

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860743

研究課題名(和文)細胞膜エストロゲン受容体GPR30の喘息病態への関与と新規治療薬の探究

研究課題名(英文) Involvement of GPR30 in the pathogenesis of asthma and research on novel treatment for asthma.

研究代表者

竹田 正秀 (Takeda, Masahide)

秋田大学・医学部・寄附講座等教員

研究者番号：30466594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、細胞膜エストロゲン受容体であるGPR30の喘息病態への関与を検討した。喘息マウスを用いた研究では、GPR30アゴニストであるG-1投与によって、アレルギー性の気道炎症や気道抵抗の抑制が認められた。この現象は、IL-10ノックアウトマウスでみられず、GPR30がIL-10を介して喘息病態に関与することが示唆された。

一方でヒト好酸球を用いた研究においては、G-1投与によって、IL-5非存在下では、好酸球の生存延長、IL-5存在下では、生存抑制的に作用した。今後さらなる検討の余地を残してはいるが、GPR30が喘息病態において機能的な役割を果たす可能性が本研究によって示唆された。

研究成果の概要(英文)： We investigated the role of GPR30, one of estrogen receptor, in the pathogenesis of asthma. We revealed that administration of G-1, GPR30-specific agonist, attenuated airway inflammatory cell accumulation and airway hyperresponsiveness in OVA-sensitized and OVA-challenged mice. On the other hand, these responses were not induced in IL-10-deficient mice. These results indicate that extended GPR30 activation negatively regulates the acute asthmatic condition by altering IL-10 producing lymphocyte population.

In addition, we investigate the role of G-1 in human eosinophil function. We revealed that administration of G-1 inhibited eosinophil spontaneous apoptosis in absence of IL-5. In contrast, G-1 induced apoptosis when human eosinophils were co-stimulated with IL-5. These results indicate that GPR30 plays an important role in the pathogenesis of asthma.

研究分野：アレルギー学

キーワード：アレルギー 喘息 GPR30 エストロゲン 性差 好酸球

1. 研究開始当初の背景

喘息は呼吸器疾患の中でも最も患者数が多い疾患の1つであり、わが国の喘息患者数は約90万人にのぼる。喘息ガイドラインや吸入ステロイドの普及により、喘息患者のコントロールは以前より改善しつつあるが、今なお年間1000人を超える喘息死の存在は無視できない。このような背景の中、治療に抵抗する難治性喘息の病態解明が喫緊の課題となっている。

最近、喘息は様々な病態が混在した症候群として理解されるようになってきた。すなわち、個々の病態の理解と、それに即した個別化治療が必要であるとする意見が台頭しており、喘息患者のクラスター解析表現形などにより難治化因子が明らかになりつつある。疫学調査では、小児期では男児に多く、思春期以降は女性に多いことがわかっている。成人喘息では女性が男性よりも圧倒的に多く1)、女性の方が重症化・難治化しやすい2,3)。我々は喘息モデルによる検討から、この性差が難治性喘息の病態として知られている気道リモデリング形成や、種々の増殖因子の増加によるものであることを明らかにしている4)。

このような喘息の性差や女性の難治化の要因として、女性ホルモン、とりわけエストロゲンの関与が示唆されている。エストロゲン投与を行った喘息モデルマウスでは、喘息の特徴である気道過敏性、気道抵抗の上昇が確認されている。また、卵巣結紮術を行った喘息モデルでは気道過敏性、気道抵抗が有意に低下することも報告されている5)。

エストロゲンの受容体としては、これまで核内受容体である Estrogen receptor(ER)の存在が知られていた。しかし、細胞膜上にもエストロゲン結合部位が存在することが以前から指摘されており、2005年になって、それまでオーファン受容体であった GPR30 が細胞膜エストロゲン受容体であることが

