

令和 3 年 10 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15457

研究課題名(和文) 腫瘍関連マクロファージにおけるプロトン感知性受容体の生理的役割解析

研究課題名(英文) The physiological roles of proton-sensing GPCRs in tumor-associated macrophages

研究代表者

長坂 明臣 (Nagasaka, Akiomi)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：10723877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：固形癌の組織内部はpHが低下する。これまで癌細胞以外の周囲の正常細胞や癌組織に浸潤する免疫細胞におけるpH低下の生理的意義は、ほとんど解明されてこなかった。そこで本研究では、腫瘍関連マクロファージ(Tumour-Associated Macrophages; TAM)におけるpH低下の生理的意義の解明を試みた。その結果、pH低下を感知するプロトン感知受容体の一つであるTDAG8が、大腸がんモデルマウスや腫瘍細胞皮下移植モデルなどにおいてTAMに高発現していることを見出した。加えてマクロファージ特異的なTDAG8欠損マウスの作製にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍関連マクロファージ(TAM)の腫瘍組織内への浸潤増加は、悪性度および予後の悪化と正の相関関係を示すことから、治療標的細胞として注目されている。本研究によってTDAG8がTAMに高発現していることを見出し、TDAG8は炎症に関与するとの従来の報告を合わせると、TDAG8が腫瘍形成に関与する可能性が高いことが考えられ、TDAG8が新たな腫瘍の治療標的としての可能性が期待される。加えて、本研究にて作製したマクロファージ特異的なTDAG8欠損マウスは、腫瘍形成のみならず、マクロファージが関与するとされる様々な疾患におけるTDAG8の生理的役割の解明にも応用可能と考えている。

研究成果の概要(英文)：In solid tumors pH reduction is observed, however, the physiological importance of pH reduction in the surrounding normal cells and immune cells other than tumor cells remains largely unknown. Therefore, in this study, we focused on elucidating the physiological mechanism of pH reduction in tumor-associated macrophages (TAM). As a result, we found that TDAG8, which is one of proton-sensing GPCRs that are activated in acidic conditions, is highly expressed in TAM in colon cancer model mice and tumor cell subcutaneously inoculated model mice. In addition, we generated macrophage-specific TDAG8 deficient mice.

研究分野：分子生物学、薬理学

キーワード：腫瘍 プロトン感知性受容体 腫瘍関連マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

過剰な炎症応答は、細胞の壊死などといった組織障害を引き起こすだけでなく、腫瘍形成の要因となることから、炎症応答の厳密な制御は病態時において極めて重要である。一般的に虚血時や炎症時においては、組織の pH が低下(プロトン濃度の上昇)することが知られている。例えば心筋梗塞の梗塞部位は(pH7.4 pH5.5~7.0)まで低下する。しかしながら、心筋梗塞後の pH の低下が心臓にどのような影響を及ぼすかは明らかにされていなかった。そこで私達は、細胞外 pH の低下によって活性化される G タンパク共役型受容体(GPCR)であるプロトン感知性 GPCR に着目した。これまでプロトン感知性 GPCR として TDAG8、GPR4、OGR1 の 3 種類が同定されている。これら受容体の発現量を Real time RT-PCR で調べたところ、心筋梗塞処置後には TDAG8 のみが顕著に発現量が増加した。そこで、TDAG8 遺伝子欠損(KO)マウスに心筋梗塞処置を施したところ、TDAG8 KO マウスの心筋梗塞処置後の生存率が、野生型(WT)マウスに比べて 30% 以上減少した。従って、TDAG8 は心筋梗塞時の心臓に対して保護的に働く分子であることが明らかとなった。このことは、心筋梗塞時に TDAG8 が pH 低下を感知することは生理的に重要な意味を持つことを示している。さらに申請者は心筋梗塞時の TDAG8 の作用メカニズムを調べた。その結果、心臓マクロファージに発現している TDAG8 が炎症応答を負に制御することにより、細胞死や線維化を抑制することで、心保護的な作用をもたらすことを明らかにした(A. Nagasaka et al., Scientific reports, 2017)。

固形腫瘍においても pH が低下すること(pH7.4 pH6.5~6.9)が報告されている。腫瘍細胞の増殖や転移には、腫瘍細胞を取り巻く非腫瘍細胞(免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など)が大きく関与している。例えば、腫瘍に浸潤してきたマクロファージは、腫瘍関連マクロファージ(tumour-associated macrophages; TAM)と呼ばれ、血管新生促進、免疫抑制、増殖因子産生などの機能により、発癌、転移や腫瘍増殖を促進することが知られている。一般的に、腫瘍組織内の TAM の浸潤増加は、悪性度および予後の悪化と正の相関関係を示すことから、治療標的細胞として注目されている。しかしながら、プロトン感知性受容体の中でも、TAM における TDAG8 の生理的役割は明らかにされてこなかった。

