

論文内容要旨

Potential role of inducible GPR3 expression under stimulated T cell conditions

(T細胞刺激による GPR3 発現誘導とその役割)

Journal of Pharmacological Sciences, 148(3):307-314, 2022.

主指導教員：酒井 規雄 教授

(医系科学研究科 神経薬理学)

副指導教員：坂口 剛正 教授

(医系科学研究科 ウイルス学)

副指導教員：田中 茂 講師

(医系科学研究科 神経薬理学)

白榊 紘子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

GPR3 は G 蛋白質共役型受容体の 1 つで、恒常的 $G\alpha_s$ 活性化能を有し、リガンド非存在下で細胞内 cAMP レベル上昇に寄与する受容体である。GPR3 は中枢神経系、卵母細胞に豊富に発現し、中枢神経系において神経突起伸長・生存・分化に関与し、卵母細胞では減数分裂停止の維持への関与、病態ではアルツハイマー病、多発性硬化症、脳梗塞との関連性が報告されている。近年、多発性硬化症において、末梢血単核細胞における GPR3 発現低下と予後不良の相関性が報告された。しかしながら、免疫細胞における GPR3 の機能や役割は不明であり、本研究では T 細胞における GPR3 発現と機能について検討した。

ヒト T リンパ球細胞株 Jurkat 細胞では、PKC 活性化剤 PMA とカルシウムイオノフォアの ionomycin 刺激により、刺激後 2 時間で顕著な GPR3 発現を観察し、さらにその発現は 8 時間まで持続した。T 細胞における GPR3 発現の役割を検索するため、Jurkat 細胞において GPR3 発現抑制下で変化する遺伝子群をマイクロアレイで解析した。PMA/ionomycin 刺激後 6 時間で GPR3 発現抑制条件下で強い発現低下を認めた遺伝子として転写因子 NR4A2 を同定した。リアルタイム RT-PCR 法による NR4A 受容体発現解析においても、Jurkat 細胞刺激後 6 時間および 12 時間で NR4A2 発現の有意な低下を認めたが、NR4A1 および NR4A3 の有意な変化を認めなかった。一方、GPR3 発現上昇により NR4A1-3 全ての発現誘導を認めた。以上の結果から、T 細胞刺激による GPR3 の持続的発現上昇が、NR4A2 発現を誘導することが明らかとなった。

次に、GPR3 を介した NR4A2 発現誘導のシグナル伝達経路を検討した。Jurkat 細胞では PMA/ionomycin 刺激による NR4A2 発現誘導は、PKC、MEK、p38MAPK の各阻害剤によって有意に抑制された。GPR3 導入細胞においても、刺激後 6 時間で NR4A2 発現が有意に増加し、この効果は PKC、PKA、MEK、p38 MAPK の各阻害剤で有意に抑制された。以上の結果から GPR3 を介した NR4A2 発現誘導には、PKA および MAPK シグナル経路の関与が示唆された。

NR4A 受容体は、NBRE プロモーター領域にモノマーとして、NurRE プロモーター領域にはホモまたはヘテロダイマーとして結合し、転写活性を上昇させる。Jurkat 細胞において、GPR3 発現が NR4A 活性に与える影響を解明するため、NBRE または NurRE プロモーター領域をルシフェラーゼの上流に挿入したコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて評価した。NBRE・NurRE プロモーター活性は PMA/Ionomycin 刺激 12 時間まで発現増加がみられたが、GPR3 発現抑制により刺激後 12 時間において NBRE・NurRE プロモーター活性の有意な減少を認めた。一方で、GPR3 過剰発現により刺激後 4 時間で顕著で有意な NBRE・NurRE プロモーター活性増加を認めた。したがって、GPR3 発現と NBRE・NurRE プロモーター活性には正の相関を認めた。

さらに、マウス初代脾臓 T 細胞を用いて、T 細胞における GPR3 の役割を検索した。予想通り、マウス CD4⁺脾臓細胞における GPR3 発現は、CD3/28 または PMA/ionomycin 刺激後 1 時間で誘導されたが、この発現はそれぞれ一過性または持続的であった。T 細胞では NR4A2 発現により、Treg 細胞分化の制御が報告されていることから、野生型マウス (WT) または GPR3 ノックアウト (GPR3KO) マウスを用いて、胸腺や脾臓細胞における Treg 細胞分化を検討した。胸腺と脾臓における T 細胞数や Treg 細胞割合について、WT と GPR3KO で差異を認めなかった。また、T 細胞刺

激条件下で WT と GPR3KO の間で、NR4A1-3 発現に有意な差異を認めなかった。一方で、GPR3KO マウスでは、CD4+および CD8+ T 細胞両分画において、エフェクター T 細胞 (CD44+CD62L-) の有意な割合増加を認めた。

本研究において、T 細胞において GPR3 が細胞刺激後 1-2 時間の早期に発現誘導し、持続的な GPR3 発現は NR4A2 発現や NR4A プロモーター活性に影響を与えることを明らかにした。また、初代培養 CD4 陽性 T 細胞においては、GPR3 発現レベルの持続はシグナル入力により異なり、今回検討した T 細胞刺激条件下では NR4A2 発現に影響を与えなかった。一方で、GPR3 は総じてエフェクター T 細胞活性の抑制に寄与することが明らかになった。T 細胞における GPR3 発現レベルと持続時間が、抗原受容体のシグナル伝達を調節し、T 細胞寛容性などに影響を与える可能性が示唆された。