The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

博 士 論 文 題 名

T cell death-associated gene 8 の免疫学的機能解析

学位申請者

小野澤　佳子

目次

略語一覧 1

緒論 3

本論 6

第一章　TDAG8 KO マウスにおけるフェノタイプ解析 6

第一節　マウス TDAG8 の発現解析 7
第二節　関節炎モデルにおける評価 10
第三節　遅延型過敏反応モデルにおける評価 15
第四節　小括 20

第二章　オーファン GPCR (TDAG8、GPR84) のアゴニスト探索
およびアゴニストを用いた細胞機能評価 21

第一節　cAMP 試験およびGTPγS 結合試験による
TDAG8 アゴニスト探索 22
第二節　TDAG8 アゴニストのマウス脾臓細胞における活性評価 29
第三節　TDAG8 アゴニストのマウスマクロファージ細胞における
活性評価 32
第四節　GPR84 アゴニストのマクロファージ細胞における
活性評価 35
第五節　小括 39

総括 41

結論 44

謝辞 46

引用文献 47

主論文 53

参考論文 54

略語一覧

AC	: Adenylate cyclase
CHO	: Chinese hamster ovary
CD3	: Cluster of differentiation 3
CAIA	: Anti-type II collagen antibody-induced arthritis
CFA	: Complete Freund's adjuvant
CIA	: Type II collagen-induced arthritis
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate
CsA	: Cyclosporin A
DTH	: Delayed-type hypersensitivity
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EST	: Expressed sequence tag
GPCR	: G protein coupled receptor
GPR84	: G protein coupled receptor 84
HBSS	: Hanks' Balanced Salt Solution
HEK	: Human embryonic kidney
H37RA	: Mycobacterium Tuberculosis H37Ra
HTS	: High throughput screening
IBMX	: 3-isobutyl-1-methylxanthine
IFA	: Incomplete Freund's adjuvant
IFN	: Interferon
IL-2	: Interleukin 2
IL-6	: Interleukin 6

IL-10	: Interleukin 10
KO	: Knock out
LPS	: Lipopolysaccharide
mBSA	: Methylated bovine serum albumin
PCR	: Polymerase chain reaction
PEC	: Peritoneal exudate cells
PMA	: Phorbol 12-myristate 13-acetate
TDAG 8	: T cell death associated gene 8
TG	: Thioglycollate
TNF	: Tumor necrosis factor
WT	: Wild type

緒　論

人類は常に疾病と向き合って生きていかなければならないが、その疾病は、時代・環境・地域・文化・人種などの複数の因子の影響を受ける。現代社会においては、栄養不足や衛生状態の悪さに起因する疾病が減少する一方で、代謝疾患や免疫・アレルギー疾患の増加が著しい[1)]。近年、これら多くの現代病の発症や進行には、往々にして慢性の炎症が関わることが明らかになりつつあり、とりわけ社会の高齢化が著しい我が国では、これら炎症性疾患の分子病態の解明や治療薬の開発は重要課題である。これまで、炎症性疾患に対する治療薬は、免疫を非特異的に低下させ炎症を鎮めるステロイド剤や免疫抑制剤などが主流であったが、昨今では、炎症性のサイトカインシグナルを標的とした分子標的薬が台頭し、多くの製薬メーカーによって開発が進められている[2)]。しかし、炎症性疾患の中には、患者数が極めて少なく、未だ有効な治療薬に乏しい希少疾患も数多く存在する[3)]。また、同じ疾患に分類されても、その原因や重症度、臨床経過や治療応答性など、炎症の病態は千差万別といっても過言では無い。従って、１つの抗炎症薬が全ての炎症性疾患に対して著効することはありえず、炎症性疾患に対する新しい薬剤を希求する患者が絶えることはない。

さて、現在承認されている既存薬を眺めてみると、その分子ターゲットの約 45 % は受容体である[4)]。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場合が多く、既存薬の分子ターゲットの大部分を占めている[4)]。これまで GPCR の同定は、作用する物質（リガンド）が先に見出され、その後、対応する GPCR が同定されてきた。しかし近年のゲノム研究の進展により、疎水性アミノ酸クラスターが 7 回繰り返して存在する特徴的な共通構造を手がかりに、ゲノムデータベースの解析から直接 GPCR 遺伝子を見出すことが可能になった[5)]。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 程度である[5)]。つまり、残りの大部分はリガンド・機能ともに不詳であり、”オーファン 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[6)]。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、dexamethasone 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マウスに比べて亢進する一方[7)]、TDAG8 欠損マウスでは、明確な表現系は観察されず、その疾患への関与は長年不明であった[8)]。しかし、TDAG8 が細胞外プロトンを感知するプロトン感知性 GPCR であると報告されたことにより、この TDAG8 の疾患との関わりに注目が集まっている[9-12)]。そのような背景から著者は、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[13)]、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[14)]に着目し、TDAG8 のプロトン感知性という特性が、炎症部位の低 pH 環境と関係しているという仮説を立てた。プロトン感知性の TDAG8 の炎症部位での役割の解明は、プロトン感知性 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となるものと期待される。

一方、GPR84 は、expressed sequence tag (EST) 法により単離された GPCR の一種であり[15)]、C9-C14 の炭素鎖長を持つ中鎖脂肪酸によって活性化され、中鎖以外の短鎖および長鎖脂肪酸には反応しない脂肪酸センサーである[16)]。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[17)]、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[15)] 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[18)]。従って、炎症部位に蓄積する脂肪酸[14)] に対して感知性を示す 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 に関する薬理学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。

以上の背景に基づき、本研究では、TDAG8 の生体内での機能および炎症性疾患病態との関連を解明するため、TDAG8 の個体レベル、細胞レベルにおける免疫学的機能解析を試みた。個体レベルでの機能解析には、TDAG8 ノックアウト (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。一方、細胞レベルにおける機能については、細胞内のセカンドメッセンジャーの変動を指標にアゴニストを探索

することで解析した。また、脂肪酸センサーとしての機能が知られる GPR84 についても、同様に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。これらの実験の結果、TDAG8 は炎症反応抑制に、 GPR84 は炎症反応増悪に関与する可能性を見出した。これらの研究成果は、免疫組織に発現が高いプロトンセンサーである TDAG8、 および中鎖脂肪酸センサーである GPR84 が新規の炎症性疾患治療のターゲットとなる可能性を示す有用な知見と考えられ、ここに博士論文として記した次第である。

本　論

第一章　TDAG8 KO マウスにおけるフェノタイプ解析

生体は、ウィルスや細菌などの感染をはじめとする様々なストレスを受けることで、ストレスを受けた組織や細胞から、プロスタグランジン類や炎症性サイトカインなどの炎症関連物質を産生し、炎症応答を惹起する。また炎症部位では、感染した細菌からの脂肪酸の産生や炎症周辺に存在する細胞における乳酸産生の増加などにより、pH が低下する。細胞外液の pH の低下に伴って、炎症部位に高濃度のプロトンが蓄積し、そのプロトンが炎症部位の細胞の機能に多彩な影響を及ぼす可能性について示されている[14)]。しかし、その分子機構はほとんど明らかになっておらず、実際に炎症性疾患とプロトンとの関連についての報告もない。従って、プロトンセンサーとして報告のある TDAG8 の機能を解析することで、炎症部位における pH 低下と集積する免疫細胞の機能変化との関連についての有用な情報が得られると考えられる。そこで本章では、炎症性疾患治療のターゲットとしての可能性を追求する目的で、TDAG8 の生体における発現解析を行うとともに、TDAG8 の炎症性疾患への関与について検討した。本研究では、TDAG8 KO マウスを作製し、TDAG8 の機能解析の手段として用いた。まず、TDAG8 の炎症性疾患への関与について調べる目的で、免疫学的病態モデルにおける TDAG8 KO マウスのフェノタイプ解析を行った。

第一節　マウス **TDAG8** の発現解析

上述したように、 TDAG8 は免疫組織に発現が高いことや、胸腺細胞のアポトーシスに伴って発現の上昇が認められることが知られている[13)]。また、炎症部位や、虚血部位・腫瘍内部などの酸素不足の部位では pH の低下が認められており、プロトンを感知する受容体である TDAG8 が、炎症部位に集積する免疫細胞の機能調節に対し、何らかの生理的役割を担っていることが考えられる[14)]。そこで、TDAG8 KO マウス解析に先立ち、TDAG8 が免疫細胞の機能調節に関与する可能性を調べる目的で、正常マウスにおける TDAG8 の発現を臓器別・免疫細胞種別に解析した。

実験材料

[試薬]

mouse anti-CD4 antibody、mouse anti-CD8 antibody、mouse anti-B220 antibody、mouse anti-CD11b antibody は、BD Pharmingen より、Thioglycollate Medium は DIFCO より、Qiagen RNeasy Kit , QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit は Qiagen よりそれぞれ購入した。

その他の試薬は、分子生物学研究用グレード、研究用特級グレードまたはそれに準ずるものを使用した。なお、本研究に使用した fetal bovine serum (FBS) は全て、56 ℃、30 分間の非働化処理を行った。

[動物]

C57BL/6J マウス（H-2^b、雌性　8 週齢）は日本チャールスリバー社より購入した。なお、本研究における動物の飼育および実験は第一三共株式会社実験動物施設内において行い、本実験内容は第一三共株式会社実験動物研究倫理委員会で承認済みである。

実験方法

[発現解析用組織・細胞調製方法]

C57BL/6J マウスより心臓、胸腺、脾臓、腎臓、脳、リンパ節、肺、肝臓、大腸、骨髄を採取した。また、CD4 T 細胞・CD8 T 細胞・B 細胞は脾臓組織より、 CD4+, CD8+, B220+細胞として調製した。マクロファージ細胞はチオグリコレートを腹腔内に投与 4 日後の腹腔内浸潤細胞より CD11b 陽性細胞として調製した。

[RNA 調製方法]

上記で採取された各種細胞および組織を RLT バッファーで溶解し、Qiagen RNeasy Kit を用いて total RNA を調製した。

[TDAG 8 発現解析方法]

QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit を使用し、ONE-step real PCR (polymerase chain reaction) 法にて解析を行った。2 X QuantiTect SybrGreen buffer 10 μL、Primer F (GATCACTATTTGTTTCCCATT, 10 μM) 1 μL、Primer R (TTGCCATTTCTCTAAAGGGTA, 10 μM) 1 μL、QuantiTect RT Mix 0.25 μL、DW 6.75 μL を混合した反応液に RNA 1 μL (50 ng/mL) を加えた後、Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムを用いて各種細胞および組織における TDAG8 遺伝子の発現量を 50 ug RNA 量におけるコピー数として相対的に示した。

<u>結果および考察</u>

マウス TDAG8 の組織における発現は、臓器別にみると、胸腺、脾臓、リンパ節、骨髄などの免疫組織に高く認められ、さらに免疫細胞においては、CD4+, CD8+, B 細胞、マクロファージそれぞれ、同程度に認められた (Fig. 1)。

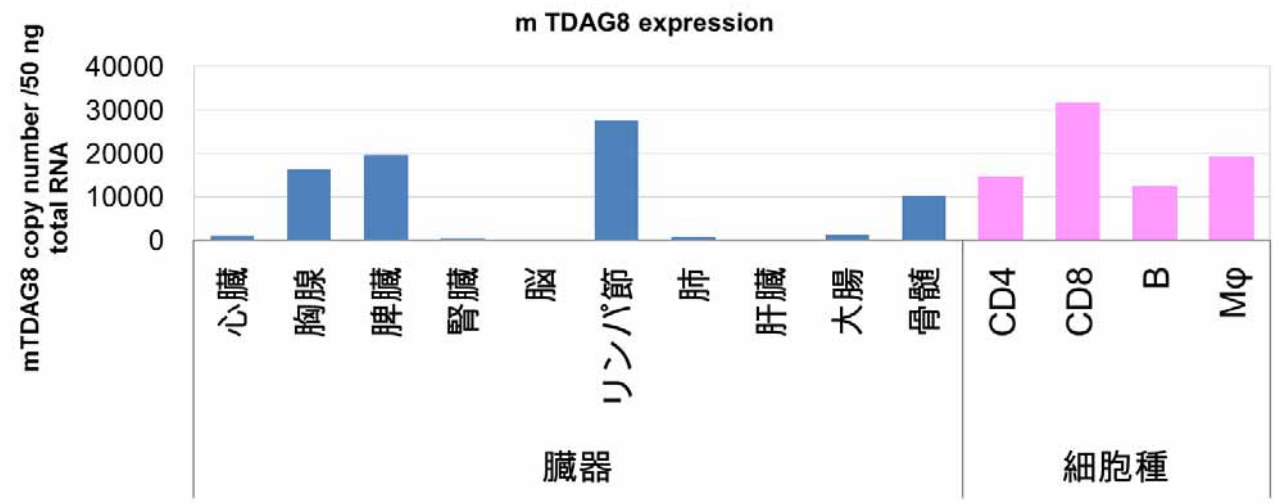


Figure. 1 Expression profile of mouse TDAG8.
The gene expression of mouse TDAG8 in various tissues was determined by real-time PCR. Actin was used as an internal control. The mouse TDAG8 transcript number was normalized to the quantity of β-actin. Data are the means (n=2).

