

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860635

研究課題名(和文) 気管支喘息におけるプロトン感知性受容体のOGR1の役割

研究課題名(英文) The role of Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 in a murine asthma model.

研究代表者

青木 悠 (AOKI, HARUKA)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：80447268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：OGR1は細胞外プロトンを感じ、pHセンサーとして細胞内シグナル系を活性化する。細胞外pHの低下は細胞集簇や乳酸貯留の起こる炎症部位局所で起こっている。事実、気管支喘息患者の気道ではpHが低下することが報告されている。そこでOGR1欠損マウスを用いて、気管支喘息におけるOGR1の機能について解析した。OGR1欠損マウスは野生型に比較し、気道抵抗、気道過敏性や気道炎症が有意に抑制された。これらの結果から、病態の鍵となる樹状細胞に着目し、OGR1の役割についてさらに解析を行った。OGR1欠損マウス骨髄由来樹状細胞では遊走能が低下していることがin vivo, in vitro実験で明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：OGR1 stimulation by extracellular protons causes the activation of G proteins and subsequent cellular functions. In the present study, we show that OGR1-deficient mice are resistant to the cardinal features of asthma, including airway eosinophilia, airway hyperresponsiveness, and goblet cell metaplasia, in association with a remarkable inhibition of Th2 cytokine and IgE production. Intratracheal transfer to wild-type mice of OVA-primed bone marrow-derived dendritic cells (DCs) from OGR1-deficient mice developed lower AHR and eosinophilia after OVA inhalation compared with the transfer of those from wild-type mice. Migration of OVA-pulsed DCs to peribronchial lymph nodes was also inhibited by OGR1 deficiency in the adoption experiments. OVA-induced expression of CCR7, a mature DC chemokine receptor, and migration response to CCR7 ligands in an in vitro Transwell assay were attenuated by OGR1 deficiency.

研究分野：呼吸器

キーワード：気管支喘息 アレルギー

1. 研究開始当初の背景

気管支喘息は気道炎症細胞を中心に起こる一連の炎症反応によって起こる疾患であり、ステロイド吸入療法により、その治療法は大きな進歩をとげたが、いまだ重症発作による喘息死が起こる難治性炎症性疾患と言える。

(1) プロトン感知性受容体 OGR1 ファミリー

OGR1、TDAG8、GPR4、G2A からなる OGR1 ファミリーは、発見された当初はリゾ脂質(スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)、リゾフォスファチジルコリン (LPC)、サイコシン)が特異的に結合する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であると考えられていた。その後、私たちを含むいくつかのグループから(Ludwig et al, *Nature*, 2003 他)、OGR1 ファミリーは細胞外 pH の低下、つまりプロトンを感じ取るユニークな受容体群であることが明らかとなった。当初想定されたリゾ脂質分子のリガンド機能に対しては否定的なデータも多いが、支持する知見も報告されている。このように、特徴的なリガンドを持つ OGR1 ファミリーの生理機能については未だ不明な点が多い状態である。そこで我々は、これまでに OGR1、GPR4 の欠損マウスを作製するとともに (Mogi et al. *J Immunol*, 2009)、個体レベルで OGR1 ファミリーの機能解明を目指し、研究を進めてきた。

(2) 気管支喘息と pH

血液の酸塩基平衡は厳格に pH 7.35~7.45 に保たれているが、炎症局所では pH は 5.5 まで低下することが報告されており、慢性気道炎症が病態の本質である気管支喘息患者の気道では pH が低下することが予想される。事実、気管支喘息患者の呼気凝縮液の pH が低下していることが示唆されている。喘息患者に認められる樹状細胞、好酸球、リンパ球など炎症細胞が集簇する気道炎症局所では

嫌気性代謝や乳酸産生により細胞外 pH の低下が起こることが容易に予想される。我々はこのような炎症局所での pH 変化が炎症誘発、もしくは抗炎症作用の重要な鍵を担っていると考え、OGR1 ファミリーはこれら一連の反応において重要な役割を果たしている可能性があると思定している。

2. 研究の目的

本研究では OGR1 欠損マウスを用いて、気管支喘息モデルを作成し、OGR1 の役割を解析する。

3. 研究の方法

(1) 喘息モデルの作成

OGR1 欠損マウスと野生型マウス (BALB/c、♀) に対して、第 1 日、第 14 日目に卵白アルブミン (OVA) および水酸化アルミニウムを PBS に溶解した液 (50mg OVA alum) を腹腔注射することにより感作し、第 28 日より 3 日連日、OVA 溶解液 (1% OVA) をネブライザーで吸入させることによりチャレンジした。3 日目の吸入終了 48 時間後、肺機能測定および気道炎症の解析を行った。

