

氏 名 ・ (本籍) 今野 泰典 (北海道)

専攻分野の名称 博士 (医学)

学位記番号 医博甲第 882 号

学位授与の日付 平成 27 年 3 月 22 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科 ・ 専攻 医学系研究科医学専攻

学位論文題名 **Functional analysis of tree fatty acid receptor GPR120 in human eosinophils:implications in metabolic homeostasis**

(ヒト好酸球における遊離脂肪酸受容体 GPR120 の機能解析：代謝恒常性との関係)

論文審査委員 (主査) 教授 妹尾 春樹

(副査) 教授 柴田 浩行 教授 大森 泰文

学位論文内容要旨

Functional analysis of free fatty acid receptor GPR120 in human eosinophils:
implications in metabolic homeostasis

(ヒト好酸球における遊離脂肪酸受容体 GPR120 の機能解析: 代謝恒常性との関係)

申請者氏名 今野 泰典

研究目的

好酸球は、寄生虫感染やアレルギー性炎症において重要な役割を果たすことが知られている。最近の知見では、好酸球は生理的に脂肪組織にも動員され、Th2 サイトカイン依存性のマクロファージの機能調節を介し、エネルギー代謝や糖代謝の恒常性維持に深く関与していることが明らかになってきた。

一方、G 蛋白共役型受容体(GPCR)の一つである G-protein-coupled receptor(GPR)120 が長鎖脂肪酸の膜受容体として新たに同定され、その機能が注目を集めている。これまでに、GPR120 の合成アゴニストや自然リガンド、GPR120 欠損マウスによる研究により、GPR120 は炎症性サイトカインの産生の抑制やインクレチンの放出促進などの働きを有しており、炎症や代謝の制御を行っていることが明らかになった。しかしながら、代謝において重要な働きをもつ好酸球において GPR120 の作用は検討されていない。そこで、ヒト好酸球における GPR120 の発現と機能を明らかにするため、本研究を行った。

研究方法

健常人ドナーから提供された末梢血から、CD16 negative selection 法により高純度分離したヒト好酸球を用いた。GPR120 の遺伝子発現は RT-PCR 法で、蛋白発現については抗 GPR120 抗体を用いて flow cytometry 法と免疫蛍光染色法で検討した。受容体の発現変化については、GPR120 の合成アゴニストである GW9508 で刺激後、同様に flow cytometry 法で検討した。GPR120 の好酸球機能への影響を検討するため、eotaxin-1 に対する遊走活性への影響を Boyden chamber 法を用いて検討した。脱顆粒に与える影響を検討するため好酸球を GW9508 で 4 時間刺激し、上清中の好酸球特異的な顆粒蛋白 (EDN) を ELISA 法で測定した。また、GPR120 の好酸球生存能に及ぼす影響について、GW9508 を用い、annexin V と propidium ionide による二重染色により検討した。GPR120 が好酸球の apoptosis に及ぼす影響を検討するために、GW9508 存在下で培養した細胞の Fas 受容体の発現、caspase-3 活性を測定した。また、PI3K γ 阻害薬である AS605240、pan-PI3K 阻害薬である LY294002 を用いて、GW9508 が生存能への影響を与えるメカニズムを検討

した。さらに、好酸球の Th2 サイトカイン産生に及ぼす影響については、IL-4 の産生を ELISpot 法で検討した。また、GPR40 特異的アタゴニスト GW1100 を用いて、GW9508 による生存延長と IL-4 産生における GPR40 の役割を検討した。

研究成績

ヒト末梢血好酸球において、mRNA レベルで GPR120 の発現が認められた。細胞膜の透過処理を行わない好酸球を、抗 GPR120 抗体で染色して flow cytometry 法、免疫蛍光染色法で検討したが、いずれの方法でも GPR120 の発現が確認された。また、アゴニストにより短時間 (10 分) で細胞表面の GPR120 の発現減少が認められ、GPCR の特徴である受容体の internalization が示唆された。

通常細胞培養条件で、無刺激の好酸球は 48 時間後には大半が apoptosis をきたし、生存細胞の割合は 30%程度であったが、GW9508 (100 μ M) の存在下では、その割合は約 60%に増加し、統計学的にも有意な生存延長効果が認められた。同条件において、apoptosis の関連分子である Fas 受容体の発現の減少と、apoptosis の実行分子である caspase-3 の活性が抑制されていることも明らかになった。GW9508 による好酸球生存延長効果は、2 種類の異なる PI3K 阻害薬 (AS605240、LY294002) によって有意に抑制されたことから、PI3K を介したものであることが示唆された。また、好酸球による IL-4 産生については、GW9508 により有意に産生が促進された。GW9508 は GPR40 にも結合し生物学的な作用を示すことが報告されているものの、GPR40 の特異的アタゴニストは GW9508 による作用に影響は認めなかった。

