

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670617

研究課題名(和文)脳虚血にpH感知性受容体は機能しているか～受容体欠損マウスを用いた解析

研究課題名(英文)Are proton-sensing receptors working in ischemia-analysis with receptor-deficient mice

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：虚血部位では酸性化が伴う。しかし、酸性pHに対する神経系細胞の応答とその機構は不明である。本研究では脳の機能制御におけるOGR1ファミリー-受容体の役割を調べた。受容体欠損マウスの中脳動脈閉塞再灌流による解析、また、ミクログリア、神経細胞のモデル系細胞としてN1E115細胞での酸性pH応答機構を解析した。その結果、TDAG8が脳虚血再灌流後の脳傷害に保護的に機能していること、その作用にミクログリアの関与が示唆された。また、神経細胞ではOGR1がnNOS/cGMP系にかかわっている可能性が示唆された。このように、OGR1受容体ファミリーは脳機能制御に受容な役割を担っている。

研究成果の概要(英文)：It is well known that acidification takes place in the ischemia region. However, how acidic pH regulates neuronal cell functions remains uncharacterized yet. In the present study, we characterized the roles of OGR1 family GPCRs, which have been recently identified as extracellular proton-sensing receptors, in ischemia reperfusion model in vivo and in mouse microglia and cultured N1E115 cells as neuronal cell model in vitro. We found that TDAG8 is functioning as protective for brain damage after the ischemia reperfusion. TDAG8 in microglia might be involved in the protective effects. We also found that acidic pH activates nNOS/cGMP signaling through OGR1 in N1E115 cells. Thus, OGR1 family GPCRs are involved in the regulation of brain functions.

研究分野：生理化学

キーワード：プロトン 虚血再灌流 脳梗塞 ミクログリア 神経細胞死 GPCR TDAG8 OGR1

1. 研究開始当初の背景

虚血部位では低酸素と酸性化(低 pH)が伴うことはよく知られている。虚血部位では酸素供給の不足により、解糖系/乳酸産生が亢進し pH が 6.0 近くまで低下する場合もある。低酸素時の応答においては HIF-1 を中心とした解析が進んでいる。即ち、HIF-1 は血管新生、トランスポーター、アポトーシスの回避に関わる様々な蛋白の転写を高め、低酸素から細胞を守っている。一方、酸性 pH に対する神経系細胞の応答とその機構はほとんど解析されていない。また、実際に虚血をおこした個体での再還流後の応答における pH 受容体の役割は不明である。最近、私達の研究グループを含む国内外のグループによって、従来リゾ脂質性の G 蛋白質共役受容体 (GPCR) と報告されていた OGR1 ファミリー (OGR1, GPR4, TDAG8) が細胞外の pH (プロトン) を感知して細胞内にシグナルを伝達する GPCR であることが判明した。

2. 研究の目的

私達はこのユニークな GPCR の生体での機能を知る目的で受容体欠損マウスの作成を手がけ、OGR1 受容体ファミリー欠損マウスを作成した。そこで、本研究では虚血再還流後の細胞ダメージとその回復過程に OGR1 ファミリー受容体がどのように関わっているかを受容体欠損マウスの中大脳動脈閉塞再灌流による(脳梗塞モデル)解析、また、ミクログリア、神経細胞のモデル系細胞として N1E115 細胞での酸性 pH 応答機構の解析によって明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデル:

中大脳動脈にフィラメントを挿入し、一定時間(本研究では 30 分)の虚血後、フィラメントを抜き、再灌流 24 時間後のマウスの運動機能、脳組織の TTC 染色(生きたミトコンドリア活性)、ニッスル染色(神経細胞特異的な染色)などを行った。

(2) ミクログリアの調製:

生後 1~2 後のマウス胎仔脳をコラゲナーゼ処理により細胞を遊離し、常法に従って、ミクログリア細胞を調製した。ミクログリア特異的染色により 95%以上がミクログリアであった。

(3) N1E115 神経細胞:

