

皮膚の偽アレルギーを誘導する分子のスクリーニング法開発

順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター

北浦 次郎

Recently, it was reported that many cationic drugs (e.g., antibiotics) directly activate connective tissue mast cells, which leads to drug-induced pseudo-allergy via Mas-related G-protein coupled receptor X2 (MRGPRX2) in humans and Mrgprb2 in mice. On the other hand, a variety of cationic peptides/proteins (e.g., host defense peptides and neuropeptides) have been identified as endogenous ligands of MRGPRX2/Mrgprb2. Of these, many show a significantly lower EC₅₀ against MRGPRX2 than against Mrgprb2. Accordingly, we hypothesize that unknown cationic molecules contained in cosmetics or foreign matters which can come into contact with skin could activate connective tissue mast cells via MRGPRX2, resulting in skin pseudo-allergy. The objective of the current study is to develop a screening method for the identification of molecules that can induce pseudo-allergy in skin. For this end, we used newly-bred MRGPRX2 knock-in (MRGPRX2-KI) and Mrgprb2 knock-out (Mrgprb2-KO) mice as well as wild-type (WT) mice. We found that peritoneal mast cells from WT and MRGPEX2-KI mice, but not from Mrgprb2-KO mice, degranulated in response to stimulation with compound 48/80, a known MRGPRX2/Mrgprb2 ligand, although MRGPEX2-KI mast cells more strongly activated than WT mast cells. In addition, WT and MRGPEX2-KI mice, but not Mrgprb2-KO mice, exhibited skin pseudo-allergic reactions in response to intradermal injection of compound 48/80. Moreover, skin pseudo-allergic reactions were stronger in MRGPRX2-KI mice than in WT mice. Thus, we were able to develop both *in vitro* and *in vivo* methods to identify MRGPRX2 ligands, which will help uncover the molecular mechanisms underlying skin pseudo-allergy and test the safety of cosmetics and therapeutic drugs.

1. 緒言

非常に多くのカチオン性薬剤(抗菌薬など)が皮膚の結合組織型マスト細胞を直接活性化(脱顆粒)させて皮膚の炎症やかゆみを誘導することが知られている。これが偽アレルギーと呼ばれるのは、その症状がIgEと抗原によるマスト細胞の活性化(脱顆粒)に依存する即時型アレルギーの症状と類似するためである。最近、マウスの結合組織型マスト細胞に発現するGタンパク共役型受容体Mas-related G protein-coupled receptor b2(Mrgprb2)(ヒトではMRGPRX2)がカチオン性薬剤により活性化して偽アレルギーを引き起こすことが判明した¹⁾。また、ヒトMRGPRX2(マウスMrgprb2)は多くの内因性リガンド(カチオン性の抗菌ペプチドや神経ペプチドなど)を有することも明らかになった²⁻⁷⁾。これらの結果は、皮膚に塗布される化粧品や皮膚に付着する動植物成分の中にも偽アレルギーを誘導する分子が存在する可能性を示唆した。

研究の目的は、ヒトMRGPRX2に着目して偽アレルギーを誘導する分子を*in vitro*及び*in vivo*でスクリーニングする系を確立して、皮膚に塗布する医薬品・化粧品の安全

性を向上させることである。

Mrgprb2ノックアウト(Mrgprb2-KO)マウスの解析はMRGPRX2の機能を想定するのに役立つが、ヒトMRGPRX2の生体内機能を解明するには不十分である。また、MRGPRX2とMrgprb2に共通する既知リガンドに対するMRGPRX2のEC₅₀はMrgprb2と比較して低いことから、MRGPRX2はヒトの皮膚で多くのリガンドを鋭敏に認識してより重要な役割を担うと考えられた。そこで、申請者は、世界に先駆けてMRGPRX2ノックイン(MRGPRX2-KI)マウス(Mrgprb2の代わりにMRGPRX2を発現するマウス)を作製した。本研究では、野生型(WT)、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KIマウスから結合組織型マスト細胞を分離・誘導して、マスト細胞の脱顆粒を指標としてMRGPRX2リガンドを*in vitro*でスクリーニングする系の確立を目指した。さらに、WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KIマウスの耳介における偽アレルギー反応を指標としてMRGPRX2リガンドを*in vivo*でスクリーニングする系の確立を目指した。多くの医薬品・化粧品の成分や皮膚に付着する動植物成分をスクリーニングすることにより、偽アレルギーを誘導する分子の同定が可能になる。また、動植物成分の中からMRGPRX2リガンドが同定されれば、皮膚における炎症やかゆみの新規病態機序の解明につながる。最終的な目標は、*in vitro*及び*in vivo*のスクリーニング系を利用してMRGPRX2リガンドを同定して、皮膚における偽アレルギーの予防法を開発することである。



