

機関番号：82302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591916

研究課題名(和文)内視鏡手術時の二酸化炭素気腹による抗炎症性応答とプロトン感知性受容体

研究課題名(英文)The role of proton-sensing G-protein coupled receptors(GPCRs) in the regulation of inflammatory cytokine production during endoscopic surgery

研究代表者

村田 直哉(MURATA, Naoya)

群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員

研究者番号：00533473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：リポポリサッカライド(LPS)誘導性の炎症性サイトカインの産生制御におけるプロトン感知性受容体の役割について解析した。腹腔内のLPSの投与はTNF- α 産生を高めた。この炎症性サイトカイン産生はTDAG8やGPR4欠損により増強する傾向にあったが、有意な差としては確認されなかった。腹腔内マクロファージを細胞外pHが酸性状態でインキュベートすると、LPSによるTNF- α のタンパク産生、mRNA発現が抑制される。我々の解析結果は、酸性pHによる炎症性サイトカイン産生抑制の少なくとも一部はTDAG8/cAMP/PKAを介していることを示した。

研究成果の概要(英文)：The role of proton-sensing GPCRs in the regulation of lipopolysaccharide(LPS)-induced inflammatory cytokine production was investigated. In vivo injection of LPS into mice resulted in the remarkable accumulation of TNF- α . The LPS-induced action tends to be enhanced in the mice deficient in TDAG8 or GPR4; however, the effects of receptor deficiency were not significant. Extracellular acidification inhibited LPS-induced TNF- α protein and mRNA production in mouse peritoneal macrophages in vitro. Our results suggest that acidic pH inhibits inflammatory cytokine production at least partly through TDAG8/cAMP/PKA pathways in mouse macrophages.

研究分野：臨床腫瘍学、生化学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：プロトン感知性受容体 OGR1受容体ファミリー TDAG8 抗炎症性応答

1. 研究開始当初の背景

内視鏡を用いた外科手術は低侵襲性のため、疼痛の軽減、出血量の軽減が期待され、現在では胆嚢摘出をはじめ、大腸癌、早期胃癌、子宮筋腫、子宮内膜症など外科、産婦人科領域で頻繁に用いられている。この内視鏡を用いた外科手術は、円滑な手術の遂行のために、通常気腹とよばれる二酸化炭素で腹部を膨らませた状態で行われている。この二酸化炭素気腹は肺や心臓、静脈の圧迫による無気肺、血栓症などの合併症を生じるデメリットがある反面、手術時の炎症性サイトカインの産生を抑制することから、内視鏡手術後の疼痛の軽減、回復に積極的に関わっていることが、米国の Talamini 等のグループによって報告されている。しかし、この二酸化炭素気腹法がどのような機構で炎症性サイトカイン産生を抑制するのかは不明である。OGR1 受容体ファミリーに分類される G 蛋白質共役受容体 (OGR1, GPR4, TDAG8, G2A) は、当初リゾ脂質性のシグナル分子の受容体として同定されてきたが、我々を含む国内外のグループによって、細胞外プロトン感知機構、すなわち pH センサー機能など従来の G 蛋白質共役受容体 (GPCR) にはない新しい機能が存在することが明らかにされてきた。炎症性サイトカインの産生は、主にマクロファージから分泌されることから、腹腔内マクロファージに発現するプロトン感知性受容体が細胞外 pH を感知して、炎症性サイトカインの分泌を制御していることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、二酸化炭素気腹時に予想される細胞外 pH 低下が、プロトン感知性受容体を介して炎症性サイトカイン産生を抑制するという仮説の実証をめざした。実際、酸性 pH はリポポリサッカライド (LPS) による炎症性サイトカイン産生を抑制すること、そのファミリー受容体の一つである TDAG8 受容体が欠損したマクロファージでは、この酸性 pH 効果が減弱しているという結果を既に得ている。しかし、この TDAG8 依存性、非依存性の炎症性サイトカイン産生の抑制機構は不明であった。

3. 研究の方法

個体レベルの実験では、LPS をマウスの腹腔内に投与して一定時間後に採血を行い、炎症性サイトカイン濃度を測定した。同様な実験を TDAG8 ならびに GPR4 欠損マウスでも行った。

