

論文の内容の要旨

論文題目 抗炎症薬としてのGPR39アゴニストの薬理学的研究

氏名 宗岡 聡

第1章 研究の背景と目的

亜鉛は微量元素の1つであり、恒常性維持、免疫機能、酸化ストレス、アポトーシス等に関与している。亜鉛と疾患との関係は古くより知られ、例えば、6ヵ月間の亜鉛の毎日摂取は、プラセボ摂取群と比較して、IL-6等の炎症誘発性サイトカインの血漿中濃度を有意に減少させたと報告されている。

亜鉛受容体として知られるGタンパク質共役受容体39（GPR39）は、グレリン受容体ファミリーのメンバーであり、胃腸、膵臓、肝臓、腎臓、脂肪組織、甲状腺、心臓、および肺に発現している。GPR39ノックアウトマウスまたは天然リガンドである亜鉛を使用した試験から、メタボリックシンドローム、うつ病、大腸炎、創傷治癒等におけるGPR39の関与が報告されている。近年ではGPR39アゴニストとしてTC-G 1008が報告された。GPR39アゴニストは亜鉛単独よりも強力な活性を示すため、GPR39の生理学的役割を明らかにする有用なツールである。

GPCR はマクロファージの細胞膜表面上に発現し、機能を調整していることが知られているが、マクロファージにおける GPR39 の機能についてはこれまでに報告されていない。本研究では、マクロファージに発現する GPR39 が抗炎症機能を有するという仮説を立て、GPR39 の抗炎症作用の解明ならびに敗血症治療薬・肝炎治療薬としての GPR39 アゴニストの創薬研究を目的とした。

第2章 敗血症モデルにおけるGPR39の抗炎症作用

敗血症は、感染に対する宿主応答の調節不全によって引き起こされる生命を脅かす臓器機能不全である。世界中で約 3000 万人の敗血症患者が存在し、抗生物質による早期治療にもかかわらず毎年 600 万人の患者が死亡している。敗血症を引き起こす微生物として、グラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌が報告されている。グラム陰性菌のユニークな構造構成要素であるリポ多糖（LPS）は、敗血症の病因における毒性因子である。グラム陰性細菌による感染後、LPS はマクロファージなどの TLR4 発現宿主細胞と相互作用し、炎症誘発性サイトカイン産生の調整不全を引き起こす。したがって、*in vitro* で LPS 刺激したマクロファージおよび LPS 誘発マウス敗血症モデルは、敗血症の病因を理解するため、そして敗血症治療の薬物候補化合物を評価する

ために広く使用されている。本章では、LPS 刺激したマクロファージおよび LPS 誘発マウス敗血症モデルにおける GPR39 の抗炎症作用ならびに GPR39 アゴニストの生存延長効果を検討した。

チオグリコレート誘発腹膜細胞（大部分はマクロファージ）における mRNA 発現を調べたところ、腹腔常在細胞と比較し、*Gpr39* 発現が有意に増加することを見出した。GPR39 アゴニストである TC-G 1008 は LPS 刺激したチオグリコレート誘発腹腔マクロファージからの IL-10 産生を濃度依存的に増強したが、その作用は GPR39 ノックアウトマウス由来腹腔マクロファージでは観察されなかった。したがって、他の GPCR と同様に GPR39 が活性化マクロファージに発現しており、LPS 刺激による IL-10 産生を GPR39 が調整していることが明らかとなった。

次に、LPS 誘発マウス敗血症モデルにおける TC-G 1008 の効果を検討した。LPS 投与は野生型マウスにおける血中 IL-10 濃度および TNF- α 濃度を有意に増加させ、TC-G 1008 は用量依存的に血中 IL-10 濃度を増加、血中 TNF- α 濃度を抑制した。GPR39 ノックアウトマウスを用いて同様の検討を実施した結果、LPS 刺激による IL-10 および TNF- α 産生は野生型と同様に観察されたが、TC-G 1008 (30 mg/kg) 投与による有意なサイトカイン変動は観察されなかった。未刺激の野生型マウスに TC-G 1008 (30 mg/kg) を経口投与しても血中 IL-10 は検出されなかった。さらに、LPS 誘発致死性敗血症モデルにおいて、TC-G 1008 (30 mg/kg) の単回経口投与は、媒体投与と比較して LPS 接種後 45 時間の生存率を有意に改善した。これらの結果から、GPR39 アゴニストはマクロファージからのサイトカイン産生を制御することで抗炎症に作用し、敗血症モデルにおいて薬効を示したと考えられた。