Development of a screening method for the identification of molecules that can induce pseudo-allergy in skin

Jiro Kitaura

Atopy (Allergy) Research Center,
Juntendo University Graduate School of
Medicine

2. 方法

2.1. マウスから腹腔マスト細胞や骨髓由来マスト細胞の誘導

WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスの腹腔をPBSで洗浄して採取した腹腔細胞をIL-3 (10ng/mL) とSCF (100ng/mL) の存在下で10日間培養した。flow cytometryにより、細胞の90%以上がFcεRIα陽性・c-Kit陽性の腹腔マスト細胞であることを確認した。WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスの脛骨から採取した骨髓細胞をIL-3 (10 ng/mL) の存在下で5週間培養した。flow cytometryにより、細胞の95%以上がFcεRIα陽性・c-Kit陽性の骨髓由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cell: BMMC)であることを確認した⁸⁾。

2.2. マスト細胞の脱顆粒率の*in vitro*測定法

既知のMrgprb2/MRGPRX2リガンドを含む種々の分子(薬剤など)で、WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウス由来の腹腔マスト細胞あるいはBMMCを刺激した。また、上記のマスト細胞をanti-TNP IgE (0.5 μg/mL)で感作(24h)した後、TNP-HSA (10ng/mL)で刺激した。刺激1時間後のマスト細胞の脱顆粒率をβ-hexosaminidase assay (細胞内から細胞外に放出されたβ-hexosaminidaseの割合を解析する)やflow cytometry (マスト細胞表面にCD63を発現する細胞の割合を解析する)により測定した⁸⁾。

2.3. 皮膚における偽アレルギーの*in vivo*評価法

WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスの耳介に既知のMrgprb2/MRGPRX2リガンドを含む種々の分子(薬剤など)を皮下注射し、その直後に、色素(エバンスブルー)を静脈注射した。1時間後に採取した耳介に含まれる色素

漏出量を定量化した(通常の受動的皮膚アナフィラキシー反応の評価法と同様⁸⁾)。色素漏出量は、マスト細胞の脱顆粒により上昇する血管透過性と比例するので、偽アレルギーの程度を評価できる。

3. 結果

3.1. MRGPRX2リガンドを*in vitro*でスクリーニングする系の確立

WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスから誘導した腹腔マスト細胞表面におけるFcεRIαやc-Kitの発現レベルに有意な差はなかった(図1)。抗MRGPRX2抗体による細胞表面染色により、MRGPRX2-KIマウス由来腹腔マスト細胞表面にMRGPRX2の発現が確認された。IgEと抗原で刺激したときの腹腔マスト細胞の脱顆粒率に有意な差は認められなかった。他方、compound 48/80(既知のMRGPRX2/Mrgprb2リガンド)で腹腔マスト細胞を刺激すると、WT及びMRGPRX2-KI腹腔マスト細胞は濃度依存的に脱顆粒した。しかし、Mrgprb2-KO腹腔マスト細胞の脱顆粒は認められなかった。また、WT腹腔マスト細胞と比較して、MRGPRX2-KI腹腔マスト細胞は同じ濃度のcompound 48/80に対してより強く脱顆粒した(図2)。

WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスから誘導したBMMC表面におけるFcεRIαやc-Kitの発現レベルに有意な差はなかった。抗MRGPRX2抗体による細胞表面染色により、MRGPRX2-KIマウス由来BMMCにMRGPRX2の発現は認められなかった。つまり、MRGPRX2は結合組織型マスト細胞表面に発現するが、未熟な粘膜型マスト細胞(BMMC)表面に発現しないことが確認された。IgEと抗原で刺激したときのBMMCの脱顆粒率に有意な差は認められなかった。また、compound 48/80でこれらのBMMCを刺激しても脱顆粒しないこと

