

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：31101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04641

研究課題名(和文) pH環境を感知するOGR1受容体ファミリーの作用機構と生体機能

研究課題名(英文) Action mechanism of pH-sensing OGR1 family receptors and in vivo functions

研究代表者

岡島 史和 (Okajima, Fumikazu)

青森大学・薬学部・教授

研究者番号：30142748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：虚血部位や炎症部位では酸性化が伴う。しかし、細胞外の酸性化が生理機能や疾患の発症にどのように関与しているかは、ほとんど解明されていない。本研究では、最近発見されたOGR1ファミリーGタンパク質共役受容体(OGR1、TDAG8、GPR4)の欠損マウスを用い、骨リモデリング活性、脳梗塞、腫瘍形成モデル、気管支喘息モデルにおける受容体の役割について解析した。また、今後の創薬標的として観点から、GPR4阻害薬を用いた解析も行った。その結果、これらの受容体は種々の生理機能、疾患に関わっていることが推定された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that acidification takes place in the ischemia and inflammatory region. However, how extracellular acidic pH regulates physiological and pathophysiological actions remains uncharacterized yet. In the present study, we investigated the roles of OGR1 family GPCRs, including OGR1, TDAG8, and GPR4, which have been recently identified as extracellular proton-sensing receptors, in bone remodeling, brain ischemia, tumorigenesis, and asthma. The results showed that these receptors play important roles in the physiological cellular functions and the development of ischemic and inflammatory disorders. We further characterized a novel GPR4 antagonist and found that it was effective in the myocardial infarction model.

研究分野：生理化学

キーワード：プロトン TDAG8 OGR1 GPR4 ミクログリア 骨代謝 内皮細胞 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

正常な pH 環境は pH 7.4 であり、40 nM のプロトンが存在している。一方、虚血時や癌、気管支喘息、骨疾患などの慢性炎症性疾患では炎症性細胞の浸潤を伴い、低酸素、低 pH 環境 (~6 以下) になるのが特徴である。しかし、HIF-1 を中心とした低酸素バイオロジーの重要性が理解されているのとは対象的に細胞外 pH 環境の生理的变化に対する応答機構、また、虚血性・炎症性疾患時における低 pH の病態生理学的な意義とそのメカニズム (pH バイオロジー) はほとんど未解明である。

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、リゾ脂質性の G 蛋白質共役受容体 (GPCR) として報告されていた OGR1 ファミリー (OGR1, GPR4, TDAG8) が細胞外の pH (プロトン: pH 6~8) 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。従来、細胞外 pH を感知する機構としては味覚、痛覚における pH 4~6 といった低 pH を感知する TRPV1、ASIC 等チャネルが知られていたが、OGR1 ファミリーは種々の G 蛋白質に関連していること、また、pH 6~8 という生理的な状態から炎症時など病態下の pH を感知することから、生体の様々な組織、細胞における多彩な機能への関与が予想される。実際、我々の研究グループの成果だけでも、血管平滑筋細胞、骨芽細胞では、細胞外 pH 低下が OGR1 を介して COX-2 発現、プロスタグランジン産生をおこすこと、マクロファージ、ミクログリア、好中球では TDAG8 を介して炎症性サイトカインやスーパーオキシド産生抑制に働くこと、気道平滑筋細胞では pH 低下による IL-6 産生や CTGF 産生に OGR1 が関与していることなどが明らかにされてきた。従って、個体レベルでも、これらの細胞応答が関わる生理作用や

様々な疾患での役割を想定されるが、pH 環境変化が実際に個体レベルでどのように関わっているのかは不明である。

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 OGR1 ファミリー受容体欠損マウスを作成した。そこで、本研究では、OGR1 ファミリープロトン感知性 G 蛋白共役受容体が正常 pH 下での生理作用、並びに低 pH 微小環境のセンサーとして疾患の発症、進展にどのように関わっているかに関して受容体欠損マウスを用いて明らかにすることを旨とした。具体的には骨代謝リモデリング、虚血 (脳梗塞モデル~中大脳動脈虚血再灌流モデル)、腫瘍形成、呼吸器炎症 (気管支喘息モデル) における役割を明らかにする。また、今後の創薬研究の基礎実験として、GPR4 阻害薬の研究も実施する。

3. 研究の方法

(1) GPR4 阻害薬の特徴と細胞、個体レベルでの解析: GPR4 阻害薬は北海道大学 周東教授から供与をうけた。OGR1 ファミリー-GPCR である GPR4, OGR1, TDAG8, G2A を過剰発現した HEK293 細胞にレポーター遺伝子を導入して SRE 活性を測定した。GPR4 を過剰発現した CHO 細胞、COS7 細胞やヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、cAMP アッセイ、炎症性サイトカインや接着因子の発現を調べた。また、心筋梗塞モデルでは冠動脈を結索前 (1 日) と結索後 7 日間、GPR4 阻害薬を腹腔内に投与し、その後の生存活性をカプランマイヤー法にて解析した。

(2) 骨代謝リモデリングにおける役割: pQCT の方法により、個体レベルで骨密度の測定を行った。また、組織レベルの骨形態

計測により、これらの変化が骨芽細胞、破骨細胞いずれの変化なのかを調べた。骨髄由来の骨芽細胞、破骨細胞を用い、骨芽細胞マーカーとしてアルカリホスファターゼ、破骨細胞マーカーとして酒石酸抵抗性酸ホスファターゼを細胞染色で、また、OGR1 mRNA の発現を調べた。

(3)脳梗塞モデル～中大脳動脈虚血再灌流モデルと細胞機能解析：中大脳動脈にカニューレを挿入し、一定時間の虚血後、再灌流する中大脳動脈灌流モデルを作成した。虚血再灌流後のニッスル染色(神経細胞)や免疫染色(ミクログリアの Iba-1)などによって神経細胞の壊死やグリア細胞の状況を観察した。また、組織を採取して炎症性サイトカイン(TNF- など)の mRNA(TaqManリアルタイム PCR)とタンパク質(Western blotting)を測定した。

(4)腫瘍形成モデル：マウス由来の癌細胞をマウス皮下に接種し、B16-F1 に関しては2週間、LLC に関しては4週間前後、隔日に腫瘍を計測し、生存活性を測定した。また、化学発癌物質 3'-methylcholanthrene (3-MCA)をイソフルレン麻酔下でマウス背部に皮下注射し腫瘍の大きさを調べた。これらの実験を TDAG8 欠損マウスでもおこない、受容体の効果を判定した。

(5)気管支喘息モデル：卵白アルブミン(OVA)あるいはハウスダストマイト(HDM)による感作、吸入刺激により喘息モデルを作成した。肺胞洗浄液の好酸球などの炎症性細胞やサイトカイン量の測定、また、肺組織におけるサイトカイン mRNA の測定、また、気道炎症の程度を組織染色によって判定した。

4. 研究成果

1. GPR4 阻害薬を用いた解析

1.1. GPR4 阻害薬の特異性などの解析と細胞応答

HEK293 細胞を用い SRE 活性を指標にして GPR4 に対する特異性を解析した。その結果、GPR4 阻害薬は OGR1, TDAG8, G2A を過剰発現した細胞における低 pH による SRE 活性化に影響せず、GPR4 発現細胞においてのみ、SRE 活性化を抑制した。GPR4 は cAMP を産生することが知られているが、GPR4 を発現した CHO 細胞や COS7 細胞において、低 pH は cAMP 産生を増強し、その作用も GPR4 阻害薬で抑制された。GPR4 は炎症性サイトカイン応答などを発揮することが知られているので、GPR4 を発現したヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて解析した。酸性 pH6.8 は IL-8、VCAM-1、ICAM-1、CXCL2、COX2 の発現を亢進するが、この応答は GPR4 阻害薬でいずれも抑制された。このように、今回の実験に用いたイミダゾピリジン化合物は GPR4 に対して特異的に作用していることが示唆された。

1.2. GPR4 阻害薬の心筋梗塞モデルにおける効果

冠動脈結紮による心筋梗塞モデルにおいて、結紮後、溶媒のみの投与マウスでは7匹中6匹が1週間以内に死亡し、28日目では1匹のみが生き残った。一方、GPR4 投与マウスでは、GPR4 阻害薬の投与量で異なった結果が得られたが、6.7mg/kg/day の投与群では6匹中6匹共、28日間生存していた。このように、GPR4 阻害薬は心筋梗塞に対して予防・治療効果を発揮することが示唆された。

2. 骨代謝における役割

2.1. 骨量変化における OGR1 の役割

pQCT の方法により、個体レベルで骨密度の測定を行ったところ、骨密度は OGR1 欠損で増加していた。そこで、骨組織を用いて骨形態計測を行い、これらの変化が骨形成あるいは骨吸収のいずれの変化なのかを調べた。その結果、OGR1 欠損マウスではいずれの過程も抑制的であった。しかし、その抑制の程度は骨吸収の方が、骨形成の抑制よりも大きいと、受容体欠損では相対的に骨形成が骨吸収を上回り、骨量の増加が導かれたと考えられた。すなわち、OGR1 は骨形成、骨吸収のいずれの過程に対しても必要であるが、骨吸収過程の方が骨形成過程よりも OGR1 に対する依存性が大きいと思われる。