(2) マウス気道過敏性、気道抵抗の解析

BUXCO 社製 Mouse *in vivo* 無拘束呼吸機能解析システム(XA アクイジション&アナリシスシステム)を用いて、上記プロトコールに従い OVA により感作、チャレンジしたマウスを測定に供した。無麻酔下での肺機能測定は Hamelmann ら(*Am J Resp Crit Care Med* 1997;156:766-775)の方法に準じた。すなわち、第 30 日、最終の OVA 吸入チャレンジ 48 時間後のマウスを無拘束、無麻酔の状態に測定用プレチスモグラフ内に入れ、呼吸、吸気のフロー波形を検出する。非特異的気道収縮物質であるメサコリンを低濃度より順に (saline, 2.5mg/ml MCh, 5mg/ml MCh, 10mg/ml MCh, 20mg/ml MCh) 吸入させ肺機能を測定した。気道過敏性は、Penh

(enhanced pause) を指標として示した。また、麻酔下に同システムを用いて、気道抵抗も測定した。

(3) 気道炎症についての解析

気管支肺胞洗浄と肺組織病理学的検討

肺機能測定後、マウスをペントバルビタールで麻酔し、気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar lavage, BAL)を行った。生理食塩液(1回 0.5 mlを6回、合計 3 ml)を気管挿管チューブより注入し、肺胞洗浄後回収した。回収液(BAL液)中の総細胞数、細胞分画、好酸球などの炎症細胞数をカウントした。また、得られた肺組織の一部は病理組織学的検討に用い、肺組織中の好酸球をヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)、杯細胞をPAS染色などにより染色し、炎症細胞の分布、組織変化などについても解析した。

(4) 骨髄由来樹状細胞を用いた気管支喘息モデルにおける *in vivo*, *in vitro* 遊走能解析

1. *in vivo* 解析

OGR1欠損マウスもしくは野生型マウスの骨髄から単球を採取しGM-CSF、IL-4存在下に培養し、骨髄由来樹状細胞を作成した。OVAを取り込ませたOGR1欠損マウスと野生型の骨髄由来樹状細胞をそれぞれ野生型マウスに気管内移植し、OVA溶解液で3日間チャレンジした。最終チャレンジ48時間後にメサコリンに対する気道過敏性を測定し、肺胞洗浄を行った。また、傍気管支リンパ節へ遊走する骨髄由来樹状細胞数をフローサイトメトリー法で解析した。

2. *in vitro* 解析

OGR1欠損マウス、野生型マウスの骨髄由来樹状細胞を作成し、上層に作成した樹状細胞を、下層に遊走に関連するケモカインを含む培養液を置き、樹状細胞の遊走能について検討した。

4. 研究成果

(1) マウス気管支喘息モデルにおける

OGR1の役割

OGR1欠損マウスでは野生型マウスに比較し、メサコリン吸入に対する気道抵抗、気道過敏性が有意に減少した。(図1) OGR1欠損マウスでは最終チャレンジ後48時間で採取した肺胞洗浄液中の総細胞数、好酸球数、リンパ球数の減少を認めた。(図2A、B) また、肺胞洗浄液中のTh2系サイトカインIL-4、IL-13の減少を認めた。血清中のOVA特異的IgEもOGR1欠損マウスで減少していた。(図2C、D) よってマウス気管支喘息モデルにおいてOGR1は炎症を促進することが考えられた。

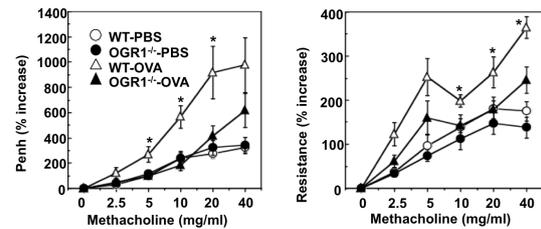


図1 メサコリンに対する気道過敏性(左)と気道抵抗(右)ともにOGR1欠損マウスで減弱した。

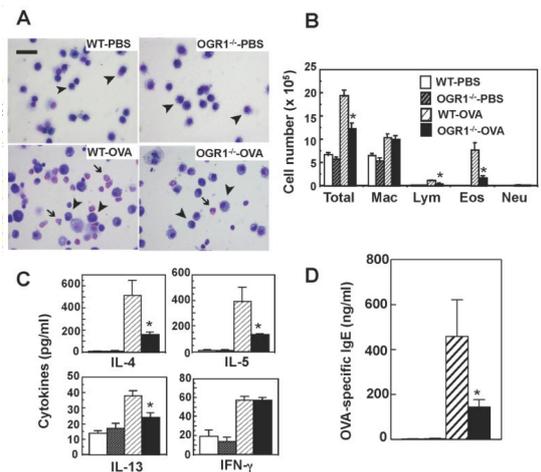


図2

A:肺胞洗浄液の細胞所見(楔形がマクロファージ、矢印が好酸球)