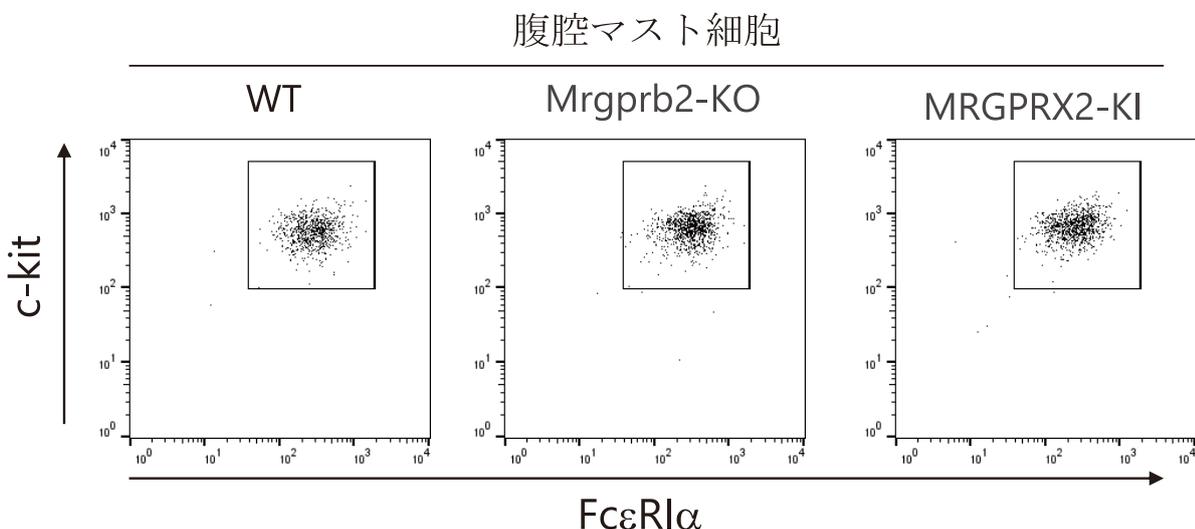


図1 WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KI マウス由来腹腔マスト細胞における FcεRIα と c-Kit の(細胞表面)発現レベル

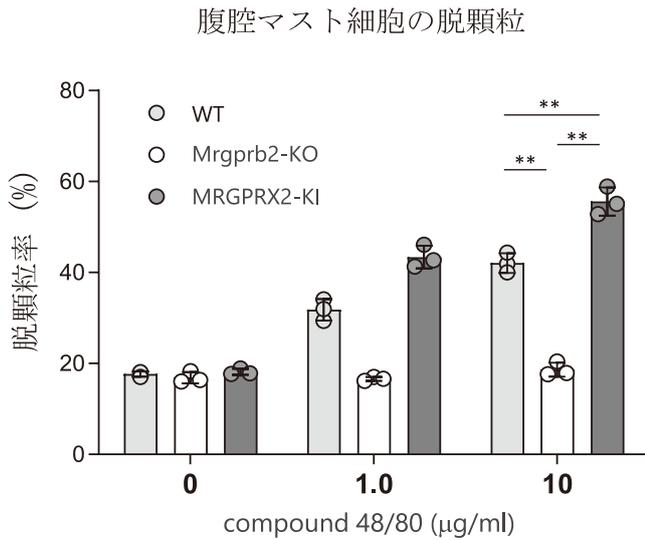


図2 WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウス由来腹腔マスト細胞の compound 48/80 に対する脱顆粒率 (β -hexosaminidase assay)

が確認された。

このように、WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウスから誘導した腹腔マスト細胞の脱顆粒を指標に、MRGPRX2リガンドを同定するための *in vitro* スクリーニング法が確立された。Mrgprb2リガンドとして作用しないがMRGPRX2リガンドとして作用する分子、Mrgprb2リガンドとしての作用は弱いMRGPRX2リガンドとしての作用が強い分子を *in vitro* で同定することが可能になった。

3.2. MRGPRX2リガンドを *in vivo* でスクリーニングする系の確立

WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウスの成長・発達に差は認められなかった。また、定常状態における(マスト細胞を含む)血球系細胞の組織分布や数に有意な差は認められなかった。次に、WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウスの耳介に compound 48/80 を皮下注射した直後に色素を静脈注射し、1時間後の耳介における色素漏出量を定量化した。その結果、WTマウスの耳介で認められた色素漏出はMrgprb2-KOマウスではほとんど認められなかった。また、WTマウスと比較してMRGPRX2-KIマウスの耳介における色素漏出量は多かった(図3)。これらの結果は、compound 48/80 による(耳介の)組織型マスト細胞の脱顆粒による偽アレルギー反応がMrgprb2/MRGPRX2 依存的であること、生体内でMRGPRX2はMrgprb2より鋭敏に compound 48/80 を認識して偽アレルギーを誘導することが示された。このように、MRGPRX2リガンドとして作用する分子を *in vivo* で同定することが可能になった。

偽アレルギー反応 (マウス)

