



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

대식세포의 염증 반응에 대한
GPR40 리간드의 양극성 효과

Bifunctional effects of GPR40 ligands on inflammatory
responses of macrophage

2018년 2월

서울대학교 대학원
약학대학 약물학 전공
강 병 석

초 록

대식세포의 염증 반응에 대한

GPR40 리간드의 양극성 효과

지방산은 에너지원으로 이용될 뿐만 아니라 수용체의 리간드로도 작용한다. 최근 연구에서 이들을 내인성 리간드로 인지하는 GPCR family가 밝혀졌다. 이 중 Long chain fatty-acid를 리간드로 갖는 GPCR은 GPR40과 GPR120이 알려져 있다.

GPR40은 주로 이자의 베타세포나 장내분비 세포(enteroendocrine cell)에 많이 발현되어 있다. 반면 GPR120은 대식세포에 많이 발현되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 long chain fatty-acid의 대식 세포에 대한 영향에 대한 연구는 주로 GPR120에 초점이 맞춰져 있다. 반면, GPR40 자극이 대식 세포에 미치는 영향에 대한 연구는 미흡한 상태이다.

본 연구에서는 먼저 대식 세포에서 GPR40의 발현을 측정하고, GPR40의 선택적 리간드인 TAK-875, AM-837, AM-1638을 이용하여, GPR40 선택적 리간드의 염증 반응에 대한 역할을 평가하였다.

우선 잘 알려진 단구/대식세포주인 Raw264.7, J774.A1 세포 및 일차배양 면역세포의 GPR40 발현 여부를 확인하였다. 기존에 알려진 바와 달리 이들 세포에서 GPR40 mRNA의 발현이 확인되었다. 염증 반응에 대한 GPR40 리간드의 작용을 살펴보기 위하여

lipopolysaccharide(LPS)와 GPR40 리간드 3종을 Raw264.7 세포에 처리하였다. GPR40 리간드 처리에 따라 염증성 인자인 iNOS의 발현 감소를 확인하였으며, 이 때 TAK-875가 가장 강한 억제 작용을 보였다. 또한 TAK-875 처리시 염증성 cytokine인 IL-6, chemokine인 MCP-1의 발현 감소도 확인하였다. 한편 GPR40 antagonist인 GW1100 처리 시, TAK-875에 의한 iNOS 발현 억제가 역전되지 않았다. 따라서 GPR40 리간드에 의한 iNOS 감소 반응은 GPR40을 경유하는 작용이 아니라, TAK-875 화합물의 구조적 특성에 기인한 작용으로 보인다.

iNOS, IL-6, MCP-1 등의 염증 단백질의 발현을 공통적으로 조절하는 전사인자로 NF- κ B가 알려져 있다. 따라서 가장 강한 항염증 효과를 보인 TAK-875를 이용하여, NF- κ B의 활성화에 대한 영향을 평가하였다. TAK-875를 전처리한 뒤 LPS를 처리하여 염증 반응을 유도한 뒤, NF- κ B 활성화 조절의 상위 단백질인 I κ B α , IKK β 의 인산화를 확인하였다. 하지만 TAK-875에 의한 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 또한 p65의 핵질 이동에도 영향이 없는 것을 확인하였다. 따라서 TAK-875에 의한 항염증 효과는 NF- κ B pathway와 무관한 반응으로 생각된다.

흥미롭게도, J774.A1 세포를 이용하여 동일한 실험을 시행했을 때, iNOS의 감소가 관찰되지 않았다. J774.A1 세포의 GPR40 리간드에 의한 항염증 반응성 감소의 원인을 살펴보기 위하여 Raw264.7 세포와 J774.A1 세포의 기질적 상이점에 주목하였다. Raw264.7 세포는

inflammasome 구성 요소 중 하나인 ASC가 결손된 세포임이 알려져 있고, 실험을 통하여 이 사실을 확인하였다. 또한 Raw264.7 세포에 LPS/ATP 처리로 NLRP3 inflammasome을 활성화 했을 때에도 IL-1 β 가 방출되지 않는 것을 확인하였다. 반면 J774.A1세포는 LPS/ATP 처리시 IL-1 β 가 방출 되는 것을 확인하였으며, 특히 LPS 처리 이후 TAK-875 처리 시에도 IL-1 β 가 미약하게 증가하는 것을 확인하였다. IL-1 β 또한 iNOS 등의 염증 단백질 발현을 유도하므로, TAK-875에 의하여 발생한 IL-1 β 가 항염증 반응성 감소의 원인이 될 수 있다.

또한, GPR40 리간드가 NLRP3 inflammasome 활성화 증폭에 영향을 주는지 확인하기 위하여, LPS 처리 후 ATP와 함께 GPR40 리간드를 동시 처리하였다. GPR40 리간드 처리군에서 현저한 IL-1 β 의 방출 증가와 함께 IL-1 β 의 활성화에 영향을 주는 cleaved caspase-1의 발현 증가를 확인하였다. 또한 pyroptosis 마커인 LDH 방출과 활성화형 gasdermin-D의 증가를 확인하였다. 따라서 J774.A1 세포에서 GPR40 리간드가 NLRP3 inflammasome 반응 증폭을 통한 염증 증폭 효과를 일으킴을 보였다. 반면, LPS/ATP 조건에 TAK-875를 추가적으로 처리하였을 때, 골수유래 수지상세포를 대상으로 하는 실험에서는 유의한 변화가 나타나지 않았고, 일차배양 대식세포 및 Kupffer cell를 대상으로 하는 실험에서는 오히려 NLRP3 inflammasome 반응이 감소한 결과를 보였다. 따라서 면역세포마다 GPR40 자극에 따른 NLRP3 inflammasome 반응 양상이 다르다는 결론을 내렸다.

본 연구에서는 단구/대식세포주와 일차배양 면역세포에서 GPR40의

발현을 보였다. 또한, inflammasome 구성요소인 ASC가 결손된 Raw264.7 세포 및 일차배양 대식세포에서 GPR40 리간드가 항염증 효과를 보이는 것을 보였다. 한편, J774.A1 세포에서는 항염증 효과는 미미하였고, 오히려 NLRP3 inflammasome 활성화 증폭을 통하여 염증 반응을 매개할 수 있음을 확인하였다. 따라서 TAK-875가 대식 세포의 염증 반응에 대하여 양극성 반응을 보일 수 있음을 제시하였다. 하지만 실제 *in-vivo* 조건에서 어떤 반응이 나타나는지, 어떠한 조건에서 항염증 반응과 염증 반응이 차별적으로 나타나는 지에 대한 후속 연구가 필요하다.

주요어: GPR40, NF- κ B, IL-1 β , inflammasome

학번: 2016-29286

목 차

List of Abbreviations	6
List of Figures	6
I. 서 론	9
II. 실험 방법	9
III. 실험 결과	20
IV. 고찰 및 결론	362
V. 참고 문헌	36

List of Abbreviations

ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosine triphosphate
BMDC	Bone marrow-derived dendritic cells
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GM-BMM	GM-CSF-induced bone marrow-derived macrophages
GPR120	G-protein coupled receptor 120
GPR40	G-protein coupled receptor 40
I κ B α	Nuclear Factor of kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells Inhibitor, alpha
IKK β	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6 beta
iNOS	inducible nitric oxide synthase
LDH	Lactate dehydrogenase
LPS	lipopolysaccharide
M-BMM	M-CSF-induced bone marrow-derived macrophages
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
N.D.	Not detected

NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
TAB1	TGF-beta Activated Kinase 1 Binding Protein 1
TAK-1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1

List of Figures

- Figure 1** Expression level of GPR40 and anti-inflammatory effect of TAK-875 in both Raw 264.7 cells and primary immune cells (M-BMM, GM-BMM and BMDC)
- Figure 2** No involvement of NF- κ B pathway in anti-inflammatory effect of TAK-875
- Figure 3** Reduced anti-inflammatory effect of TAK-875 and mild activation of NLRP3 inflammasome in J774.A1 cells
- Figure 4** Amplified activation of NLRP3 inflammasome by GPR40 ligands in J774.A1 but not in primary immune cells.

I. 서론

지방산은 에너지원뿐만 아니라 수용체의 리간드로 작용한다. 최근 연구에서 이들을 내인성 리간드로 인지하는 G-protein coupled receptor (GPCR) family가 밝혀졌다(Itoh et al., 2003; Hirasawa et al., 2005; Tazoe et al., 2008; Wang et al., 2006). 이들 중 long-chain fatty acid을 리간드로 갖는 GPCR은 GPR40과 GPR120이 알려져 있다. GPR40의 경우 이자의 베타세포나 장내분비 세포(enteroendocrine cell)에 발현되어 당의 항상성 유지에 관여하는 것으로 잘 알려져 있지만, 대식세포 등의 면역세포에서의 발현 및 역할은 잘 알려져 있지 않다(Itoh et al., 2003; Elfalk et al., 2008; Tan et al., 2017). 반면 GPR120은 대식세포에 발현되어 오메가3의 항염증 효과를 매개하는 것으로 알려져 있다(Oh et al., 2010).

한편 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells(NF- κ B)는 2합체 전사인자 family로 대다수의 생명체의 염증 반응 조절에 중심적인 역할을 한다. 이들은 내재 면역, 획득 면역뿐만 아니라 세포의 분화와 증식, 생존에도 관여한다(Mitchell et al., 2016). 지방산에 의한 NF- κ B 신호에 대한 관여할 수 있으며, 특히 대식세포에서 오메가3에 의한 NF- κ B 신호억제가 잘 알려져 있다. 오메가3가 대식세포의 GPR120을 활성화시키면 β -arrestin-2-TAB1 상호작용을 통하여 TAK-1의 인산화를 저해한다. 이를 통하여 I κ B/NF- κ B 신호전달 조절에 관여하고, 결과적으로 NF- κ B의 활성이 저해되어 항염증 효과가

나타난다(Oh et al., 2010).

Inflammasome은 세포 내의 미생물 침입이나 세포 손상에 대한 감지 작용을 하는 세포 내 단백질 복합체이다. 그 중 NLRP3 inflammasome은 매우 다양한 병원체와 위험 신호에 반응하여 Interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-18 등 cytokine을 분비하는 역할이 있다. 또한 통풍, 죽상동맥경화 질환, 제 2형 당뇨 등의 대사질환에 영향이 알려져 있다(Strowig et al., 2012, Lamkanfi et al., 2014). 오메가3와 관련해서 Zhou 연구팀에서는 오메가3가 GPR40과 GPR120을 통하여 THP-1 세포에서 NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3(NLRP3) inflammasome의 활성화를 저해하는 것을 보고 하였다(Yan et al., 2013).

GPR40에 의한 대식세포에서 염증 반응에 대한 영향은 주로 오메가3, GW9508 등 GPR40, GPR120의 dual agonist를 이용하여 연구되었다. 대식세포에는 GPR40에 비하여 GPR120의 발현양이 많기 때문에, 이들 연구는 주로 GPR120에 초점이 맞춰졌다. 또한 GPR120에 의한 항염증 효과는 항당뇨 효과의 원인으로 알려져 있다(Oh et al., 2010). 반면, 염증 반응에 있어서 GPR40 선택적 리간드의 작용 및 GPR40의 역할은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 GPR40 선택적 리간드가 유발하는 염증 반응에 대한 효과를 확인하고자 하였다.

본 연구에서는 GPR40 선택적 리간드인 TAK-875, AM-837, AM-1638의 효과에 대하여 연구하였다. 본 연구에서는 NF- κ B에 대한 영향과 NLRP3 inflammasome에 대한 효과를 연구하였다. NF- κ B에 대

하여 TAK-875는 항당뇨 효과로도 이어질 수 있는 항염증 효과를 지녔으며 이러한 효과가 GPR40 수용체와 무관하게 일어난다는 것을 밝혔다. 또한 GPR40 리간드가 J774.A1 세포에 있어서 NLRP3 inflammasome 증폭 효과를 지닐 수 있다는 것을 보였다. 반면 일차배양 대식세포와 Kupffer cell에서는 오히려 NLRP3 inflammasome 저해 효과를 확인하였다.

II. 실험 방법

1. 시약 및 항체

lipopolysaccharide (LPS), Adenosine triphosphate (ATP)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. mouse iNOS 항체, mouse NF- κ B p65 항체, human caspase-1 항체, mouse gasdermin D 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. mouse IKK β 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. mouse Lamine A/C 항체, mouse p-I κ B α 항체, mouse I κ B α 항체, mouse p-IKK α/β 항체, mouse IKK β 항체, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat 항체는 Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. GAPDH 항체는 Millipore (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. Mouse ASC 항체는 Adipogen (San Diego, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

Raw264.7 세포주 (마우스 단핵구/대식세포주)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. J774.A1 세포주 (마우스 단핵구주)는 한국세포주은행에서 구입하였다. Raw264.7은 10% FBS를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였고, J774.A1은 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin, 5mM HEPES을 포함하는 Roswell Park

Memorial Institute medium 1640 (RPMI1640)에서 배양하였다. 세포 주는 37°C, 5% CO₂를 공급하는 인큐베이터에서 배양하였다.

3. 면역화학적 분석 (western blot analysis)

세포의 배지를 제거 한 후 1XPBS로 워싱 한 후 700 μ l의 PBS로 세포를 긁어 원심 분리한 후(5600g, 5min) 상층액을 제거하여 phosphatase inhibitor(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 proteinase inhibitor(Roche, Basel, Switzerland)를 포함하고 cell lysis buffer를 사용하여 세포를 용해시켰다. 1시간동안 얼음 위에서 용해시킨 후 원심 분리(13000g, 15 min)후 그 상층액을 전세포 추출액으로 하여 단백질 농도를 Bradford을 이용해 정량하였다. 전세포추출액을 시료 희석 완충용액[63 mM Tris(pH6.8), 10% 글리세롤, 2% SDS, 0.0013% 브로모페놀 블루, 5% β -머캅토에탄올]에 희석해 일정한 농도의 샘플을 만들었다. 각 샘플을 10% 전기영동 젤에 로딩 하였고 nitrocellulose membrane 0.45 μ filter(GE healthcare Life Sciences, Chalfont, Buckinghamshire, UK)로 transfer하였다(90min, 190mA). Nitrocellulose membrane을 5% skim milk(BD Biosciences, San Jose, CA)로 1시간 동안 블록킹한 후, 1차 항체로 4도씨에서 overnight 반응 시켰고, HRP-conjugated 2차 항체에 상온에서 1시간 반응 시켰다. 이를 enhanced chemiluminescence(ECL) system reagent(EMD Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 LAS3000-mini(Fujifilm,

Tokyo, Japan)으로 측정하였다.

4. 일차 배양 골수 유래 면역세포 (Primary bone marrow derived immune cells) 분리

8주령 C57BL/6J 마우스에서 양쪽 대퇴골과 정강뼈를 분리하여 1xPBS로 3번 워싱한 후 다리뼈 양쪽을 가위로 잘라내었다. 그 후 1 mL 주사기로 RPMI1640 배지를 흘려주었다. 이를 원심분리(400 G, 5 min)한 후 ACK lysis buffer(Life Technologies, Grand Island, NY)로 적혈구를 제거하였다. 다시 원심분리를 하여(400 G, 5 min) 새 배지에 세포를 쏜 뒤, 40 μ M cell strainer 를 사용하여 걸러냈다. M-CSF 10 ng/mL를 처리하여 배양하여 M-BMM(부착 세포)을 얻었으며, GM-CSF 15 ng/mL를 처리하여 배양하여 GM-BMM(부착 세포) 및 BMDC(부양 세포)를 얻었다.

5. mRNA 분리와 Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

세포의 배지를 suction하여 제거한 후, 1XPBS로 한 번 워싱하였다. 그 후 TRIzol reagent(Life Technologies, Grand Island, NY)를 제조사의 프로토콜에 따라 mRNA를 분리하였다. 이 후 mRNA는 Maxime RT Premix (iNtRON, biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)를

사용하여 complementary DNA(cDNA)로 역전사하였다. Primer sequence는 다음과 같다.

5'-TTTCATAAACCCGGACCTAGGA-3'(GPR40-forward)

5'-CCAGTGACCAGTGGGTTGAGT-3'(GPR40-reverse)

5'-TGGGCATCAACATACCCGTG-3'(GPR40-forward)

5'-GCCTCCTAGGTCCGGGTTTA-3'(GPR40-reverse)

5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'(18s rRNA-forward)

5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'(18s rRNA-reverse)

증폭된 DNA의 밴드 강도는 FLA-7000(Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 측정되었다.

6. Real-time quantitative polymerase chain reaction(qPCR)

세포의 배지를 suction하여 제거한 후, 1XPBS로 한 번 워싱하였다. 그 후 TRIzol reagent(Life Technologies, Grand Island, NY)를 제조사의 프로토콜에 따라 mRNA를 분리하였다. 이 후 mRNA는 Maxime RT Premix(iNtRON, biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 complementary DNA(cDNA)로 역전사하였다. 이후, iTaq Universal SYBR Green Supermix(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 및 SYBR Select Master Mix for CFX(Life Technologies, Grand Island,

NY), Bio-Rad CFX Manager 3.1기계와 제공되는 프로그램(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 real-time PCR 분석을 수행하였다. 18s rRNA로 보정된 타겟 mRNA의 상대적인 양은 $2^{-\Delta Ct}$ method를 사용하여 분석하였다. Primer sequence는 다음과 같다.

5'-CCAGAGATACAAAGAAATGATGG-3'(IL-6-forward)

5'-ACTCCAGAAGACCAGAGGAAAT-3'(IL-6-reverse)

5'-GGGCCTGCTGTTTCACAGTT-3'(MCP-1-forward)

5'-CCAGCCTACTCATTGGGAT-3'(MCP-1-reverse)

5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3' (18s rRNA-forward)

5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' (18s rRNA-reverse)

7. LDH release

J774.A1의 배지를 취한 후, 그 배지를 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit(Promega, Madison, MI, USA)를 이용하여 측정하였다.

8. 효소 결합 면역 흡착 분석 (ELISA analysis)

Raw264.7, J774.A1, M-BMM, GM-BMM 및 BMDC의 배지를 취한 후, 그 배지를 mouse IL-1 β ELISA kit(R&D systems, Minneapolis,

MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

9. 핵 분획 분리

핵 분획(nuclear fraction)은 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 핵 분획을 얻기 위해 세포에 10 mM HEPES(pH7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT 및 0.5 mM PMSF를 포함하는 저삼투압 완충용액을 넣고 4°C에서 10분간 반응하였다. 10% Nonidet P-40을 넣고 10초간 vortexing 후 13000g에서 3분간 원심분리한 후 취한 상등액을 제거하고 저삼투압완충용액으로 3회 세척한 후, 침전물에 고삼투압 완충용액 [20 mM HEPES(PH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF]을 넣은 후 다시 4°C에서 10분간 vortexing 후 20분 동안 반응시켰다. 20000g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 취해 핵 분획으로 사용하였다. 단백질 농도는 Bradford 법으로 정량 하였다.

10. 통계처리 방법 (statistical analysis)

densitometric analysis는 multiguage software (Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 수행되었다. 그룹 간의 유의성 검정은 student' s t-test를 이용하였다. 통계학적 유의성은 $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ 을 기준으로 표기하였다.

III. 실험 결과

1. GPR40 발현 및 TAK-875의 Raw 264.7 세포와 일차배양 면역세포에 대한 항염증 효과

먼저 마우스의 단구/대식세포주인 Raw264.7 세포주와 마우스의 단구/대식세포주인 J774.A1 세포주 및 여러가지 일차배양 면역세포에서 GPR40의 mRNA 발현을 확인하였다. GPR40의 mRNA 발현양은 M-CSF-induced bone marrow-derived macrophages(M-BMM)에서 가장 발현이 높았으며, GM-CSF-induced bone marrow-derived macrophages(GM-BMM), bone marrow-derived dendritic cells(BMDC) 및 대식세포주에서도 GPR40의 mRNA 발현이 확인되었다(Figure1A).

본 논문에서는 GPR40만을 선택적으로 자극하는 리간드로 알려진 TAK-875, AM-837, AM-1638을 실험에 이용하였다(Muhammad, 2016). 또한 세포 독성을 일으키지 않는 수준의 농도에서 실험을 진행하였다.

염증 반응에 대한 GPR40 리간드의 작용을 살펴보기 위하여 lipopolysaccharide(LPS)와 GPR40 리간드 3종을 Raw264.7 세포에 처리하였다. GPR40 리간드 처리에 따른 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 발현 억제 양상은 각 리간드마다 다르게 나타났다. 이때 TAK-875의 경우, 10 μ M 이상의 농도에서 뚜렷한 iNOS 발현 억제 작용을 보였다. 또한 TAK-875 처리시 염증성 cytokine인 IL-6 및

chemokine인 Monocyte chemotactic protein 1(MCP-1)의 mRNA 발현양도 감소하였다(Figure1B).

리간드마다 서로 다른 정도의 염증 억제효과가 나타났기 때문에, 이 효과가 GPR40을 경유하는 효과인지 확인하고자, GPR40 antagonist인 GW1100을 이용하여 실험을 진행하였다(Biscoe et al., 2006). GW1100 전처리에 의하여, GPR40 리간드로 인하여 유도된 iNOS의 발현 억제 양상이 역전되지 않는 것을 확인하였다. 따라서 TAK-875에 의한 iNOS 발현 억제 효과는 GPR40을 경유하지 않는 물질 특이적 반응에 의한 것으로 생각된다(Figure1C).

한편 TAK-875에 의한 항염증 효과가 Raw264.7 세포에 특이적으로 나타나는 현상인지 확인하기 위하여, 여러가지 일차배양 면역세포를 대상으로 동일한 실험을 진행하였다. 평가한 모든 일차배양 면역세포에서 TAK-875의 처리에 따른 iNOS 발현 억제를 확인하였다(Figure1D). 따라서 TAK-875는 대식세포 및 골수기원 수지상세포에 대하여 항염증 작용을 지니며, 이 작용은 GPR40을 경유하는 작용이 아니라, TAK-875 화합물의 구조적 특성에 기인한 작용으로 보인다.

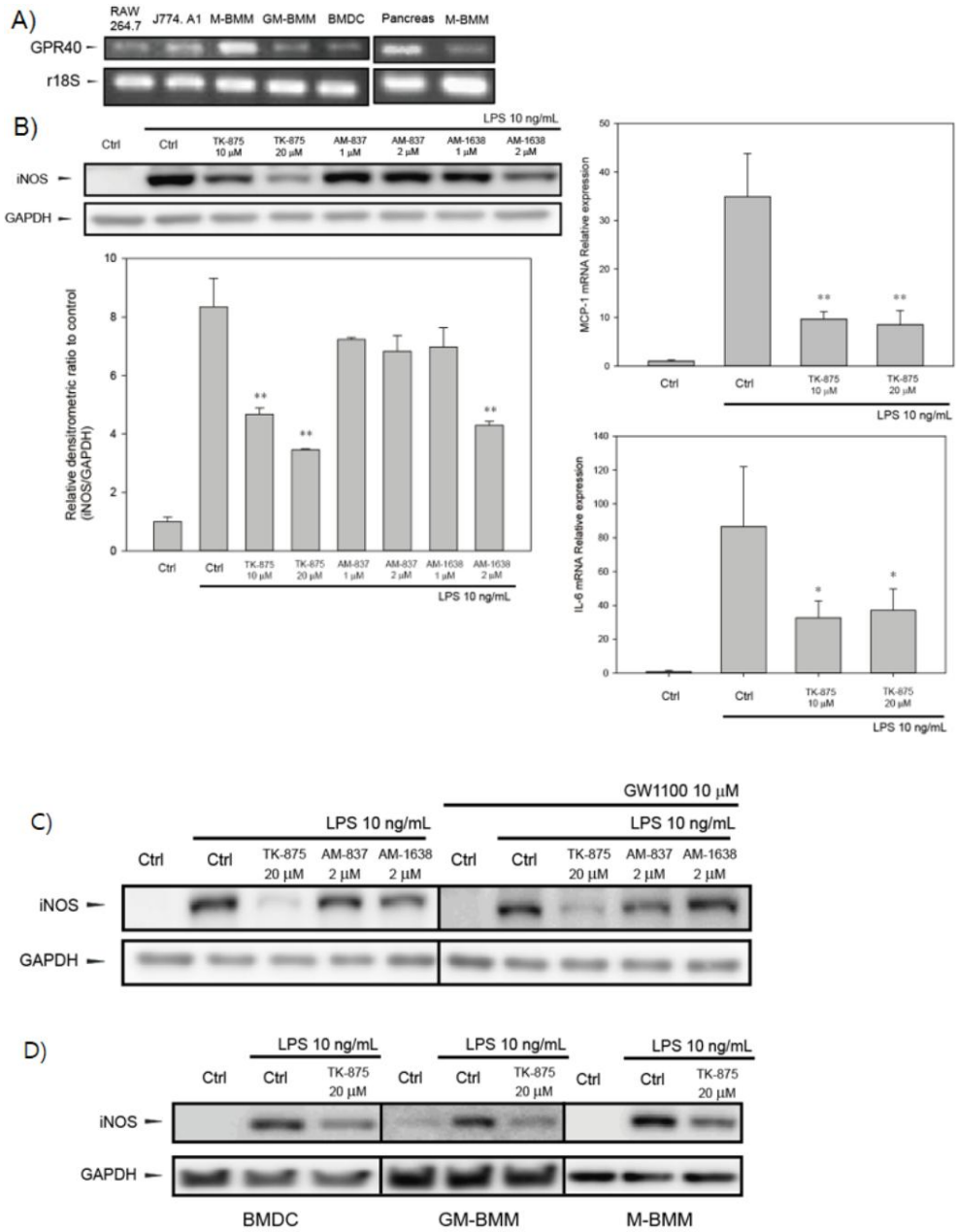


Figure1. Expression level of GPR40 and anti-inflammatory effect of TAK-875 in both Raw 264.7 cells and primary immune cells(M-BMM, GM-BMM and BMDC)

(A) GPR40 mRNA expression in Raw264.7 cells, J774.A1 cells, M-BMM, GM-BMM, BMDC and the isolated mouse pancreas.

(B) iNOS protein expression in Raw264.7 cells (mouse monocyte/macrophage cell line). The cells were co-treated with GPR40 agonists and LPS for 8 hr (left). MCP-1 and IL-6 mRNA expression in Raw264.7 cells. Cells were co-treated with GPR40 agonists and LPS for 1 hr (right). * p-value < 0.05, ** p-value < 0.01, *** p-value < 0.001, significant versus LPS.

(C) iNOS protein expression in Raw264.7 cells. Cells were pretreated with vehicle (DMSO, left) or GW1100 (right) for 30 min and then the cells were co-treated with GPR40 agonists and LPS for 8 hr.

(D) iNOS protein expression in M-BMM, GM-BMM and BMDC. Cells were co-treated with TAK-875 and LPS for 8 hr.

2. TAK-875의 항염증 효과와 NF- κ B 경로간의 무관성

iNOS, IL-6, MCP-1 등의 염증 단백질의 발현을 공통적으로 조절하는 전사인자는 NF- κ B가 알려져 있다(Park et al., 2016). 또한 오메가 3가 GPR120를 자극하였을 때, GPR120/ β -arrestin-2을 거쳐 활성화된 TGF-beta Activated Kinase 1 Binding Protein 1(TAB1)이 TGF-beta Activated Kinase 1 Binding Protein 1(TAK1)과 상호작용하여 TAK1 하위의 NF- κ B pathway를 조절하는 것이 알려져 있다(Oh et al., 2010). 이에 따라 TAK-875 또한 NF- κ B 활성을 억제한다는 가설을 세우고 이를 평가하였다. Raw264.7 세포에 TAK-875를 전처리한 후에 LPS를 처리하여 NF- κ B 활성화를 유도한 뒤, NF- κ B 활성 조절의 상위 단백질인 Nuclear Factor of kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-Cells Inhibitor, alpha(I κ B α) 및 inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta(IKK β)의 인산화를 확인하였다. 경시적으로 이들 단백질의 변화를 확인하였을 때, 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Figure 2A). 또한 p65의 핵질 이동을 확인하였을 때에도, 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Figure 2B). 따라서 TAK-875에 의한 염증억제 효과는 NF- κ B 활성 억제와 무관한 것으로 생각된다.

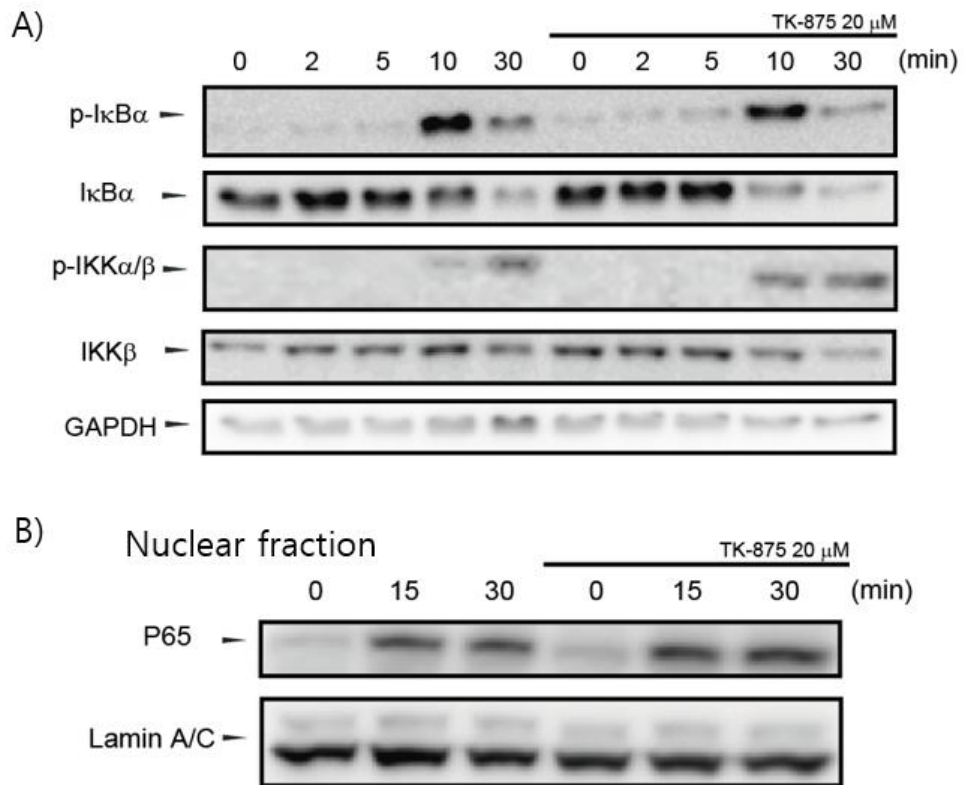


Figure2. No involvement of NF- κ B pathway in anti-inflammatory effect of TAK-875

(A) Raw264.7 cells were pretreated for 30 min with vehicle (DMSO, left) or TAK-875 (right) before stimulation of cells with LPS for the indicated time points.

(B) Nuclear p65 accumulation in Raw264.7 cells treated with TAK-875 and LPS.

3. J774.A1 세포에 대한 TAK-875의 항염증 효과 감소 및 미약한 NLRP3 inflammasome 유도 효과

LPS와 GPR40 리간드 3종을 J774.A1 세포주에 처리하여 염증억제 효과를 확인하는 실험을 진행하였다. 이 때, 흥미롭게도 TAK-875에 의한 염증억제 효과는 J774.A1세포에서 관찰되지 않았다(Figure3A). 이에 대한 원인을 찾기 위하여, Raw264.7 세포와 J774.A1 세포의 기질적 상이점에 주목하였다. Raw264.7 세포는 inflammasome의 구성요소인 Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD(ASC) 결손된 세포임이 알려져 있으며, 이를 실험을 통하여 확인하였다(Figure3B) (Pelegrin et al., 2008). 또한 Raw264.7 세포는 잘 알려진 NLRP3 inflammasome 활성화 조건인 LPS/ATP 처리시에도 IL-1 β 방출로 대표되는 inflammasome 반응성이 없었다(Figure3C). 반면, ASC가 결손 되지 않은 J774.A1세포에서는 LPS/ATP 처리에 의하여 NLRP3 inflammasome의 결과물인 IL-1 β 의 증가 및 cleaved caspase-1 증가가 확인되었다(Figure3D). 특히 TAK-875 처리에 의해서도 IL-1 β 의 미약한 방출과 약간의 cleaved caspase-1 증가가 확인되었다. IL-1 β 또한 iNOS 등의 염증 단백질 발현을 유도할 수 있으므로, TAK-875에 의한 NLRP3 inflammasome 활성화는 J774.A1 세포에서 항염증 효과가 감소한 원인 중 하나가 될 수 있다.

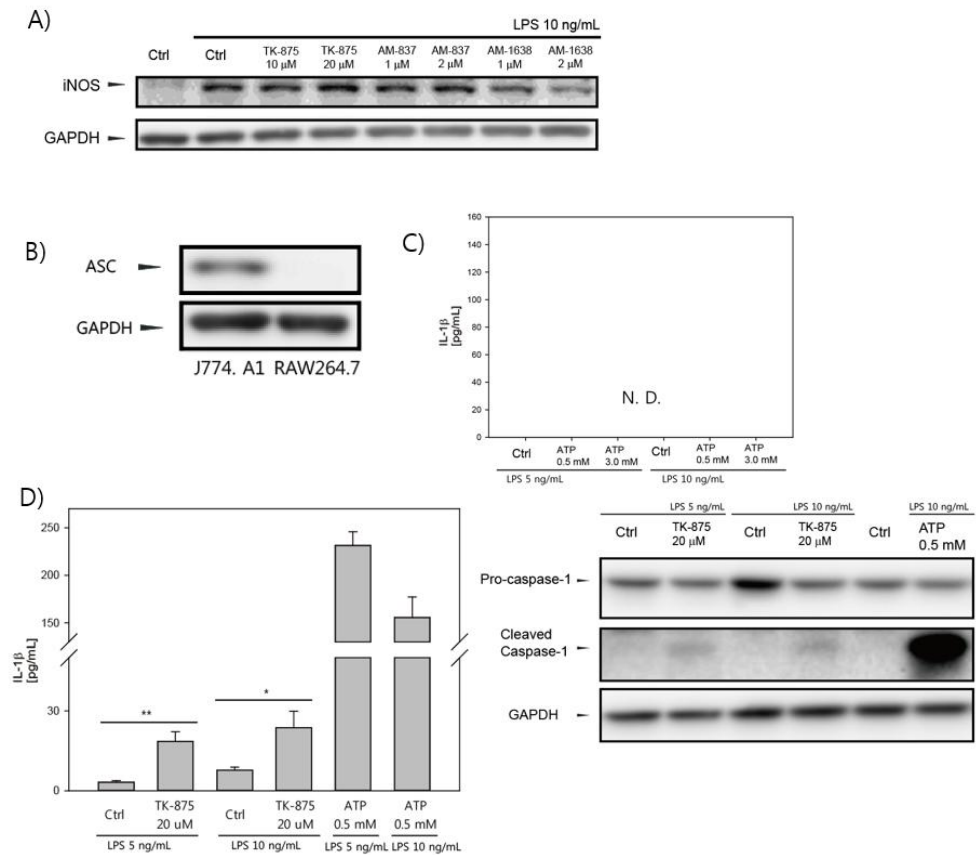


Figure 3. Reduced anti-inflammatory effect of TAK-875 and mild activation of NLRP3 inflammasome in J774.A1 cells

(A) iNOS protein expression in J774.A1 cells. J774.A1 cells were co-treated with GPR40 agonists and LPS for 8hr.

(B) ASC protein expression in J774.A1 and Raw264.7 cells.

(C) LPS primed-Raw264.7 cells were stimulated with ATP. Medium supernatants were analyzed by ELISA for IL-1β secretion. N.D., not detected.

(D) LPS primed-J774.A1 cells were stimulated with TAK-875 or ATP. Medium supernatants were analyzed by ELISA for IL-1β secretion and the residual cell extracts were analyzed by

immunoblotting for the determination of cleaved caspase-1 and pro-caspase-1. * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001, significant versus LPS.

4. 일차배양 면역 세포와는 다른 J774.A1 세포에 대한 GPR40 선택적 리간드의 NLRP3 inflammasome 증폭 효과

J774.A1세포에서 LPS 전처리 후, TAK-875 처리에 의하여 NLRP3 inflammasome의 미약한 증가를 확인하였기 때문에, GPR40 리간드 처리가 NLRP3 inflammasome 활성화 조건인 LPS/ATP 조건에서는 어떠한 영향이 있을지 평가하였다. 이를 위하여, J774.A1 세포에 LPS 처리 후 ATP와 함께 GPR40 리간드를 동시 처리하였다. 그 결과, LPS/ATP 조건에서 IL-1 β 의 방출 및 cleaved caspase-1을 확인하였고, GPR40 리간드 처리에 따라 LPS/ATP 조건 보다도 현저히 증가된 IL-1 β 방출 및 cleaved caspase-1 생성을 확인하였다. 또한 pyroptosis를 유도하는 활성화형 gasdermin-D의 증가 및 pyroptosis로 인하여 발생하는 배지 내 LDH 활성증가를 확인하였다(Aglietti et al., 2017). 따라서 GPR40 리간드가 LPS/ATP 조건에서, NLRP3 inflammasome 반응 증폭효과가 있음을 J774.A1 세포에서 입증하였다.

유사한 실험을 일차배양 면역 세포 및 Kupffer cell에서 시행하였다. 이때, BMDC 세포에서는 TAK-875 처리에 따른 유의한 변화가 관찰되지 않았으며, 다른 대식세포에서는 오히려 IL-1 β 방출이 감소한 것을 확인하였다. 따라서 TAK-875에 의한 NLRP3 inflammasome 반응은 세포마다 다른 양상을 띄고 있다고 결론 내렸으며, 여기에 대해서는 추후 추가적인 연구가 필요하다.

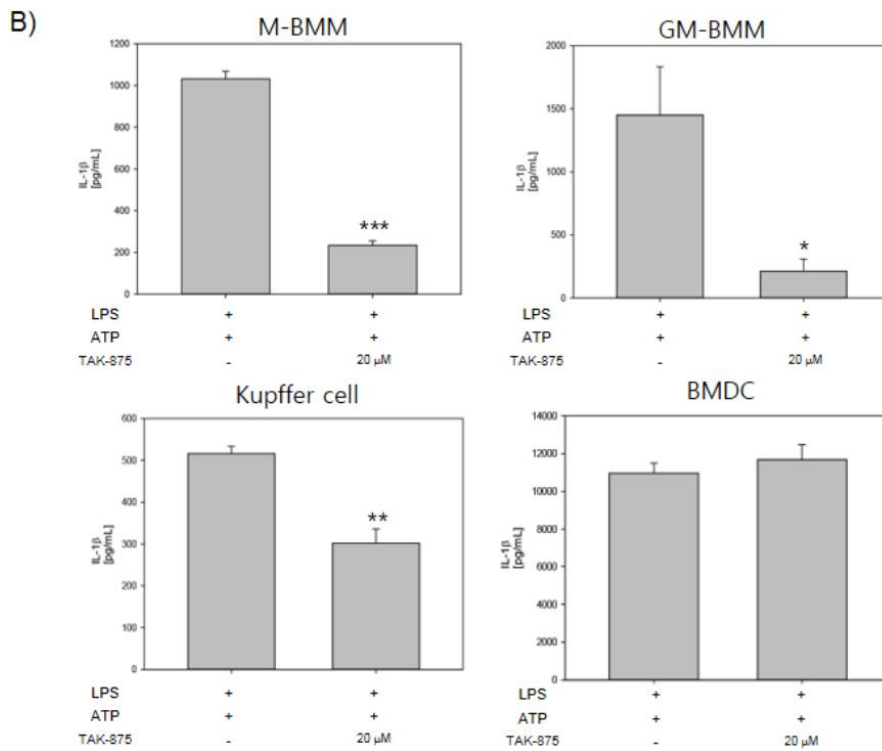
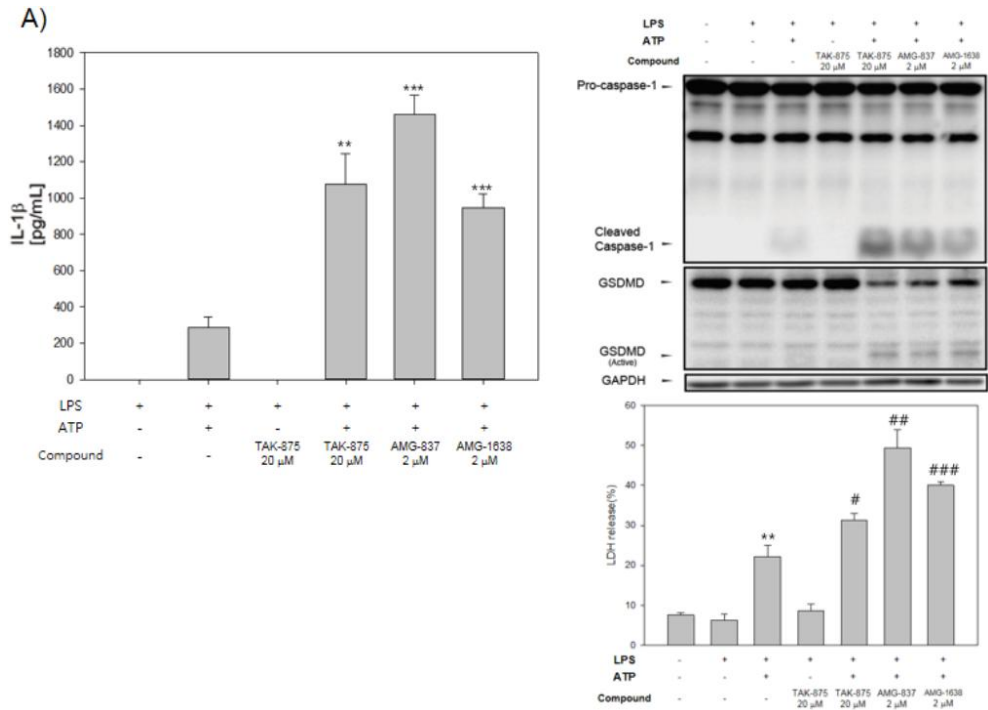


Figure 4. Amplified activation of NLRP3 inflammasome by GPR 40 ligands in J774.A1 but not in primary immune cells.

(A) LPS(10 ng/mL) primed-J774.A1 cells were stimulated with TAK-875 and ATP(0.5 mM). Medium supernatants were assayed for IL-1 β release by ELISA and LDH release. Cell extracts were analyzed by immunoblotting. * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001, significant versus LPS/ATP(left), ** p-value<0.01, significant versus LPS(right), # p-value<0.05, ## p-value<0.01, ### p-value<0.001, significant versus LPS/ATP(right)

(B) LPS primed-primary immune cells were stimulated with TAK-875 and ATP(BMDCs: 1.5 mM, others: 1.0 mM). Medium supernatants were analyzed by ELISA for IL-1 β release. significant versus LPS/ATP, * p-value<0.05, ** p-value<0.01, *** p-value<0.001

IV. 고찰 및 결론

당뇨 등 성인병과 염증의 상관관계에 대하여 많은 연구가 있었다. 만성적이고 지속적인 염증 상태는 인슐린 저항성을 증가시키는 것으로 잘 알려져 있다(Dandona et al., 2004; Donath et al., 2011). 이들의 상관관계는 지방산에 의한 자극에 의해서도 연결될 수 있다. 오메가3에 의한 염증 억제효과는 GPR120 리간드에 의하여 나타나는 항당뇨 효과를 설명하는 기전으로 알려져 있다(Oh et al., 2010).

한편 GPR40의 가장 잘 알려진 역할은 이자의 베타세포에서 자유지방산의 수용체로 작용하여 당 의존적 인슐린 분비(GSIS)를 촉진하는 것이다(Itoh et al., 2003). 기존에는 자유지방산에 의한 인슐린 분비 촉진 효과는 주로 'malonyl-CoA/Long-chain acyl-CoA 모델'로 설명되었다(Mancini et al., 2013). 하지만 2003년에 GPR40의 존재가 알려짐에 따라 자유지방산이 리간드로 작용하며, 이들의 작용이 GSIS에 영향을 준다는 연구가 진행되었다. 다른 잘 알려진 작용으로는 장내분비 세포에 작용하여 incretin 분비를 촉진하는 것이다(Elfalk et al., 2008). 실제로 GPR40은 이자의 베타세포, 장내분비 세포에 많이 분포한 것으로 알려져 있으며, 또한 뇌에도 발현되어 총체적인 당 조절에도 관여할 것으로 생각된다(Yamashima, 2015).

하지만 대식세포에서 이들의 발현 및 역할에 대해서는 연구가 부족한 실정이다. 실제로 GPR40은 대식세포에서는 발현이 매우 적으며, 단핵세포에서 소량 발현된 것으로 알려져 있다(Briscoe et al., 2003).

단핵세포에서 GPR40의 역할은 주로 파골세포(Osteoclasts)로의 분화 억제 작용을 매개하는 것으로 알려져 있다(Wauquier et al., 2012). 반면 염증 반응에 있어서는, 인간 단구세포인 THP-1 세포에서 DHA에 의한 염증 억제효과를 GPR120과 GPR40이 매개하는 것으로 알려졌다(Yan et al., 2013). 하지만 이후 추가적인 연구가 부족한 실정이며, 이들 실험 모두는 GPR40과 GPR120의 dual agonist를 이용한 실험으로 GPR40 선택적 리간드의 효과는 잘 알려지지 않았다.

본 논문에서는 GPR40 선택적 리간드가 대식세포에 미치는 영향에 주목하였다. 우선 마우스의 단구/대식세포주인 Raw264.7 세포, 마우스의 단구/대식세포주 J774.A1세포 및 여러 방법으로 분화 시킨 일차배양 면역세포에서 GPR40의 mRNA 발현을 확인하였다. 양성 대조군으로 이용한 이자에서의 발현보다는 작지만, 각각의 면역세포에서 GPR40의 mRNA 발현을 확인하였다(Figure 1A). 이후 잘 알려진 GPR40 선택적 리간드인 TAK-875, AM-837 및 AM-1638을 이용하여 면역세포에서의 GPR40 리간드의 작용을 확인하였다. 우선 Raw264.7 세포에서 LPS에 의하여 유도된 염증성 단백질 iNOS의 발현을 TAK-875 및 고농도의 AM-1638이 억제하는 것을 확인하였다(Figure 1B). 가장 효과가 좋았던 TAK-875를 처리하였을 때, LPS에 의하여 유도된 다른 염증성 단백질인 MCP-1, IL-6의 mRNA 발현 억제효과도 나타나는 것을 확인하였다. 한편 합성 리간드별로 염증 억제효과가 달랐기 때문에, 이 효과가 GPR40을 경유한 작용인지에 대한 의문이 들었다. 따라서 GPR40의 antagonist로

잘 알려진 GW1100를 이용한 실험을 통하여 이를 확인하고자 하였다(Biscoe et al., 2006). GW1100을 전처리한 실험에서, GPR40 리간드를 통하여 유도된 항염증 작용은 GW1100 전처리에 의하여 억제되지 않았다(Figure 1C). 따라서 GPR40 리간드에 의한 항염증 작용은 GPR40을 경유하지 않는 것으로 잠정적으로 결론 내렸다. 하지만 GW1100의 작용은 주로 GPR40에 의하여 유도되는 Ca^{2+} 의 농도 상승을 억제하는 것으로, 다른 경로에 대한 억제는 알려져 있지 않다. 실제로 Zhou 연구팀의 연구에 따르면 GPR40에 의한 NLRP3 inflammasome의 억제작용은 β -arrestin-2을 경유하여 일어난다(Yan et al., 2013). 따라서 이 부분에 대하여 실제로 GPR40을 경유하는지, β -arrestin-2을 경유하지는 않는지에 대한 추가적인 실험이 필요하다. 한편 TAK-875는 일차배양 대식세포 및 BMDC에 대하여 LPS에 의하여 유도된 iNOS 발현을 억제하였다(Figure 1D). 따라서 실험 결과에 따르면 TAK-875는 전반적인 대식세포에 대하여 항염증 효과를 지닌다.

한편 TAK-875에 의하여 일어나는 항염증 효과의 기전을 밝히기 위하여 NF- κ B 경로에 대한 억제 작용을 확인하였다. 실제로 TAK-875에 의하여 발현이 억제된 단백질인 iNOS, MCP-1, IL-6 등은 공통적으로 NF- κ B에 의하여 발현이 조절되는 단백질로 알려져 있다. Raw264.7세포에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도한 뒤 NF- κ B 활성 조절의 상위 단백질인 I κ B α , IKK β 의 인산화를 확인하였을 때, TAK-875 처리에 따른 변화는 없었다(Figure 2A). 또한 p65의 핵질 내

이동을 확인하였을 때에도 별다른 변화를 확인할 수 없었다. 따라서 TAK-875의 염증 억제작용은 NF- κ B 경로에 영향을 주지 않는 작용으로 생각된다.

흥미롭게도 J774.A1 세포에서는 LPS에 의하여 유도된 iNOS 발현이 TAK-875 처리에 의하여 억제되지 않았다(Figure 3A). 이 원인을 찾기 위하여 Raw264.7 세포와 J774.A1 세포의 기질적 상이함에 주목하였다. Raw264.7 세포는 inflammasome의 구성요소인 ASC가 결손되어 inflammasome에 의한 IL-1 β 의 활성화가 일어나지 않는 것으로 알려져 있다(Pelegrin et al., 2008). 실제로 실험을 통하여 ASC 결손을 확인하였으며, Raw264.7 세포는 NLRP3 inflammasome 활성화 조건에 대하여 반응하지 않는 것을 확인하였다(Figure 3B, C). 반면 J774.A1 세포에서는 ASC가 발현하며, NLRP3 inflammasome 활성화 조건에 반응하여 IL-1 β 방출 및 caspase-1의 활성화가 일어남을 확인하였다(Figure 3B, D). 게다가 J774.A1 세포는 LPS 조건에서 TAK-875 처리에 의하여도 미약하지만 IL-1 β 방출 및 caspase-1의 활성화가 일어났다(Figure 3D).

이에 따라 J774.A1 세포에서 GPR40 리간드가 NLRP3 inflammasome에 어떠한 영향을 미치는지 확인해 보았다. NLRP3 inflammasome 활성화 조건에 GPR40 선택적 리간드를 처리하자, NLRP3 inflammasome 반응이 증폭되었다. 그 결과, IL-1 β 방출의 유의한 증가 및 caspase-1의 활성화 증가를 확인하였다. 또한 pyroptosis를 유발하는 단백질인 활성화된 gasdermin D의 증가와 pyroptosis로 인하여

유발되는 LDH 방출의 유의한 증가를 확인하였다(Figure 4A) (Aglietti et al., 2017). 따라서 J774.A1 세포에서는 GPR40 선택적 리간드가 NLRP3 inflammasome 반응의 증폭을 유발한다는 결론을 내렸다. 반면, 일차배양 대식세포에 있어서는 TAK-875 처리시에 오히려 NLRP3 inflammasome 억제 작용이 나타났다(Figure 4B). 이런 NLRP3 inflammasome 억제 작용은 기존에 Zhou 연구팀에서 보고한 GPR40 작용과 유사하였다(Yan et al., 2013).

기존 보고에 따르면 만성적인 염증상태와 이로 인한 cytokine이 인슐린 저항성을 매개하는 것으로 알려져 있다. 특히 TNF- α 와 IL-1 β 등의 cytokine이 주목받았는데(Moller, 2000; Spranger et al., 2003), TNF- α 신호 차단에 대한 임상시험 결과, TNF- α 신호 차단은 유의한 인슐린 저항성 개선 효과를 보이지 못했다(Ofei et al., 1996, Dominguez et al., 2005). 반면 제 2형 당뇨의 인슐린 저항성에 있어서 NLRP3 inflammasome과 IL-1 β 의 관계가 꾸준히 연구되고 있으며 실제 IL-1 β 신호 억제가 인슐린 저항성의 개선 효과를 보인 임상시험 결과가 존재한다(Donath, 2014). 따라서 본 연구에서 제시된 TAK-875에 의하여 발생하는 염증 억제효과는 TAK-875의 항당뇨병 효과와 연관성이 있을 수 있다.

흥미로운 점은 J774.A1세포에서 반응이 매우 상이했다는 점이다. J774.A1 세포에서는 GPR40 리간드 처리가 오히려 NLRP3 inflammasome을 증폭시켜 염증 유발효과를 지녔다. 현재 GPR40 리간드들을 이용한 약물개발에 있어서 부각되는 가장 중요한 문제점은

이들의 독성 반응의 기전을 알지 못하며, 이들의 독성을 예측할 수 있는 비임상시험이 없다는 데 있다. 예컨대 TAK-875의 경우 임상3상에서 실패한 약물로 안전성의 문제가 있는 약물로 알려져 있으나, 그 독성 작용에 대하여는 잘 알려져 있지 않다(Li et al., 2017). 따라서 이러한 현상을 바탕으로 이후 이들 약물의 독성에 대한 연구에도 본 논문이 이용될 수 있다.

본 논문에서는 항당뇨 기전을 가진 것으로 잘 알려진 GPR40 선택적 리간드가 염증 반응에 미치는 영향을 밝히고자 하였다. 그 결과 GPR40 선택적 리간드인 TAK-875가 Raw264.7 세포와 일차배양 대식세포에 대하여 염증 억제효과를 지니고 있는 것을 밝혔다. 한편 J774.A1 세포에서 GPR40 선택적 리간드들은 모두 강한 NLRP3 inflammasome 증폭 효과를 지녀, GPR40 리간드에 의한염증 반응 유발 기전을 제시하였다.

V. 참고 문헌

Aglietti, R.A., and Dueber, E.C. (2017). Recent Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Pyroptosis and Gasdermin Family Functions. *Trends Immunol* 38, 261–271.

Briscoe, C.P., Peat, A.J., McKeown, S.C., Corbett, D.F., Goetz, A.S., Littleton, T.R., McCoy, D.C., Kenakin, T.P., Andrews, J.L., Ammala, C., et al. (2006). Pharmacological regulation of insulin secretion in MIN6 cells through the fatty acid receptor GPR40: identification of agonist and antagonist small molecules. *Br J Pharmacol* 148, 619–628.

Briscoe, C.P., Tadayyon, M., Andrews, J.L., Benson, W.G., Chambers, J.K., Eilert, M.M., Ellis, C., Elshourbagy, N.A., Goetz, A.S., Minnick, D.T., et al. (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278, 11303–113

Dandona, P., Aljada, A., and Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 25, 4–7.

Dominguez, H., Storgaard, H., Rask-Madsen, C., Steffen Hermann, T., Ihlemann, N., Baunbjerg Nielsen, D., Spohr, C., Kober, L., Vaag, A., and Torp-Pedersen, C. (2005). Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor- α blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. *J Vasc Res* 42, 517–525.

Donath, M.Y. (2014). Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat Rev Drug Discov* 13, 465–476.

Donath, M.Y., and Shoelson, S.E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11, 98–107.

Edfalk, S., Steneberg, P., and Edlund, H. (2008). Gpr40 is expressed

in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* 57, 2280–2287.

Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S., and Tsujimoto, G. (2005). Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med* 11, 90–94.

Itoh, Y., Kawamata, Y., Harada, M., Kobayashi, M., Fujii, R., Fukusumi, S., Ogi, K., Hosoya, M., Tanaka, Y., Uejima, H., et al. (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422, 173–176.

Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013–1022.

Li, Z., Xu, X., Huang, W., and Qian, H. (2017). Free Fatty Acid Receptor 1 (FFAR1) as an Emerging Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus: Recent Progress and Prevailing Challenges. *Med Res Rev.*

Mancini, A.D., and Poynter, V. (2013). The fatty acid receptor FFA1/GPR40 a decade later: how much do we know? *Trends Endocrinol Metab* 24, 398–407.

Mitchell, S., Vargas, J., and Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFkappaB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 8, 227–241.

Mohammad, S. (2016). GPR40 Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: Benefits and Challenges. *Curr Drug Targets* 17, 1292–1300.

Moller, D.E. (2000). Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 11, 212–217.

Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., and Taylor, R. (1996). Effects of an engineered human anti-TNF- α antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45, 881–885.

Oh, D.Y., Talukdar, S., Bae, E.J., Imamura, T., Morinaga, H., Fan, W., Li, P., Lu, W.J., Watkins, S.M., and Olefsky, J.M. (2010). GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142, 687–698.

Park, M.H., and Hong, J.T. (2016). Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells* 5.

Pelegrin, P., Barroso-Gutierrez, C., and Surprenant, A. (2008). P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1 β in mouse macrophage. *J Immunol* 180, 7147–7157.

Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M.M., Ristow, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A.F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)–Potsdam Study. *Diabetes* 52, 812–817.

Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., and Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481, 278–286.

Tan, J.K., McKenzie, C., Marino, E., Macia, L., and Mackay, C.R. (2017). Metabolite-Sensing G Protein-Coupled Receptors–Facilitators of Diet-Related Immune Regulation. *Annu Rev Immunol* 35, 371–402.

Tazoe, H., Otomo, Y., Kaji, I., Tanaka, R., Karaki, S.I., and Kuwahara, A. (2008). Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 2, 251–262.

Wang, J., Wu, X., Simonavicius, N., Tian, H., and Ling, L. (2006). Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem* 281, 34457–34464.

Wauquier, F., Philippe, C., Leotoing, L., Mercier, S., Davicco, M.J., Lebecque, P., Guicheux, J., Pilet, P., Miot-Noirault, E., Poitout, V., et al. (2013). The free fatty acid receptor G protein-coupled receptor 40 (GPR40) protects from bone loss through inhibition of osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 288, 6542–6551.

Yamashima, T. (2015). Dual effects of the non-esterified fatty acid receptor 'GPR40' for human health. *Prog Lipid Res* 58, 40–50.

Yan, Y., Jiang, W., Spinetti, T., Tardivel, A., Castillo, R., Bourquin, C., Guarda, G., Tian, Z., Tschopp, J., and Zhou, R. (2013). Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 38, 1154–1163.

Abstract

Bifunctional effects of GPR40 ligands on inflammatory responses of macrophage

ByeongSeok Kang

College of Pharmacy, Pharmacology

The Graduate School

Seoul National University

Long-chain fatty acids are not only used as energy sources but also act as ligands for G protein-coupled receptors (GPCRs). The GPCR family recognizing long-chain fatty acids as endogenous ligands has been recently identified, and GPR40 and GPR120 are known as GPCRs bound with long chain fatty-acids.

GPR40 is expressed mainly in pancreatic beta cells and enteroendocrine cells. On the other hand, it is known that GPR120 is highly expressed in macrophages. Therefore, researches on the influence of long chain fatty-acid on macrophages are mainly focused on GPR120, while studies on the effect of GPR40 stimulation on macrophages are not sufficient.

In this study, expression of GPR40 was assessed in primary macrophages and monocyte/macrophage cell lines, and the role of inflammatory response of GPR40-selective ligands was evaluated using TAK-875, AM-837, AM-1638 which are selective ligands of GPR40.

First, we evaluated the expression of GPR40 in Raw264.7, J774.A1 cells (well known as mouse monocyte/macrophage cell lines) and primary cultured mouse immune cells. Unlike previous studies, the expression of GPR40 mRNA was detected in these cell types. To investigate the effect of GPR40 ligand on inflammatory response, lipopolysaccharide (LPS) and three GPR40 ligands were treated in Raw264.7 cells. The expression of iNOS, a representative pro-inflammatory protein, was decreased by treatments with GPR40 ligands, and TAK-875 showed the most potent inhibitory effect. We also confirmed decreased expression of inflammatory cytokine IL-6, chemokine MCP-1 by treatment with TAK-875. On the other hand, inhibition of iNOS expression by TAK-875 was not reversed when treated with GPR40 antagonist GW1100. Therefore, iNOS reduction by GPR40 ligands is not due to GPR40, but may result from the unique structural property of TAK-875 compound.

NF- κ B is known as a transcription factor that commonly regulates expression of inflammatory proteins such as iNOS, IL-6 and MCP-1.

Hence, the effect on NF- κ B activation was evaluated using TAK-875 which showed the strongest anti-inflammatory effect in previous experiments. After pre-treatment with TAK-875, LPS was treated to induce an inflammatory response, and the phosphorylation of I κ B α , IKK β , which are regulatory proteins for NF- κ B activation, was determined. However, no significant change was observed by treatment of TAK-875. Moreover, nuclear accumulation of p65 was not changed by TAK-875. Therefore, the anti-inflammatory effect of TAK-875 is believed to be irrelevant to the NF- κ B pathway.

Interestingly, no reduction in iNOS was observed when the same experiment was performed using J774.A1 cells. In order to investigate the cause of the reduced anti-inflammatory activity by GPR40 ligand in J774.A1 cells, we focused on the difference in the congenital properties of Raw264.7 cells and J774.A1 cells. Raw264.7 cells are known to lack expression of ASC, one of the inflammasome components. In fact, we could not detect the significant amounts of ASC in Raw264.7 cells. Moreover IL-1 β was not released even when NLRP3 inflammasome was activated by LPS / ATP treatment in Raw264.7 cells. On the other hand, J774.A1 cells release higher amounts of IL-1 β by LPS/ATP treatment, especially IL-1 β was slightly increased even after treatment with TAK-875 after LPS treatment. Because IL-1 β also can induce the expression of

inflammatory proteins such as iNOS, mild elevation of IL-1 β secretion by TAK-875 may cause a decrease in anti-inflammatory activity in J774.A1 cells.

In order to confirm whether the ligands of GPR40 affect amplification of NLRP3 inflammasome activity, ATP and GPR40 ligands were co-treated after LPS treatment. Increased expression of cleaved caspase-1, which influences the activation of IL-1 β , was confirmed as well as a marked increase in release of IL-1 β in the group co-treated with GPR40 ligands. In addition, we confirmed the LDH release and the increase of active gasdermin-D, which are pyroptosis markers in LPS/ATP-primed, TAK-875 treated J774.A1 cells. Thus, GPR40 ligands were shown to induce pro-inflammatory effect in J774.A1 cells through NLRP3 inflammasome amplification. On the other hand, when TAK-875 was additionally treated with LPS/ATP, there was no significant change in bone marrow-derived dendritic cells, and even NLRP3 inflammasome response was decreased in primary cultured macrophages and Kupffer cells. Therefore, we concluded that NLRP3 inflammasome response by GPR40 stimulation was immune cell-type dependent.

In summary, GPR40 is expressed in macrophage cell types. GPR40 ligands show anti-inflammatory effect in Raw 264.7 cells lacking inflammasome component ASC and primary macrophage cells.

Contrary, the anti-inflammatory effect of TAK-875 was not found in J774.A1 cells, and rather GPR40 ligands could mediate the amplified inflammatory response via enhanced NLRP3 inflammasome activation. Thus, we suggest that TAK-875 may exhibit bifunctional effects to the inflammatory responses of macrophages. Further studies will be needed to determine which types of reaction occurs in actual *in vivo* conditions and to clarify molecular mechanistic basis for the differential effects of GPR40 ligands.

Keywords: GPR40, NF- κ B, IL-1 β , inflammasome