

論 文 要 旨

**N-arachidonoyl glycine induces macrophage apoptosis
via GPR18**

N-アラキドノイルグリシンは GPR18 を介して
マクロファージのアポトーシスを誘導する

竹ノ内 里奈

【序論および目的】

プロスタグランジンやロイコトリエンなどを代表とする生理活性脂質の多くは G タンパク質共役型受容体 (GPCR) と結合し、免疫、血圧調節、痛みや発熱、消化管活動、細胞増殖、分裂と分化制御など幅広い生理機能を示す。本研究で着目した N-arachidonoyl glycine (NAGly) は、脂質とアミノ酸が結合したリポアミノ酸の一つである。多くのリポアミノ酸は哺乳類にも内在することが確認されており、またカンナビノイドの構造類似物として、その生理作用が注目されている。

これまでに、NAGly を含むいくつかのリポアミノ酸が耳浮腫モデルマウスや腹膜炎モデルマウスにおいて抗炎症作用を示すことや、マウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 細胞の増殖を抑えることが報告されているが、これらの詳細なメカニズムは明らかになっていない。

NAGly は当初オーファン GPCR のひとつ、GPR18 のリガンドとして報告されたが、最近になり否定的な見解が報告された。一方、delta-9-tetrahydrocannabinol や N-arachidonoyl ethanol amide もまた GPR18 のリガンドであるとの意見もあり、更なる議論・研究が必要とされている。

自然免疫において重要な役割を果たしているマクロファージは生体内に侵入した細菌・ウイルス、また異物 (がん細胞) をも貪食し消化する。マクロファージは機能的に分類すると、少なくとも M1 と M2 と 2 種類存在することが知られている。M1 マクロファージは細菌、ウイルス、真菌類の感染時に活性化し、病原体の排除に重要な腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor : TNF) や炎症性サイトカインを産生する炎症促進性の古典的活性化を示す。一方、M2 マクロファージは寄生虫感染、アレルギー応答、脂肪代謝、創傷治癒、がん転移などに関与し、炎症抑制性の選択的活性化を示す。

本研究ではマクロファージにおける NAGly の効果と、そのシグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

1. 細胞生存率 ; cell counting kit-8 (Dojindo)
2. アポトーシス細胞の検出 ; TUNEL 染色
3. mRNA 発現 ; 逆転写 PCR 法
4. MAPKs 発現確認、アポトーシス関連タンパク質発現 ; Western blotting 法
5. GPR18 発現抑制 ; GPR18 特異的 siRNA トランスフェクション
6. 統計学的解析 ; Student's t-test, Tukey's test

【結果】

1. NAGly (30 μ M, 24hours) は RAW264.7 細胞の細胞生存率を減少させたが、アラキドン酸 (30 μ M, 24hours) では変化がなかった。
2. NAGly (30 μ M, 16hours) は RAW264.7 細胞の TUNEL 陽性細胞数を増加した。
3. NAGly (30 μ M, 30minutes) は RAW264.7 細胞で ERK1/2 と p38 MAPK を活性化した。
4. MAPK/ERK kinase (MEK) および p38 MAPK 阻害剤の前処理により、RAW264.7 細胞での NAGly による細胞生存率減少効果が有意に抑制された。
5. RAW264.7 細胞での NAGly による細胞生存率減少効果は、ミトコンドリアを介したアポトーシス経路の活性化 (Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3) であることを確認した。
6. Gi タンパク質阻害剤 Pertussis toxin (PTX) の前処理および GPR18 mRNA のノックダウンにより、NAGly によるアポトーシスは有意に抑制された。
7. マウス腹腔マクロファージを lipopolysaccharide (LPS) と interferon (IFN)- γ によって M1 マクロファージ分化させた。同様に、マウス腹腔マクロファージを interleukin(IL)-4 によって M2 マクロファージに分化させた。
8. M1 マクロファージでは、GPR18 mRNA の発現量が分化刺激を加えないマクロファージと比較して有意に増加し、NAGly (3 μ M, 24 hours) は細胞生存率を 40% 減少させた。
9. M2 マクロファージでは GPR18 mRNA の発現量は変化せず、NAGly (3 μ M, 24 hours) は細胞生存率を 10% ほど減少させるのみであった。

【結論及び考察】

本研究ではリポアミノ酸の一つ、NAGly が RAW264.7 細胞においてアポトーシスを誘導していることを明らかにした。NAGly の加水分解産物であるアラキドン酸ではアポトーシスが確認できなかったため、NAGly が直接的に作用していると考えられる。