B肺胞洗浄液の細胞分画、C肺胞洗浄液中のサイトカイン、D血清中のOVA特異的IgE

(2) 骨髄由来樹状細胞におけるOGR1の役割

(1)の結果から、病態の鍵となる樹状細胞に着目し、OGR1の役割についてさらに解析を行った。骨髄由来樹状細胞にはOGR1が発現しており、OVA感作によりOGR1の発現が増加することがわかった。OGR1欠損マウスもしくは野生型マウスの骨髄由来樹状細胞を作製し、気管内に移植後、OVAによりチャレンジを行うと、欠損マウス由来樹状細胞移植群では気道過敏性、気道炎症の減弱が認められた。(図3)

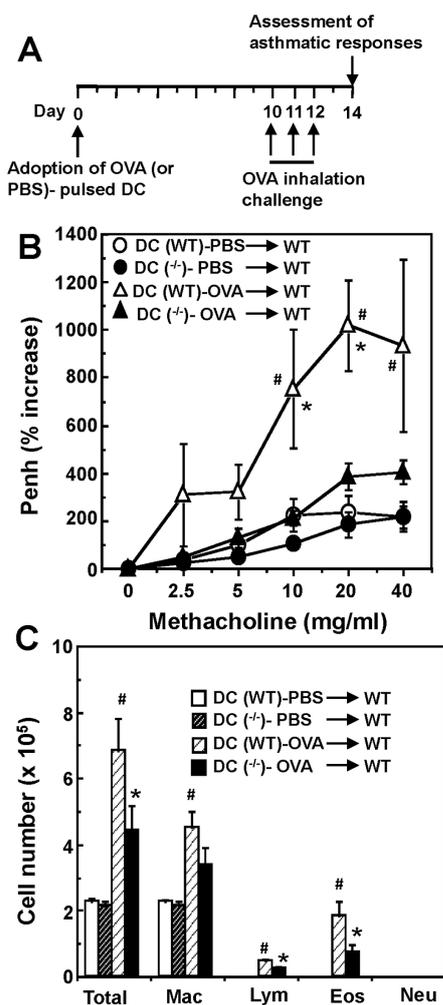


図3 A; 骨髄由来樹状細胞を気管内に移植し、さらにOVAチャレンジを行い喘息モデルを作成するprotocol、B;メサコリンに対する気道過敏性、C; 肺胞洗浄液中の細胞分画

樹状細胞の機能のうち、欠損マウス由来樹状細胞では傍気管支リンパ節への遊走能が低下していることがin vivo実験で明らかとなった。(図4)

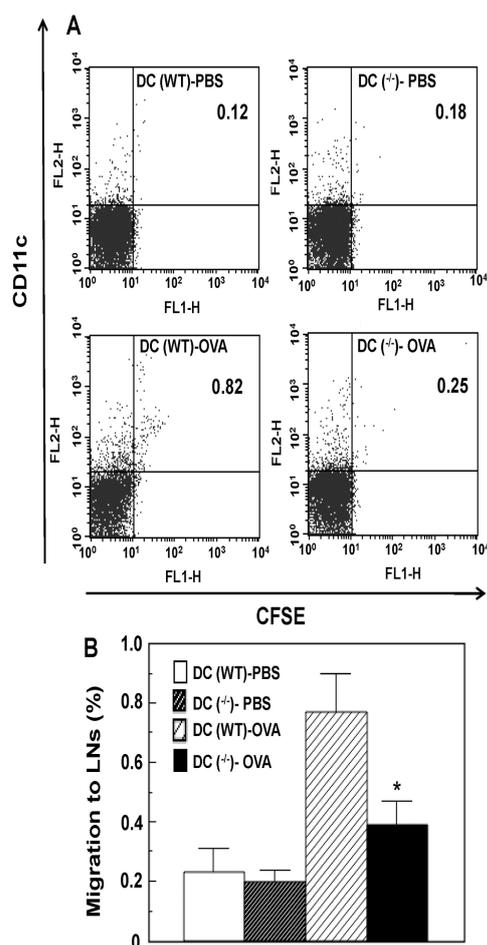


図4 A; 傍気管支リンパ節へ遊走する骨髄由来樹状細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。OGR1欠損マウス由来樹状細胞は野生型に比べ遊走が抑制されていた。B; Aを棒グラフで示した。