細胞レベルの実験では、マウス腹腔内にチオグリコレート刺激を行い、4 日後に浸潤してきた細胞をマクロファージとして使用した。LPS などの炎症性サイトカイン産生刺激の存在下で細胞外 pH を変化させ、マクロファージによる TNF- α やインターロイキン 6 (IL-6) 産生を ELISA 法で測定した。同様な実験を TDAG8 ならびに OGR1 欠損マウス由来のマクロファージを用いて行った。さらに G2A の関与については、siRNA によるノックダウン法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 敗血症モデルにおけるプロトン感知性受容体の役割

LPS をマウス腹腔内に投与すると、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生が亢進し、LPS の投与量が多くなると多臓器不全によって死亡する。LPS 投与量に応じて血中の炎症性サイトカイン濃度が上昇した。TDAG8 欠損マウスについても野生型マウスと同様に LPS 投与による血中の炎症性サイトカイン濃度の測定とマウスの生存を観察した。その結果、TDAG8 欠損マウスでは血中の炎症性サイトカイン濃度が高い傾向がみられたが、有意な変化としては確認されなかった。同様に GPR4 欠損マウスについても LPS 投与の実験を行った。この際にも、GPR4 欠損マウスで炎症性サイトカイン濃度が高い傾向がみられたが、有意な変化としては確認できなかった。今後、さらに例数をふやし、その点を明らかにしたいと思う。一方で個体差が大きく、投与法の改善などの必要性があるかもしれない。

(2) 細胞レベルの炎症性サイトカイン産生抑制機構

マウスマクロファージを LPS (トールライク受容体 TLR4 アゴニスト)、あるいは polyinosinic-polycytidic acid (poly (I:C)) (トールライク受容体 TLR3 アゴニスト) で処理すると、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインが産生される。この応答は細胞外 pH を低下させると抑制される。この pH 低下による応答抑制は mRNA レベルでも確認されている。そこで、同様な実験を TDAG8 欠損マウス由来のマクロファージで行ったところ、著明な減弱が観察された。しかし、pH 低下による効果はすべて TDAG8 欠損で消失することではなく、TDAG8 非依存性の作用の存在が示唆された。

TDAG8 は、通常 Gs/cAMP 系に関連していることが知られている。実際、TDAG8 受容体刺激では cAMP が上昇すること、また cAMP を上昇させるプロスタグランジンや β -アドレナリンアゴニスト、cAMP 誘導体が LPS によるサイトカイン産生を抑制する。そこで、Gs に対する siRNA によるノックダウン法、A キナーゼ阻害薬である H89 などを用いて解析したところ、pH 応答が抑制された。したがって、酸性 pH は TDAG8/Gs/アデニル酸シクラーゼ/cAMP/A キナーゼを介していることが証明された。

トールライク受容体 TLR4、TLR3 受容体刺激による炎症性サイトカインの産生には、NF- κ B、AP-1 などの転写因子が関与している。そこで、これらの転写因子活性化の上流のシグナル伝達系である Ik-B のリン酸化、プロテオリシスによる蛋白分解、ERK リン酸化、p38MAP キナーゼのリン酸化などをウェスタンブロットング法で追跡した。しかし、LPS でこれらの活性化は確認されたが、酸性 pH による有意な効果は観察されなかった。従って、酸性 pH はこれらの経路とは異なる経路を修飾していることが推定された。

マクロファージでは TDAG8 に加え OGR1、G2A を著明に発現しているため、OGR1 欠損マウス由来のマクロファージ、G2A を siRNA でノックダウンさせた細胞でも解析した。しかし、OGR1 欠損や G2A ノックダウンの効果は観察されなかった。したがって、これらのプロトン感受性受容体の関与は否定的である。

PI3 キナーゼの阻害薬であるワートマンニンを投与すると、TDAG8 欠損で観察される酸性 pH による炎症性サイトカイン産生抑制が消失する傾向が認められた。したがって、PI3 キナーゼが TDAG8 非依存性の抑制に何らかの役割りを発揮していることが推定された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

Sato K, Tobo M, Mogi C, Murata N, Kotake M, Kuwabara A, Im DS, and Okajima F.: Lipoprotein-associated lysolipid molecules are differentially involved in high-density lipoprotein- and its oxidized form-induced neurite remodeling in PC12 cells. *Neurochem Int* 68:38-47 (2014) doi: 10.1016/j.neuint.2014.02.005. 査読有

Jin Y, Sato K, Ayaka Tobo, Mogi C, Tobo M, Murata N, Ishii S, Im DS, Okajima F.: Inhibition of interleukin-1 production by extracellular acidification through the TDAG8/cAMP pathway in mouse microglia. *J Neurochem* 129:683-695 (2014) DOI: 10.1111/jnc.12661 査読有