マウス由来の神経細胞株を 10% FBS を含む DMEM 中で培養して実験に用いた。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞モデル

中大脳動脈の虚血(30 分)再灌流による 24 時間後の TTC 染色やニッスル染色、また、運動機能測定から梗塞で明らかな傷害が観察された。また、しっぽを持ってマウスを逆さにして、起き上がろうとする運動機能の測定でも、対象マウスと梗塞を行ったマウスであきらかな運動機能の違いが観察された。それをスコア化することで、運動機能の測定が可能であった。そこで、このような虚血再灌流後の傷害に対する TDAG8 の役割を知る目的で、TDAG8 欠損マウスでも同様な実験をおこなった。また、例数は十分ではないが、TDAG8 欠損で傷害が進行している傾向があった。このことは、TDAG8 が虚血再灌流後の傷害に対して保護的に機能していることを示唆しており、今後、結果を再確認し、さらに、炎症性サイトカインの産生など他の指標を調べる必要がある。

(2) ミクログリアでの解析

マウス胎仔から採取したミクログリアでは TDAG8 が主要なプロトン感知性受容体である。酸性 pH は LPS による炎症性サイトカイン(IL-1 β)産生を抑制する。この応答は TDAG8 欠損マウス由来のミクログリアでは有意に抑制された。cAMP 誘導体(PKA 特異的誘導体、Epac 特異的誘導体)、PKA 阻害薬の効果などを調べた実験から、pH 低下が TDAG8/cAMP/PKA を介して LPS 応答を抑制していることが判明した。また、阻害薬の実験から、LPS による

(IL-1 β)産生はNA κ B, JNK, ERKが関与していること、その中で、酸性pHがJNK, ERKを抑制することが見いだされた。今後、酸性pHのMAPK活性制御がTDAG8を介しているかどうかを見極める必要がある。

(3) N1E115細胞での解析

N1E115神経細胞では酸性pHによって、カルシウム動員、Aktのリン酸化、nNOSリン酸化、cGMP産生が観察される。N1E115細胞ではOGR1とGPR4が発現している。そこで、OGR1に対するsiRNAを用い受容体ノックダウン細胞を作成して解析したところ、細胞外pHの低下はOGR1/Gq/ホスホリパーゼC/カルシウム/nNOSの活性化を介してcGMP産生を促進していることが推定された。AktはnNOSのS1412をリン酸化してnNOSを活性化する可能性があるが、Akt/nNOSリン酸化を介した経路は細胞外pH低下によるcGMP産生制御にはあまり関与していないことが推定された。

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11件)

1. Mochimaru Y, Azuma M, Oshima N, Ichijo Y, Satou K, Matsuda K, Asaoka Y, Nishina H, Nakakura T, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H.: Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebra fish. *Biochem Biophys Res Commun*. In press (2015) 査読有
doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.105
2. Aoki H, Mogi C, Okajima F: Ionotropic and metabotropic proton-sensing receptors involved in airway inflammation in allergic asthma. *Mediators of Inflammation* volume 2014, Article ID 712962, 8 pages (2014) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/712962>
3. Kotake M, Sato K, Mogi C, Tobo M, Aoki H, Ishizuka T, Sunaga N, Imai H, Kaira K, Hisada T, Yamada M, Okajima F: Acidic pH increases cGMP accumulation through the OGR1/phospholipase C/Ca²⁺/neuronal NOS pathway in N1E-115 neuronal cells. *Cellular Signaling* 26:2326-2332 (2014) 査読有

doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.010

4. Park SJ, Lee KP, Kang S, Lee J, Sato K, Chung HY, Okajima F, Im DS.: Sphingosine 1-phosphate induced anti-atherogenic and atheroprotective M2 macrophage polarization through IL-4. *Cellular Signalling* 26:2249-2258 (2014) 査読有
doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.009
5. 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) 査読有
doi: 10.1016/j.neuint.2014.02.005.
6. in Y, Sato K, Ayaka Tobo, Mogi C, Tobo M, Murata N, Ishii S, Im DS, Okajima F: Inhibition of interleukin-1 β production by extracellular acidification through the TDAG8/cAMP pathway in mouse microglia. *J Neurochem* 129:683-695 (2014) 査読有
DOI: 10.1111/jnc.12661
7. 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*. 61:101-110 (2014) 査読有
<http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0380>
8. 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) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0079985.
9. Okajima F: Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cellular Signalling* 25: 2263-2271 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.cellsig.2013.07.022.
10. Seki K, Hisada T, Kawata T, Kamide Y, Dobashi K, Yamada M, Mori M, Okajima F, Ishizuka T.: Oxidative stress potentially enhances FceRI-mediated leukotriene C₄ release dependent on the late-phase increase of intracellular glutathione in mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 439:357-362 (2013) 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.081.

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

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 青木悠、茂木千尋、久田剛志、砂長則明、古賀康彦、小野昭浩、解良恭一、上出庸介、関香織、矢富正清、鶴巻寛朗、小竹美絵、西岡正樹、笠原礼光、土橋邦生、山田正信、石塚全、岡島史和: Proton-sensing OGR1 on dendritic cell is required for airway responses in a murine asthma model. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会, 2014 年 4 月 25 日 ~ 27 日, 大阪国際会議場 (大阪)
2. 上出庸介、石塚全、笠原礼光、西岡正樹、解良恭一、小野昭浩、古賀康彦、砂長則明、久田剛志、土橋邦生、岡島史和、山田正信: プロトンはマウス肥満細胞の機能を制御する. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会, 2014 年 4 月 25 日 ~ 27 日, 大阪国際会議場 (大阪)
3. 青木悠、茂木千尋、久田剛志、古賀康彦、小野昭浩、関香織、矢富正清、上出庸介、鶴巻寛朗、西岡正樹、土橋邦生、森昌朋、石塚全、山田正信、岡島史和: 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 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2014 年 5 月 9 日 ~ 11 日, 国立京都国際会館(京都)
4. 上出庸介、石塚全、西岡正樹、鶴巻寛朗、小野昭浩、古賀康彦、久田剛志、土橋邦生、岡島史和、山田正信: プロトンはマウス肥満細胞の機能を調整する. 第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2014 年 5 月 9 日 ~ 11 日, 国立京都国際会館(京都)
5. 青木悠、茂木千尋、佐藤幸市、岡島史和: プロトン感知性 G タンパク質共役受容体 OGR1 の気管支喘息における役割. 第 13 回生命科学研究会, 2014 年 6 月 20 日 ~ 21 日, JR タワーホテル日航札幌 (札幌)
6. 岡島史和、青木悠、茂木千尋、佐藤幸市: 気管支喘息におけるプロトン感知性 G タンパク質共役受容体 OGR1 の役割. 第 13 回生体機能研究会, 2014 年 7 月 18 日 ~ 19 日, ホテルパーク (岐阜)

7. 佐藤幸市、金暉、当房文香、茂木千尋、岡島史和: マウスミクログリアにおいて酸性 pH は TDAG8/PKA を介して MAPK 系を抑制することによって IL-1 産生を抑制する. 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 15 日 ~ 18 日, 国立京都国際会館 (京都)

8. Haruka Aoki, Chihiro Mogi, Takeshi Hisada, Takashi Nakakura, Yosuke Kamide, Isao Ichimonji, Hideaki Tomura, Masayuki Tobo, Koichi Sato, Hiroaki Tsurumaki, Kunio Dobashi, Tetsuya Mori, Akihiro Harada, Masatomo Mori, Tamotsu Ishizuka, Fumikazu Okajima: Critical role of proton-sensing OGR1 in dendritic cells in development of asthma. International symposium on "Homeostasis through development, life, and diseases." 2014 年 11 月 7 日, Tojo Hall, Gunma University (前橋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://signal-transduction.imcr.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし