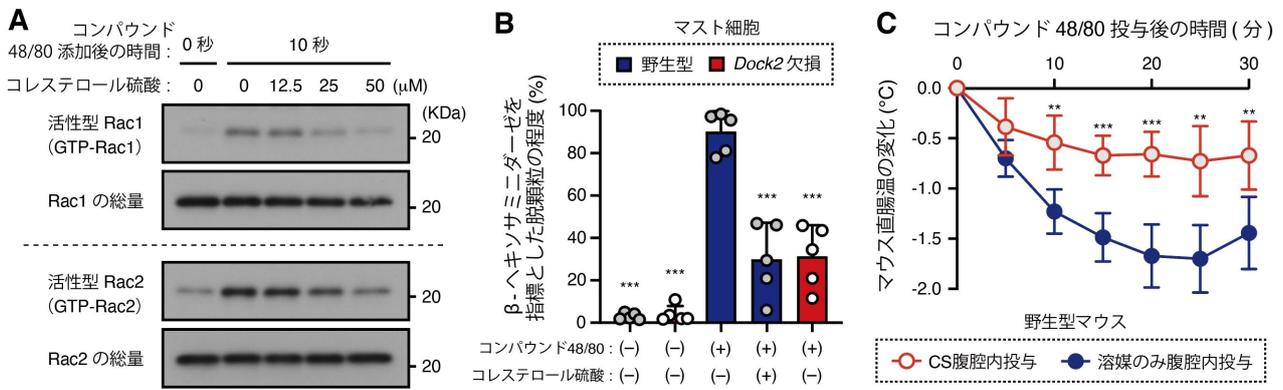


図2 DOCK2 阻害剤により薬剤刺激後の Rac 活性化、脱顆粒、アナフィラキシーが抑制される

- (A) 野生型マスト細胞へコンパウンド 48/80 添加後 10 秒で Rac が活性化するが、コレステロール硫酸 (DOCK2 阻害剤) で事前に処理すると濃度依存的に Rac 活性化が障害される。
- (B) コレステロール硫酸 (50 μM) の添加により薬剤誘導性の脱顆粒反応は DOCK2 欠損マスト細胞と同程度にまで抑制される。
- (C) コレステロール硫酸をマウスに投与することで、薬剤性アナフィラキシー反応は減弱する。

Rac と脱顆粒を繋ぐ経路を同定する上で、私達は Rac のエフェクター分子であり、かつ、アクチン線維による細胞骨格を制御する分子 “PAK1” に注目しました。野生型マスト細胞をコンパウンド 48/80 で刺激すると PAK1 の活性化に関わるアミノ酸残基がリン酸化される一方、DOCK2 欠損マスト細胞ではそのリン酸化が障害されていました (図 3 : A)。また、野生型マスト細胞を PAK1 選択的な阻害剤で処理すると上記リン酸化が障害され、薬剤誘導性の脱顆粒反応も抑制されました (図 3 : B)。

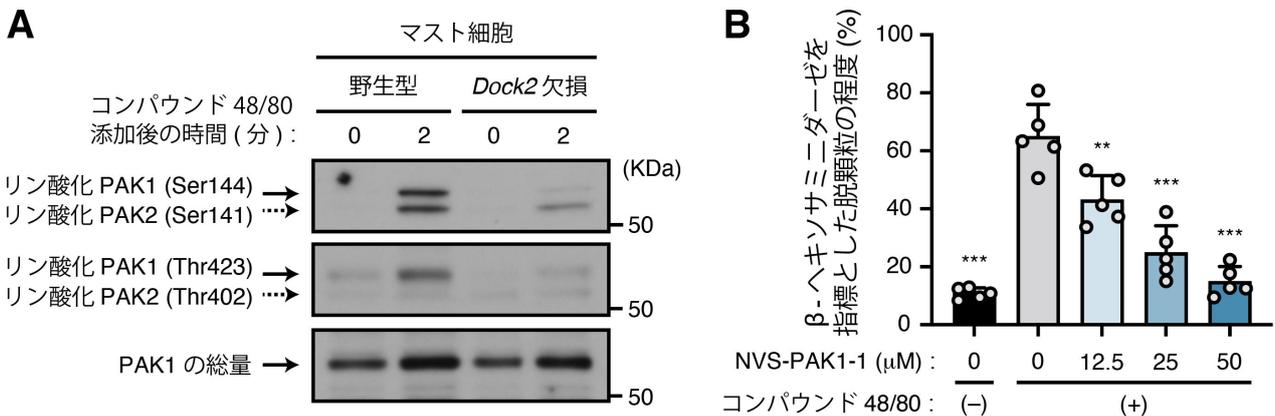


図3 PAK1 阻害剤の処理によって、薬剤誘導性の脱顆粒が抑制される

- (A) 野生型マスト細胞ではコンパウンド 48/80 添加後 2 分で PAK1 の 144 番目と 423 番目のアミノ酸残基がリン酸化されるが、DOCK2 欠損マスト細胞では両方のリン酸化が顕著に障害される。
- (B) 野生型マスト細胞を PAK1 阻害剤 (NVS-PAK1-1) で処理すると薬剤誘導性の脱顆粒が抑制される。