報告された6)。GPR30は、エストロゲンによる迅速な細胞内シグナルの活性化や機能に参与しているが、興味深いことに、ERと拮抗した作用を有することで、細胞の働きを調節していることがわかってきた7,8)。GPR30は、性ホルモンの関連する乳癌や卵巣癌以外にも、免疫・炎症性疾患の病態形成に参与することも明らかになりつつあり、例えばGPR30の活性化は多発性硬化症や糖尿病などの動物疾患モデルの病態を改善する9)。

興味深いことに、GPRが主に分布する臓器のひとつは肺であるが10)、これまでのところ肺疾患におけるGPR30の機能解析はなされていない。

- 1) Michelle A. et al. TRENDS in Endocrinology and Metablism, 2007
- 2) S.T. Holgate et al. Eur Respir J, 2003
- 3) Chen Y et al. J Clin Epidemiol, 2003
- 4) Takeda M et al. Respirology, 2013
- 5) Riffo-Vasquez Y et al. Clin Exp Allergy, 2007
- 6) Revankar CM et al. Science, 2005
- 7) Chakrabarti S et al. PLoS One, 2012
- 8) Ariazi EA et al. Cancer Res, 2010
- 9) Teng J et al. Endocrinology, 2008
- 10) Mizukami Y et al. Endocrine J, 2010

2. 研究の目的

既に当施設で確立しているマウス喘息疾患モデルを用いて、GPR30の合成アゴニスト(G-1)投与の影響を検討し、喘息病態におけるGPR30の機能的役割を検討する。

加えて、我々はGPR30が喘息のリモデリング形成に深く関わっている好酸球にも発現していることを確認している。そこで本研究では、in vitroの実験として好酸球細胞機能におけるGPR30の役割についても検討し、エストロゲンの細胞膜上受容体であるGPR30について、そのアレルギー性炎症細胞・気道炎症における働きやERとの機能的な違いを検討し、将来的な難治性喘息の個別化治療につながる基盤知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

1) マウス喘息モデルにおける GPR30 の機能的役割に関する検討

卵白アルブミン(OVA)を雌性マウスに腹腔内投与することによって、感作を成立させたのち、OVA の 3 日間連続吸入により曝露を行い、喘息疾患モデルを作成する。以上のモデル作成において、OVA3 日連続吸入の 1 日前から 1 日後までの合計 5 日間、GPR30 agonist である、G-1 を皮下注射し、G-1 投与/非投与群での比較を行う。

具体的には、

Methacholine に対する気道抵抗、肺コンプライアンスの測定(invasive system, Baxco Inc)

気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、好酸球などの細胞分画の計測

BALF 中のサイトカインの測定(ELISA 法による)

を行い、G-1 投与の影響について検討する。

2) ヒト好酸球細胞機能における、GPR30 agonist の機能的役割に関する検討

ヒト好酸球は、CD16 negative selection 法を用いて分離抽出する。

好酸球細胞表面における GPR30 の発現について、RT-PCR 法、フローサイトメーターによる発現解析、免疫蛍光染色法による解析によって検討する。

IL-5 非存在下での好酸球の eotaxin(10nM) に対する遊走能について、Boyden chamber 法を用いて検討する。

IL-5 存在下/非存在下での好酸球の生存に対する GPR30 agonist の影響について検討する。

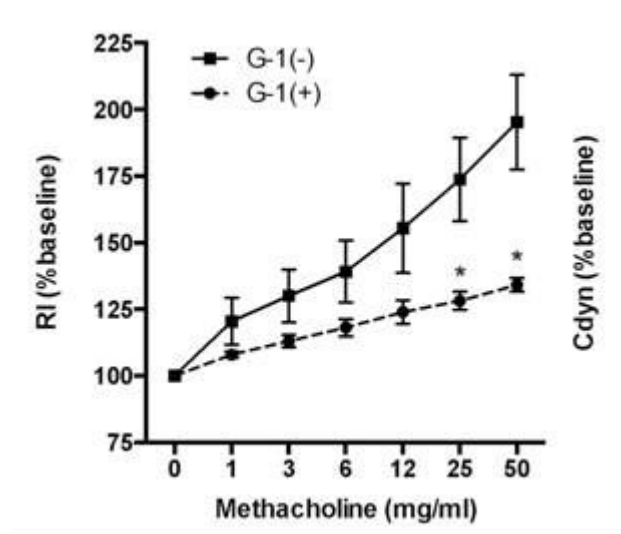
好酸球の生存について、シグナル経路である Caspase-3 の活性を APOPCYTO colorimetric assay kit で測定する。