以上の発現解析から TDAG8 は、炎症時において、炎症反応に関与する細胞に作用する可能性が示唆された。また未検討ではあるが、胸腺、骨髄にも発現していることが報告されていることから[13)]、非炎症部位における未熟な免疫細胞の分化やアポトーシスに関与する可能性も示唆された。

第二節　関節炎モデルにおける評価

TDAG8 の発現は、主として免疫組織であり、また細胞別の発現解析からも免疫細胞に広く認められたことから、免疫細胞の活性化を伴う炎症性疾患へ関与することが考えられる。本研究では TDAG8 KO マウスを用い、抗タイプ II コラーゲン抗体誘導関節炎 (CAIA) およびタイプ II コラーゲン誘導関節炎 (CIA) で有用な知見が得られたので報告する。CAIA および CIA モデルはともに、ヒトの慢性関節リウマチに類似した病理的所見を有したモデルである。CAIA モデルは、関節のコラーゲンに対する抗体を直接投与することで主に好中球およびマクロファージの活性化によって関節炎を誘導することが可能な、最もシンプルな関節炎モデルである[19-21]（Fig. 2）。本モデルは、T 細胞の感作過程を介さないモデルではあるものの、マウスの系統差に関係なく安定して病態を発症させることができるため、TDAG8 の関節炎をはじめとする炎症性疾患への関与を調べる目的において有用なモデルの一つであると考えられる。一方、CIA モデルは、関節のコラーゲンを 2 回感作することで関節炎を誘導するモデルであり、CAIA とは異なり、T 細胞への抗原感作過程などを含めた獲得性免疫による炎症反応を反映したモデルである（Fig. 2）。 獲得性免疫への関与の可能性を検討する目的においては、本モデルを用いた。

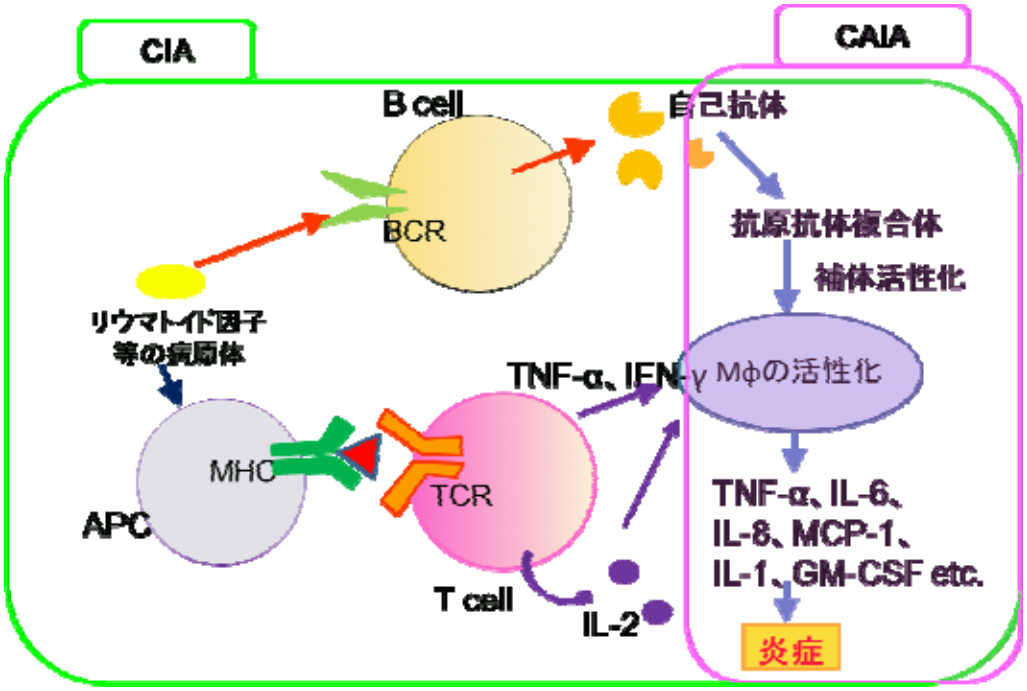


Figure. 2　Mechanism of mouse CAIA and CIA model.

実験材料

[試薬]

Anti-type II collagen antibody mixture は Immuno-Biological Laboratories より、Lipopolysaccharide (LPS) は CALBIOCHEM より、Bovine type II collagen は コラーゲン技術研究会 より、Mycobacterium Tuberculosis H37Ra (H37RA) および incomplete Freund's adjuvant (IFA) は DIFCO よりそれぞれ購入した。その他の試薬は前節の実験材料に準じた。

[動物]

TDAG8 KO マウスおよび 野生型 (WT) マウスは Deltagen 社 (CA, USA) よりヘテロマウスを購入し、日本チャールスリバー社にて委託飼育・繁殖したものを用いた (Deltagen 社では、129 系 ES 細胞を用いて作製した KO クローン細胞をもとに、偽妊娠マウスに移植、キメラマウスを作製した。その後、得られた F1 マウスを C57BL/6 マウスと交配させ F2 マウスを作製し、インタークロスにより得られた F2 マウスを供給) 。マウスのジェノタイプについては納品前に日本チャールスリバー社にてジェノタイピングを行い確認した。その他の動物は前節の実験材料に準じた。

実験方法

[CAIA 誘導方法]

TDAG8 KO マウスおよび WT マウスの雄を 9 週齢まで馴化後、使用した (WT : n=9, KO : n=13)。 Day 0 に抗タイプ **II** コラーゲン抗体を 2 mg/mouse で尾静脈内投与し、Day 3 に LPS を 100 μg/mouse で腹腔内投与した。

[CAIA 評価方法]

関節炎の評価は抗体投与後、四肢の腫脹の程度をスコア化することによる数値および発症率を指標として行った。四肢のスコアの合計値として示し、Wilcoxon 検定法を用いて有意差検定を行った。

スコア基準は以下の通りである。

スコア0：変化なし

スコア1：指が 1 本腫れた状態

スコア2：指が 2 本以上腫れた状態

スコア3：全体が腫れた状態

スコア4：全体が腫れ、硬直および骨にまで異常が認められた状態

[CIA 誘導方法]

TDAG8 KO マウスおよび WT マウスの雌を 8 週齢まで馴化後、使用した (WT : n=11, KO : n=10)。 2 mg/mL タイプ II コラーゲンと 5 mg/mL の H37RA / IFA を 1 : 1.3 の割合で混合し、超音波処理によりエマルジョンを形成させた。このエマルジョンをマウス 1 匹あたり 100 μL、3 週間の間隔で（Day 0 および Day 21 に）、計 2 回尾根部に皮内投与した。

[CIA 評価方法]

関節炎の評価は 2 回目の免疫後、四肢の腫脹の程度をスコア化することによる数値および発症率を指標として行った。スコア基準は CAIA 評価方法に準じた。

<u>結果および考察</u>

TDAG8 KO マウスと WT マウスに対し、CAIA モデルを構築し、それぞれの関節炎のスコアを比較した。その結果、TDAG8 KO マウスでは WT マウスよりも 4 日早期にスコアの上昇が認められ、スコアの最大値も高かった。さらに関節炎の持続期間においても KO マウスの方が長く（Fig. 3 A）、発症率においても TDAG8 KO マウスは WT マウス に比べ高い値を示した（Fig. 3 B）。

また、TDAG8 KO マウスにおいては関節炎の発症が Day 0 に抗コラーゲン抗体を投与後、LPS 投与前の Day 2 においても既に 2 割程度のマウスで認められた。さらに、Day 3 に LPS を投与した後の発症期間も早かった。TDAG8 KO マウスにおいて関節炎の発症が早期に認められたことから、抗原抗体複合体を介した補体の活性化によって誘導される好中球およびマクロファージの活性化反応（炎症部位への遊走および異物に対する貪食作用など）が、 WT マウスに比べて、TDAG8 KO マウスの方が強い可能性が考えられた。また、 LPS 刺激に誘導される好中球およびマクロファージの炎症反応の増幅が TDAG8 KO マウスは WT マウスに比べ強い可能性が考えられた。TDAG8 は関節炎の増悪に関与する可能性が示された。

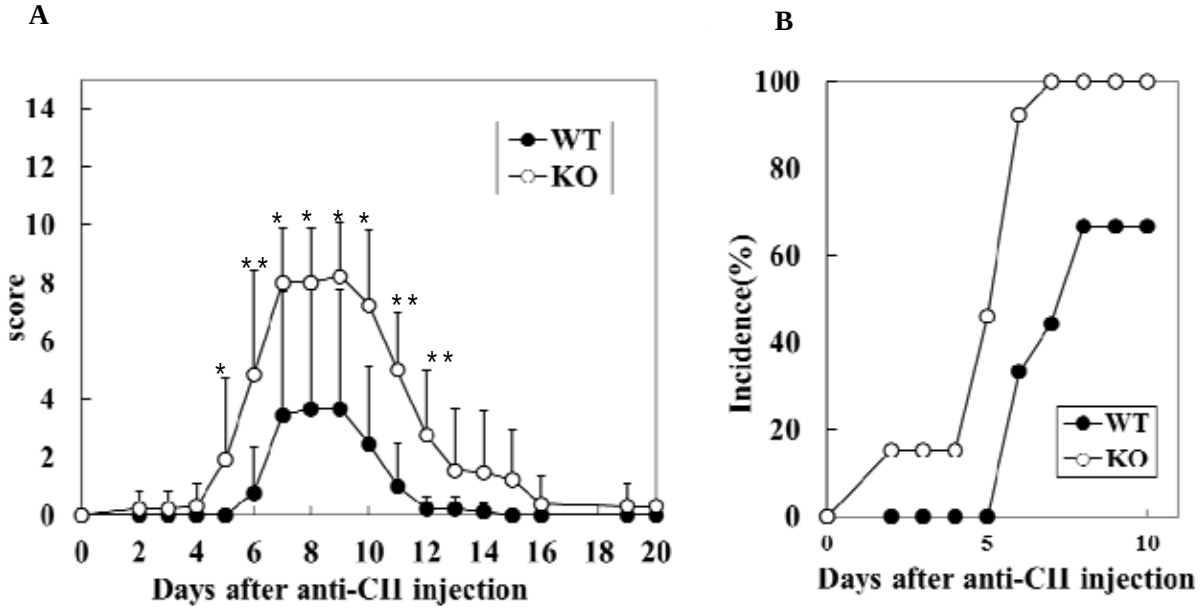


Figure. 3　Anti-type II collagen antibody-induced arthritis in WT and TDAG8 KO mice.
Arthritis scores (A) and the incidence (B) of WT and TDAG8 KO mice with anti-type II collagen antibody-induced arthritis. WT mice (●, n=9) and TDAG8 KO mice (○, n=13) were injected intravenously with an anti-type II collagen cocktail (day 0), followed by LPS injection intraperitoneally (day 3). The arthritis score was expressed as the means ± S.D. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, significantly different from WT mice.

TDAG8 KO マウスを用いた CAIA モデルにおいて、関節炎の増悪が認められたことから、TDAG8 がマクロファージおよび好中球の炎症惹起反応を伴う関節炎に関与することが示唆された。そこで次に、関節炎発症に関して T 細胞の獲得性免疫による炎症反応に関与する可能性について、CIA モデルを用いて[22-25] 検討した。

CIA の結果についてスコアの推移をみると、TDAG8 KO マウスにおいて WT マウスに比べ CAIA と同様、スコアの上昇が早期に認められ、関節炎スコアの最大値も高く、関節炎を増悪する傾向が認められた（Fig. 4 A）が、有意差を認めなかった。また、発症率においてもスコアが最大値に達した時点 (Day 40) においては両群に違いはなく、有意差を認めなかった（Fig. 4 B）。

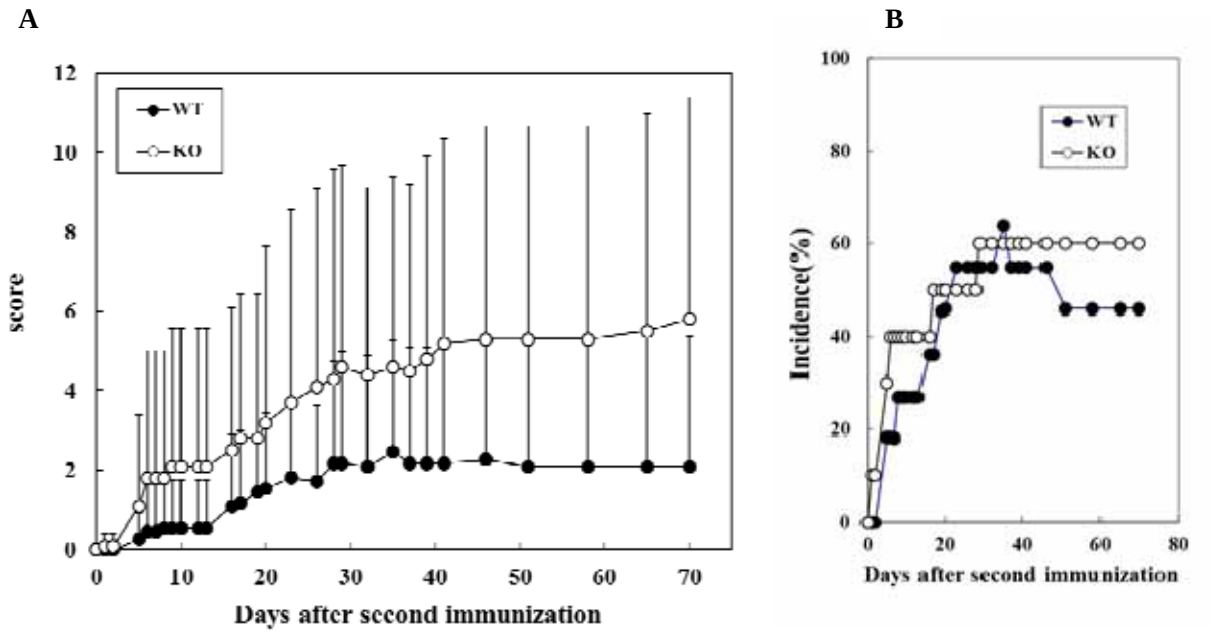


Figure. 4　Bovine type II collagen-induced arthritis (CIA) in WT and TDAG8 KO mice.

Arthritis scores (A) and incidence (B) of WT mice (●, n=11) and TDAG8 KO mice (○, n=10) with CIA. Arthritis score was expressed as the means ± S.D.