さらにケモタキセルチャンバーを用いたin vivo遊走能実験ではコントロールとして用いたATPではOGR1欠損マウス由来樹状細胞、野生型由来樹状細胞の両者に有意な差は認められなかったが、遊走に重要なリガンドであるCCL19,CCL21に対する遊走能はOGR1欠損マウスで抑制されていることがわかった。

(図5A,B) さらにこれらのリガンドの受容体であるCCR7の発現がOGR1欠損マウスで減少していることがわかった。

以上の結果は、樹状細胞に発現するOGR1が遊走能を制御し、気道過敏性と気道炎症に関わっていることを示唆している。今後、OGR1は気管支喘息治療の新たなターゲットとなることが期待される。

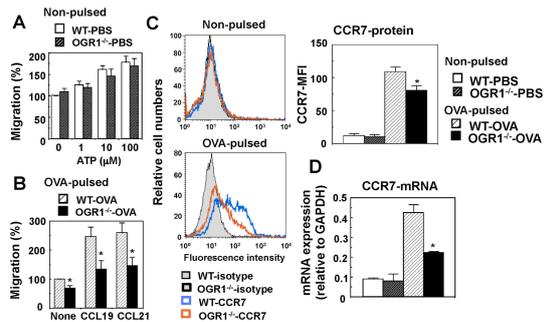


図 5

A ; ケモタキセルチャンバーを用いた遊走能実験では ATP に対する骨髄由来樹状細胞の遊走能に差は認められなかった。
 B ; 遊走因子 CCL19,21 に対する遊走能は OGR1 欠損マウスで抑制が認められた。
 C、D : CCL19,21 の受容体である CCR7 の発現が OGR1 欠損マウスで減少していることがフローサイトメトリー法 (C)、mRNA レベル (D) で確認できた。

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 5 件)

(1) Ionotropic and metabotropic proton-sensing receptors involved in airway inflammation in allergic asthma. Aoki H, Mogi C, Okajima F. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:712962. (査読あり)

(2) The effects of concomitant GERD, dyspepsia, and rhinosinusitis on asthma symptoms and FeNO in asthmatic patients taking controller medications.

Ishizuka T, Hisada T, Kamide Y, Aoki H, Seki K, Honjo C, Sakai H, Kadowaki M, Umeda Y, Morikawa M, Anzai M, Ameshima S, Ishizaki T, Dobashi K, Yamada M, Kusano M.

J Asthma Allergy. 2014 Sep 5;7:131-9. (査読あり)

(3) Acidic pH increases cGMP accumulation through the OGR1/phospholipase C/Ca(2+)/neuronal NOS pathway in N1E-115 neuronal cells.

Kotake M, Sato K, Mogi C, Tobo M, Aoki H, Ishizuka T, Sunaga N, Imai H, Kaira K, Hisada T, Yamada M, Okajima F. *Cell Signal.* 2014 Nov;26(11):2326-32. (査読あり)

(4) Safety and efficacy of high-dose leukocytapheresis in patients with refractory asthma.

Ishizuka T, Hisada T, Hatori M, Koike A, Hanabuchi K, Matsuzaki S, Kamide Y, Utsugi M, Aoki H, Yoshino R, Yanagitani N, Koga Y, Ono A, Kaira K, Sunaga N, Dobashi K, Tsuburai T, Akiyama K, Yamada M, Suzuki K, Mori M.

Inflamm Res. 2014 Sep;63(9):789-96. (査読あり)

(5) Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells is required for airway responses in a murine asthma model.

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, Okajima F.

PLoS One. 2013 Nov 11;8(11):e79985. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

(1) Critical role of proton-sensing OGR1 in dendritic cells in development of asthma H. Aoki, T. Hisada, C. Mogi, M. Yatomi, H. Tsurumaki, Y. Kamide, A. Ono, Y. Koga, K. Dobashi, T. Ishizuka, M. Yamada, F. Okajima

European Respiratory Society (ERS) International Congress 2014

Munich (Germany)

2014年09月08日

(2) 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 (シンポジウム 1 アレルギー疾患モデルからの最新知見)

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

第 26 回日本アレルギー学会春季臨床大会
国立京都国際会館 (京都府・京都市)

2014 年 5 月 9 日～11 日

(3) Proton-sensing OGR1 on dendritic cell is required for airway responses in a murine asthma model (ミニシンポジウム)

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

第 54 回日本呼吸器学会学術講演会
大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

2014 年 4 月 27 日

(4) プロトン感知性受容体 OGR1 の気管支喘息における役割

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

第 63 回日本アレルギー学会秋季学術大会
ホテルニューオータニ (東京都・千代田区)

2013 年 11 月 28 日～30 日

(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 悠 (Aoki Haruka)

群馬大学 生体調節研究所・助教

研究者番号: 80447268