NAGly は主に 2 つの MAPK (ERK1/2, p38 MAPK) を活性化し、MEK および p38 MAPK の阻害剤が NAGly による細胞生存率減少効果を抑制したことから、NAGly によるアポトーシス誘導には ERK1/2 と p38 MAPK 経路が関与していると考えられる。ERK1/2 経路の活性化は主に細胞増殖促進的に作用することが知られているが、MEK 阻害剤 PD98059 が RAW264.7 細胞における resin monomer triethylene glycol dimethacrylate で誘導されるアポトーシスを抑制するという以前の報告と一致している。

NAGly が Gi タンパク質と共役する GPR18 のリガンドとして報告されていることから、PTX 前処理を施したところ、NAGly による細胞生存率減少効果が抑制された。また、GPR18 mRNA をノックダウンしても同様の効果が見られた。したがって、NAGly によるマクロファージのアポトーシス誘導には GPR18 が関与していると考えられる。

マクロファージは、活性化の表現型に基づき炎症性の M1 と炎症抑制性の M2 に分類できる。マウス腹腔マクロファージに LPS と IFN- γ を添加すると、M1 の分化マーカーである TNF- α mRNA および IL-6 mRNA の発現量が増加し、GPR18 mRNA の発現量が増加した。一方、IL-4 を添加すると M2 の分化マーカーである IL-10 mRNA の発現量が増加したが、GPR18 mRNA の発現量は変化しなかった。M1 マクロファージでは、NAGly は細胞生存率を減少させたが、M2 マクロファージではその効果はわずかであった。

NAGly の生合成過程や生体内での動態はまだほとんど分かっておらず、マクロファージの機能における NAGly の病態生理学的役割を明らかにするにはさらなる研究が必要である。しかしながら、NAGly が GPR18 を発現する炎症性マクロファージのアポトーシスを誘導する抗炎症因子として機能する可能性を本研究で示した。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 172 号	学位申請者	竹ノ内 里奈
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学)
	副査	谷本 昭英	副査 井上 博雅
	副査	堀内 正久	副査 原口 みさ子

N-arachidonoyl glycine induces macrophage apoptosis via GPR18

(N-アラキドノイルグリシンは GPR18 を介して
マクロファージのアポトーシスを誘導する)

脂質は三大栄養素の一つであり、エネルギー源として働く一方で多岐にわたる生理機能調節に関わっている。脂肪酸とアミノ酸が結合したリポアミノ酸はカンナビノイドの構造類似物として近年その機能が注目されている。なかでも N-arachidonoyl glycine (NAGly) は炎症モデルマウスにおける抗炎症作用やマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞の増殖抑制作用などが報告されているが、メカニズムは明らかにされていない。NAGly は 2006 年に G タンパク質共役型受容体の一つである GPR18 のリガンドとして同定され、次いで GPR92 のリガンドとしても同定されたが、否定的な見解も報告されているため、NAGly と GPCR との相互作用についてはさらなる研究が必要な現状にある。そこで学位申請者は GPR18 が免疫機能に重要な役割を示す脾臓に高発現していることに注目し、NAGly のマクロファージにおけるシグナル活性経路と、GPR18 の関与と機能を検討した。マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞、マウス腹腔マクロファージ、マウスミクログリア細胞株 MG6 細胞、ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を用いて、RT-PCR 法による mRNA 発現確認、Western blotting 法によるタンパク質検出、cell counting kit-8 を用いた細胞生存率の測定、TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の検出、特異的 siRNA による GPR18 遺伝子ノックダウンを行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) NAGly は GPR18 を介して、p38MAPK 経路と ERK 経路を活性化させて、RAW264.7 細胞のアポトーシスを誘導した。
- 2) 炎症促進性に分化させた腹腔マクロファージでは GPR18 の発現が増加し、低濃度の NAGly で刺激によりアポトーシスが誘導された。
- 3) MG6 細胞において炎症を惹起する LPS の刺激により GPR18 の発現は増加し、NAGly によるアポトーシスが促進され、また LPS により誘導された炎症性サイトカインの発現は NAGly により抑制された。
- 4) GPR18 を発現している単球様の THP-1 細胞は NAGly によりアポトーシスが誘導されたが、マクロファージ様に分化させると GPR18 の発現が抑制され、アポトーシスも抑制された。

NAGly の生体内での動態はまだほとんど分かっておらず、マクロファージの機能における NAGly の病態生理学的役割を明らかにするにはさらなる研究が必要である。しかしながら、NAGly が、炎症性刺激により増加した GPR18 を介してマクロファージのアポトーシスを選択的に誘導し、同時に炎症性サイトカインの産生を抑制する抗炎症因子として機能する可能性を示したという点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第172号		学位申請者	竹ノ内 里奈
審査委員	主査	古川 龍彦	学位	博士 (医学)
	副査	谷本 昭英	副査	井上 博雅
	副査	堀内 正久	副査	原口 みさ子

主査および副査の5名は、平成24年2月22日、学位申請者 竹ノ内 里奈 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) なぜマクロファージを研究対象に選んだのか。マクロファージ以外での炎症性細胞や好中球などでの作用は調べていないのか。
 (回答) NAGly の抗炎症作用が動物実験で報告された。また NAGly の受容体と報告された GPR18 の発現が炎症刺激によりマウス骨髄由来マクロファージにおいて増加することも報告された。これらのことから GPR18 の発現挙動と NAGly の抗炎症作用に関連があるのではないかと考えた。マクロファージ以外での炎症性細胞や好中球などでの作用は調べていないが、リポアミノ酸が白血球の遊走を促進するという報告はある。

質問2) アポトーシスの評価が TUNEL と cell viability では不十分ではないか。タイムコースは妥当か。アポトーシス細胞はどうなるのか。
 (回答) NAGly 刺激後 24 時間後の細胞生存率の測定、AnnexinV 染色 (8 時間) と TUNEL 染色 (16 時間) で評価し、アポトーシス実行酵素の活性 (12 時間) も検討し、アポトーシスの誘導と判断するに十分妥当と判断していた。AnnexinV 染色と TUNEL 染色の経時変化の検討が必要である。アポトーシスを起こした細胞は in vitro の実験では接着細胞がはがれるが、in vivo でアポトーシス細胞がどうなるかは今後の検討課題である。

質問3) siRNA transfection 試薬はどのようなものか。ノックダウンをタンパク質レベルで確認していないのか。
 (回答) Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) は従来製品より細胞毒性が低く、ノックダウン効率が低い。48 時間の transfection を行うと、NAGly の有無にかかわらず生細胞数は減少している。しかし、Negative Control siRNA を transfection した細胞群との比較により Lipofectamine RNAiMAX による毒性を相殺したデータとした。タンパク質レベルのノックダウン確認は必要であるが、現在のところ評価するにふさわしい市販品の GPR18 抗体を得ることは困難であり、確認できていない。今後の検討課題としたい。

質問4) PI3K 経路は確認していないのか。また他のアポトーシス経路は確認していないのか。
 (回答) 確認していない。今回示したミトコンドリア経路以外にも小胞体ストレスによるものやデスリガンドの活性化によるものなど、複数存在するが、それらの評価については今後の検討課題としたい。

質問5) 今回示したマクロファージのアポトーシスは抗炎症と言えるのか、サイトカイン抑制にどう作用しているのか。
 (回答) マクロファージのアポトーシスによる抗炎症作用というのはこれまでに例がないが、NAGly の抗炎症作用というのは、炎症刺激がマクロファージに加わることでサイトカインの産生と共に GPR18 の発現が増加し、その GPR18 と NAGly が結合することで MAPK 活性化を介したアポトーシスを誘導することと考えている。NAGly がサイトカインの合成・分泌を抑制している可能性もあるが、主にサイトカインを産生しているマクロファージのアポトーシスを選択的に誘導することで、結果として全体の炎症性サイトカインの産生量が減少し炎症終息が促進されると考えている。今後、敗血症モデルマウスなどに NAGly を投与したときの作用など検討したい。

質問6) オーフアン受容体の定義とはなにか。
 (回答) 日本薬学会によると、リガンドが特定されていない受容体のことをオーフアン受容体と呼び、リガンドが特定された時点で脱オーフアンとなるそうだが、GPR18 に関しては未だにオーフアン受容体として扱われている。

質問7) GPR92 の発現変化、アポトーシスへの寄与はないのか。
 (回答) GPR92 は Gs, G12, Gq タンパク質共役型受容体であるが、RAW264.7 細胞における NAGly による細胞死は Gi/o タンパク質の阻害剤 PTX 処理により抑制されたことや、THP-1 細胞では GPR92 の発現は確認されなかったが NAGly による細胞死は観察されたことから、今回の実験については GPR92 の寄与は考え難い。