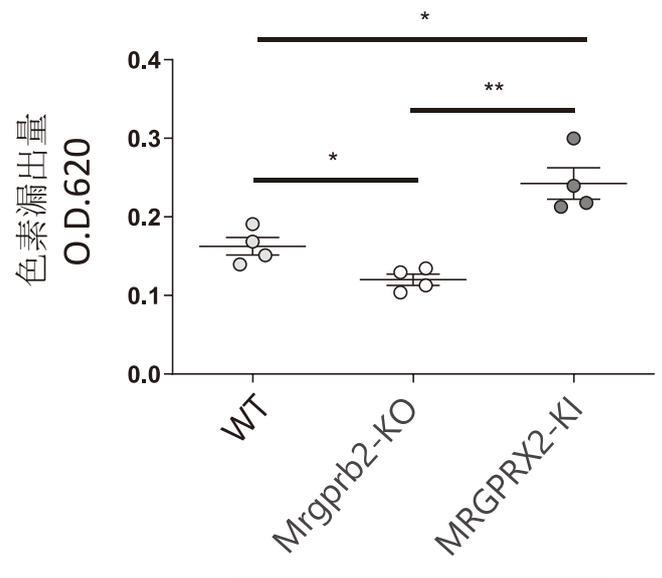


図3 WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウスの耳介に compound 48/80 を皮下投与したときの偽アレルギー反応

皮下投与 (compound 48/80)

4. 考察

マウスやヒトのマスト細胞(株)の解析、Mrgprb2やMRGPRX2を一過性に過剰発現させた細胞の解析などから、(compound 48/80を含む)多くの共通リガンドに対するMRGPRX2のEC₅₀はMrgprb2より低いことが報告された。今回、WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KIマウス由来の腹腔マスト細胞を利用する *in vitro* スクリーニング法により、同じ条件下で容易にMrgprb2/MRGPRX2リガンドの同定及びリガンドとしての強さの評価が可能になった。腹腔マスト細胞における脱顆粒の強さが、

- ①MRGPRX2-KI \approx WT > Mrgprb2-KO
- ②MRGPRX2-KI > WT > Mrgprb2-KO
- ③MRGPRX2-KI > WT \approx Mrgprb2-KO

の場合などが想定される。いずれもMRGPRX2リガンドであるが、③の場合はヒトでのみ重要な作用を有すると考えられる。また、腹腔マスト細胞の脱顆粒を誘導しないが、BMDCの脱顆粒を誘導する場合、その分子はMrgprb2/MRGPRX2とは異なる受容体(粘膜型マスト細胞に発現する)のリガンドとしてマスト細胞を脱顆粒させると想定される。Mrgprb2やMRGPRX2の発現とは無関係に腹腔マスト細胞が脱顆粒する場合、その分子は(結合組織型マスト細胞に発現する)Mrgprb2/MRGPRX2とは異なる受容体のリガンドとして作用すると想定される。

さらに、MRGPRX2リガンドの*in vivo*スクリーニング法の確立により、上記の*in vitro*スクリーニング法で同定されたりガンド分子が生体内でMRGPRX2依存的な偽アレルギーを誘導するか否かを評価することが可能になった。偽アレルギーの強さがMRGPRX2-KI > WT ≒ Mrgprb2-KOの場合、その分子はヒトでのみMRGPRX2依存的な偽アレルギーを誘導する可能性が高い。他方、MRGPRX2-KI腹腔マスト細胞を脱顆粒させない分子が*in vivo*でMRGPRX2依存的に偽アレルギーを誘導する場合、この分子は皮膚でマスト細胞以外の細胞に作用して、そこで放出される内因性MRGPRX2リガンドが組織型マスト細胞に作用して脱顆粒を引き起こすと考えられる。実際、ダニに含まれるプロテアーゼが神経細胞に作用し、活性化した神経細胞の放出するサブスタンスPが組織型マスト細胞を脱顆粒させて、皮膚炎症を増悪させることが報告されている⁹⁾。また、MRGPRX2リガンドの*in vitro*及び*in vivo*スクリーニング系において、サブスタンスPはcompound 48/80とほぼ同じような傾向(MRGPRX2-KI > WT > Mrgprb2-KO)を示すことが確認されている。いずれにせよ、本研究で確立した、MRGPRX2リガンドの*in vitro*及び*in vivo*スクリーニング法を活用して、偽アレルギーを誘導する分子の同定及び偽アレルギーの分子機序の解明が期待される(図4、5)。

5. 総括

WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KIマウス由来の腹腔マスト細胞の脱顆粒を指標とするMRGPRX2リガンドの*in vitro*スクリーニング法とWT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KIマウスの偽アレルギー反応を指標とするMRGPRX2リガンドの*in vivo*スクリーニング法が開発された。現在、様々な生体内外分子をスクリーニングしており、今後、皮膚の偽アレルギーの全貌を明らかにする予定である。