Mogi C, Nakakura T, and Okajima F.: Role of extracellular proton-sensing receptors in regulation of insulin secretion and pancreatic β -cell functions. *Endocrine J.* (2014) 61:101-110 (2014) <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0380> 査読有

Okajima F.: Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cellular Signalling* 25: 2263-2271 (2013) doi: 10.1016/j.cellsig.2013.07.022. 査読有

Seki K, Hisada T, Kawata T, Kamide Y, Dobashi K, Yamada M, Mori M, Okajima F, Ishizuka T.: Oxidative stress potentially enhances Fc ϵ R1-mediated leukotriene C₄ release dependent on the late-phase increase of intracellular glutathione in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 439:357-362 (2013) doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.081. 査読有

Park SJ, Lee KP, Kang S, Chung HY, Bae YS, Okajima F, and Im DS.: Lysophosphatidylethanolamine utilizes LPA1 and CD97 in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cellular Signalling* 25: 2147-2154. (2013) doi: 10.1016/j.cellsig.2013.07.001. 査読有

Aoki H, Mogi C, Hisada T, Nakakura T, Kamide Y, Ichimonji I, Tomura H, Tobo M, Sato K, Tsurumaki H, Dobashi K, Mori T, Harada A, Yamada M, Mori M, Ishizuka T, and Okajima F.: Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells is required for airway responses in a murine asthma model. *PLoS ONE* 8: e79985(2013) doi:

10.1371/journal.pone.0079985. 査読有
Wang J, Sun Y, Tomura H, Okajima F.: Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 induces the expression of the pain mediator prostaglandin E2 in response to an acidic extracellular environment in human osteoblast-like cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 44:1937-1941 (2012) doi: 10.1016/j.biocel.2012.07.015. 査読有
Nakakura T, Mogi C, Tobo M, Tomura H, Sato K, Kobayashi M, Ohnishi H, Tanaka S, Wayama M, Sugiyama T, Kitamura T, Harada A, and Okajima F.: Deficiency of Proton-Sensing Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1 Attenuates Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Endocrinology* 153:4171-4180 (2012) doi: 10.1210/en.2012-1164. 査読有
Komachi M, Sato K, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Ohta H, Tomura H, Kimura T, Im DS, Yanagida K, Ishii S, Takeyoshi I, and Okajima F.: An orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. *Cancer Sci* 103:1099-1104 (2012) doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02246.x. 査読有
He XD, Tobo M, Mogi C, Nakakura T, Komachi M, Murata N, Takano M, Tomura H, Sato K, Okajima F.: Involvement of proton-sensing receptor TDAG8 in the anti-inflammatory actions of dexamethasone in peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 415:627-631 (2011) doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.122. 査読有
Matsuzaki S, Ishizuka T, Yamada H, Kamide Y, Hisada T, Ichimonji I, Aoki H, Yatomi M, Komachi M, Tsurumaki H, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Mogi C, Sato K, Tomura H, Mori M, and Okajima F.: Extracellular acidification induces connective tissue growth factor production through proton-sensing receptor OGR1 in human airway smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 413: 499-503 (2011) doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.087. 査読有

Uchiyama T, Tomono S, Utsugi T, Ohyama Y, Nakamura T, Tomura H, Kawazu S, Okajima F., and Kurabayashi M.: Constitutively active heat shock factor 1 enhances glucose-driven insulin secretion. *Metabolism* 60:789-798 (2011) doi: 10.1016/j.metabol.2010.07.029. 査読有
Sato K, Horiuchi Y, Jin Y, Malchinkhuu E, Komachi M, Kondo T, Okajima F.: Unmasking of LPA(1) receptor-mediated migration response to lysophosphatidic acid by interleukin-1 -induced attenuation of Rho signaling pathways in rat astrocytes. *J Neurochem* 117:164-174 (2011) doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07188.x. 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