4. 研究成果

1) マウス喘息モデルにおける GPR30 の機能的役割に関する検討 1)

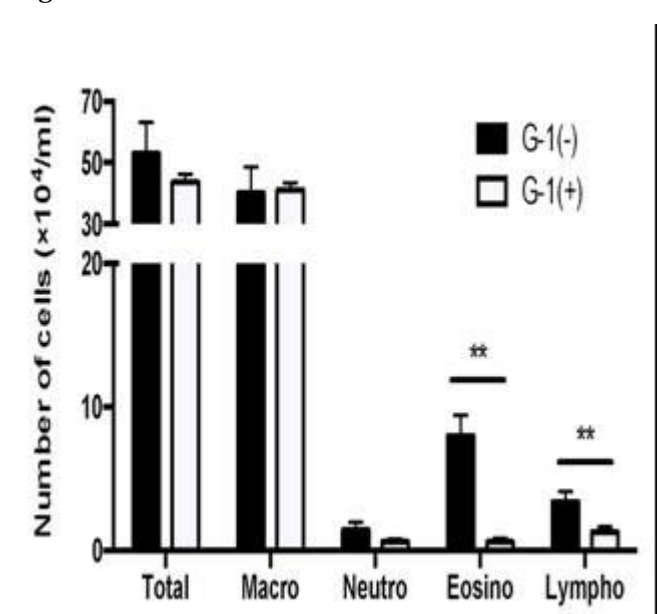
喘息疾患マウスにおいて、G-1 投与群/非投与群における、Methacholine に対する気道抵抗および肺コンプライアンスを測定した。その結果、Methacholine 25mg/ml, 50mg/ml の濃度において、G-1 投与群では、有意に非投与群と比較して、気道抵抗の低下ならびに肺コンプライアンスの上昇が認められた。この現象は、GPR30 agonist である G-1 投与によって喘息の気道抵抗・気道過敏性が改善することが示唆されるものと考えられた (Figure 1)。

Figure 1.



BALF 中の細胞解析においては、G-1 投与群において、アレルギー性気道炎症に重要な役割を果たしている好酸球、リンパ球の細胞数が有意に減少していた (Figure 2)。このことは、肺組織について H.E 染色をすることも確認したが、気道周囲の炎症細胞浸潤は、G-1 投与群において有意に抑制されていた。

Figure 2.



BALF 中のサイトカイン測定については、Th2 サイトカインである、IL-5, IL-13 において、G-1 投与群のマウスが有意にその値の低下が認められた。

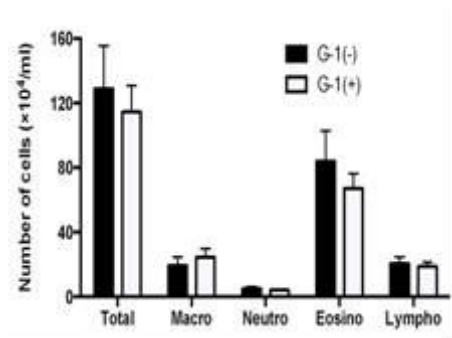
以上より G-1 投与によって喘息病態のアレ

アレルギー性気道炎症が抑制される結果が得られた。この現象について、我々はアレルギー性気道炎症に対して抑制的に作用する、IL-10 に着眼し、さらなる検討を行った。具体的には、マウスより脾細胞を取り出し、G-1 刺激することで IL-10 の産生が増加するかを確認した。結果、G-1 刺激を行うことで脾細胞からの IL-10 産生が有意に上昇する結果が得られた。