主に皮膚に塗布される化粧品は美容に貢献し健康的な生活に不可欠な存在であるがゆえに、偽アレルギーを誘導する成分の混入を避けることは不可欠である。従って、本研究の成果がコスメトロジーの進歩・発展に貢献することが期待される。

(引用文献)

- 1) McNeil BD, Pundir P, Meeker S, Han L, Undem BJ, Kulka M, Dong X. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature*. 2015 519, 237-241 (2015).
- 2) Bader M, Alenina N, Andrade-Navarro MA, Santos RA. *Pharmacol Rev*. MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. 66, 1080-105 (2014).
- 3) Alkanfari I, Freeman KB, Roy S, Jahan T, Scott RW,

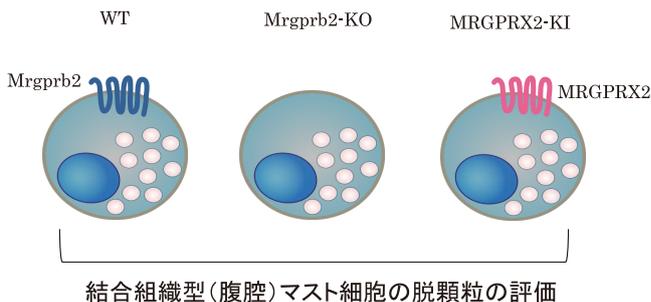


図4 MRGPRX2リガンドの*in vitro*スクリーニング法

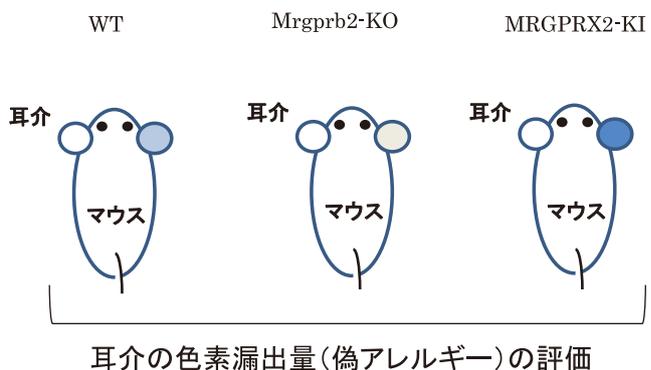


図5 MRGPRX2リガンドの*in vivo*スクリーニング法

Ali H. Small-Molecule Host-Defense Peptide Mimetic Antibacterial and Antifungal Agents Activate Human and Mouse Mast Cells via Mas-Related GPCRs. *Cells*. 8, 311 (2019).

- 4) Roy S, Chompunud Na Ayudhya C, Thapaliya M, Deepak V, Ali H. Multifaceted MRGPRX2: New insight into the role of mast cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 148, 293-308 (2021).
- 5) Kühn H, Kolkhir P, Babina M, Düll M, Frischbutter S, Fok JS, Jiao Q, Metz M, Scheffel J, Wolf K, Kremer AE, Maurer M. Mas-related G protein-coupled receptor X2 and its activators in dermatologic allergies. *J Allergy Clin Immunol*. 147, 456-469 (2021).
- 6) McNeil BD. MRGPRX2 and Adverse Drug Reactions. *Front Immunol*. 12, 676354 (2021).
- 7) Subramanian H, Gupta K, Ali H. Roles of Mas-related G protein-coupled receptor X2 on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions, and chronic inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 138, 700-710 (2016).
- 8) Takamori A, Izawa K, Kaitani A, Ando T, Okamoto Y, Maehara A, Tanabe A, Nagamine M, Yamada H,

Uchida S, Uchida K, Isobe M, Hatayama T, Watanabe D, Ando T, Ide T, Matsuzawa M, Maeda K, Nakano N, Tamura N, Ikeda K, Ebihara N, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kitaura J. Identification of inhibitory mechanisms in pseudo-allergy involving Mrgprb2/MRGPRX2-mediated mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol.* 143, 1231-1235 (2019).

9) Serhan N, Basso L, Sibilano R, Petitfils C, Meixiong J, Bonnart C, Reber LL, Marichal T, Starkl P, Cenac N, Dong X, Tsai M, Galli SJ, Gaudenzio N. House dust mites activate nociceptor-mast cell clusters to drive type 2 skin inflammation. *Nat Immunol.* 20, 1435-1443 (2019).