

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790273

研究課題名(和文) G蛋白共役型受容体を介したエストロゲンシグナルによる免疫反応終息機構の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of immune regulation by estrogen signaling through the G-coupled receptor

研究代表者

岡本 まり子 (Okamoto, Mariko)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：30415111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：女性ホルモンであるエストロゲンは抗炎症作用が知られており、自然免疫系細胞の活性化を制御して免疫反応を終息させている可能性が高いが、詳細な分子機構は明らかではない。本研究では新たに細胞膜型エストロゲン受容体として同定されたG蛋白共役型受容体GPR30が自然免疫制御に関与しているかどうかについて、炎症性サイトカイン産生制御に着目して検討を行ったところ、マクロファージ細胞においてGPR30からのシグナルが活性化マクロファージ細胞からのIL-6産生を低下させること、これはGPR30シグナルがNFkB経路に関与するキナーゼの活性化を低下させることでサイトカイン産生を低下させていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Estrogen effects the immune response through ERalpha or ERbeta, but recently the involvement of GPR30 (G protein Coupled Receptor 30), a membrane-type estrogen receptor, in anti inflammatory response is reported. This study investigated the molecular mechanism about the regulation of inflammatory cytokines by GPR30. We found that the treatment of GPR30 by G-1, GPR30 specific agonist, suppressed the expression of inflammatory cytokine IL-6 in macrophage cell line stimulated with LPS. G-1 also decreased NFkB promoter activation by LPS, and phosphorylation of kinases which involved in the translocation of transcription factor NFkB from cytosol to nucleus.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：GPR30 自然免疫 IL-6 シグナル伝達 NFkB

1. 研究開始当初の背景

我々の体は常に多様な細菌やウイルスなどの侵入に対して免疫システムを稼働させ体内からの排除を行っている。病原体の侵入により、即時的に自然免疫系が活性化される。自然免疫担当細胞は食作用により病原体を除去したり、サイトカインを産生して獲得免疫系のリンパ球を活性化・動員し、炎症を促進させる。一連の免疫反応の結果、病原体が体内から排除されるとともに、死細胞が除去されて感染により損傷した組織が修復される。これらが終了すれば免疫反応、特に自然免疫系細胞の活性化を終息させねばならず、生体内には免疫反応を終息させるシステムが存在することが知られている。免疫反応終息機構に参与する因子としては、制御性T細胞から分泌されるIL-10や、副腎皮質ホルモンなどが挙げられるが、女性ホルモンであるエストロゲンも免疫反応終息機構に参与していることが近年報告されている。

2. 研究の目的

エストロゲンには抗炎症作用が知られており自然免疫系細胞の活性化を制御して免疫反応を終息させている可能性が高いが、その詳細なメカニズムについてはほとんど知られていない。そこで、新たに細胞膜型エストロゲン受容体として同定したG蛋白共役型受容体GPR30に着目し、この新規受容体による免疫反応終息機構を炎症性サイトカイン産生への制御の有無を中心に検討した。

3. 研究の方法

(1) TNF α 刺激による炎症性サイトカイン産生におけるGPR30による制御についての検討

エストロゲンからのシグナルを受け細胞動態を制御する分子として核内受容体ER α 、ER β が知られている。GPR30シグナルによる炎症性サイトカインの制御を検討する際、これらの因子の関与の可能性を除外するため、ER α 、ER β が発現していないヒト乳癌細胞株SKBR3細胞株を使用し、GPR30への刺激はエストロゲン(E2)の他に、GPR30アゴニストであるG-1を用いて検討を行った。