本モデルでの検討では、WT マウスと比較して関節炎が悪化する傾向にあったものの、病態の発症率が低かったこと、さらにスコアについては個体間のばらつきが大きかったことから、結果的に有意な差が認められなかった。このことから、本実験結果からは TDAG8 の T 細胞の獲得性免疫による炎症反応への関与を明らかにすることはできなかった。

第三節　遅延型過敏反応モデルにおける評価

タイプ II コラーゲン誘導関節炎のモデル動物を用いた結果からは TDAG8 の T 細胞の獲得性免疫による炎症反応への関与について明らかにすることができなかった。そこでよりシンプルかつマウスの系統差に関係なく 獲得性免疫機構への関与を評価できるモデル系である遅延型過敏反応 (DTH) モデル (Fig. 5) を用いて獲得性免疫による炎症反応への関与を評価した。DTH は、抗原とその抗原に特異的に反応する感作 T 細胞によって誘導される炎症反応であり、その反応は T 細胞の感作過程と、感作 T 細胞によって炎症反応が増幅される惹起過程の 2 つの過程により成立する。抗原が体内に侵入すると T 細胞が感作され、感作 T 細胞へと分化する。その後、その感作 T 細胞が再び同じ抗原に出会うと、自ら IFN-γ、TNF-α、IL-2 などの炎症性サイトカインを産生し、マクロファージなどの炎症性細胞の活性化および炎症部位への遊走を誘導するとともに炎症が惹起され、DTH が誘導される[26)]。従って本モデルは T 細胞の獲得性免疫による炎症反応への関与を解析する手段として有用なモデルであると考えられる。

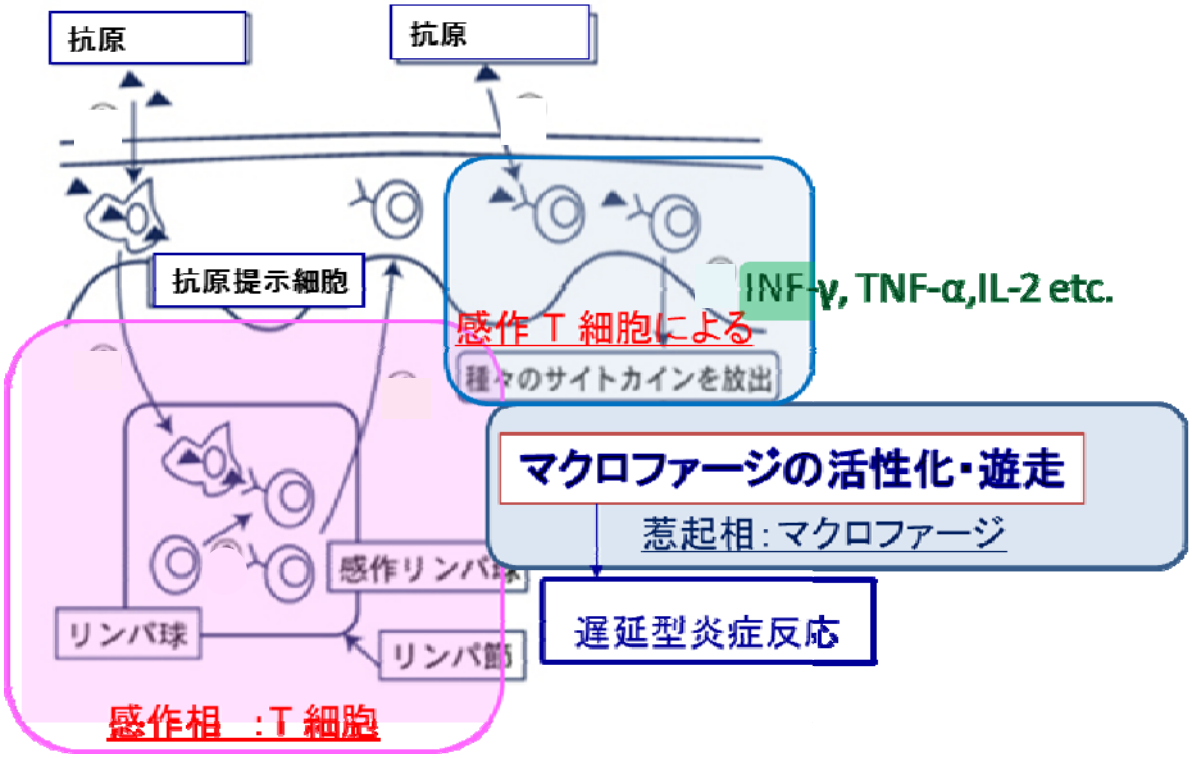


Figure. 5　Relation of macrophage, neutrophil and T cell in DTH reaction.

実験材料

[試薬]

Methylated bovine serum albumin (mBSA) は Sigma-Aldrich より、complete Freund's adjuvant (CFA) は DIFCO よりそれぞれ購入した。その他の試薬は前節の実験材料に準じた。

[動物]

前節までの実験材料に準じた。

実験方法

[DTH 誘導方法]

TDAG8 KO マウスおよび WT マウスの雌を 9 週齢まで馴化後、使用した (n=8)。mBSA 5 mg/mL を CFA と 1：1 の割合で混合し、氷冷下、ポリトロンホモジナイザー（Kinematica AG, PT3100）を用いてホモジナイズ（20,000 rpm, 2 分間 X 2 回、30 秒間隔）することによりエマルジョンを形成させた。このエマルジョンを、マウス 1 匹あたり 50 μL を 2 箇所、計 100 μL を腹部に皮内投与し、その 7 日後、mBSA 0.5 mg/mL を 50 μL 右肢裏に皮下投与した。コントロールとして左肢裏には生理食塩水を 50 μL 皮下投与した。24、 48、 72 時間後、両後肢の腫脹をダイアルゲージ（Ozaki 製作所製）で測定した。腫脹の程度は肢裏に免疫する前の後肢裏の厚さとの差で示した。WT マウスおよび TDAG8 KO マウスの腫脹の差は *t* 検定を行った。

[細胞移入による DTH 誘導方法]

上記の DTH モデル誘導法により Day 0 に腹部皮内に mBSA で感作したマウスをドナーとして用い、Day 7 に脾臓を採取し、RPMI1640 培地（10% FBS を含む）中ですりつぶし、100 μm のセルストレイナーに通して単細胞化し、遠心した。抗 CD3 マイクロビーズにより T 細胞を分離し、T 細胞画分に HBSS を加えて再懸濁し、遠心した。得られた細胞を HBSS に懸濁し、無感作状態のレシピエントマウスに尾静脈内投与（5 X 10^6 cells/200 μL/mouse ）した。移入当日に 0.5 mg/mL の mBSA を 50 μL 右肢裏に、コントロールとして左肢裏には生理食塩水を 50 μL 皮下投与し DTH を誘導した。24 および 48 時間後、両後肢の腫脹をダイアルゲージで測定した。腫脹の程

度は肢裏に免疫する前の後肢裏の厚さとの差で示した。ドナー細胞の違いによる腫脹の差およびレシピエントマウスの違いによる腫脹の差は *t* 検定を行った。

実験 A

ドナーを WTマウス および TDAG8 KO マウス (雌、14 週齢) 、レシピエントを C57BL/6J (雌、8 週齢) として検討した（Fig. 7 A）。

実験 B

ドナーを C57BL/6J マウス（雌、7 週齢）、レシピエントを WT マウスおよび TDAG8 KO マウス (雌、14 週齢) として検討した（Fig. 7 B)。

結果および考察

通常の DTH を誘導した結果、肢裏への mBSA および生理食塩水投与、24, 48, 72 時間後の肢において、WT マウスおよび TDAG8 KO マウスともにコントロールの生理食塩水を投与した肢に比べ、mBSA を投与した肢は有意な腫脹を認め、DTH が成立していることがわかった。さらに mBSA を投与した肢において TDAG8 KO マウスは WT マウスに比べ 1.5 倍程度の腫脹が認められ、DTH の症状が有意に悪化した（Fig. 6）。

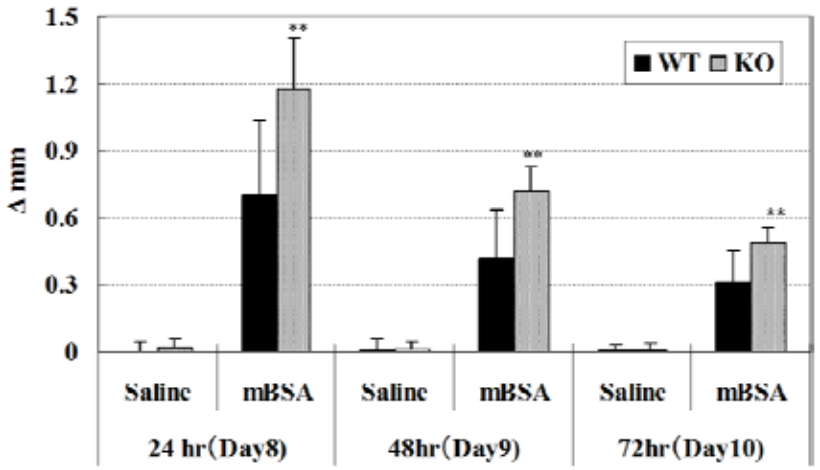


Figure. 6 DTH in TDAG8 KO mice and WT mice.

Hindpaw swelling was calculated by subtracting the thickness at each point (24, 48, 72 hr) from the thickness before the challenge (Δ mm). WT (n=8), KO (n=8). ** $p<0.01$ significantly different from WT mice.

TDAG8 KO マウスに対する DTH モデルにおいて、症状が悪化したことから、TDAG8 が T 細胞の獲得免疫機構に関与する可能性が示唆された。そこで DTH 成立に必要な生体反応に関して TDAG8 が関与する可能性を調べた。

DTH は、感作相と惹起相の 2 相の生体反応により成立する。感作相では T 細胞が抗原により感作され、抗原に対する反応性を持つ感作 T 細胞へと分化する。惹起相では感作された T 細胞が再度抗原にさらされることで活性化され、好中球、マクロファージの炎症反応を惹起する[26)]。TDAG8 は T 細胞の感作相に関与するのか、あるいは抗原により活性化された T 細胞によってマクロファージなどの細胞において炎症が惹起される惹起相に関与するのかを調べることを目的とし、mBSA で感作後、7 日目の脾臓から調製した感作 T 細胞を無感作のマウスに移入することで DTH を誘導する方法を用いて検討した。

まず、TDAG8 が T 細胞の感作過程および感作 T 細胞の機能に関与する可能性について検討した。WT マウスおよび TDAG8 KO マウスから調製した抗原感作 T 細胞を無感作の WT マウスに移入し、DTH を誘導し、両群を比較した。その結果、まず肢裏に mBSA およびコントロールとして生理食塩水投与 24 ,48 時間後において、WT マウス、TDAG8 KO マウスどちらの由来の細胞を移入した群においても mBSA を投与した肢は、コントロールの生理食塩水を投与した肢に比べ、有意な腫脹を認め、細胞移入による DTH が成立していることがわかった。さらに、mBSA を投与した肢において比較すると、TDAG8 KO マウス由来の抗原感作 T 細胞移入群は、WT マウス由来の細胞移入群に比べ 1.2 倍程度の腫脹を認め、有意な病態の増悪が認められた（Fig. 7 A）。TDAG8 が T 細胞の感作過程、および感作 T 細胞の機能に関与する可能性が示唆された。

次に、TDAG8 が惹起相に関与する可能性について検討した。WT マウスから調製した抗原感作 T 細胞を、無感作の TDAG8 KO マウスおよび WT マウスに移入し、DTH を誘導し、両群を比較した。その結果、mBSA を投与した肢において、コントロール生理食塩水を投与した肢に比べ、両群ともに有意な腫脹が認められ、DTH が成立していた。さらに mBSA を投与した肢において比較した場合、両群に違いは認められなかった（Fig. 7 B）。従って、本モデルにおいて TDAG8 が惹起相に関与する可能性および割合は低いことが示唆された。

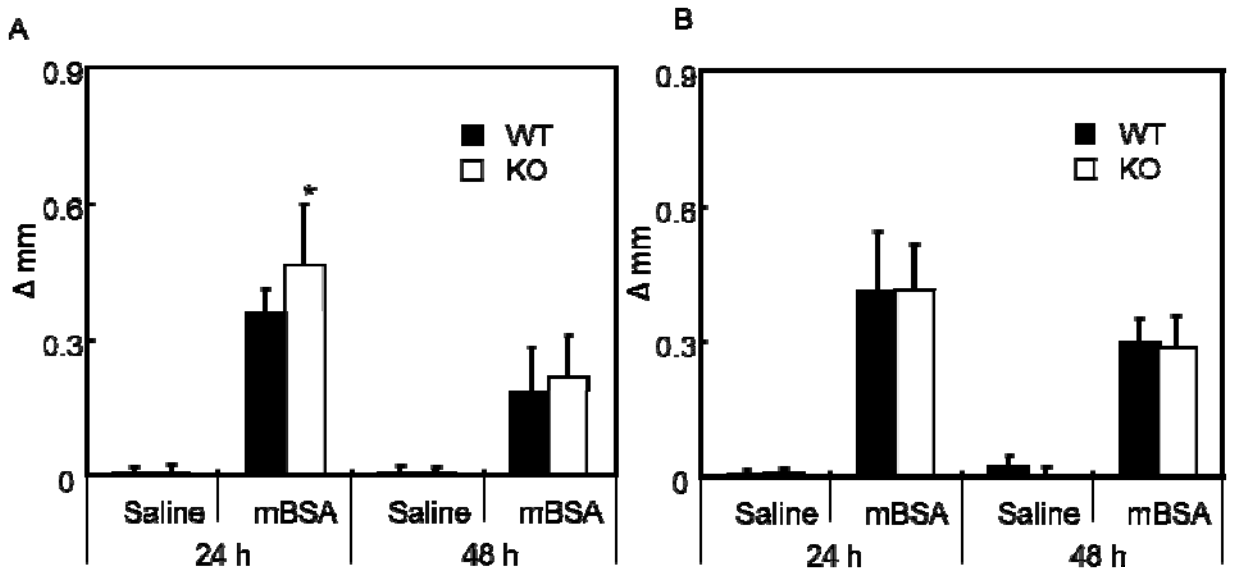


Figure. 7　Transfer DTH model in TDAG 8 KO mice and WT mice.

(A) NaÏve WT (n=9) mice received splenocytes from WT mice (n=5) or KO mice (n=5) immunized with mBSA, followed by the injection of mBSA into the footpads (Exp.A). (B) Naive WT (n=7) and KO mice (n=7) received splenocytes from WT mice (n=11) immunized with mBSA, followed by the injection of mBSA into the footpads (Exp.B).
Hindpaw swelling was calculated by subtracting the thickness at each time point (24, 48 hr) from the thickness before the challenge (Δ mm). * $p<0.05$, significantly different from WT mice.