最後に、今までの知見がヒトにおいても当てはまるかどうかを検証しました。まず、健康人由来の末梢血より造血幹細胞のみを採取し、様々な成長因子を添加して培養することで MRGPRX2 を発現するマスト細胞に分化させました (図 4 : A)。その上で、DOCK2 阻害剤 (コレステロール硫酸) や PAK1 阻害剤 (NVS-PAK1-1) でヒトマスト細胞を処理した際の脱顆粒反応を解析すると、性別を問わずシプロフロキサシン誘導性の脱顆粒が抑制されることが確認できました (図 4 : B、C)。以上より、マウス同様にヒトにおいても DOCK2-Rac-PAK1 経路が重要であることが明らかになりました。

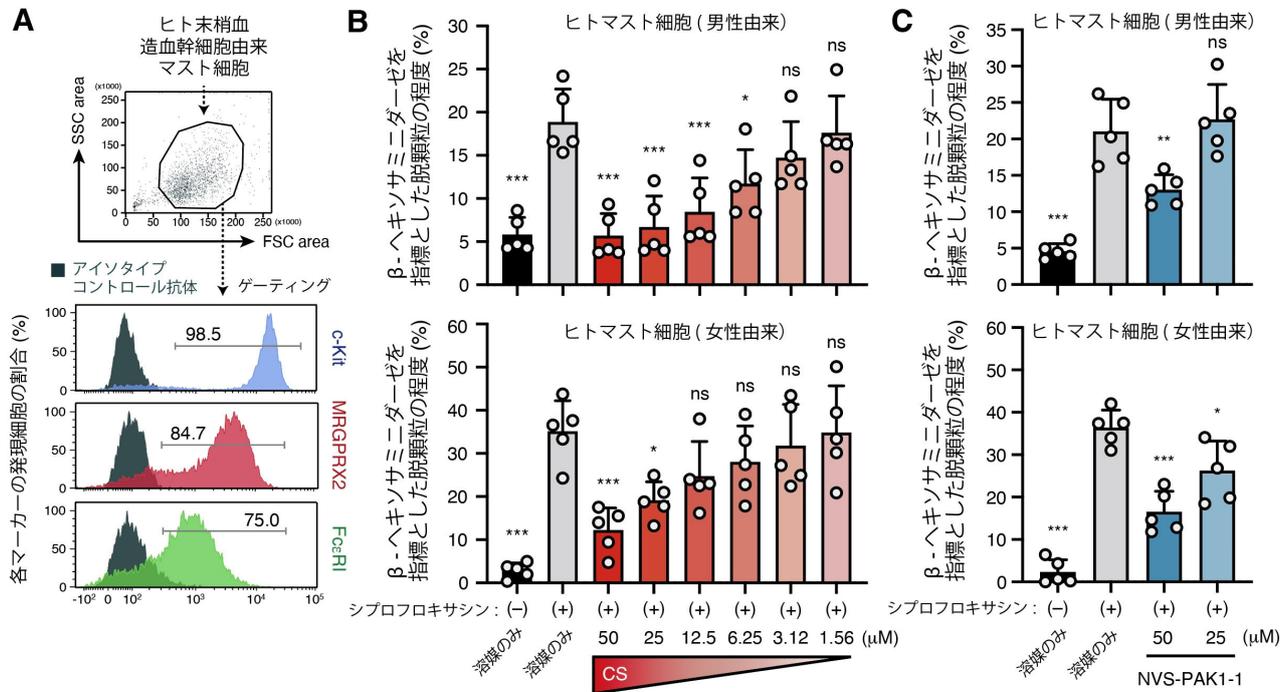


図 4 ヒトのマスト細胞でも DOCK2 阻害剤・PAK1 阻害剤は薬剤誘導性の脱顆粒反応を抑制する

- (A) 健康人の末梢血より採取した CD34⁺造血幹細胞を SCF、IL-3、IL-6 といった成長因子で 10 週間培養すると、c-Kit⁺ MRGPRX2⁺ FcεRI⁺ の結合組織型マスト細胞に分化する。
- (B) コレステロール硫酸を事前に添加しておく、シプロフロキサシン誘導性の脱顆粒反応が濃度依存的に抑制される (男性・女性由来マスト細胞を問わず)。
- (C) PAK1 阻害剤 (NVS-PAK1-1) を事前に添加しておく、薬剤誘導性の脱顆粒反応が抑制される。