以上の結果より、GPR30 刺激による喘息病態抑制的な作用は IL-10 を介して引き起こされていると仮説を立て、次に我々は、IL-10 KO マウスを用いて、同様の G-1 刺激実験を行った。結果、IL-10 KO マウスでは、Wild type でみられたアレルギー性気道炎症や Th2 サイトカインの産生増加が認められなかった(Figure 3)。

以上の結果より、動物実験による *in vivo* の研究では、GPR30 は IL-10 の産生を介して、喘息病態に対して抑制的に作用することが示唆された。

Figure 3.



2) ヒト好酸球細胞機能における、GPR30 agonist の機能的役割に関する検討 12)

ヒト好酸球の細胞機能に対する G-1 の影響を検討した。まずはじめに、ヒト好酸球細胞表面に GPR30 が発現しているかを種々の方法を用いて検討した。結果、RT-PCR、フローサイトメトリー法、免疫蛍光染色法、いずれにおいてもヒト好酸球細胞表面上に GPR30 が発現していることが確認された(Figure 4)。

次に、好酸球の遊走に関わる eotaxin に対する好酸球遊走能に対する G-1 の影響について検討した。Eotaxin 10nM に対する好酸球の遊走は、G-1 の濃度依存性に亢進することが確認された。

好酸球の生存能についての G-1 の影響について、フローサイトメトリー法を用いて検討した。結果、IL-5 非存在下では、好酸球の生存活性は、G-1 の濃度が上昇することで有意に上昇した。また、Caspase-3 活性についても G-1 刺激によって有意に低下が認められた。

以上の結果は、G-1 刺激によってアレルギー性気道炎症に関わる好酸球の機能亢進的に作用することを示唆するものであり、*in vivo* の実験との乖離が考えられた。しかしながら生体内においては、喘息病態では特に、生体細胞が、IL-5 にさらされていることが考えられることより、IL-5 存在下での好酸球の生存についても検討した。その結果、IL-5 存在下では、G-1 の濃度上昇により、生存活性が有意に減少し、また Caspase-3 活性も G-1 投与により有意に上昇が認められた。

以上の結果より、まだ検討の余地を残しているが、好酸球における GPR30 刺激は、好酸球の細胞機能を調節している可能性があることが示唆された。

以上、GPR30 の喘息病態における機能について *in vivo*, *in vitro* で解析を本研究内で行った。特にヒト好酸球の実験では、IL-5 の存在の有無で、異なる結果が得られており、今後さらなる検討の余地を残してはいるが、GPR30 が喘息病態において機能的な役割を果たす可能性が本研究によって示唆された。喘息病態の性差の存在はひろく知られた事実であり、本研究は、喘息の性差のメカニズムについてもその一翼を担う知見が得られたものと考えられる。また *in vivo* では GPR30 刺激がアレルギー性気道炎症抑制的に働いたことから、喘息治療の新たなストラ

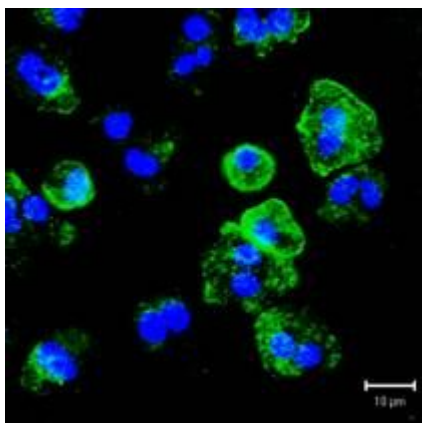
テジーのひとつとなりうる知見が得られたものとする。今後、生体内での働きなど、さらなる研究を行い、喘息の新規治療や個別化治療への可能性について探求していきたい。

11) Itoga M et al. PLoS One, 2015

12) Tamaki M et al. Immunol Lett, 2014

Figure 4.