以上の DTH モデルの解析結果から、TDAG8 は T 細胞の抗原による感作過程および特定の抗原に反応して活性化する過程に主に関与する可能性が示唆された。なお、TDAG8 の発現が樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示機能を持つ細胞にも認められていることや、抗原提示細胞が酸性条件下で活性化される[27)] という報告もあることから、この T 細胞の感作過程における TDAG8 の関与については、T 細胞への作用以外に抗原提示細胞における抗原提示機能などに対する作用の可能性も考えられる。また、感作 T 細胞移入 DTH において TDAG8 KO マウスの増悪が持続する時間は 24 時間程度であり、通常の DTH における TDAG8 KO マウスによる増悪が 72 時間程度続くことに比べると、その持続時間は短かった。通常の DTH において、TDAG8 KO マウスにおける DTH の持続が WT マウスに比べ長く認められたことは、 TDAG8 が感作相と惹起相の 2 相の生体反応に関与した結果であることが考えられた。

第四節　小括

本章において、著者らは、TDAG8 KO マウスを用い、TDAG8 の炎症性疾患への関与について関節炎を中心に解析を行った。病態の主な原因が　T 細胞の獲得性免疫による炎症反応に存在する DTH [26] において、 TDAG8 KO マウスで増悪が認められたことより、TDAG8　は DTH をはじめとする T 細胞の獲得性免疫による炎症反応においては T 細胞の機能調節に関与している可能性が示された。一方、T細胞, B 細胞の獲得性免疫による炎症反応を介さずに、主にマクロファージおよび好中球が主体となって病態が発症すると考えられている CAIA [19,21] においても TDAG8 KO マウスにおいて増悪が認められた。TDAG 8 の発現は、 T 細胞, B 細胞のみならず、マクロファージおよび好中球にも高く認められていることから、今回検討した CAIA モデルにおいては、TDAG8 が好中球、マクロファージの機能調節にも関与していることが示唆される。その機能の可能性としては、抗原抗体複合体が誘発するマクロファージの貪食作用[28,29] や LPS 刺激によるサイトカイン産生作用などが考えられるが、アゴニスト非存在下において TDAG8 が活性化していない状態では TDAG8 の機能を評価できないことが推測されるため、TDAG8 病態フェノタイプに関与する細胞および細胞機能についての検討は、アゴニストの取得後における課題とした。また、CAIA に関しては 、T 細胞も関与している[30] ことや、B 細胞が CAIA を調節する[31] との報告もあるが、CAIA モデルにおける T 細胞 および B 細胞の病態発症における役割については、報告も少なく不明な点が多い。今後、CAIA モデルの病態発症メカニズム解析が進むことで 本モデルにおける T 細胞および B 細胞機能調節に対する TDAG8 の関与の可能性が見えてくると考えられる。

以上、本章では、我々の検討した病態モデルの解析結果から、TDAG8 KO マウスは病態増悪傾向を示すことを明らかにした。また、TDAG8 は、マウス同様、ヒトにおいても、T 細胞や胸腺、リンパ節、脾臓などに発現していることが知られている。今後、ヒトを対象にした TDAG8 の機能解析や病態との連関解析が待たれるが、本知見は、TDAG8 が関節炎の病態悪化に関わる可能性を提示するものである。そこで次章では、これら機能解析や病態との連関解析、創薬開発に資するアゴニストの探索を試みた。

第二章　オーファン GPCR (TDAG8, GPR84) のアゴニスト探索および アゴニストを用いた細胞機能評価

前章の検討から TDAG8 は、好中球およびマクロファージの炎症反応および抗原特異的 T 細胞の感作反応について、それぞれの反応を負に制御する可能性が示された。これらの結果より、 TDAG8 は炎症性疾患を抑制する可能性が期待された。そこで本章では、TDAG8 の機能を明らかにすべく、TDAG8 を活性化できるアゴニストを取得・利用することで、細胞レベルでの解析を行った。TDAG8 は Gs タンパク質と共役している GPCR であることが知られているため、受容体が活性化されると細胞内の adenylate cyclase (AC) が活性化され、その結果、細胞内の cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 濃度が上昇する。そこで細胞内 cAMP 濃度の上昇を指標とした試験方法 (cAMP 試験法）を用いて、アゴニストを探索することとした。TDAG8 恒常発現細胞を用いた cAMP 試験法を用いて 18 万検体 HTS を実施し、アゴニスト探索を試みた。さらに、得られたヒット化合物を用いて免疫系細胞（TDAG8 KO マウスおよび WT マウス由来の脾臓細胞およびマクロファージ細胞）における機能解析を行った。

また、炎症部位にはプロトン以外に、細菌などから産生される脂肪酸も高濃度に存在すると考えられている。そこで脂肪酸を感知するオーファン GPCR である GPR84[16)] についてもアゴニストを探索し、免疫細胞における機能解析を行った。

第一節　cAMP 試験および GTP 結合試験による TDAG8 アゴニスト探索

本節では、 TDAG8 の活性化に依存した細胞内 cAMP 蓄積量の増加を指標に HTS を実施した。さらにヒット化合物がプロトンセンサーすべてを活性化させるものではなく、TDAG8 を特異的に活性化させることを確認するために、一過性にヒト TDAG8 (hTDAG8) およびマウス TDAG8 (mTDAG8) を発現させた human embryonic kidney (HEK) 細胞における活性と、TDAG8 とアミノ酸配列の相同性が高く、TDAG8 と同様プロトンセンサーである G protein coupled receptor 4 (GPR4) [9,10] を発現させた HEK 細胞における活性を比較した。

また、cAMP 試験法は生細胞を用いた系であるため、TDAG8 発現量を変動させた活性を見ている可能性も考えられる。 そこで、完全な cell free 系である GTPγS 結合試験における活性も確認した。GTPγS 結合試験は、受容体タンパク質に対するアゴニスト化合物の活性を評価する試験である。GTP 結合試験においては、受容体タンパク質にアゴニストが結合し、受容体が活性化状態になると、反応液中に存在させておいた RI ラベル体の GTPγ^{35}S が、受容体と共役する Gs タンパク質に結合する。従って、受容体に結合したラベル体のカウント数を測定し、その上昇を指標にアゴニスト活性を評価することができる。本試験では、昆虫細胞である Sf9 細胞に hTDAG8 とその共役する Gs タンパク質を融合した hTDAG8-Gs タンパク質を発現させ、その細胞膜画分を精製することで解析を試みた。

<u>実験材料</u>

[試薬]

Inositol free Dulbecco's Modified Eagle Medium (Inositol free DMEM) は Cell Science and Technology Institute Inc. より、Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)、CO_2 Independent Medium、 RPMI1640 medium、 Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS)、 Lipofectamine 2000、pcDNA3.1 は Invitrogen Corporation より、Fetal bovine serum (FBS) は Moregate Bio Tech より、Bovine serum albumin fatty acid free (BSA)、TritonX-100 、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) は Sigma-Aldrich より、Chinese hamster ovary-S (CHO-S) cell は 大日本製薬より、 Human embryonic kidney (HEK) 293 cell (ATCC No.: CRL-1573) は American Type Culture Collection (ATCC) より、cAMP dynamic 2 Kit は Cisbio より、 BTB09089 は

Maybridge よりそれぞれ購入した。 pFAST-BAC、Sf9 cell は Invitrogen Corporation より、[^{35}S]-GTPγS はアマシャムよりそれぞれ購入した。その他の試薬は前章の実験材料に準じた。

[プラスミド作製]

hTDAG8 発現プラスミドは株式会社宝酒造へ外注して取得した配列を pcDNA3.1 の NotI/XbaI サイトに組み込んで作製した。mTDAG8 発現プラスミドはマウス骨髄 cDNA（Clontech 社製）を鋳型として PCR 法により取得した配列を pcDNA3.1 の NotI/XbaI サイトに組み込んで作製した。hGPR4 発現プラスミドは株式会社宝酒造へ外注して取得した配列を pcDNA3.1 の NotI/HindIII サイトに組み込んで作製した。

[ウィルスベクター作製」

hTDAG8-GαS 融合タンパク質を発現するウィルスベクターは以下のように作製した。hTDAG8 と GαS をつないだ配列を PCR 法で取得した後、pFAST-Bac の NotI/XbaI サイトに組み込み、Bac-to-Bac Baculo virus expression system (Invitrogen) にてウィルスベクターを作製した。

[動物]

前章の実験材料に準じた。

<u>実験方法</u>

[hTDAG8 恒常発現細胞の取得]

CHO-S 細胞を 24 穴プレートで一晩培養後、hTDAG8 発現プラスミドを Lipofectamine 2000 を用いて transfection した。一晩培養後、15 cm シャーレに撒きかえ、さらに 5 倍希釈を 4 回繰り返した。5 枚のシャーレを一週間培養後、生じたコロニーを回収した。コロニーを増幅して得られたクローンについて RNA を回収し、RT-PCR 法により hTDAG8 の発現を確認した。hTDAG8 発現が確認されたクローンについて cAMP 試験法により pH 依存性を解析し、pH 6.4 における cAMP 蓄積量 / pH 7.9 における cAMP 蓄積量の比の値が高いクローンを選択した。

[hTDAG8/CHO-S 細胞を用いた HTS]

hTDAG8 恒常発現 CHO-S 細胞を 5 X 10^3 cells/50 μL/well で Multidrop を用いて 384 white plate に撒いた。翌日培地を除き、Multidrop を用いて CO_2 independent medium (pH 7.6) を 30 μL/well で分注した。続いて、検体を含んだ 4 mM の IBMX 含有 DMEM serum free 培地を 10 μL/well 添加し、室温で 30 分間反応させた。反応後、培地を除き、1 % Triton-X100 溶液を 10 μL/well 添加し、-20 ℃ で凍結・融解することにより細胞を溶解した。細胞内 cAMP 蓄積量は cAMP dynamic 2 Kit を用いて測定した。

[一過性に GPCR を発現させた HEK 細胞を用いた cAMP 試験]

HEK293 (15 mL, 5 X 10^5 cells/mL) に Lipofectamine (40 μL) を用い 10 μg の発現プラスミド (hTDAG8, mTDAG8, hGPR4) をトランスフェクションし、poly-lysine coat 済みの 96 well culture plate に 100 μL/well で播種した。5 % CO_2、 37 ℃ で 6 時間培養後、培地交換をし、さらに一晩培養し、アッセイに用いた。

アッセイは、検体を含んだ 1 mM IBMX 含有 CO_2 independent medium (pH 7.3) 溶液を、細胞培養培地を除いた細胞へ 100 μL/well 添加し、CO_2 非存在下、37 ℃ で 30 分間培養した。反応後、培地を除き、1 % Triton-X100 溶液を 10 μL/well 添加し、-20 ℃ で凍結・融解することにより細胞を溶解した。細胞内 cAMP 量の測定は cAMP dynamic 2 キットの添付プロトコールに従った。データは 3 連の cAMP 値の平均値として示し、parametric Williams 検定法を用いて有意差検定を行った。

[マウス脾臓細胞を用いた cAMP 試験]

WT マウスおよび TDAG8 KO マウス（雄、8 週齢）より脾臓を採取し、RPMI1640 培地（10 % FBS を含む）中ですりつぶし、70 μm のセルストレイナーに通して単細胞化し、遠心（400 xg, 8 min, 4 ℃）した。HBSS を加えて再懸濁し、再度遠心した。0.1 % BSA および 10 mM IBMX を含んだ RPMI1640 を用いて 2 X 10^7 cells/mL に調製した。

96 well culture plate に終濃度の 20 倍濃度に調製した化合物を 2.5 μL/well 添加し、上記方法にて調製したマウス脾臓細胞を 50 μL/well で播種し、37 ℃、5% CO_2 にて、40 分間培養した。培養後、10% Triton X-100 in PBS を 5 μL/well 添加し、cAMP 測

定に用いた。細胞内 cAMP 量の測定は cAMP dynamic 2 キットの添付プロトコールに従った。データは、化合物無処置細胞群の cAMP 産生量を 100 % として化合物処置細胞群の値を求めて示し、parametric Williams 検定法を用いて有意差検定を行った。

[Sf9 細胞由来 hTDAG8- GαS 融合タンパク質の調製]

Sf9 細胞を 2 X 10^7 cells/150 cm^2 で培養フラスコに播き、接着させた。その後、培地を交換し、新しい培地 24 mL に対してウィルス液 2 mL を添加した。 27 ℃ で 2 日間培養後、細胞を回収し、3000 rpm で 10 分間遠心分離することで細胞ペレットを回収した。回収した細胞に membrane 調製用バッファー (20 mM HEPES-KOH, 1 mM EDTA, 2 mM $MgCl_2$, protease inhibitor, pH 7.4) を添加後、N_2 cabitation を用いて破砕した。破砕された細胞は 3000 rpm, 10 min 遠心分離することで核画分を分離した後、55000 rpm で 30 min 超遠心分離することで細胞膜画分を回収した。回収した膜画分は membrane ストックバッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 % glycerol, protease inhibitor) で再件濁し、1000 rpm, 10 min で遠心分離することで不懸濁な画分を分離後、タンパク質濃度 5 mg/mL に調製した。

[hTDAG8-GαS 発現細胞膜を用いた GTPγS 結合試験]

上記の方法により調製した膜画分 5 μg と BTB09089 を [^{35}S]-GTPγS を含む反応バッファー (50 mM HEPES-KOH, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM $MgCl_2$, protease inhibitor, 100 μg/mL saponins, GDP 10 μM, [^{35}S]-GTPγS 2.2 nCi/μL, pH 7.3) 中、室温で 2 時間反応させた。反応後、セルハーベスターを用いて UniFilter-96 GF/B に転写し、 4 ℃ に冷却した反応バッファーで 3 回洗浄し、フィルターを一晩風乾させた。フィルターに吸着している放射能はマクロシンチ 20 を加えた後トップカウントで測定した。データは 3 連のカウント値の平均値として示した。

<u>結果</u>

RT-PCR 解析によって、 TDAG8 の発現が確認された 86 クローンの中から、pH 6.4 における cAMP 蓄積量と pH 7.9 における cAMP 蓄積量の比が最も高いクローンを選び、cAMP 試験法で約 18 万検体をスクリーニングした。その結果 、5 検体がヒットした。5 検体中骨格が異なるものは 3 検体あり、その 3 検体を用いて再現性試験を

行った結果、最も強い活性を認めたヒット化合物 BTB09089 を得た (Fig. 8)。

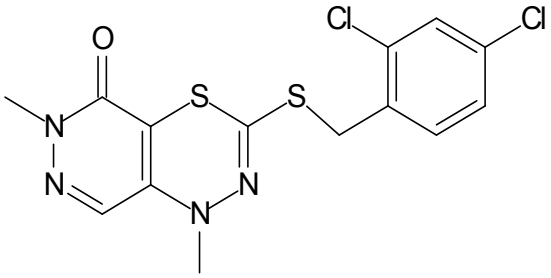


Figure. 8　Chemical structure of BTB09089.

