



Title	T cell death-associated gene 8の免疫学的機能解析
Author(s)	小野澤, 佳子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26145
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論 文 内 容 の 要 旨

〔 題 名 〕

T c e l l d e a t h - a s s o c i a t e d g e n e 8 の免疫学的機能解析

学位申請者 小野澤 佳子

現在承認されている既存薬を眺めてみると、その標的分子の約 45 % は受容体であり、中でも、G タンパク質共役型受容体 (G protein coupled receptor : GPCR) は疾患と関連していることが数多く報告され、既存薬の分子ターゲットの大部分を占めている。現在のところ、GPCR は 700 から 800 種類の存在が示唆されているが、その内、リガンド既知の GPCR は約 250 程度でしかない。つまり、残りの大部分はリガンド・機能ともに不詳であり、“ オーフアン GPCR ” として新規創薬ターゲットとしての可能性が期待される。また、オーファン GPCR の研究は、多様な生命現象の調節機構を理解するための基礎研究としても極めて重要と考えられる。本観点から著者は、炎症性疾患の分子病態解明と新規治療薬開発を目的に、オーファン GPCR として知られる 2 つの分子、T cell death-associated gene 8 (TDAG8) および G protein coupled receptor 84 (GPR84) に着目し、それぞれの分子について免疫学的な機能解析を行った。

TDAG8 は、未熟な胸腺細胞のアポトーシスに伴い、発現量が上昇する遺伝子群の第 8 番目の遺伝子として見出された。胸腺細胞特異的に TDAG8 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、デキサメタゾン誘導性の胸腺細胞におけるアポトーシス感受性が野生型(WT)マウスに比べて亢進する一方、TDAG8 欠損(KO)マウスでは、明確な表現系は観察されず、その疾患への関与は不明であった。しかし、TDAG8 が細胞外のプロトンを感知する GPCR であると報告されたことにより、TDAG8 の疾患との関わりに注目が集まっている。著者は、TDAG8 の発現が末梢の白血球、脾臓、胸腺、リンパ節を含めた免疫組織で高いことを確認したうえで、炎症部位が一般に脂肪酸や乳酸の産生によって周囲組織に比べて pH が低いことに着目し、プロトンセンサー機能を持つ TDAG8 が、炎症部位の低 pH 環境の形成と関係しているという仮説を立てた。この TDAG8 の炎症部位での役割の解明は、プロトンセンサーの機能を持つ GPCR を標的とした新たな炎症疾患治療薬の開発へと繋がる可能性を秘めており、既存の炎症疾患治療薬とは別の視点からのアプローチになるものと期待される。そこでまず、著者は TDAG8 KO マウスを利用し、炎症性疾患病態モデルにおけるフェノタイプを解析した。その結果、マウス抗タイプ II コラーゲン抗体誘導関節炎および遅延型過敏反応において、野生型マウス群と比較し、TDAG8 KO マウス群において病態の増悪が認められた。

次に、TDAG8 の詳細な機能解析を行うために、アゴニストの取得を試みた。TDAG8 は、Gs タンパクと共役する GPCR であることから、受容体が活性化されると細胞内の cAMP 濃度が上昇する。そこで、ヒト TDAG8 安定発現させた CHO 細胞株を樹立・利用し、細胞内 cAMP 濃度の上昇を指標に第一三共社内化合物ライブラリーより約 18 万検体について

てスクリーニングを行った結果、ヒット化合物 BTB09089 を得た。BTB09089 のマウス TDAG8 に対するアゴニスト作用、および構造的に近縁でかつpH依存性を示す GPR4 に対するアゴニスト作用を評価するため、各 GPCR を一過性過剰発現させた HEK 細胞を用い、細胞内 cAMP 濃度の上昇を指標に解析した。その結果、マウス TDAG8 に対してはアゴニスト作用を示したが、GPR4 に対してはアゴニスト作用を示さなかった。さらに別のアッセイ系である GTP γ S 結合試験法を用いてアゴニスト活性を検討した結果、このアッセイ系においても TDAG8 特異的なアゴニスト活性が確認された。以上により、複数のアッセイ系にてヒトおよびマウス TDAG8 に対して、アゴニスト作用をもつ化合物 (BTB09089) を得ることができた。

そこで、BTB09089 を活用し、TDAG8 KO マウスおよび WT マウス由来プライマリー細胞を用いて TDAG8 の機能を解析した。その結果、脾臓細胞においては抗 CD3 抗体刺激による IL-2 産生抑制作用、またチオグリコレート誘導腹腔浸潤マクロファージにおいては、LPS 刺激による TNF- α 産生抑制作用、IL-6 産生抑制作用、IL-10 産生増強作用を示した。これらの作用は WT 由来細胞にのみ認められ、KO 由来細胞では認められなかった。これらの結果より、BTB09089 は TDAG8 を介して、サイトカイン産生調節作用 (IL-2 産生抑制作用、TNF- α 産生抑制作用、IL-6産生抑制作用、IL-10 産生増強作用) を有し、免疫反応を負に制御する可能性が示された。

一方、GPR84 は、expressed sequence tag (EST) 法により単離された GPCR の一種であり、C9 から C14 の炭素鎖長を持つ中鎖脂肪酸によって活性化され、短鎖および長鎖脂肪酸には反応しない脂肪酸センサーとして知られている。GPR84 は、骨髄や脾臓の T 細胞および B 細胞に発現することが報告されており、LPS によって活性化された単球/マクロファージにおいて発現が誘導されるとともに、神経の炎症時にはミクログリアにおいても発現が上昇する。従って、炎症部位での脂肪酸センサーである GPR84 は、TDAG8 と同様、炎症反応に対して何らかの機能を有していることが考えられる。しかし、GPR84 に関する薬理的な実験はこれまで行われておらず、その機能の詳細も明らかにされていない。従って、炎症部位に認められる脂肪酸の蓄積と免疫細胞の機能変化との関連を解析する目的において、GPR84 の研究は有用であると考えられる。著者は GPR84 についても、アゴニストを創製することで、細胞レベルにおける機能解析を行った。GPR84 は、Gi タンパクと共役する GPCR であることから、ヒト GPR84 安定発現させた CHO 細胞株を樹立・利用し、forskolin 刺激による細胞内 cAMP 濃度上昇の抑制活性を指標に約 24 万検体についてスクリーニングを行った結果、GPR84 のアゴニストとして 6-OAU を見出した。さらに 6-OAU を用いて GPR84 の機能解析を行った結果、6-OAU はヒト由来マクロファージ細胞株 (U937) において、LPS 刺激による TNF- α 産生増強作用を示した。これらの結果より GPR84 が炎症反応増悪に関与する可能性を見出した。

以上、本研究では、プロトンセンサーTDAG8が、関節炎をはじめとする炎症性疾患に関与する可能性、および TDAG8 の機能解析に必要なツールであるアゴニストをスクリーニングし、TDAG8 が炎症性サイトカイン産生調節に関与することを見出した。また、脂肪酸センサーである GPR84 の機能解析に必要なツールであるアゴニストもスクリーニングし、GPR84 が炎症反応に関与する可能性を見出した。これらの成果は、プロトンセンサーおよび脂肪酸センサーが炎症性疾患をはじめとする疾患治療の新たな創薬ターゲットとなる可能性を示すものと考えられる。今後、新たな難治性疾患治療法の発見につながることに期待したい。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (小 野 澤 佳 子)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 堤 康央
	副 査	教授 土井 健史
	副 査	教授 辻川 和丈
	副 査	教授 小比賀 聡

論文審査の結果の要旨

本論文では、免疫疾患等に対する画期的新薬のシーズ探索の観点から、オーファン GPCR TDAG8 および GPR84 の免疫学的機能解析を目的に、TDAG8 についてはそのノックアウトマウスを用い、種々の病態モデルにおけるフェノタイプ解析に加え、アゴニストを探索した。また、GPR84 についてはアゴニストの探索を図り、以下の興味深い知見が得られた。

1. 創薬ターゲットとして期待される TDAG8 の発現を解析したところ、胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄で、高発現していることが判明した。また CD4+、CD8+、B 細胞、およびマクロファージでの発現も認めた。
2. TDAG8 KO マウスでは、抗コラーゲン抗体誘導関節炎モデルにおいて、関節炎の悪化が観察され、TDAG8 の関節炎の発症への関与が示唆され、創薬標的としての可能性を認めた。
3. TDAG8 KO マウスを用いた遅延型過敏反応モデルにおいて、炎症が悪化したことから、TDAG8 がアレルギーをはじめとする炎症性疾患に関与することを認めた。
4. オーファン GPCR であった TDAG8 のアゴニスト、BTB09089 を見出した。
5. BTB09089を用い TDAG8 の機能を解析したところ、脾細胞由来の T 細胞における IL-2 の産生を負に制御することが判明した。
6. BTB09089のマウス腹腔浸潤マクロファージへの作用を検討した結果、TNF- α やIL-6 といった炎症性サイトカインの産生を抑制すること、逆に、IL-10の産生を増加させることを認めた。
7. 中鎖脂肪酸センサーである GPR84 のアゴニスト (6-OAU) を見出し、GPR84 が炎症反応増悪に関与する可能性を見出した。

本研究では、プロトンセンサー TDAG8 の免疫系疾患への関与について解析を試み、TDAG8 が炎症性疾患へ関与する可能性および TDAG8 の機能解析に必要なツールであるアゴニスト、さらに TDAG8 が炎症性サイトカイン産生調節に関与することを見出した。また、脂肪酸センサーである GPR84 の機能解析に必要なツールであるアゴニストおよび GPR84 が炎症反応に関与する可能性を見出した。これらの成果は、プロトンセンサーおよび脂肪酸センサーが炎症性疾患をはじめとする疾患治療の新たなターゲットとなる可能性を示唆するものと考えられる。今後、新たな発見につながることに期待したい。

以上は、今後の炎症性難治性疾患克服に向けた興味深い知見であり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。