青木悠、茂木千尋、久田剛志、鶴巻寛朗、上出庸介、中倉敬、笠原礼光、西岡正樹、関香織、矢富正清、小野昭浩、古賀康彦、土橋邦生、石塚全、山田正信、岡島史和、プロトン感知性受容体 OGR1 の気管支喘息における役割、第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2013 年 11 月 28 日～30 日、ホテルニューオオタニ(東京)
小竹美絵、佐藤幸市、岡島史和、N1E115 神経細胞における細胞外酸性 pH による cGMP 産生機構、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日～12 日、パシフィコ横浜(横浜)
五十嵐忠彦、村山佳予子、入沢寛之、村田直哉、Follow-up of reactivation of HB virus in HBV antibody positive lymphoma after chemotherapy in a single institution、第 11 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2013 年 8 月 29 日～31 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)
村山佳予子、入沢寛之、村田直哉、五十嵐忠彦、化学療法後に甲状腺の再腫大を認めた甲状腺原発悪性リンパ腫の 2 例、第 53 回日本リンパ網内系学会総会、2013 年 5 月 16 日～17 日、国立京都国際会館(京都)
岡島史和、プロトン感知性 OGR1 ファミリー - GPCR とその機能、第 85 回日本生化学

会大会、2012年12月14~16日、福岡国際会議場(福岡)

中倉敬、茂木千尋、戸村秀明、岡島史和、藤 細胞におけるプロトン感知性 OGR1 を介したインスリン分泌シグナルの解析、第85回日本生化学会大会、2012年12月14~16日、福岡国際会議場(福岡)

Ye Jin, Koichi Sato, Fumikazu Okajima、Involvement of TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of interleukin-1beta production in microglia、第85回日本生化学会大会、2012年12月14~16日、福岡国際会議場(福岡)

佐藤幸市、小竹美絵、岡島史和、N1E115 神経細胞における細胞外酸性 pH による細胞内 Ca²⁺動員、Akt リン酸化とプロトン感知性受容体の関与、第85回日本生化学会大会、2012年12月14~16日、福岡国際会議場(福岡)

上出庸介、石塚全、鶴巻寛朗、山下均、山田秀典、宇津木光克、小野昭浩、古賀康彦、久田剛志、土橋邦生、岡島史和、森昌朋、プロトンはマウス肥満細胞からのサイトカイン産生を調節する、第62回日本アレルギー学会秋季学術大会、2012年11月29日~12月1日、大阪国際会議場(大阪)

青木悠、茂木千尋、久田剛志、石塚全、上出庸介、鶴巻寛朗、土橋邦生、岡島史和、森昌朋、プロトン感知性 G タンパク質共役型受容体 OGR1KO マウスにおける気管支喘息モデルの解析、第62回日本アレルギー学会秋季学術大会、2012年11月29日~12月1日、大阪国際会議場(大阪)

Tadahiko Igarashi, Kayoko Murayama, Hiroyuki Irisawa, Naoya Murata, Masaru Kojima, Yasuhiro Yanagida、Primary malignant lymphoma of the breast presenting a huge inflammatory breast mass、第74回日本血液学会学術集会、2012年10月19日~21日、国立京都国際会館(京都)

Kayoko Murayama, Hiroyuki Irisawa, Naoya Murata, Tadahiko Igarashi、Incidence and outcome of the infectious diseases after MEAM therapy with autoPBSCT for lymphoma、第74回日本血液学会学術集会、2012年10月19

日~21日、国立京都国際会館(京都)
Naoya Murata, Tadahiko Igarashi, Hiroyuki Irisawa, Kayoko Murayama, Yoshimasa Nakazato、A case of Enteropathy-associated T-cell lymphoma(EATL) complicating CLL/SLL、第74回日本血液学会学術集会、2012年10月19日~21日、国立京都国際会館(京都)

佐藤幸市、小町麻由美、当房雅之、茂木千尋、岡島史和、ヒト脾臓がん細胞の浸潤・転移に対する経口可能なリゾホスファチジン酸受容体アンタゴニスト Ki16198 の抑制作用、第54回日本脂質生化学会、2012年6月7~8日、九州大学医学部百年講堂(福岡)

Kayoko Murayama, Tadahiko Igarashi, Naoya Murata, Hiroyuki Irisawa, Masaru Kojima、Feasibility of MEAM therapy with autologous stem cell transplant for high-risk/relapsed lymphoma、第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14日~16日、名古屋国際会議場(名古屋)

Naoya Murata, Hiroyuki Irisawa, Kayoko Murayama, Tadahiko Igarashi、Diffuse large B cell lymphoma(DLBCL) of stomach with fatal Edwardsiella tarda sepsis、第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14日~16日、名古屋国際会議場(名古屋)

6. 研究組織

(1)研究代表者

村田 直哉 (MURATA, Naoya)
群馬県衛生環境研究所・研究企画係・研究員
研究者番号：00533473

(2)研究分担者

岡島 史和 (OKAJIMA, Fumikazu)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：30142748