(3-[(2,4-dichlorobenzyl)thio]-1,6-dimethyl-5,6-dihydro-1H-pyridazino[4,5-e][1,3,4]thiadiazin-5-one)

そこで次に 、BTB09089 の TDAG8 に対する特異性を確認する目的で、ヒトおよびマウス TDAG8 に対するアゴニスト作用、および TDAG8 と構造的に近縁でかつ pH 依存性を示す GPCR である GPR4 に対するアゴニスト作用について、各 GPCR を一過性過剰発現させた HEK 細胞を用い、cAMP 試験法で解析した。その結果、ヒトおよびマウス TDAG8 発現細胞においては、 BTB09089 の濃度依存的な細胞内の cAMP 濃度の上昇を認めたが (Fig. 9 A,B)、モックの細胞および hGPR4　発現細胞においては cAMP 濃度の上昇を認めなかった (Fig. 9 C,D)。また、TDAG8 KO マウス由来脾臓細胞において cAMP 試験を行った結果、WT マウス由来脾臓細胞においては BTB09089 の濃度依存的な cAMP 濃度の上昇を認めたが、TDAG8 KO マウス脾臓細胞においては認めなかった (Fig. 9 E)。以上の結果より、ヒトおよびマウス TDAG8 特異的にアゴニスト活性を示す化合物（BTB09089）を得ることができた。

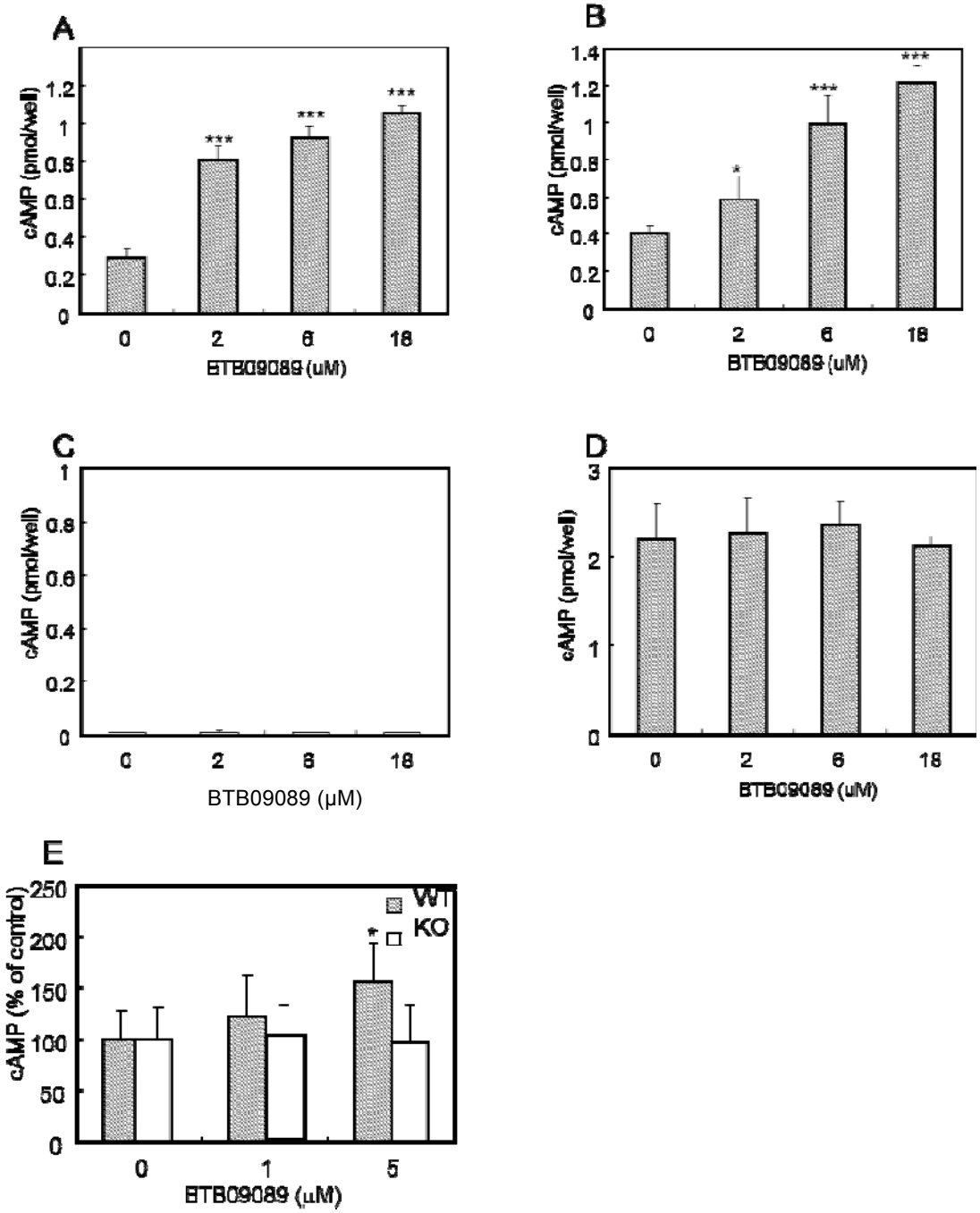


Figure. 9 BTB09089 as an agonist for TDAG8.

Effect of BTB09089 on cAMP accumulation in various cells was examined. hTDAG8 (A), mTDAG8 (B), control pcDNA 3.1 (C) and hGPR4 (D) transiently expressing HEK293 cells was examined. Cells were treated with various concentrations of BTB09089 at pH 7.3 for 30 min (n=3). Effect of BTB09089 on cAMP production in splenocytes from WT or TDAG8 KO mice (E). Splenocytes prepared from WT or TDAG8 KO mice were treated with or without BTB09089 followed by measurement of intracellular cAMP. Data are expressed as a percentage of the control (0; meaning no BTB09089, WT: 1.61±0.44 n moles/9 X 10^4 cells, KO: 2.12±0.68 n moles/9 X 10^4 cells) (n=4). *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ significantly different from the control without BTB09089 treatment.

HTS ヒット化合物 BTB09089 がヒトおよびマウス TDAG8 を特異的に活性化する化合物であることを cAMP 試験法で確認したが、生細胞を用いた系であるため、TDAG8 発現量を変動させた活性を見ている可能性も考えられる。 そこで、完全な cell free 系である GTPγS 結合試験で確認した。結果、hTDAG8 を発現させた細胞膜を用いたアッセイにおいては、BTB09089 の濃度依存的に、ラベル体のカウント数の上昇が認められた（Fig. 10 A）。しかし、mock の細胞膜を用いた場合には、ラベル体のカウント数の上昇が認められなかった （Fig. 10 B）。なお、データには示していないが 、TDAG8 と同様に Gs タンパク質と共役する GPCR である PHOR-1-GαS を発現させた細胞膜に対する作用も検討したが、ラベル体のカウントの上昇は認められず、アゴニスト活性は示さなかった。これらの結果より、BTB09089 は TDAG8 タンパク質特異的に直接作用し、TDAG8 を活性化するアゴニストであることが示唆された。

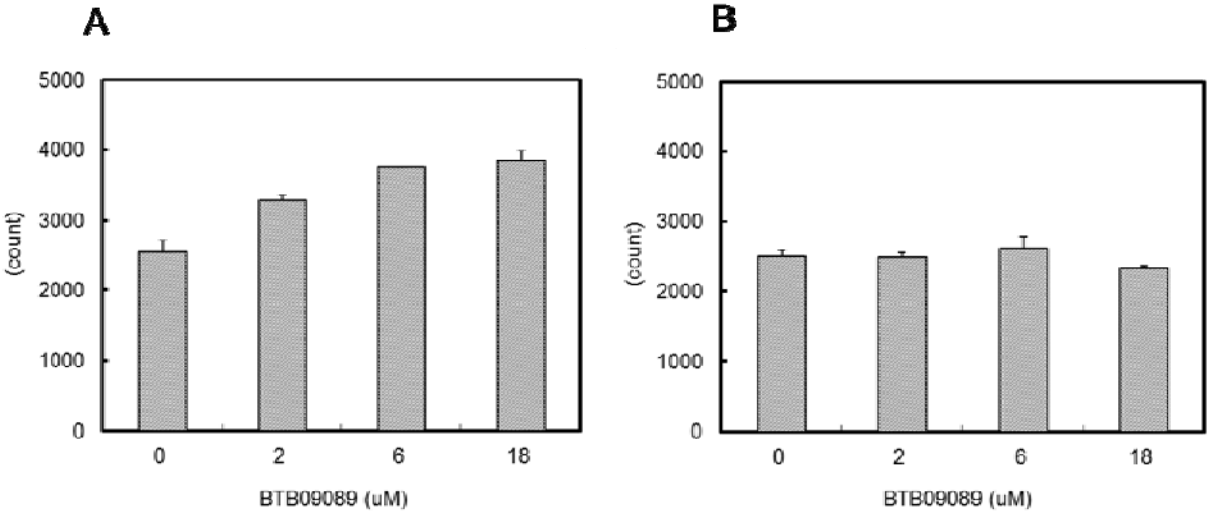


Figure. 10 BTB09089 activates GTPγS binding activity of the TDAG8-Gs fusion membrane.

Effect of BTB09089 on activation of GTPγS binding in hTDAG8-Gs (A) or mock protein were examined. Data are the means ± S.D. (n=3)

第二節　TDAG8 アゴニストのマウス脾臓細胞における活性評価

前節において、TDAG8 を特異的に活性化するアゴニスト化合物（BTB09089）を取得できたため、BTB09089 を用いて TDAG8 の免疫系細胞における機能を解析した。TDAG8 KO マウスを用いた病態モデル解析 (DTH) の結果より、TDAG8 は T 細胞の感作過程および感作 T 細胞の活性化機能に関与することが示唆された。T 細胞の抗原に対する感作過程においては、抗原刺激によって T 細胞が活性化・IL-2 を産生し、増殖する。そこで本節では、T 細胞の活性化機能に対する作用を検討することを目的に、CD3/CD28 に対する抗体でマウス脾臓中の T 細胞を刺激し、産生される IL-2 量に対する作用を比較検討した。

実験材料

[試薬]

mouse anti-CD3 antibody、mouse anti-CD28 antibody は BD Pharmingen より、mouse IL-2 Quantikine®ELISA kit は R and D systems よりそれぞれ購入した。

その他の試薬は前節までの実験材料に準じた。

[動物]

前節までの実験材料に準じた。

実験方法

[マウス脾臓細を用いた IL-2 産生評価]

WT マウスおよび TDAG8 KO マウス（雄、8 週齢）より脾臓を採取し、RPMI1640 培地（10 % FBS を含む）中ですりつぶし、70 μm のセルストレイナーに通して単細胞化し、遠心（400 ×g, 8 min, 4 ℃）した。HBSS を加えて再懸濁し、遠心後 RPMI1640 培地（10 % FBS を含む）に懸濁し 2 X 10^6 cells/mL に調製した。96 well culture plate (Costar Code No. 3595） を 5 μg/mL anti-mouse CD3 antibody および 5 μg/mL anti-mouse CD28 antibody（100 μL/well）で 37 ℃、 3 時間コーティングし、使用直前に PBS で 1 回洗浄した。 上記 96 well culture plate に、RPMI1640 培地（10 % FBS を含む）を用いて終濃度の 2 倍濃度に調製した BTB09089、Cyclosporin A (CsA) を 100 μL/well 添加し、続いて splenocytes を 100 μL/well 播種した。 20 時間培養

後、培養上清を回収し、ELISA 法で IL-2 測定を行った。化合物処置群の IL-2 産生量は、Anti-CD3/CD28 抗体処置細胞の値を 100 % として示し、parametric Dunnet 検定法を用いて有意差検定を行った。なお、IL-2 産生抑制活性についての陽性コントロールとして免疫抑制剤である CsA を用いた。

<u>結果および考察</u>

始めに、BTB09089 非存在下における anti-CD3/CD28 抗体刺激による脾臓細胞からの IL-2 産生量を WT マウス、TDAG8 KO マウスで比較したところ、違いは認められなかった (data not shown)。従って、BTB09089 非存在下における IL-2 産生量を 100 % とし、BTB09089 および CsA 存在下での値を検証した。その結果、BTB09089 は WT マウス由来脾臓細胞に対しては濃度依存的に anti-CD3/CD28 抗体刺激による IL-2 産生を抑制したが、TDAG8 KO マウス由来脾臓細胞においては抑制活性を認めなかった。BTB09089 は TDAG8 を介して主に T 細胞における anti-CD3/CD28 抗体刺激誘導 IL-2 産生を負に制御することが示唆され、T 細胞の活性化および、マクロファージなどの炎症性細胞の活性化に必要なサイトカインの産生調節に関与することが示唆された（Fig. 11）。

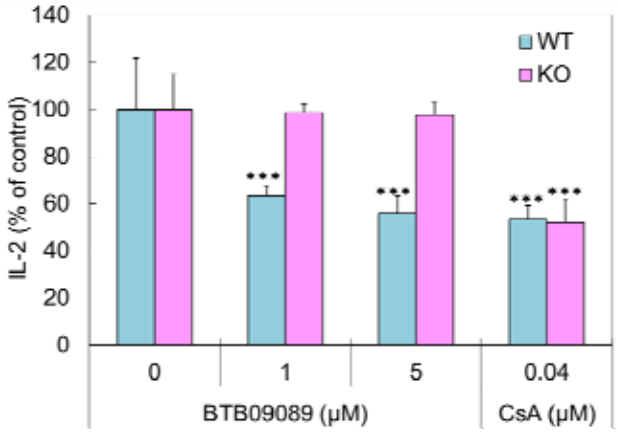


Figure. 11　Effect of BTB09089 or Cyclosporin A (CsA) on IL-2 production stimulated with anti-mouse CD3 and CD28 antibodies in TDAG8 KO and WT mice splenocytes.