### 2. 研究の目的

TAM に TDAG8 が発現しているかを確認し、TAM に発現する TDAG8 が、腫瘍形成にどのような影響を与えるかを解明し、その生理的意義を見出すことを目的とする。加えて、TDAG8 を標的とした新規癌治療法の開発の礎を築くことを目指す。

### 3. 研究の方法

- ・腫瘍モデルマウスから TAM を単離し、TDAG8 が発現しているかを確認する。
- ・WT マウスとマクロファージ特異的 TDAG8 KO マウスの腫瘍形成における病態比較(免疫細胞の浸潤、血管新生、細胞増殖など)を詳細に行い、TAM の TDAG8 が腫瘍形成の病態のどの現象に関与しているかを明らかにする。

### 4. 研究成果

ルイス肺がん細胞株(LLC)を野生型マウスの皮下に投与し、担癌モデルを作製した。その後、その腫瘍から CD45+CD11b+F4/80+(Ly6C<sup>low</sup>)の細胞を TAM として、セルソーターにより回収した。Real-time PCR により TDAG8 を含めたプロトン感知性受容体の発現量を調べた。その結果、TAM には TDAG8 が高発現していることが判明した(図1)

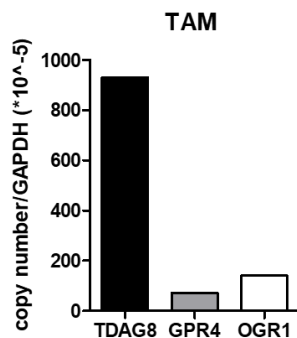


図 1. LLC 皮下接種による腫瘍モデルマウスからの TAM におけるプロトン感知性受容体の発現量比較  
腫瘍モデルマウス 3 匹から回収した腫瘍を 1 つのサンプルにした後に、CD45+CD11b+F4/80+ Ly6C<sup>low</sup> の細胞を回収し、TDAG8 の mRNA 量を Real time RT-PCR で測定した。

その他の腫瘍モデルとして大腸がんモデルマウスを作製した。その方法は、野生型マウスにアゾキシメタン(AOM)を腹腔内投与 1 週間後に、2% デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を 5 日間自由飲水させた。その後 13 週間飼育することで、大腸がんモデルを作製した。腫瘍関連マクロファージ(TAM)の単離は、大腸腫瘍組織を酵素処理後、細胞を抗体染色した。その後、セルソーターにより CD45+CD11b+F4/80+(Ly6C<sup>low</sup>)の細胞を TAM として回収した。Real-time PCR により TDAG8 を含めたプロトン感知性受容体の発現量を調べた。その結果、大腸がんの TAM にも TDAG8 が高発現していることが判明した(図2)。

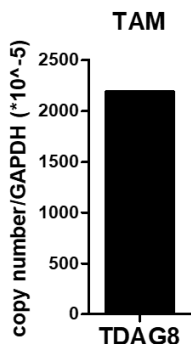


図 2. 大腸がんの TAM にも TDAG8 が高発現する腫瘍モデルマウス 3 匹を 1 つのサンプルにした後に、CD45+CD11b+F4/80+Ly6C<sup>low</sup> の細胞を回収し、TDAG8 の mRNA 量を Real time RT-PCR で測定した。

TDAG8 は TAM 以外にも T 細胞、好中球などの免疫細胞にも発現していることが、これまでの研究より確認されている。ところで、TAM の中でも CD169 陽性マクロファージにおける pH 低下とその生理的な影響は全く明らかにされていない。そこで CD169 陽性細胞に着目し、CD169 陽性 TAM において TDAG8 の発現を調べたところ、CD169 陽性 TAM は TDAG8 を発現していることが確認できた (図 3)。この結果を踏まえて、CD169 陽性 TAM 特異的な TDAG8 のコンディショナル欠損マウスの作製を試みた。まず、TDAG8<sup>Flox</sup> マウスを樹立し、CD169-Cre マウスと交配させ、CD169 陽性マクロファージ特異的な TDAG8 欠損マウス (CD169-Cre/TDAG8<sup>Flox/Flox</sup>) を作製した。このマウスは腫瘍モデルのみならず、CD169 陽性マクロファージが関与するとされる様々な疾患における TDAG8 の生理的役割の解明にも応用可能と考えている。