(2) 活性化自然免疫担当細胞におけるGPR30による制御についての検討

マクロファージ細胞株Raw264.7細胞を使用し、LPS刺激で誘導される炎症性サイトカインについてGPR30アゴニスト投与による産生への影響について検討した。

NK細胞を使用しGPR30のNK細胞機能への関与の可能性について検討した。

マスト細胞機能におけるGPR30による制御の有無についてマスト細胞株P815を使用し検討した。

(3) IL-8産生胃細胞株におけるNF- κ B活性化におけるGPR30による制御の有無について、胃細胞株AGS細胞を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) TNF α 刺激による炎症性サイトカイン産生におけるGPR30による制御についての検討

NF- κ B配列を含んだルシフェラーゼレポータープラスミドおよびコントロールプラスミドを導入したSKBR3細胞を17 β -エストラジオール(E2)あるいはGPR30アゴニストG-1で処理し、その後TNF刺激を行い、NF- κ Bプロモーターの活性化を検討した。GPR30は、E2あるいはG-1の存在下でTNFによるNF- κ Bプロモーター活性化を有意に抑制した。SKBR3細胞においてTNF α 刺激によるNF- κ B活性化をGPR30からのシグナルは負に制御することが明らかとなった。

(2) 活性化自然免疫担当細胞におけるGPR30による制御についての検討

マクロファージ細胞株RAW264.7細胞をGPR30アゴニストであるG-1で処理し、その後LPS刺激を行った。刺激後の細胞上清中のIL-6量を測定した。また、刺激後の細胞からTotal RNAを回収し、IL-6 mRNA量をRT-qPCR法で測定した。G-1投与により、LPSによって誘導されるIL-6産生はmRNA、タンパクどちらも抑制された(図1)。GPR30からのシグナルが細胞死を促進したために結果的にIL-6産生を抑制したのかどうかについて調べたが、細胞数には変化が見られなかった。他のいくつかの炎症性サイトカインの発現についても検討したが、G-1による抑制が見られたのはIL-6のみであった。この特異的な制御の機構についてはまだ不明である。

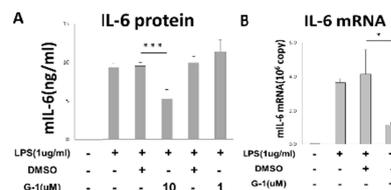


図1 G-1によるIL-6発現への影響

次にRAW 264.7細胞にNF- κ Bレポータープラスミド、補正用プラスミドをエレクトロポレーション法により導入した。24時間後、G-1で処理し、その後LPS刺激を行った。刺激後の細胞ライセートを回収し、ルシフェラーゼアッセイによりNF- κ Bプロモーター活性化を調べたところ、LPSによるNF- κ Bプロモーター活性化はG-1投与により低下した(図2)。

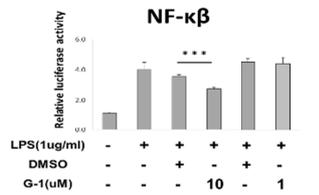


図2 G-1によるNF-κBプロモーター活性化への影響

G-1 処理により LPS 刺激時の RAW264.7 細胞における NF-κB 活性化が低下することから、GPR30 シグナルが、NF-κB 経路に関わる分子の活性化を制御している可能性があるため、それらの活性化への影響について調べたところ、G-1 処理によりあるキナーゼの活性化が低下することがわかった (図3。論文投稿準備中のためキナーゼについては "kinase X" と表記)。この分子に結合する別のキナーゼの活性化についても検討したところ、G-1 処理により活性化の低下が見られた。これらより GPR30 はこれらのキナーゼの活性化を低下させることで NF-κB 経路の活性化を総的に抑制し炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

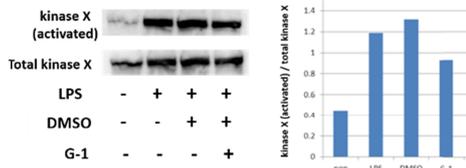


図3 G-1によるNF-κB経路に関与するキナーゼの活性化への影響

エストロゲンにより NK 細胞の活性が制御されることが報告されている。そこで GPR30 が NK 細胞でも発現しているかどうかを RT-qPCR 法で検討した。マウス脾臓より NK 細胞を単離し RNA を抽出し RT-qPCR 法で GPR30 mRNA 発現を測定したところ、脾臓の非 NK 細胞に比べ、NK 細胞では GPR30 の発現が高いことがわかった。また NK 細胞では ERβ の発現がほとんど検出されなかった。次に NK 細胞の障害活性について検討した。標的細胞として YAC1 細胞を使用した。YAC1 細胞とマウス脾臓 NK 細胞を混合培養し G-1 投与を行って、NK 細胞による細胞障害能を LDH アッセイにより測定したが、G-1 による差は認められなかった。しかし G-1 刺激は標的細胞である YAC1 細胞の FcγR II の発現量を変化させており、標的細胞側にも作用して結果的に細胞障害に影響を与えている可能性が示唆された。

マスト細胞機能における GPR30 による制御の有無について検討した。マスト細胞株 P815, MC/9, IC-2 における GPR30 の発現について調べたところ、P815 細胞で高い GPR30 発現が認められた (図4)。

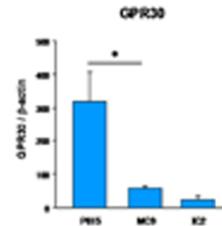


図4 マスト細胞株間での GPR30 発現量比較

次に P815 細胞に G-1 投与を行い細胞生存への影響を調べたところ、マクロファージ細胞株とは異なり、P815 細胞では細胞数の低下が認められた。アネキシン V 染色では、G-1 処理細胞群での細胞表面アネキシン V 陽性細胞の割合が増加していた。また活性型カスペーゼも増加することがわかった。これらことから P815 細胞では GPR30 は細胞死亢進に働くことが示唆された。

(3) ヒト臓器での GPR30 発現を調べたところ、胃で高い発現が認められた。ヒトでは *Helicobacter pylori* CagA により胃細胞から炎症性サイトカイン IL-8 が産生されることが知られているため、GPR30 が胃細胞においても炎症性サイトカイン産生制御に関与しているかどうか検討した。*Helicobacter pylori* CagA 遺伝子を含んだ発現プラスミドおよび NF-κB 配列を含んだルシフェラーゼレポータープラスミド、コントロールプラスミドを導入したヒト胃癌細胞株 AGS 細胞を G-1 で処理し、NF-κB プロモーターの活性化を検討した。GPR30 は、G-1 の存在下で CagA による NF-κB プロモーター活性化を有意に抑制した。AGS 細胞において CagA による NF-κB 活性化を GPR30 からのシグナルは低下させることが明らかとなった (図5)。

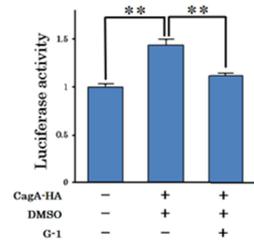


図5 G-1 は CagA 誘導性の NF-κB の活性化を低下させる

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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

岡本まり子

「獣医師のための免疫の基礎について」
平成25年度公益法人徳島県獣医師会小動物講習会、2013年8月11日、徳島市(徳島県) 招待講演

三浦篤史、伊東諒太、鎌田駿季、池田輝雄、
岡本まり子

「Helicobacter pylori CagA による胃細胞でのNF-κB 経路活性化におけるGPR30の関与について」
第88回麻布獣医学会、2013年11月3日、山口市(山口県)
本発表により、発表者は麻布獣医学会奨励賞受賞。

鈴木拓人、潮崎日名子、水上洋一、池田輝雄、
岡本まり子

「マクロファージにおけるGPR30による炎症性サイトカインの制御」
第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸市(兵庫県)

〔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

<http://www.azabu-u.ac.jp/>

http://www.azabu-u.ac.jp/lab/vv/vv_009.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 まり子 (OKAMOTO, Mariko)
麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：304515111

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：