Effect of BTB09089 or CsA on IL-2 production in splenocytes. Splenocytes were stimulated with anti-mouse CD3 and anti-mouse CD28 antibodies and were treated with or without BTB09089 nor CsA for 20 hr. The IL-2 levels in the supernatant were quantified by ELISA. Data are expressed as a percentage of the anti-mouse CD3 and anti-mouse CD28 antibodies treated control (0; meaning no BTB09089, WT: 450.8±20.5 pg/ml, KO: 502.4±22.1 pg/ml) Data are the means ± S.D. (n=4). *** $p<0.001$ significantly different from the control.

また、TDAG8 の活性化によって上昇した cAMP は T 細胞において、IL-2 産生を負に調節することが知られており[32)]、TDAG8 の IL-2 産生抑制作用は一部 cAMP を介した作用であることが考えられる。なお、 BTB09089 の IL-2 産生抑制作用の強さは、細胞毒性作用を示さない最高濃度の、免疫抑制剤 Cyclosporin A とほぼ同程度であり、TDAG8 を介した IL-2 産生抑制作用による抗炎症の薬効は、十分に期待できるものと考えられた。

第三節　TEDAG8 アゴニストのマウス マクロファージ細胞における活性評価

TDAG8 の発現は、リンパ球をはじめ、免疫系広範にわたっている。また、TDAG8 KO マウスを用いた 病態モデル（CAIA モデル）において、病態が増悪するフェノタイプが認められた結果から推測すると、マクロファージによる炎症の増幅機能に関与する可能性が考えられる。そこで、チオグリコレート刺激によってマウス腹腔内に浸潤したマクロファージ細胞（TG-PEC）を用い、LPS 刺激することで産生される炎症性サイトカイン（TNF-α、IL-6）および抗炎症性サイトカイン（IL-10）に対するアゴニストの作用を検討した。

実験材料

[試薬]

Fluid Thioglycollate Medium は DIFCO より、mouse IL-6 Quantikine®ELISA kit、mouse IL-10 Quantikine®ELISA kit、mouse TNF-α/TNFSF1A Quantikine®ELISA kit、は R and D systems よりそれぞれ購入した。

その他の試薬は前節までの実験材料に準じた。

[動物]

前節までの実験材料に準じた。

実験方法

[Thioglycollate 誘導マウス腹腔浸潤細胞（TG-PEC）を用いたサイトカイン産生評価]

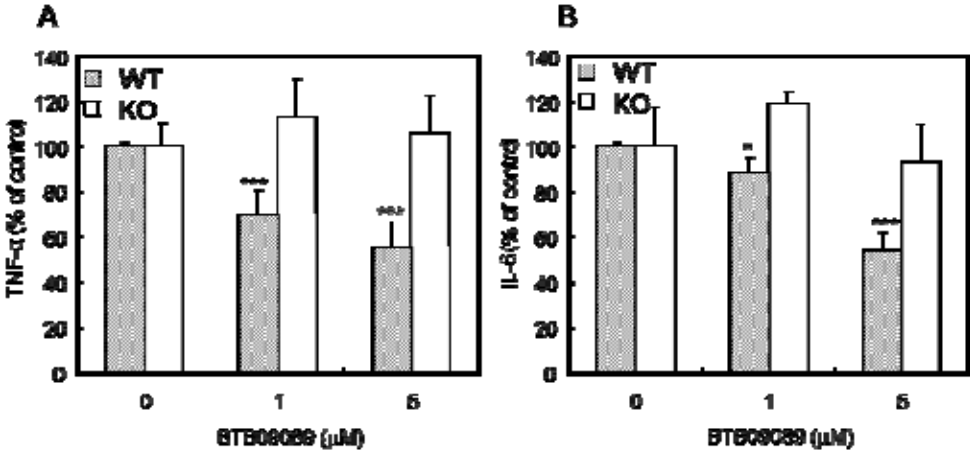
WT マウスおよび TDAG8 KO マウス（雌、8 週齢）に 3 % Thioglycollate Medium を 0.5 mL 腹腔内投与し、4 日後に 5 mL の生理食塩水を腹腔内に注入し、腹水を回収した。遠心（400 ×g, 8 min, 4 ℃）して上清を除き、細胞を HBSS で 2 回洗浄した後、RPMI1640 培地（5 % FBS を含む）で懸濁した。得られたマウス腹腔浸出細胞 (peritoneal exudate cells : TG-PEC) を用いて以下のサイトカイン産生実験を行った。

TG-PEC を 96 well culture plate に、1.0 X 10^5 cells/well で播種し、4 時間後、付着細胞を HBSS で 2 回洗浄し、RPMI1640 培地 (100 ng/mL LPS および 0.1 % dialyzed FBS を含む) を 180 μL/well 加え、さらに終濃度の 10 倍濃度に調製した BTB09089 を 20 μL/well 添加した。18 時間培養後、上清を回収し、ELISA 法により

IL-6, IL-10, TNF-α 量を各キットの添付プロトコールに従い測定した。化合物処置群のサイトカイン 産生量は LPS 処置細胞の値を 100 % として示し、parametric Dunnet 検定法を用いて有意差検定を行った。

結果および考察

まず、BTB09089 非存在下におけるそれぞれのサイトカイン産生量に、 TDAG8 KO マウスおよび WT マウス両群に有意な違いが認められなかったことから、それぞれ化合物非存在下におけるサイトカイン産生量を 100 % とし、BTB09089 存在下での値を示した。



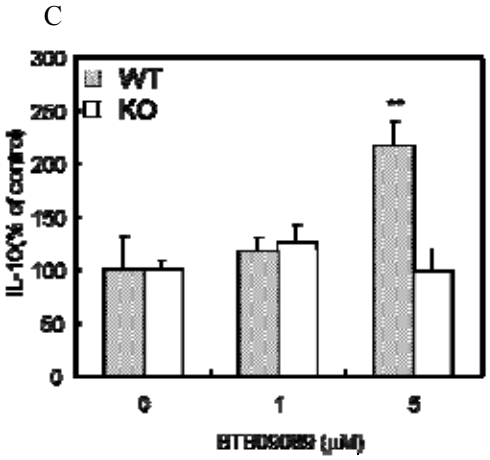


Figure 12　Effect of BTB09089 on TNF-α, IL-6 and IL-10 production from LPS-stimulated TG-PEC derived from TDAG8 KO and WT mice. Effects of BTB09089 on LPS stimulated (A) TNF-α, (B) IL-6 and (C) IL-10 production in TG-PEC from TDAG8 KO and WT mice (n=4). TG-PEC was stimulated with LPS with or without BTB09089 for 18 hr. TNF-α, IL-6 and IL-10 production in the supernatant were quantified by ELISA. Data are expressed as a percentage of the LPS-treated control (0; meaning no BTB09089). Data are the means ± S.D. (n=4). *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, * $p<0.05$ significantly different from the control.

TNF-α 産生について、BTB09089 は、 WT マウス由来細胞において濃度依存的な抑制作用を認めたのに対し、TDAG8 KO 由来細胞においては認めなかった（Fig. 12 A）。IL-6 産生についても同様に、WT マウス由来細胞のみに抑制作用を認めた（Fig. 12 B）。一方、抗炎症サイトカインである IL-10 産生については、 WT マウス由来細胞においてのみ産生増強作用を認めたが、TDAG8 KO 由来細胞においては認められなかった（Fig. 12 C）。BTB09089 は、TDAG8 を介してマクロファージにおけるサイトカイン産生を調節することが示唆され、TDAG8 のマクロファージにおける抗炎症作用の一つにサイトカイン産生調節能が示唆された。また、TDAG8 の活性化によって上昇する cAMP は TNF-α、IL-6 産生を負に、IL-10 産生を正に調節することが知られており[33)]、TDAG8 の TNF-α、IL-6、IL-10 産生調節作用は一部 cAMP を介した作用であることが考えられる。なお、データには示していないが、マクロファージにおける貪食能についても検討したが、本実験系ではアゴニストによる機能変化は認められなかった。従って、TDAG8 がサイトカイン産生以外の機能に関与する可能性については、さらに検討の余地があることが示唆された。

第四節　GPR84 アゴニストのマクロファージ細胞における活性評価

前節までは、炎症部位に高濃度に存在するプロトンを感知する TDAG8 について解析した。炎症は、細菌などの感染に伴い、生体外異物として細菌を除去するための生体防御機構の一つとして発動されるため、炎症部位局所にはプロトン以外にも、その感染に関わる細菌由来の脂肪酸も高濃度に存在する場合があると考えられる。そこで本節では、中鎖脂肪酸センサー である GPR84[16] に着目し、解析を試みた結果の一部を紹介する。GPR84 は活性化すると細胞内 cAMP の上昇を抑制する Gi タンパク質と共役する GPCR[16] である。また、GPR84 は骨髄や脾臓の T 細胞や B 細胞において発現していること[17] や、LPS によって活性化された単球、マクロファージ、好中球において発現上昇が誘導される[15] ことから、免疫系において炎症反応に対し、何らかの機能を有していることが示唆される。しかしながら、この受容体に対する薬理学的な実験はなされておらず、機能についても明らかにされていない。そこで、我々は GPR84 のアゴニストを取得し、マクロファージ細胞における機能解析を試みた。

上述したように、GPR84 は Gi タンパク質と共役することが知られているため、受容体の活性化は、forskolin 処理による細胞内 cAMP 濃度上昇を抑制する活性で判断できる[34]。そこで、cAMP 試験法を用いた HTS を実施した。 HTS の結果、得られたアゴニストを用い、マクロファージ（U937 細胞）における作用を解析した。

実験材料

[試薬]

DMEM without L-glutamine は ICN より、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), forskolin, siRNAs for human GPR84, negative control siRNA は Sigma-Aldrich より、CHO-K1 細胞は 大日本製薬より、 U937 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) よりそれぞれ購入した。その他の試薬は前章の実験材料に準じた。

実験方法

[hGPR84 安定発現細胞株の作製]

CHO-K1 細胞は 10 % FBS および抗生物質（50 units/mL ペニシリンおよび 50 μg/mL ストレプトマイシン）を含む F12 培地を用い、継代培養した。安定発現細胞株の取得は CHO-K1 細胞に pcDNA3.1 (+)/hGPR84 を Lipofectamine 2000 を添

付文書に従い導入し、400 μg/mL の Geneticin 添加条件下にて培養することで行った。薬剤耐性細胞株からのヒト GPR84 (hGPR84) 安定発現細胞株の選択は、hGPR84 に対する Western blotting 解析によるタンパク質レベルを指標に行った。得られた発現細胞を限界希釈し、同様の方法で培養し、選択を行った。さらにもう一度同様の操作を行い、最終的にクローン化された hGPR84 安定発現細胞株を得た。

[hGPR84/CHO-K1 細胞を用いた HTS]

hGPR84 恒常発現 CHO-K1 細胞を 1 X 10^4 cells/50 μL/well で Multidrop を用いて 384 white plate に撒いた。翌日培地を除き、Multidrop を用いて DMEM/10 mM HEPES/0.5 mM IBMX を 10 μL/well で分注した。続いて検体を 2 μL、50 μM Forskolin を 3 μL 添加し、室温で 30 分間反応させた。反応後、培地を除き、1 % Triton-X100 溶液を 10 μL/well 添加し、-20 ℃ で凍結・融解することにより細胞を溶解した。細胞内 cAMP 量の測定は cAMP dynamic 2 キットの添付プロトコールに従った。

[U937 細胞を用いたサイトカイン産生評価]

ヒト単球系細胞株 U937 細胞は RPMI1640 培地（10 % FBS を含む） を用い継代培養した。 si RNA によるノックダウンは Amaxa cell line nucleofector kit C を用い、30 nM の si RNA 条件で行った。その後、2 X 10^4 cells/well/100 μL となるように 96 well プレート（Corning、3595）に播種し、37 ℃ で 1 時間インキュベーションして接着させた。マクロファージ様細胞への分化は TPA（10 ng/mL）存在下で 2 日間培養することにより行った。0.064 μM, 0.32 μM, 1.6 μM の 6-OAU（final 0.016 μM, 0.08 μM, 0.4 μM）または 0.1 % DMSO/MeOH（7/3、final 0.025 %）を 50 μL ずつ細胞に添加し、ついで RPMI1640 培地（10 % FBS を含む）で調製した 400 ng/mL の LPS を 50 μL（final 100 ng/mL）添加して刺激を行った。18 時間後、細胞培養上清を回収して、ELISA 法で培養上清中の TNF-α 濃度を測定した。データは 3 連の平均値で示し、parametric Dunnet 検定法を用いて有意差検定を行った。

<u>結果および考察</u>

ヒト GPR84 恒常発現細胞株 (CHO- hGPR84) を用い、forskolin 刺激による cAMP 上昇の抑制活性を指標に、24 万検体をスクリーニングした結果、15 検体がヒットした。

ヒット化合物を複数のアッセイ系（IP アッセイ、GTP　結合アッセイ、インターナリゼーションアッセイ）にて活性を確認したところ、すべてのアッセイ系で活性を認めた化合物 6-n-octylaminouracil (6-OAU) をヒット化合物とし、cAMP 試験において再現性を確認した (Fig. 13 A)。そこで次に、マクロファージにおける作用を解析する目的で、PMA で刺激することによってマクロファージに分化させた U937 細胞を用い、 LPS 刺激によるサイトカイン産生（TNF-α）に対する 6-OAU の作用を検討した。本試験における hGPR84 の陰性コントロール細胞として、hGPR84 に対する siRNA を処置した U937 細胞を用いた。結果、hGPR84 陽性の U937 細胞 (si Cont) において、6-OAU は濃度依存的に LPS 刺激による TNF-α 産生量を増強した (Fig. 13 B)。なお、本作用は hGPR84 に対する siRNA 処置した hGPR84 陰性細胞 (siGPR84) においては認められなかったことより、GPR84 を介した作用であることが示唆された。