【今後の展開】

本研究では、DOCK2-Rac-PAK1 経路が薬剤誘導性の脱顆粒反応に重要な経路であり、薬剤性アナフィラキシー制圧の鍵になることを明らかにしました。また、DOCK2 阻害剤として今回用いたコレステロール硫酸は私達の身体で合成されている天然物質であり、異物に対する過剰なアレルギー反応が起きないよう生理的な意義を持っている可能性があります。さらに、最近の臨床研究によるとマスト細胞の MRGPRX2 受容体を介した反応は慢性蕁麻疹や皮膚肥満細胞症、接触性皮膚炎などと関連していることが指摘されているため、本知見の各種アレルギー疾患制御への応用も期待されます。

【用語解説】

(※1) アナフィラキシー

蕁麻疹や呼吸困難、嘔吐などを伴う急性のアレルギー症状をアナフィラキシーと呼び、さらに重篤なものでは血圧低下を伴うアナフィラキシーショックに進み、対応が遅れると死に至る。アナフィラキシーの原因物質としてハチ刺傷による昆虫毒、甲殻類などの食物、そして薬剤が挙げられる。

(※2) マスト細胞

細胞内にヒスタミンなどの顆粒を多く蓄えており、その細胞形態から肥満細胞とも呼ばれる。抗原に感作されると蓄えた顆粒を迅速に放出し、寄生虫の排除に働く。しかし、顆粒中に含まれる様々な物質が血管にも作用することでアナフィラキシーを引き起こすため、先進国では負の側面が大きい。

(※3) Mas 関連 G タンパク質共役型受容体

ヒトでは MRGPRX2 受容体として知られ、主に皮膚に存在するマスト細胞で発現している。マウスでは MRGPRB2 受容体に相当する。コンパウンド 48/80 やシプロフロキサシン（抗生剤）、アトラクリウム（筋弛緩剤）といった物質がリガンドとなり、マスト細胞を直接刺激する。IgE 抗体を介する経路とは異なり初回の感作で脱顆粒を誘導すること、反応が速いことが特徴である。

(※4) DOCK2 (Dedicator of cytokinesis 2)

免疫細胞のみで発現し、細胞の動きや活性化を制御しているタンパク質。低分子量 G タンパク質の 1 種である Rac の活性化を介して、アクチン線維の重合・再構築を制御する。

(※5) Rac

Rho ファミリーに属する低分子量 G タンパク質。GDP 結合型から GTP 結合型へ転換することで活性化型となり、標的分子に結合して細胞内シグナルを伝達する分子スイッチとして機能する。

(※6) コレステロール硫酸

コレステロールから合成され、涙や皮膚に含まれる天然物質。DOCK2 タンパク質内の Rac 活性化ドメインに結合し、DOCK2-Rac 機能を抑制することで“DOCK2 阻害剤”としての生理活性作用を持つ。

【謝辞】

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 免疫アレルギー疾患実用化研究事業「食物・薬品アナフィラキシーにおける DOCK ファミリー分子の機能と制御機構の解明」(研究代表者：福井宣規)、革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ (AMED-CREST)「胎児・母体免疫クロストークによる生体恒常性維持と疾患感受性決定の分子基盤」(研究代表者：福井宣規)、JSPS 科研費 若手研究「薬剤性アナフィラキシー克服を目指したマスト細胞の脱顆粒制御機構の解明」(JP21K15472、研究代表者：國村和史)、九州大学 QR Program 若手研究「薬剤性アナフィラキシーの攻略を目指した分子基盤の解明」(No.02243、研究代表者：國村和史)の助成を受けた研究成果です。また、九州大学高深度オミクス医学拠点形成事業よりご支援を頂きました。この場をお借りして御礼申し上げます。

【論文情報】

掲載誌：The Journal of Allergy and Clinical Immunology

タイトル：DOCK2 regulates MRGPRX2/B2-mediated mast cell degranulation and drug-induced anaphylaxis

著者名：Kazufumi Kunimura, Sayaka Akiyoshi, Takehito Uruno, Keisuke Matsubara, Daiji Sakata, Kenji Morino, Kenichiro Hirotoni, Yoshinori Fukui

DOI：10.1016/j.jaci.2023.01.029

【お問合せ先】

<研究に関すること>

九州大学 生体防御医学研究所 主幹教授 福井 宣規 (フクイ ヨシノリ)
助教 國村 和史 (クニムラ カズフミ)

TEL : 092-642-6828 FAX : 092-642-6829

Mail : fukui@bioreg.kyushu-u.ac.jp / kunimura@bioreg.kyushu-u.ac.jp

<報道に関すること>

九州大学 広報室

TEL : 092-802-2130 FAX : 092-802-2139

Mail : koho@jimu.kyushu-u.ac.jp



Kyushu U 111th Anniversary

VISION EXPO

「本学は今年 111 周年を迎えます」