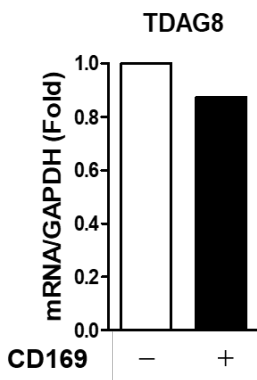


図 3. TDAG8 は CD169 陽性 TAM に発現している LLC 細胞皮下接種による腫瘍モデルから TAM を単離し、CD169 陰性と CD169 陽性細胞における TDAG8 の発現量を測定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. 長坂 明臣、黒瀬 等：マクロファージにおける pH 低下の生理的意義  
細胞 51(1) 47-50 (2019) 査読無
2. 長坂 明臣、黒瀬 等：マクロファージにおける pH 感知性 GPCR の生理的意義  
アグリバイオ 2(11) 79-83 (2018) 査読無
3. 長坂 明臣、黒瀬 等：マクロファージにおける pH 低下の生理的意義  
Medical Science Digest 44(8) 405-409 (2018) 査読無
4. Nagasaka A, Mogi C, Ono H, Nishi T, Horii Y, Ohba Y, Sato K, Nakaya M, Okajima F, Kurose H : The proton-sensing G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) shows cardioprotective effects against myocardial infarction. Scientific reports 7(1) 7812 (2017) 査読有 DOI: 10.1038/s41598-017-07573-2

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 伊藤 峻太、萩原 柁、渡 健治、長坂 明臣、仲矢 道雄、黒瀬 等：心筋梗塞時におけるプロトン感知性受容体 (GPR4) の役割解析 第 92 回 日本薬理学会年会、2019 年 3 月、大阪
2. Shunta Ito, Masaki Hagiwara, Kenji Watari, Toshihide Nishi, Akiomi Nagasaka, Michio Nakaya, Hitoshi Kurose : The role of GPR4 in myocardial infarction Translational Research on Metabolic and Inflammatory Diseases, and Cancer、2018 年 12 月、韓国ソウル

3. 伊藤 峻太、萩原 柁、渡 健治、長坂 明臣、仲矢 道雄、黒瀬 等： 心筋梗塞時におけるプロトン感知性受容体 (GPR4) の役割解析 第 71 回 日本薬理学会西南部会、2018 年 11 月、福岡
4. 伊藤 峻太、萩原 柁、渡 健治、長坂 明臣、仲矢 道雄、黒瀬 等： 心筋梗塞時におけるプロトン感知性受容体 (GPR4) の役割解析 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2018、2018 年 8 月、福岡
5. 伊藤 峻太、萩原 柁、渡 健治、長坂 明臣、仲矢 道雄、黒瀬 等： 心筋梗塞時におけるプロトン感知性受容体 (GPR4) の役割解析 生体機能と創薬シンポジウム 2018、2018 年 8 月、福岡
6. 伊藤 峻太、萩原 柁、渡 健治、長坂 明臣、仲矢 道雄、黒瀬 等： 心筋梗塞時におけるプロトン感知性受容体 (GPR4) の役割解析 第 34 回日本薬学会九州支部大会、2017 年 11 月、熊本
7. Shunta Ito, Masaki Hagiwara, Kenji Watari, Toshihide Nishi, Akiomi Nagasaka, Michio Nakaya, Hitoshi Kurose : The role of GPR4 in myocardial infarction 69th Korean Pharmacology Association Fall Conference、2017 年 11 月、韓国ソウル
8. Masaki Hagiwara, Akiomi Nagasaka, Daisuke Asanuma, Hiroki Ono, Toshihide Nishi, Kenzo Hirose, Michio Nakaya, Hitoshi Kurose : pH imaging at infarct area in myocardial infarction、 69th Korean Pharmacology Association Fall Conference、2017 年 11 月、韓国ソウル
9. 長坂 明臣、小野 達貴、仲矢 道雄、黒瀬 等： プロトン感知性受容体 (TDAG8) に着目した心筋梗塞時における pH 低下の生理的影響の解析 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017 2017 年 8 月、京都
10. 萩原 柁、長坂 明臣、伊藤 峻太、仲矢 道雄、浅沼 大祐、廣瀬 謙造、黒瀬 等： 心筋梗塞モデルマウスにおける心筋梗塞時の pH 低下の in vivo イメージング 生体機能と創薬シンポジウム 2017、2017 年 8 月、京都
11. 長坂 明臣、小野 達貴、仲矢 道雄、黒瀬 等： 心筋梗塞時におけるプロトン感知性受容体 TDAG8 の役割解析 第 90 回 日本薬理学会年会 2017 年 3 月、長崎

〔その他〕

ホームページ: <http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。