最終試験の結果の要旨

質問8) THP-1 細胞に PMA 刺激を与えると炎症抑制性 M2 になるのか。LPS 刺激によりどうなるか。ヒト単球由来 U937 は用いないのか。

(回答) THP-1 細胞は M1, M2 という分類は一般的になされていないが、THP-1 細胞に PMA を加えると炎症促進性 M1 に近いといえる。しかし NAGly による細胞死は抑制されるという予想に反するものであったので U937 細胞での作用についてと同様に今後の検討課題としたい。また THP-1 細胞に PMA を添加すると GPR18 発現は減少するが、さらに LPS した時の GPR18 発現変化も今後検討していきたい。

質問9) GPR18 が NAGly のレセプターでないとする論文のデータはどのようなものか。

(回答) HEK293 細胞と CHO 細胞における GPR18 の安定発現細胞株を用いた、リガンド結合による細胞内シグナルの活性化状態を指標とする β -arrestin Pathhunter assay による実験結果である。

質問10) NAGly 以外の GPR18 のリガンドはないのか。GPR18 ノックアウトマウスはいるのか。

(回答) THC や arachidonoyl ethanol amide (AEA) が GPR18 のアゴニストとして報告されている。GPR18 ノックアウトマウスは国際ノックアウトマウスコンソーシアム (IKMC) がすでに作成しているようだが、論文などの報告はない。

質問11) NAGly とアラキドン酸の物性・特性・溶解度等の違いはあるのか。

(回答) どちらも両親媒性のようで、エタノールにも PBS にも溶解し、扱う上での違いは感じなかった。

質問12) NAGly 誘導のアポトーシスに関して NAGly 以外の物質の寄与があるのか。

(回答) 細胞死に関しては AEA も細胞死を誘導し、RAW264.7 細胞において NAGly 刺激により AEA を増加させるという過去の報告があることから AEA の寄与があるかもしれない。しかし AEA 単独刺激による細胞死は PTX 処理により抑止することができないため、別のシステムで細胞死を誘導しているのかもしれない。

質問13) NAGly 局在について(合成の酵素・経路、細胞内局在、脾臓での濃度、実験系での添加濃度の濃さとの比較)

(回答) NAGly は AEA がアルコール脱水素酵素とアルデヒド脱水素酵素との二段階反応により生成するという説や AEA が脂肪酸アミド脱水素酵素により生成したアラキドン酸とグリシンが結合して生成するという in vitro での結果はあるが、in vivo での合成経路は分かっていない。また NAGly を含め他のリポアミノ酸についても acyl CoA とアミノ酸が cytochrome C の触媒作用により生成されるという報告もある。細胞内の NAGly の局在は調べられた報告はない。GPR18 は脾臓で他の組織より発現量が多いが、NAGly は約 5 pmol/g dry weight と多くない。炎症組織での NAGly 濃度についてこれまでの報告はないが、実験で用いた添加濃度まで増加しているのではないかと考えており今後の検討課題である。

質問14) NAGly が見つかった経緯について

(回答) リポアミノ酸研究の初期 (1990 年頃) はバクテリア由来の化合物として発見され、カンナビノイドとの構造の類似から機能が期待されていたものの、バクテリアにおける機能はあまり研究なされていなかった。しかし 2001 年 Huang らがウシの脳から NAGly と N-arachidonoyl L-Serine の抽出に成功したため、哺乳類での生理機能が注目されるようになった。

質問15) AEA の合成経路・局在について

(回答) アラキドン酸がトランスアシラーゼによりホスファチジルエタノールアミンのアミノ基に転移されて N-アラキドノイルホスファチジルエタノールアミンが作られ、ホスホジエステラーゼの作用によりアナンドアミドが合成される。細胞内の局在はわからないが、生理状態ではほとんど存在せずに、空腹や痛みなどの刺激により主に脳や消化器で生成されると考えられている。

質問16) cck-8 assay とはどのようなものか。

(回答) Cell Counting Kit-8 (Dojindo) は細胞増殖または化学物質の感受性試験において、新規テトラソリウム塩 WST-8 を発色基質として、細胞内脱水素酵素により還元され、生成される水溶性のホルマザンの吸光度を直接測定することにより、生細胞数を評価することができる。

質問17) NAGly の一般的なアラキドン酸カスケード等への関与はないのか。

(回答) 一般的な抗炎症薬はシクロオキシゲナーゼ (COX) を抑制するものが主流であるが、NAGly は COX を増加させ、PPAR γ と結合して抗炎症作用を示すプロスタグランジン I₂ の産生を増加させると報告されている。

質問18) NAGly は内服できるのか。

(回答) NAGly を経口投与によりサフラワーオイル誘導の足浮腫を軽減している報告がある。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。