TC-G 1008 が IL-10 産生を増強する臓器を同定するために、LPS 誘発性マウス敗血症モデルにおいて、脾臓、肝臓、肺、十二指腸、空腸、回腸、および結腸を回収し、*Il10* mRNA 発現を測定した。肝臓および空腸における *Il10* 発現は、溶媒処置マウスと比較して、TC-G 1008 (30 mg/kg) 処置マウスにおいて有意に増加した。したがって、これらの臓器において産生される IL-10 が生存率改善へ寄与したことを示唆した。

第 3 章 自己免疫性肝炎モデルにおける GPR39 の抗炎症作用

自己免疫性肝炎は進行性の慢性疾患であり、全ての年齢群に広くみられ、男性よりも女性に多く罹患することが知られている。遺伝的素因、ウイルス感染、特定の薬物が自己免疫性肝炎を誘発すると推定されているが、この疾患の正確な病因は依然として不明であり、日本では指定難病 95 に登録されている。自己免疫性肝炎の標準的な免疫抑制療法では、プレドニゾロンの単独投与またはアザチオプリンとの併用投与の予後が良好であることがわかっているが、これらの療法に反応しない患者もいる。したがって、肝自己抗原に対する耐性を回復させ、長期寛解を誘導するためには、新たな治療戦略が必要である。T細胞分裂促進因子である Con A はマウスに肝炎を誘発することが知られ、自己免疫性肝炎の病態理解や肝炎治療薬候補化合物評価のための炎症モデルとして広く用いられている。本章では、GPR39 アゴニストの肝保護作用を Concanavalin A (Con A) 誘発自己免疫性肝炎モデルで検討した。

Con A投与は24時間後の血中GPT濃度を有意に増加させ、TC-G 1008は用量依存的に血中GPT濃度を抑制した。肝組織の組織病理学的解析では、Con A投与は肝細胞壊死および炎症性細胞浸潤などの組織病理学的所見により示される重篤な肝損傷が観察されたが、TC-G 1008投与マウスでは肝組織の壊死面積が用量依存的に抑制されることを見出した。血中サイトカイン解析では、Con A投与6時間後にIL-6、IL-10、TNF- α の血中濃度が有意に上昇したが、TC-G 1008 (30 mg/kg) の経口投与はIL-6およびTNF- α の血中濃度を有意に抑制した。しかし、溶媒投与マウスとTC-G 1008投与マウス間で血中IL-10濃度に差はなかった。これらの結果から、Con A誘発マウス自己免疫性肝炎モデルにおいて、GPR39アゴニストが肝障害を抑制することが示された。TC-G 1008によるIL-6あるいはTNF- α 産生抑制が肝障害抑制に繋がったと考えられるとともに、これらのサイトカインを産生する細胞がGPR39アゴニストの標的であることが示唆された。

Con A 誘発マウス肝炎モデルにおいて様々な細胞が病態に関与することが報告されている。敗血症における検討からマクロファージに着目し、肝臓常在マクロファージであるクッパー細胞ならびに単球由来マクロファージにおいて GPR39 アゴニストが抗炎症作用を示すかどうかを検討した。定量 PCR により mRNA 発現を調べたところ、PMA 処理により誘導した U937 マクロファージには *GPR39* が発現していた一方で、マウスクッパー細胞株 SCC-119 では *Gpr39* の発現が確認できなかった。U937 マクロファージにおいて、LPS 刺激は IL-6 産生を有意に増加させ、TC-G 1008 添加は IL-6 産生を有意に抑制した。これらの結果は、肝障害抑制作用を有する GPR39 アゴニストの標的細胞の 1 つが、肝臓に常在するマクロファージではなく、単球由来のマクロファージであることを示唆した。

第4章 総括

GPR39 アゴニストの創薬研究として、敗血症および肝炎モデルを用いた抗炎症作用の検討を行った。本研究では、LPS 誘発敗血症モデルおよび Con A 誘発自己免疫性肝炎モデルの 2 種類のマウスモデルを用いた検討により、サイトカイン産生調整、生存率改善、肝保護効果に示される GPR39 アゴニストの抗炎症作用が実験的に明らかとなった。さらに、マクロファージにおける GPR39 の機能を初めて報告した。すなわち、炎症状態下でマクロファージにおける GPR39 発現が上昇しており、また、GPR39 アゴニストはサイトカイン産生を抗炎症に調整した。したがって、GPR39 アゴニストの動物モデルにおける抗炎症効果の一端として、マクロファージからのサイトカイン産生を調整していることが示唆された。

以上の結果から、GPR39 アゴニストは抗炎症薬として有用であると考えられる。さらなる研究により、新たな炎症疾患治療薬の創出が期待される。