Anti-GPER Ab



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Ueki S, Konno Y, Takeda M et al. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol.* 137(1) 258-67, 2016.

DOI: 10.1016/j.jaci.2015.04.041

(査読有)

Itoga M, Konno Y, Takeda M et al. G-protein-coupled estrogen receptor agonist suppresses airway inflammation in a mouse model of asthma through IL-10. *PLoS One.* 10(3), 2015.

DOI: 10.1371/journal.pone.0123210.

(査読有)

Konno Y, Ueki S, Takeda M et al. Functional analysis of free fatty acid receptor GPR120 in human eosinophils:

implications in metabolic homeostasis. *PLoS One.* 10(3), 2015.

DOI: 10.1371/journal.pone.0120386.

(査読有)

Ueki S, Nishikawa J, Takeda M et al. Eliciting eosinophil CCR3 expression by synthetic retinoids. *Allergol Int. Suppl 1:* 67-8, 2014.

DOI: 10.2332/allergolint.13-LE-0641.

(査読有)

Yamamoto A, Saito N, Takeda M et al. Flow cytometric analysis of red blood cell osmotic fragility. *J Lab Autom.* 19(5) 483-7, 2014.

DOI: 10.1177/2211068214532254.

(査読有)

Tamaki M, Konno Y, Takeda M et al. Expression and functional roles of G-protein-coupled estrogen receptor(GPER) in human eosinophils. *Immunol Lett.* 160(1) 72-8, 2014.

DOI: 10.1016/j.imlet.2014.03.012.

(査読有)

[学会発表](計10件)

奥田佑道、佐藤一洋、竹田正秀ら。Gefitinib 血中濃度と治療効果の関係について。第56回日本肺癌学会 2015年11月26日(横浜)

竹田正秀、鈴木貴之、佐藤一洋ら。眼瞼下垂を認めたサルコイドーシスの1例。日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 2015年11月7日(大阪)

植木重治、今野泰典、竹田正秀ら。好酸球の ETosis により生じる DNA traps は微生物を捕捉する。第55回日本呼吸器学会 2015年4月17日(東京)

植木重治、今野泰典、竹田正秀ら。好酸球性副鼻腔炎・中耳炎の分泌物における DNA traps の存在と役割。第62回日本臨床検査医学会学術集会 2015年

11月19日(岐阜)
中村由真、植木重治、竹田正秀ら. ヒト好酸球に発現する遊離脂肪酸受容体 GPR120 の機能的な役割について. 第62回日本臨床検査医学会学術集会 2015年11月19日(岐阜)
植木重治、今野泰典、竹田正秀ら. 分離好酸球のETosisを検出する簡便な実験法の確立. 第64回日本アレルギー学会 2015年5月26日(東京)
植木重治、今野泰典、竹田正秀ら. 好酸球 Extracellular DNA traps の機能的特性. 第26回日本アレルギー学会 2014年5月9日(京都)
今野泰典、植木重治、竹田正秀ら. 好酸球のETosisによる脱顆粒:電子顕微鏡による形態的特徴. 第26回日本アレルギー学会 2014年5月9日(京都)
糸賀正道、竹田正秀、今野泰典ら. GPR30はIL-10を介して喘息病態を抑制する. 第54回日本呼吸器学会 2014年4月25日(大阪)
竹田正秀、玉木真実、小林良樹ら. GPER特異的アゴニストはIL-5存在下での好酸球生存能を制御する. 第54回日本呼吸器学会 2014年4月25日(大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
竹田 正秀(TAKEDA, Masahide)
秋田大学・医学部・寄附講座等教員
研究者番号: 30466594

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: