

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19412

研究課題名(和文) 気管支喘息における樹状細胞、T細胞のプロトン感知性受容体OGR1の役割

研究課題名(英文) The role of proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells and T cells in a murine asthma model

研究代表者

齋藤 悠 (Saito, Haruka)

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80447268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Ovarian cancer G protein-coupled Receptor1 (OGR1) は、細胞外プロトンを感じ、細胞内シグナル系活性化するユニークな受容体である。細胞外pHの低下は気管支喘息の炎症部位局所で起こっていると考えられる。細胞レベルでの OGR1の局在や役割については未だ不明な点が多い。そこでエフェクター細胞であるT細胞に着目し解析した。ハウスダストマイト気管支喘息モデルから採取した傍気管リンパ節にはOGR1が発現していた。さらに脾細胞から磁気ビーズによって単離したCD4+T細胞、CD8+T細胞にもOGR1が発現していた。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 (OGR1) stimulation by extracellular protons causes the activation of G proteins and subsequent cellular functions. Expression and the role of OGR1 at the cell level were unknown. We confirmed OGR1 mRNA expression assessed by real-time TaqMan PCR in peribronchial lymph node, CD4+Tcell and CD8+Tcell from splenocyte of WT mice. OGR1 developed in the peribronchial lymph node which I gathered from house dust induced bronchial asthma model. Furthermore, OGR1 developed in isolated CD4+T cell, CD8+T cell by magnetic beads from a splenocyte.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：アレルギー

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は気道炎症細胞を中心に起こる一連の炎症反応によって起こる疾患であり、ステロイド吸入療法により、その治療法は大きな進歩をとげたが、いまだ重症発作による喘息死が起こる難治性炎症性疾患と言える。プロトン感知性受容体 OGR1 ファミリー OGR1、TDAG8、GPR4、G2A からなる OGR1 ファミリーは、発見された当初はリゾ脂質(スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)、リゾフォスファチジルコリン (LPC)、サイコシン)が特異的に結合する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であると考えられていた。その後、私たちを含むいくつかのグループから(Ludwig et al, **Nature**, 2003 他)、OGR1 ファミリーは細胞外 pH の低下、つまりプロトンを感じ取るユニークな受容体群であることが明らかとなった。当初想定されたリゾ脂質分子のリガンド機能に対しては否定的なデータも多いが、支持する知見も報告されている。このように、特徴的なリガンドを持つ OGR1 ファミリーの生理機能については未だ不明な点が多い状態である。そこで我々は、これまでに OGR1、GPR4 の欠損マウスを作製するとともに (Mogi et al. **J Immunol**, 2009)、個体レベルで OGR1 ファミリーの機能解明を目指し、研究を進めてきた。

OGR1 ファミリーと気管支喘息

我々はこれまでプロトン(H⁺)がヒト気道平滑筋細胞に発現している OGR1 を介して炎症を誘発する IL-6 や組織リモデリングに関わる結合組織成長因子 (CTGF) (Ichimonji I, **Aoki H** (10 人中 5 番目) et al, *Am J Physiol*, 2010, Matsuzaki S, **Aoki H** (18 人中 7 番目) et al, *BBRC*, 2011) の産生を増強することを明らかにした。そこで我々は OGR1 欠損マウスを用いて、卵白アルブミン (OVA ; ovalbumin) を抗原とした気管支喘息モデルを作成し、OGR1 欠損マウスでは野生型に比

べて、気道過敏性、気道炎症が抑制されることを見出した (**Aoki H** (17 人中 1 番目) et al *PLoS one*, 2013)

さらに主要な抗原提示細胞である樹状細胞では OGR1 欠損マウス由来樹状細胞の遊走能が著しく低下していることを明らかにした。これは樹状細胞に発現する OGR1 が遊走能を制御し、気道過敏性と気道炎症に関わっていることを示している。(**Aoki H** et al *PLoS one*, 2013) しかし、喘息に関わる炎症性細胞レベルでの OGR1 の発現の局在やその役割については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、気道炎症のレギュレーターとして働いている可能性がある樹状細胞、樹状細胞から抗原提示を受けエフェクター細胞として働く T 細胞に着目し、OGR1 の発現の局在とその役割について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) House Dust Mite (HDM) 気管支喘息モデルの作成

HDM 投与によって作成された気管支喘息モデルはより自然発症に近いモデルとして知られている。5-8 週令の balb/c♀マウスを用いて HDM 点鼻モデルを作製する。

OGR1 欠損、野生型マウスに Day0-2 の 3 日 HDM(0.08 µg Der p 1)50µl を麻酔下に点鼻し、Day14-17 にも同様量の HDM を点鼻した。コントロールには同容量の PBS を用いた。Day18 に BAL を行い、BALF 中の細胞数、細胞分画を解析した。

(2) 傍気管支リンパ節、脾細胞における OGR1 ファミリーの発現について

肺胞洗浄液後に傍気管支リンパ節を採取し、RNA 抽出を行い、OGR1 ファミリー肺胞洗浄液中の細胞、傍気管支リンパ節を回収しその表面マーカーの発現やサイトカイン産生