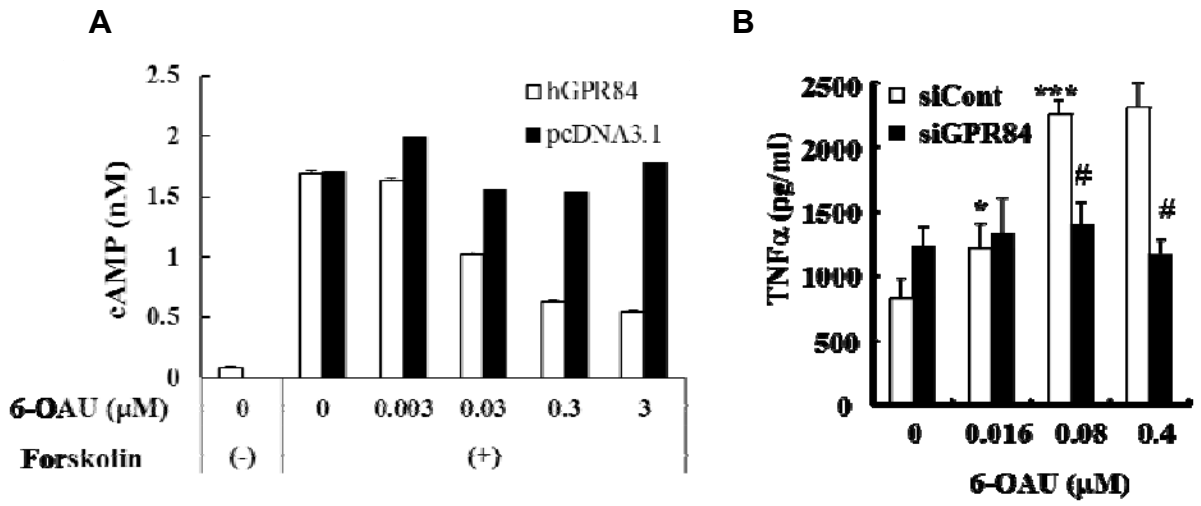


Figure. 13 (A) Effects of 6-n-octylaminouracil (6-OAU) on cAMP accumulation in forskolin stimulated human GPR84 stable transfectant (CHO-GPR84). (B) Effects of 6-n-octylaminouracil (6-OAU) on cytokine production in U937 macrophages. Negative control siRNA or GPR84 siRNA-transfected U937 macropahges were stimulated by 100 ng/mL LPS in the presence or absence of 6-OAU. Culture supernatant was collected 16 hours after stimulation. TNFα concentration in the supernatant was measured with a commercial ELISA kit. The data were expressed as the means ± S.D. of triplicate determinations. *P<0.05, **P<0.01, and ***P<0.001 compared to the agonist non-treated group. #P<0.01 compared to the negative control siRNA-transfected group.

GPR84 の内在性リガンドである中鎖脂肪酸は、直接 Toll-like receptor (TLR) 4 依存性のシグナルを活性化させる[35,36] との報告もあるため、6-OAU の TNF-α 増強作用の一部は GPR84 を介さず TLR4 シグナルを直接活性化した可能性も考えられる。この点に関して、6-OAUを LPS 非存在下で作用させた結果、 TNF-α 産生を誘導しなかった（data not shown）。さらに、TLR 4 依存性の NF-κB ルシフェラーゼレポーターの活性化も認めなかったため、その可能性は低いと考えられる。また前節において、 Gs 共役 GPCR である TDAG8 で認められた cAMP 産生促進および TNF-α 産生抑制活性の作用とは合い反することから、GPR84 を介した Gi 共役 GPCR のシグナルのうち、cAMP 抑制のシグナルの一部が TNF-α 産生増加に関与する可能性も考えられる。以上の結果より、GPR84 はマクロファージにおいて LPS 刺激による TNF-α 産生を増強する作用を持つ可能性が示唆され、炎症部位などにおいて免疫細胞が活性化されている条件下においては、その炎症をさらに増悪させる可能性のあることが示唆された。

第五節　小括

本章においては、 TDAG8 の生体内での機能解析を目的として、まず、その解析手段となるアゴニストの取得を試みた。約 18 万検体をスクリーニングし、ヒトおよびマウス TDAG8 に対して cAMP 試験および GTPγS 結合試験の両方において、特異的なアゴニスト活性を認めた化合物 BTB09089 を得ることができた。またプロトンによる TDAG8 の活性化には、 TDAG8 の histidine 残基を介したプロトネーションが重要であると報告されている[10)]。 BTB09089 が TDAG8 を活性化する機構として、受容体への直接的な結合作用なのか、プロトンを感知するときに必要な histidine 残基の修飾と同じ変化をもたらす作用なのかについて解析はしていないが、興味がもたれる。プロトンと作用様式が異なれば、炎症部位で TDAG8 がプロトンによって活性化されていることが想定される状況下においても、さらに TDAG8 を活性化させることも可能であり、医薬品開発の可能性が期待できる。TDAG8 は、プロトンセンサーとの報告はあるが、化合物としてのアゴニストは未だ見出されていない[7,9,10,11,12,37,38)]。今回、我々が見出したアゴニストが TDAG8 の生体内機能の解明に役立つものと考えられる。

また、TDAG8 の炎症性疾患への関与を解析することを目的とし、そのアゴニスト化合物 BTB09089 を用い、マウスプライマリー細胞を用いてサイトカイン産生について解析を行った。結果、BTB09089 は T 細胞においては IL-2 産生抑制作用がある一方、マクロファージにおいては、 TNF-α、IL-6 産生抑制作用および IL-10 産生増強作用を示した。すなわち、免疫疾患の中でも特に関節炎において炎症を悪化させる方向に関与すると考えられている IL-2, IL-6, TNF-α の産生[39-42)]は抑制し、また、炎症を和らげる働きをもつ IL-10[42)]の産生を増強させる作用を併せ持った化合物であることが示された。このことは TDAG8 が炎症部位において免疫・炎症反応を負に制御し、生態内の恒常性を保つことに寄与している可能性を示唆しており、第一章において TDAG8 KO マウスを用いた免疫系病態モデル解析において得られた結果（TDAG8 KO マウスにおいて CAIA および DTH における病態の増悪が認められた）と一致すると考えられる。TDAG8 は、免疫系疾患においては、活性化すると良いターゲットである可能性が強く示唆された。また、 IL-6 および TNF-α に関しては、それらの抗体が関節炎で効果を示すことや、リウマチ患者の血清中で有意に上昇していること[43)]からも、これらのサイトカイン産生を一度に抑制する作用を併せ持った TDAG8 は、新薬のターゲットとしてより強い作用をもつ可能性を秘めており、魅力があると思われる。

また、今回は残念ながら検討にはいたらなかったが、 TDAG8 の関与する細胞機能については、脾臓細胞、マクロファージのサイトカイン産生のみならず、マクロファージおよび樹状細胞における抗原提示機能、B 細胞の抗体産生能など、様々な可能性が考えられ、今後の重要な課題と考えられた。

総　括

炎症は、生体防御機構の一つであり、ウィルスや細菌等の感染を防ぐための重要な生理機能として、健康な状態を保つためには必要不可欠な生体反応である。しかし、その炎症が一旦慢性化してしまうと、自己免疫疾患などの難病の発症につながる例もあり、慢性化した炎症は、薬物治療が発達した現代医療でも治療困難な疾患群として認識されている。近年、自己免疫疾患を含む炎症性疾患は、増加傾向をたどっており、その原因として、外部環境の急激な変化、特に複合汚染・食生活の変化・多様なストレスなどの増加が考えられている[1)]。自己免疫疾患は、異物に対する免疫が自分の細胞に対して作動するのが本態であり、自己の組織に対する攻撃は脳・神経・皮膚・目などの感覚器官、筋肉、骨、内臓などすべての組織に起こりうる病態である。そのため、多発性硬化症、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ、SLE、血管炎症候群、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）、糖尿病、重症筋無力症、自己免疫性肝炎、溶血性貧血など、様々な病態となって症状を呈し、最終的には、白血球を動員した慢性炎症がターゲット臓器に起こる。現代医療では、慢性炎症を起こす根本原因を取り除くことよりもむしろ、ステロイドをはじめとする免疫抑制剤の使用といった全体的な炎症機構を一括してブロックする対処療法に終始している。症状の急性増悪に対して、時にはそのような治療モデルは有効な場合もあるが、慢性炎症という病態に対しては、その治療を継続して続けることによる副作用を含めた弊害が前面にでてしまっており、自己免疫疾患患者の QOL を著しく低下させている現状がある。従って、自己免疫疾患の発症機序を分子レベルで明らかにし、その分子をターゲットとした特異的治療法の開発は大いに期待されている。

臨床応用されている医薬品のうち、細胞膜に埋め込まれた G タンパク質共役型受容体 (GPCR) をターゲットにしたものがその半数を占めるという現状がある。GPCR の多くは、機能未知なオーファン GPCR に該当するために、新規の創薬ターゲットとして無限の可能性が秘められている受容体ファミリーとして認識されている。そのような観点から、我々はまず、免疫系組織に限局した発現を示す上、プロトンを感知することが知られる GPCR の一種、TDAG8 に着目した。生体内を循環する体液は通常は pH 7.4 付近に保たれているが、循環血漿が酸性化した状態はアシドーシスと呼ばれ、神経伝達の障害に基づく病状などを呈することが知られている。

また、局所においては炎症部位や虚血部位・腫瘍内部など酸素不足の部位で酸性になることが知られている[14)]。炎症部位や腫瘍内部の細胞においては ATP の消費、解糖系の亢進、乳酸の蓄積によって細胞内が酸性となり[44)]、その結果、それらの細胞がプロトンや乳酸を細胞外に汲み出すため、周辺部位の pH が酸性に傾く[14)]。プロトンセンサーである TDAG8 は、この細胞外 pH の低下を感知し、炎症応答を調節する可能性が示されていたが[45)] その仮説を明らかにするためのアゴニストが存在しないことから解析がなされていなかった。そこで我々は、TDAG8 が炎症性疾患に関与する可能性およびその機能を見出すことを目的に、アゴニスト探索を行い、TDAG8 の機能解析に有用なアゴニスト BTB09089 を見出した。さらに、そのアゴニスト BTB09089 を用いて、 TDAG8 の機能を細胞レベルで解析した結果、TDAG8 は炎症性サイトカイン産生を負に調節する機能をもつことを明らかにした。従って、TDAG8 は炎症性疾患においては、サイトカイン産生調節を介し、様々な炎症反応を負に制御する可能性が強く示唆され、プロトンセンサーが炎症性疾患治療における新たなターゲットとなる可能性が見出された。

TDAG8 KO マウスを用いた関節炎モデルにおいて、WT マウスと比較し関節炎の悪化が観察された。この理由としては、WT マウスでは炎症部位においてプロトン産生が亢進しても、TDAG8 により炎症性サイトカイン産生の抑制機構が働き、過度な炎症が抑制されているが、TDAG8 KO マウスではその抑制機構が解除されていた結果、関節炎が増悪した可能性が考えられる。従って、健常な状態であれば病原体が体内に存在しても自ら備わっている免疫抑制作用で病態発症を制御することができるが、TDAG8 の機能異常（脱感作、分解亢進、リサイクル停止など）があると病態発症に傾く可能性が考えられる。

さらに、TDAG8 の示す抗炎症作用、つまり、IL-2 産生抑制、TNF-α 産生抑制、IL-6 産生抑制作用については、それぞれ単一のサイトカインを抑制することで関節炎発症を抑制する[46-49)] 報告がある。しかしながら単一のサイトカインを強く抑えることは結果としてサイトカインバランスの崩れを誘導することにより、副作用を誘導する可能性が高いため、それぞれのサイトカインをバランスよく抑制することが期待されている。TDAG8 がそれらの問題点を克服できるかについては、既存の免疫抑制剤（サイクロスポリンやタクロリムスなど）との差別化の可能性を含め、さらなる検討が望まれる。また、自己免疫疾患をはじめ免疫系の疾患は、 Th1/Th2 サイトカイ

ンバランスの異常が原因の一つとも考えられている[50, 51)]。本研究において TDAG8 の関与するサイトカイン産生調節作用は、 IL-2 産生抑制, IL-10 産生増加であり、Th1 サイトカイン抑制の方向である。従って、 TDAG8 のアゴニストは、Th1 側にバランスが傾いた病態、例えば細胞性傷害活性化が必要な感染症の治療や、自己免疫疾患の一つである関節リウマチなどの病態の改善が期待される。一方、それとは逆の作用機構として、TDAG8 のアンタゴニストが、アレルギー性疾患などの Th2 側にバランスが傾いた病態を改善する可能性についても興味が持たれる。さらに、近年、TDAG8 は癌細胞の増殖を促進する可能性のあることが報告されている[52)] ことから、TDAG8 は免疫系疾患のみならず、癌などの難治性疾患治療の標的への応用も期待される。残念ながら本研究では、化合物の供給困難などの事情により、動物個体を用いての機能解析試験の実施にはいたらなかったが、本研究をきっかけに、プロトンセンサーおよび脂肪酸センサーをターゲットとした免疫系疾患をはじめとする様々な難治性疾患の治療薬の開発に発展することを期待したい。

以上、本研究によって得られた知見は、免疫疾患への関与が示唆される分子 (TDAG8 および GPR84) のファーストインクラス創薬への可能性を示すものと考えられる。今後、これらのターゲットが新規炎症性疾患治療薬の候補として開発され、炎症性疾患のみならず全世界において既存の治療薬では完治できていない難治性疾患の克服につながることを期待したい。

結　論

本博士論文では、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て種々の病態モデルにおけるフェノタイプ解析およびそのアゴニスト探索を行った。また、GPR84 についてはアゴニスト探索を行った。探索の結果得られたそれぞれの GPCR に対するアゴニストを用いて細胞レベルにおける機能解析を行い、以下の結論を得た。

1．　創薬ターゲットとして期待される TDAG8 の発現解析を行った結果、胸腺・脾臓・リンパ節・骨髄での高い発現が観察された。また CD4+、CD8+、B 細胞、およびマクロファージでの発現を認めた。
2．　TDAG8 KO マウスを用いた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を示した。
3．　TDAG8 KO マウスを用いた遅延型過敏反応モデルにおいて、炎症の悪化が観察されたことから、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示した。
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 の機能解析を行った結果、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を示した。
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・IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を抑制する一方で、IL-10の産生を増加させることを示した。
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、新たな難治性疾患治療法の発見につながることに期待したい。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、始終御指導、御鞭撻を賜りました第一三共株式会社生物医学第 3 研究所第 5 グループ長　尾田富一郎氏に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究を進めていくにあたり御指導、御助言をいただきました第一三共株式会社生物医学第3研究所所長　蔵方慎一氏に厚く御礼申し上げます。

