

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08909

研究課題名(和文) pH感受性G蛋白関連受容体OGR1の肺腎関連における役割の解明

研究課題名(英文) The role of pH sensitive G protein OGR1 in association between lung and kidney

研究代表者

池内 秀和 (Ikeuchi, Hidekazu)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60420113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：様々な肺腎障害モデルを駆使して代表的なpH調節性GPCRであるOGR1の肺腎関連における役割および予後に与えるメカニズムを解明することを目的とした。LPSの腹腔投与による敗血症モデルの他、虚血再灌流モデルを用いて、OGR1遺伝子の有無による組織学的分析、血液ガス分析および血中・肺胞液中のサイトカイン濃度の比較を行った。結論として、設定した条件下においては両群に差を認めず、肺腎関連においては積極的な差を認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

pH調節性GPCRであるOGR1に関しては、肺腎関連に与える影響はないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We used various models of pulmonary and renal injury to elucidate the role of OGR1, a representative pH-regulating GPCR, in pulmonary and renal-related diseases and its prognostic mechanism. We compared the histological analysis, blood gas analysis, and cytokine levels in blood and alveolar fluid. In conclusion, we found no difference between the two groups under the established conditions, and no positive difference in lung-renal association.

研究分野：腎臓・リウマチ性疾患

キーワード：pH調節 肺腎関連 腸内細菌 急性腎障害 敗血症

## 1. 研究開始当初の背景

### 肺腎関連について

集中治療室領域における急性腎障害 (AKI: acute kidney injury) は、多臓器不全の一分症として発症し、持続的腎代替療法の進歩に関わらず、その予後は不良である。特に、AKI に急性呼吸不全を合併した場合の予後は極めて悪いことが報告されている (Lancet 380:756-766, 2012)。こうした関係は肺腎関連と呼ばれ、肺と腎臓に共通する何らかの因子の存在が示唆されており、いくつかの基礎研究においてその候補が明らかになりつつある。AKI の動物モデルでの観察ではあるが、ENaC や AQP-5 といった細胞外液移動に関与する分子や、種々のサイトカインやケモカイン、炎症メディエーターがそれであるが、臨床的に意義のあるものかどうかについてはされておらず、また肺腎関連がこれらの分子だけで説明できる現象であるかは不明である。

### pH 調節と GPCR

肺と腎臓に共通する因子として申請者が新たに着目したのは体内の pH 調節である。これは、主に肺と腎臓で行われており、肺では二酸化炭素が、腎臓では近位尿細管における HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> の再吸収と、皮質集合管における HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 産生 (H<sup>+</sup> の排泄) が行われ pH の調節が行われている。腎臓で酸を感知する分子として GPCR の他、キナーゼ (Pyk2, ErbB1/2)、イオンチャネル (ASICs, TASK, ROMK) などが候補として挙げられているが (J Am Soc Nephrol 23: 774-780, 2012)、このうち肺の細胞でも発現が認められているのが Ovarian cancer -protein-coupled receptor 1 (OGR1) と G protein-coupled receptor 4 (GPR4) の二つの GPCR である。

### GPCR に関して

GPCR は当初、脂質性メディエーターに対する受容体として報告されたが、近年これらの受容体が細胞外プロトンを感じることが明らかとなった (Nature.2003;425:93-8.)。ノックアウトマウスを用いた実験系により、肺障害モデルや骨代謝モデルでの役割が明らかになりつつある (PLoS One. 2013 Nov 11;8(11):e79985、J Inflamm (Lond). 2019 Feb 19;16:4., Kidney Int. 2016 Mar;89(3):565-73. )

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は様々な肺腎障害モデルを駆使して GPCR が関与する生体内の pH 調節の役割および予後に与えるメカニズムを明らかにすることである。肺腎関連の研究に関しては対象となる臓器が二つあり、様々な要因が存在することもあり現象から解析することは困難であり、報告は極めて限られる。両臓器に共通に発現している分子を標的にアプローチしていく手法が適当と考えられるが、GPCR は良い候補であると考えられた。そこで、本研究課題においては、GPCR のノックアウトマウスの腎障害モデルを作成し、腎障害による肺への影響を調査した。

## 3. 研究の方法

本研究では腎臓と肺両方に発現している分子である OGR1 と GPR4 のうち、予備実験で有意差が得られた OGR1 を対象にノックアウトマウスを用いて実験を行った。

### In Vivo モデル

OGR1 のノックアウトマウス (KO) および野生型マウス (WT) は研究協力者から譲与を受け、用意した。肺腎障害モデルとしては腎臓の虚血再灌流モデル (IRI: Ischemic re-perfusion injury IRI) と LPS による敗血症モデル (腹腔内投与) を用いた。対照群として

IRI は麻酔下で右腎を摘除後、左腎動静脈に非外傷性クリップを用いて 30 分間血流を遮断する。LPS による敗血症モデルではマウスに 1 ug/mg の LPS を腹腔内投与した。

肺・腎両臓器での pH 調節能の破綻による呼吸障害の悪化をその機序として考えた。腎障害および呼吸障害の評価として

- 1) 腎の病理学的評価を行い、OGR1 遺伝子のノックアウトによりどのような差異が生じているのかを解析した
- 2) 血液の pH を血液ガス測定器により計測した
- 3) 血液中および肺液中のサイトカイン濃度 (Th1 サイトカイン: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, Th2 サイトカイン: IL-4, IL-10, IL-13) および臓器中の免疫細胞数を免疫染色 (T 細胞: CD3, CD4, CD8, B 細胞: CD20) や real time PCR によりサイトカインの遺伝子発現を調査した。LPS による肺血症モデルでは、血清 IL-18 濃度も測定を行った。

4) 2 群間の比較統計には T 検定を用い、P<0.05 を有意差ありとした。

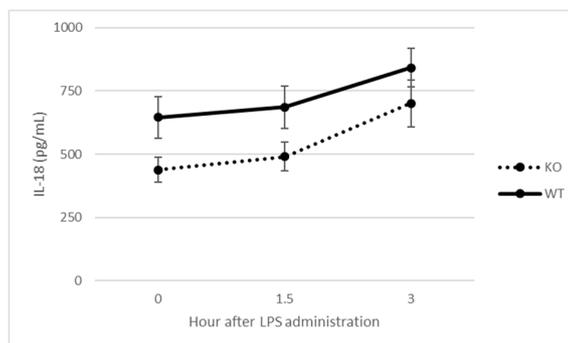
#### 4 . 研究成果

腎障害モデルにおいて OGR1 遺伝子の有無による差を調査した。腎組織障害スコア、24 時間後に BUN、血液ガス、血中 TNF-、血中 IL-6 は KO と WT で有意な差を認めなかった。続いて、肺胞洗浄液中の細胞数、各種サイトカイン濃度、血清中のサイトカイン濃度を測定した。が、両者に差を認めなかった(表 1、各群 Sham 2 例、WT 4 例、KO 4 例)

	Sham	WT	KO	P (WT vs KO)	
腎組織障害	0.5 ± 0.3	2.3 ± 0.5	3.3 ± 0.5	0.19	
血液	BUN (mg/dL)	22.4 ± 0.3	167.5 ± 11.1	196.3 ± 5.9	0.07
	pH	7.25 ± 0.14	6.94 ± 0.03	6.96 ± 0.01	0.61
	HCO3-(mmol/L)	24.8 ± 0.10	14.3 ± 1.7	14.3 ± 1.1	0.99
	TNF- (pg/mL)	79.9 ± 1.85	92.7 ± 2.76	95.7 ± 6.12	0.68
	IL-6 (pg/mL)	28.3 ± 0.47	431.5 ± 54.3	364.9 ± 93.1	0.56
	CCL2 (pg/mL)	検出感度未満	11.3 ± 8.4	11.3 ± 4.5	1
	CXCL2 (pg/mL)	検出感度未満	検出感度未満	検出感度未満	1
肺胞 洗浄液	TNF- (pg/mL)	7.9 ± 1.2	12.5 ± 2.5	8.1 ± 0.8	0.14
	IL-6 (pg/mL)	7.9 ± 3.7	7.3 ± 0.7	7.1 ± 1.7	0.94
	CCL2 (pg/mL)	0.47 ± 0.18	0.91 ± 0.28	0.45 ± 0.21	0.28
	CXCL2 (pg/mL)	1299 ± 477	1373 ± 368	888 ± 213	0.32

表 1

続いて敗血症モデルでも評価を行った (WT 群 8 例、KO 群 10 例)。LPS 投与後の生存率や、腎組織・肺組織ともに有意な差を認めなかったが、血清 IL-18 値に関して有意な差を認めた。ただし、投与前の段階から有意に KO 群で低値であり、LPS に対する反応の差ではなく、OGR1 遺伝子の欠損自体が IL-18 の発現に何らかの影響を与えたものと推定される (図 1)。



#### 結論

本研究では、OGR1 遺伝子の有無による肺腎障害モデルの程度の差は認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池内秀和
2. 発表標題 pH感受性受容体Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1の急性腎障害モデルにおける役割
3. 学会等名 日本腎臓学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------