

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 11 月 26 日現在

機関番号：32305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670657

研究課題名(和文) 受容体欠損マウスを用いた関節リウマチにおけるpH感知性受容体の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of pH-sensing receptors in arthritis using receptor-deficient mice

研究代表者

桑原 敦志 (KUWABARA, ATSUSHI)

高崎健康福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90323344

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)：関節リウマチなどの炎症部位では炎症性細胞の集積などによる解糖系の亢進などによって、低pH状態になっていることが指摘されている。しかし、低pHが関節リウマチの病態にどのようにかかわっているかは不明である。本研究では、最近同定されたpH感知性G蛋白質共役受容体、特にGPR4がどのように関わっているかについて、受容体欠損マウスのコラーゲン関節リウマチモデルを用いて解析した。また、今後のプロトン受容体の創薬をめざし、GPR4に特異性をもつ低分子化合物の特徴についても解析した。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that acidic microenvironment takes place in inflammatory sites in rheumatoid arthritis due to the stimulation of anaerobic glycolysis by infiltrated inflammatory cells. However, how acidification is involved in the pathophysiology remains unknown. In the current study, we planned to know the role of proton-sensing GPCRs, especially GPR4, in the development of arthritis. To this end, we analyzed the collagen-induced arthritis model using GPR4 knockout mouse. We also characterized chemicals which affect GPR4 activities in order to develop novel drugs related to GPR4.

研究分野：解剖生理学

キーワード：コラーゲン関節リウマチモデル Imidazopyridine化合物 GPR4

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチの炎症部位では低酸素と酸性化(低 pH)が伴う。これは炎症性細胞の解糖系亢進による乳酸産生の増加に基づく。実際、炎症部位では低 pH になっている報告はあるが、この酸性 pH と関節リウマチの炎症との関係については不明の点が多い。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。一方、今後、pH 受容体を創薬標的の考えた場合、特異性の高い低分子化合物は極めて有用である。最近、特許情報に imidazopyridine 化合物が GPR4 作用を抑制するという報告がなされた。しかし、特許情報の例にもれず、特異性などの情報はほとんど記載されていない。

2. 研究の目的

私達はこの pH を感知する GPCR の生体での機能を知る目的で受容体ノックアウトマウスを作成した。そこで、本研究では関節リウマチの発症、進展に OGR1 ファミリー受容体、特に GPR4 がどのように関わっているかを受容体ノックアウトマウスのコラーゲン関節リウマチモデルを用いて明らかにすることを目指した。

また、GPR4 の機能解析を研究者が気軽にできるためには、特許情報に記載された薬物が実際に GPR4 に特異性があるかどうかを知る事は極めて重要である。そこで、特許情報に基づいて合成された imidazopyridine 化合物の GPR4 に対する特異性について解析した。

3. 研究の方法

(1) コラーゲン関節リウマチモデル：

野生型マウスと GPR4 ノックアウトマウスを用い、コラーゲン投与(熱変性結核菌を含む Freund のアジュバンドで乳濁化したトリコラーゲン II を尻尾に皮内投与)による関節リウマチ発症とその炎症の程度を解析した。スコアは 0(無変化)、1(関節の腫れ)、2(下肢の腫れ)、3(関節、下肢の腫れ)で4本の足についてスコア化した(従って最高は16になる)。一回目の投与21日後に再度、コラーゲンを投与し、その日を0日とした。

(2) Imidazopyridine 化合物の解析：

特許情報に基づいて北海道大学・周東教授のグループが作成した imidazopyridine 化合物を用いた。HEK293 細胞に GPR4 やファミリー受容体である OGR1、GPR4、G2A 各受容体と pSRE-luc、pRL-TK を発現して、ルシフェラーゼ活性を測定し、SRF を介した SRE 転写活性を評価した。さらに、imidazopyridine 化合物の作用機構を調べるため、GPR4 の pH 感知に必要なヒスチジンをフェニルアラニンに変化させた変異 GPR の発現細胞を用い、ヒスチジンに作用して抑制作用を発揮していると考えられるサイコシンの抑制作用との比較により解析した。

4. 研究成果

(1) コラーゲン関節リウマチモデル：

最初にマウスの系統を C57BL/6 系統を用いた解析した。経過日数の14日目から両マウスに少しずつ関節腫脹がみとめられたものの、19日目までのスコアは4点程度で腫脹は軽度にとどまり、その後、31日目までスコアの変化は認めず、野生マウスとノックアウト群の関節腫脹に差はみられなかった。

そこで、炎症の程度が大きいと言われている DBA1 系統を用いて解析した。その結果、野生型マウスでは7日目あたりから腫脹が観察されはじめ、2~3週間

後に1～2程度のスコアになり、6週間後にほぼピークのスコア6に達した。一方、GPR4 ノックアウトマウスでは、腫脹は5日目から観察されはじめ、2～3週間後では3～4のスコアを示した。しかし、その後の腫脹の悪化は軽微であり、6週後のピークのスコアは野生型とほぼ同様であった。このように、GPR4 ノックアウトマウスでは関節炎の発症が早い時期からおこっている可能性が考えられた。今後、例数を増やすとともに、炎症開始の初期、後期の下肢をパラフィン包埋後、ヘマトキシリン・エオシン染色で炎症性細胞の浸潤、炎症の程度を比較する必要がある。

(2) Imidazopyridine 化合物の解析：

GPR4 発現細胞ではインキュベーション中の pH を低下させると pH が 7.2 くらいから SRE 活性が上昇し、pH6.8 前後で最大になる。この活性化は細胞をあらかじめ imidazopyridine 化合物を添加しておく、著明に抑制された。一方、OGR1、GPR4、G2A 受容体を発現した細胞では、pH 依存性や活性の程度は GPR4 とは異なるが、いずれの場合も酸性 pH で SRE 活性の増加を観察した。しかし、これらの酸性 pH による効果に対して imidazopyridine 化合物は無効であった。このように、少なくとも HEK293 細胞を用いたモデル系では imidazopyridine 化合物は特異的に GPR4 を抑制した。

また、pH 感知に必要なヒスチジンをフェニルアラニンに変化させた変異 GPR の発現実験における、サイコシンとの抑制作用との比較から、imidazopyridine 化合物がプロトン受容体の本来のリガンド結合部位(細胞外にあるヒスチジン残基)とは異なる部位に結合し、GPR4 に対するプロトン作用を抑制する negative allosteric modulator として作用していることが推定された。今後、GPR4 の創薬研究

を加速させてくれると期待される。

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1件)

1. Tobo A, Tobo M, Nakakura T, Ebara M, Tomura H, Mogi C, Im DS, Murata N, Kuwabara A, Ito S, Fukuda H, Arisawa M, Shuto S, Nakaya M, Kurose H, Sato K, and Okajima F:

Characterization of imidazopyridine compounds as negative allosteric modulators of proton-sensing GPR4 in extracellular acidification-induced responses.

PLoS ONE in press (2015)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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：

出願年月日：

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

桑原敦志 (KUWABARA ATSUSHI)

高崎健康福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90323344

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：