を mRNA レベルで解析した。さらに脾細胞から磁気ビーズを用いて CD4+T 細胞、CD8+T 細胞を採取し、OGR1 ファミリーの発現について調べた。

4. 研究成果

(1) HDM 気管支喘息モデルにおける OGR1 の役割

野生型マウスはコントロール群(1×PBS 投与群)に比べ、総細胞数、好酸球数、好中球数の増加が認められていた。OGR1 欠損マウスでは野生型に比較して、BALF 中の総細胞数の、好酸球数、好中球数、リンパ球の有意な減少が認められた。このことから、OVA 腹腔内投与、OVA 吸入刺激によって得られた気管支喘息モデルにおける OGR1 の役割と同様、気道炎症においては炎症促進的に働いている可能性が示唆された。

(2) 傍気管支リンパ節、脾細胞における OGR1 ファミリーの発現について

HDM 最終点鼻 24 時間後に採取した傍気管支リンパ節において OGR1 が発現していることが mRNA レベルでわかった。また、OGR1 欠損マウスから採取した傍気管支リンパ節では CD86 の発現が低下していることがわかった。IL-12, IL-10 の産生に有意な差は認められなかった。

脾細胞から磁気ビーズにて回収してきた CD4+T 細胞、CD8+T 細胞にも OGR1 の発現が認められた。

傍気管支リンパ節には抗原提示細胞である樹状細胞と T 細胞が存在している。また樹状細胞、T 細胞共に OGR1 の発現が認められたことから、両細胞に発現している OGR1 が炎症のレギュレーターとして働いている可能性があることが考えられた。

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 4 件)

(1) Koga Y, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Ono A, Yatomi M, Kamide Y, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Dobashi K, Yamada M. CREB regulates TNF- α -induced GM-CSF secretion via p38 MAPK in human lung fibroblasts.

Allergol Int. pii: S1323-8930(16)30028-4. 2016 **査読あり**

(2) Tsurumaki H, Mogi C, Aoki-Saito H, Tobo M, Kamide Y, Yatomi M, Sato K, Dobashi K, Ishizuka T, Hisada T, Yamada M, Okajima F. Protective Role of Proton-Sensing TDAG8 in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury.

International Journal of Molecular Sciences 16(12) 28931-42, 2015 **査読あり**

(3) Yatomi M, Hisada T, Ishizuka T, Koga Y, Ono A, Kamide Y, Seki K, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Sunaga N, Kaira K, Dobashi K, Yamada M, Okajima F. 17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.

Physiological Reports 3(12) e12628, 2015 **査読あり**

(4) Kamide Y, Ishizuka T, Tobo M, Tsurumaki H, Aoki H, Mogi C, Nakakura T, Yatomi M, Ono A, Koga Y, Sato K, Hisada T, Dobashi K, Yamada M, Okajima F. Acidic environment augments Fc ϵ RI-mediated production of IL-6 and IL-13 in mast cells.

Biochem Biophys Res Commun. Aug 28;464(3):949-55. 2015 **査読あり**

〔学会発表〕(計 3 件)

(1)齋藤(青木)悠、茂木千尋、鶴巻寛朗、矢富正清、上出庸介、古賀康彦、小野昭浩、土橋邦生、石塚全、岡島史和、久田剛志
ハウスダストマイト点鼻気管支喘息モデルにおけるプロトン感知性受容体 OGR1 の役割
第 65 回日本アレルギー学会学術大会(東京 2016 年 6 月 17 日~19 日)

(2)齋藤(青木)悠、茂木千尋、鶴巻寛朗、久田剛志、小野昭浩、古賀康彦、関香織、矢富正清、上出庸介、土橋邦生、石塚全、山田正信、岡島史和
T 細胞におけるプロトン感知性受容体 OGR1 の役割
第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、京都国際会議場(京都) 2016 年 4 月 8 日-10 日

(3) Haruka Saito, Takeshi Hisada, Chihiro Mogi, Tsurumaki Hiroaki, Masakiyo Yatomi, Yosuke Kamide, Akihiro Ono, Yasuhiko Koga, Kunio Dobashi, Tamotsu Ishizuka, Fumikazu Okajima, Absence of proton-sensing OGR1 protects against house dust mite-induced allergic airway inflammation
European Respiratory Society (ERS) International Congress 2016, London, united kingdom, 2016 年 9 月 3 日-7 日

〔図書〕(計 2 件)

(1)齋藤(青木)悠、岡島史和
アレルギー疾患モデルからの最新知見 気管支喘息におけるプロトン感知性 G 蛋白共役型受容体 OGR1 ファミリーの役割
呼吸と循環 (0452-3458)63 巻 10 号
医学書院
Page915-920(2015.10)査読なし

(2)齋藤(青木)悠、岡島史和

「長引く咳への対応~成人・小児~」に寄せる 気管支喘息モデルにおけるプロトン感知性受容体 OGR1 の役割
アレルギーの臨床(0285-6379)35 巻 6 号
北隆社
Page570-573(2015.06)査読なし

〔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

齋藤 悠 (SAITO, Haruka)

群馬大学 医学部附属病院 ・ 医員

研究者番号: 80447268