また、実験を行うにあたり熱心にご協力をいただきました第一三共株式会社、藤田博文氏、清水川暁子氏、高石祥子氏、桑原治美氏、長崎美由紀氏、駒井知明氏、鈴木雅勝氏、飯野郁江氏、前田博昭氏に心より感謝いたします。

なお、本研究を論文博士として発表させていただく際に、温かく御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科　毒性学教室、堤康央教授、吉岡靖雄准教授、教室の皆様に心より御礼申し上げます。

さらに、大阪大学大学院薬学研究科　毒性学教室在学中のみならず、卒業後も論文博士を目指すことに際し、始終温かく御指導、御鞭撻を賜りました、大谷大学薬学部衛生・毒性学講座　田中　慶一先生に心より御礼申し上げます。

最後に、いかなるときにも温かく励まし、支えてくれた父母に心より感謝いたします。

引用文献

1. Bosma-den Boer, M.M., Wetten, M.L., Pruimboom, L. Chronic inflammatory diseases are stimulated by current lifestyle: how diet, stress levels and medication prevent our body from recovering. Nutrition and Metabolism. 9 (32), 1-14 (2012).
2. Dinarello, C.A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. Cell. 140, 935-950 (2010).
3. Kodama, T., Tomita, N. Global movement for diagnosis and treatment of rare / intractable diseases. J. Natl. Inst. Public Health. 60, 105-111 (2011).
4. Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L. How many drug targets are there? Nature Reviews. 5, 993-996 (2006).
5. Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L., Schioth, H.B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paealogon groups, and fingerprints. Mol. Pharmacol. 63, 1256-1272 (2003).
6. Choi, J.W., Lee, S.Y., Choi, Y. Identification of a putative G protein-coupled receptor induced during activation-induced apoptosis of T cells. Cell Immunol. 168, 78-84 (1996).
7. Tosa, N., Murakami, M., Jia, W.Y., Yokoyama, M., Masunaga, T., Iwabuchi, C., Inobe, M., Iwabuchi, K., Miyazaki, T., Onoe, K., Iwata, M., Ueda, T. Critical function of T cell death-associated gene 8 in glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis. Int. Immunol. 15, 741-749 (2003).
8. Radu, C.G., Cheng, D., Nijagal, A., Riedinger, M., McLaughlin, J., Yang, L.V., Johnson, J., Witte, O. Normal immune development and glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in mice deficient for the T-cell death-associated gene 8 Receptor. Mol. Cell Biol. 26, 668-677 (2006).
9. Ishii, S., Kihara, Y., Shimizu, T. Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. J. Biol. Chem. 280, 9083-9087 (2005).
10. Wang, J., Kon, J., Mogi, C., Tobo, M., Damirin, A., Sato, K., Komachi, M., Malchinkhuu, E., Murata, N., Kimiura, T., Kuwabara, A., Wakamatsu, K., Koizumi,

H., Ueda, T., Tsujimoto, G., Kurose, H., Sato, T., Harada, A., Misawa, N., Tomura, H., Okajima, F. TDAG8 is a proton-sensing and psycosine-sensitive G-protein-coupled receptor. J. Biol. Chem. 279, 45626-45633 (2004).

11. Radu, C.G., Nijagal, A., Mclaughlin, J., Wang, L., Witte, O.N. Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 1632-1637 (2005).
12. Tomura, H., Mogi, C., Sato, K. Okajima, F. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors : A novel type of multi-functional receptors. Cellular Signaling 12. 1466-1476 (2005).
13. Kyaw, H., Zeng, Z., Su, K., Fan, P., Shell, B.K., Carter, K.C., Li, Y. Cloning, characterization, and mapping of human homolog of mouse T-cell death-associated gene. DNA Cell Biol. 17, 493-500 (1998).
14. Lardner, A. The effects of extracellular pH on immune function. J. Leukoc. Biol. 69, 522-530 (2001).
15. Wittenberger, T., Schaller, H. C., Hellebrand, S. An expressed sequence tag (EST) data mining strategy succeeding in the discovery of new G-protein coupled receptors, J. Mol. Biol. 307, 799-813 (2001).
16. Wang, J., Wu, X., Simonavicius, N., Tian, H., Ling, L. Medium-chain fatty acids as ligands or orphan G protein-coupled receptor 84, J. Biol. Chem. 281, 34457-34464 (2006).
17. Venkataraman, C., Kuo, F. The G-protein coupled receptor, GPR84 regulates IL-4 production by T lymphosytes in response to CD3 crosslinking, Immunol. Lett. 101, 144-153 (2005).
18. Bouchard, C., Page, J., Bedard, A., Tremblay, P., Vallieres, L. G protein-coupled receptor 84, a microglia-associated protein expressed in neuroinflammatory conditions. Glia 55, 790-800 (2007).
19. Kagari, T., Doi, H., Shimozato, T. The importance of IL-1β and TNF-α, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. J. Immunol. 169, 1459-1466 (2002).

20. Nandakumar, K.S., Svensson, L., Holmdahl, R. Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice. Am. J. Pathol. 163, 1827-1837 (2003).
21. Tanaka, D., Kagari, T., Doi, H., Shimozato, T. Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis. Immunology 119, 195-202 (2006).
22. Svensson, L., Jirholt, J., Holmdahl, R., Jansson, L. B cell deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). Clin. Exp. Immunol. 111, 521-526 (1998).
23. Skapenko, A., Leipe, J., Lipsky, P.E., Schulze-Koops, H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. Arthritis Res. Ther. 7 Suppl 2, S4-14 (2005).
24. Wooley, P.H., Luthra, H.S., Stuart, J.M., David, C.S. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. J. Exp. Med. 154, 688-700 (1981).
25. Wooley, P.H., Luthra, H.S., Griffiths, M.M., Stuart, J.M., Huse, A., David, C.S. Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule. J. Immunol. 135, 2443-2451 (1985).
26. Marchal, G., Seman, M., Milon, G., Truffa-Bachi, P., ZilBerfarb, V. Local adoptive transfer of skin delayed-type hypersensitivity initiated by a single lymphocyte. J. Immunol. 129, 954-958 (1982).
27. Vermeulen, M., Giordano, M., Trevani, A.S., Sedlik, C., Gamberale, R., Fernandez-Calotti, P., Salamone, G., Raidem, S., Sanjurjo, J., Geffner, J.R. Acidosis improves uptake of antigens and MHC class I-restricted presentation by dendritic cells. J. Immunol. 172, 3196-3204 (2004).
28. Hietala, M.A., Nandakumar, K.S., Persson, L., Fahlen, S., Holmdahl, R., Pekna, M. Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. Eur. J. Immunol. 34, 1208-1216 (2004).
29. Nirmal, K., Takahashi, K., Allyson, K., Wood, V., Holers, M., William, P.A. Pathogenic Complement Activation in Collagen Antibody-Induced Arthritis in Mice Requires Amplification by the Alternative pathway. J. Immunol. 179, 4101-4109

(2007).

30. Nandakumar, K.S., Backlund, J., Vestberg, M., Holmdahl, R. Collagen type Ⅱ（CⅡ)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CⅡ-reactive T cells. Arthritis. Res. Ther. 6, R554-R560 (2004).
31. Nandakumar, K.S., Andren, M. Induction of arthritis by single monoclonal IgG anti-collagen type Ⅱ antibodies and enhancement of arthritis in mice lacking Inhibitory FcRⅡB. Eur. J. Immunol. 33, 2269-2277 (2003).
32. Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Heßling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staege, M.S., Stassen, M., Jonuleit, H., Schmitt, E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. J. Exp. Med. 204, 1303-1310 (2007).
33. Koga, K., Takaesu, G., Yoshida, R., Nakaya, M., Kobayashi, T., Kinjo, L., Yoshimura, A. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the c-Fos protein phosphorylated by IKK beta. Immunity. 30, 372-383 (2009).
34. Neves, S.R., Ram, P.T., Lyengar, R. G protein pathways. Science. 296, 1636-1639 (2002).
35. Lee, J. Y., Zhao, L., Youn, H.S., Weatherill, A.R., Tapping, R., Feng, L., Lee, W.H., Fitzgerald, K.A., Hwang, D.H. Saturated fatty acid activates but polyundaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. J. Biol. Chem. 279, 16971-16979 (2004).
36. Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., Mizuarai, S., Kotani, H., Yamaoka, S., Miyake, K., Aoe, S., Kamei, Y., Ogawa, Y. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27, 84-91 (2007).

37. Malone, M.H. The glucocorticoid-induced gene tdag8 encodes a pro-apoptotic G protein-coupled receptor whose activation promotes glucocorticoid-induced apoptosis. J. Biol. Chem. 279, 52850-52859 (2004).
38. Meyer, Z.U. Lysophospholipid receptors : signaling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. Biochim. Biophys. Acta. 1768, 923-940 (2007).
39. Jan, F.G., Tuija, I., Randall, E.M. Newer Immunosuppressive Drugs : A Review. J. Am. Soc. Nephrol. 10, 1366-1380 (1999).
40. Kamimura, D., Ishikawa, K., Hirano, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 149, 1-38 (2004).
41. Choy, E.H.S., Isenberg, D.A., Garrood, T., Farrow, S., Ioannou, Y., Bird, H., Cheung, N., Williams, B., Hazleman, B., Price, R., Yoshizaki, K., Nishimoto, N., Kishimoto, T., Panayi, G.S. Therapeutic benefit of blocking Interleukin-6 activity with an anti-Interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 46, 3143-3150 (2002).
42. Katsikis, P.D., Chu, C.Q., Brennan, F.M., Maini, R.N., Feldmann, M. Immunoregulatory role of Interleukin-10 in rheumatoid arthritis. J. Exp. Med. 179, 1517-1527 (1994).
43. Paramalingam, S.S. In vivo anti-inflammatory cytokines in normal and patients with rheumatoid arthritis. Ann. Acad. Med. Singapore 36, 96-99 (2007).
44. Gatenby, R.A., Gillies, R.J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nat. Rev. Cancer 4, 891-899 (2004).
45. Mogi, C., Tobo, M., Tomura, H., Murata, N., He, X., Kimura, T., Ishizuka, T., Sasaki, T., Sato, T., Kihara, Y., Ishii, S., Harada, A., Okajima, F. Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. J. Immunol. 182, 3243-3251 (2009).
46. Zhang, L.L., Wei, W., Wang, N.P., Wang, Q.T., Chen, J.Y., Wu, H., Hu, X.Y. Paeoniflorin suppresses inflammatory mediator production and regulates G protein-coupled signaling in fibroblast-like synoviocytes of collagen induced

arthritic rats. Inflamm. Res. 57, 388-395 (2008).

47. Onodera, S., Ohshima, S., Tohyama, H., Yasuda, K., Nishihira, J., Iwakura, Y., Matsuda, I., Minami, A., Koyama, Y. A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. Arthritis Rheum. 56, 521-530 (2007).
48. Hultqvist, M., Nandakumar, K.S., Bjorklund, U., Holmdahl, R. Rabeximod reduces arthritis severity in mice by decreasing activation of inflammatory cells. Ann. Rheum. Dis. 69, 1527-1532 (2010).
49. Nakao, A., Ohkawa, N., Nagasaki, T., Kagari, T., Doi, H., Shimozato, T., Ushiyama, S., Aoki, K. Tetrahydropyridine derivatives with inhibitory activity on the production of proinflammatory cytokines: part 3. Bioorg. Med. Chem. Lett. 20, 4774-4778 (2010).
50. Abbas, A.K., Murphy, K.M., Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature 383, 787-793 (1996).
51. Mosmann, T.R., Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets : Th1, Th2 and more. Immunol. Today 17, 138-146 (1996).
52. Ihara, Y. The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8(TDAG8) facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor. Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 107, 17309-17314 (2010).

主論文

1 . Yoshiko Onozawa, Tomoaki Komai, Tomiichiro Oda. Activation of T cell death-associated gene 8 attenuates inflammation by negatively regulating the function of inflammatory cells. European Journal of Pharnacology **654**, 315-319 (2011).

2 . Yoshiko Onozawa, Yoshifumi Fujita, Harumi Kuwabara, Miyuki Nagasaki, Tomoaki Komai, Tomiichiro Oda. Activation of T cell death-associated gene 8 regulates the cytokine production of T cells and macrophages *in vitro.* European Journal of Pharnacology **683**, 325-331 (2012).

3 . Masakatsu Suzuki, Sachiko Takaishi, Miyuki Nagasaki, Yoshiko Onozawa, Ikue Iino, Hiroaki Maeda, Tomoaki Komai, Tomiichiro Oda. Medium-chain fatty acid sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. The Journal of Biological Chemistry **288**, 10684-10691 (2013).

参考論文

1. Tetsuya Tanaka, Takatomo Satoh, Yoshiko Onozawa, Junya Kohroki, Norio Itoh, Motoi Ishidate Jr, Norio Muto, Keiichi Tanaka. Apoptosis during iron chelator-induced differentiation in F9 embryonal carcinoma cells. Cell Biology International **23**, 541-550 (1999).

2. Yukie Ogawa, Masahiko Ohtsuki, Miwa Uzuki, Takashi Sawai, Yoshiko Onozawa, Junichi Nakayama, Akiko Yonemura, Tomoatsu Kimura, Hiroaki Matsuno. Suppression of osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis by induction of apoptosis in activated CD4+ T Cells. Arthritis and Rheumatism **48**, 3350-3358 (2003).

3. Junichi Nakayama, Yukie Ogawa, Yasushi Yoshigae, Yoshiko Onozawa, Akiko Yonemura, Motoko Saito, Kimihisa Ichikawa, Takashi Yamoto, Tomoaki Komai, Toru Tatsuta, Masahiko Ohtsuki. A humanized anti-human Fas antibody, R-125224, Induces apoptosis in Type I activated lymphocytes but not in Type II Cells. International Immunology **18**, 113-124 (2006).