そのほか、GW9508 は好酸球の chemotaxis を誘導せず、さらに GW9508 で前処理を行っても、好酸球に選択的な遊走活性を有する CC ケモカイン (eotaxin-1) に対する遊走活性に影響を与えなかった。また、好酸球の EDN 産生についても影響を与えなかった。

結論

今回の検討から、GPR120 はヒト好酸球の細胞膜上に発現しており、そのリガンド刺激は好酸球の生存能を延長することが明らかになった。GPR120 は遊走や脱顆粒といった炎症機構には関与しないものの、IL-4 の産生を促進する。これらのことは、生理的な状況において、生体内の長鎖脂肪酸によって刺激された好酸球の機能調節に GPR120 が関与していることを示唆し、脂肪組織における代謝恒常性の維持にも寄与している可能性が考えられた。

以上、GPR120 の好酸球に及ぼす影響やその作用機序についてはじめて報告した。GPR120 をはじめとした脂肪酸受容体の機能を明らかにすることで、免疫細胞と代謝の関連と新しい治療戦略の開発につながる可能性があると考えられる。

学 位 (博士一甲) 論文審査結果の要旨

主 査：妹尾春樹

申請者：今野泰典

論文題目：Functional analysis of free fatty acid receptor GPR120 in human eosinophils: implications in metabolic homeostasis

(ヒト好酸球における遊離脂肪酸受容体 GPR120 の機能解析: 代謝恒常性との関係)

要旨

好酸球は、寄生虫感染やアレルギー性疾患における炎症細胞として働くことがよく知られている。しかし近年、脂肪組織に常在している好酸球は、Th2 サイトカインの産生を介してマクロファージの機能調節を行い、エネルギー代謝の恒常性を維持していることが明らかになった。これは生体内での新しい好酸球の役割として、研究者の注目を集めている。一方、長鎖脂肪酸に対する受容体として、G 蛋白共役型受容体(GPCR)の一つである GPR120 が同定され、炎症や代謝の制御を行っていることが明らかになってきた。

本研究は、分離したヒト末梢血好酸球を用い、GPR120 の発現と機能を検討したものである。得られた知見から、GPR120 のアゴニストは好酸球の生存を延長するとともに、IL-4 産生を誘導することが明らかになった。このことから、食事により摂取された長鎖脂肪酸は、好酸球の GPR120 を介して代謝恒常性の維持にも寄与している可能性が示唆される。

本論文の斬新性、重要性、実験方法の正確性、論旨の明瞭性は以下の通りである。

1) 研究の斬新性

脂肪酸は、これまで生体の構造を作る物質として、もしくは単なるエネルギー源とし

て認識されてきた。しかし、近年では受容体を有する生理活性物質として注目が集まっている。本研究では脂肪酸受容体の GPR120 に着目して、ヒト好酸球における発現を初めて明らかにした。また、代謝との関連に着目して種々の細胞機能の解析を行い、GPR120 の働きを明らかにしたことから、斬新性が高いと評価される。

2) 研究の重要性

脂質糖代謝を調節するメカニズムの一つとして、ヒト末梢血由来の好酸球を用いて GPR120 の機能に焦点を当てた点、また今後、GPR120 の治療標的分子としての可能性を示唆する点は重要性が高いと評価される。生体における好酸球の GPR120 の役割については、さらに詳細な研究が期待されるところである。

3) 研究方法の正確性

共焦点レーザー顕微鏡を用いた発現部位に関しては、3次元空間解析を追加した詳細解析を加えるべきとの指摘はあったが、ヒト好酸球高純度分離法、RT-PCR 法、flow cytometry 法、Boyden chamber 法、ELISA 法、ELISpot 法などの各種実験手技は正確に行われていると評価される。また、データは統計学的に検討されている。

4) 論旨の明瞭性

本学位論文で示された好酸球 GPR120 の発現、機能、代謝恒常性との関連について、論旨に矛盾や錯誤、また結果解釈に著しい誇張などなく、データに沿って明瞭に記載されている。また、本論文は PLOS ONE 誌に投稿され、受理されたように外部査読においても十分な評価を得ている。

以上の観点から、本論文は学位を授与するのに十分な条件を備えていると判定される。