そこで、これらの変化が実際の骨芽細胞、破骨細胞レベルで観察されるのかを、骨髄由来の骨芽細胞、破骨細胞を用いて解析した。マウス骨髄から調製した細胞を RANKL 存在下で培養すると多核細胞になり、破骨細胞マーカーの酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ活性の上昇が見られた。また、OGR1 mRNA 発現が亢進した。そこで、細胞外 pH を変え、さらに、野生マウス、OGR1 欠損マウスから用いた骨髄細胞を用いて解析したが、多核の程度に有意な変化は観察されなかった。また、同様にアルカリホスファターゼ染色による骨芽細胞数などの変化を調べたが、OGR1 欠損による有意な効果は観察されなかった。今後、さらに条件の検討が必要と判断された。

2.2. エナメル形成不全における OGR1 の役割

英国の Dr. Mighell らが見いだしたエナ

メル質形成不全症の家系において OGR1 が原因遺伝子であることをマウスで実証すべく、我々は OGR1 欠損マウスが実際にエナメル形成不全に関わっていることを明らかにした。本研究は pH 感知性 GPCR 変異が実際にヒトの疾患に関わっていることを示した初めての報告である。今後、この OGR1 変異が実際に OGR1 のどのような機能と関連しているかは極めて重要な課題であると考える。

3. 脳梗塞モデルとグリア細胞機能

中大脳動脈にカニューレを挿入し、0.5~1 時間の虚血後、再灌流する中大脳動脈灌流モデルを実施した。虚血再灌流後 24 時間のニッスル染色で神経細胞が変性している箇所を脳梗塞部位として評価した。この梗塞(虚血)部位と思われる箇所に微小 pH メーターを挿入して pH を測定したところ、非虚血側と比較して (pH~7.1) 明らかに虚血部位で pH の低下 (pH~6.5) が観察された。また、この梗塞領域は TDAG8 欠損マウスで拡大していた。このように、虚血部位の pH 低下は一部 TDAG8 を介して神経細胞死に対して保護的に機能していると考えられた。中枢神経系で TDAG8 を発現している細胞は選別した細胞画分ではミクログリアのみであること、調製したミクログリアを用いた実験では、低 pH によってミクログリアからの TNF- α などの炎症性サイトカイン産生が TDAG8 依存的に抑制されること、虚血部位での TNF- α mRNA 量が TDAG8 欠損マウスでは野生型マウスより増加していることなどから、虚血によるミクログリアの活性化変化が関与していることが考えられた。すなわち、虚血部位での酸性 pH が虚血によるミクログリアの活性化に対して抑制的に機能し、神経細胞保護に働いていることが推定された。今後、さらにミクログリ

アの関与について、ミクログリア機能を抑制することが知られているミノサイクリンを使った実験、ミクログリアの組織染色などの実験によって、我々の仮説をさらに実証したい。また、本研究では TDAG8 に焦点をあてて実施したが、中枢神経系では神経細胞には OGR1、血管内皮細胞には GPR4 が発現しており、これらの受容体欠損マウスを用いた解析も行う必要がある。

4. 腫瘍形成モデルでの解析

マウス由来の B16-F1 あるいは LLC をマウス皮下に投与して 2～4 週間の腫瘍細胞の形成を調べた。細胞外低 pH はマクロファージの炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6 など) 産生を抑制すること、また、マクロファージには TDAG8 が発現しているが、この抑制応答は TDAG8 欠損では減弱することをすでに見いだしていた。即ち、マクロファージは TDAG8 を介して炎症性サイトカイン産生を抑制することを示唆している。そこで、我々は TDAG8 に焦点を当て、TDAG8 欠損マウスにも同様に B16-F1 や LLC を投与して腫瘍形成ならびに生存を調べた。炎症性サイトカインは腫瘍形成に対して抑制的に働き、また、TDAG8 欠損では野生型マウスより炎症性サイトカイン産生が高いことが予想されるので、腫瘍形成が野生型より抑制されるのではと予想した。実際、TDAG8 欠損は B16-F1 の腫瘍形成に対して野生型より抑制的であったが、有意な変化としては観察されなかった。また、発癌物質である 3'-methylcholanthrene (3-MCA) 投与による腫瘍の発生率も TDAG8 欠損で低下する傾向にあったが、有意差には至らなかった。今後、さらに、条件を変えるなどの検討が必要である。

5. 気管支喘息モデルでの解析

我々は既に、卵白アルブミンの感作、吸入刺激によるマウスの喘息モデルを用い、OGR1 が喘息の進展に関与していること、そのメカニズムとして OGR1 はおそらくカルシウムシグナルを介した樹状細胞での CCR7 の発現を増加し、所属リンパ節への遊走に関与していることを報告している。本研究では気管支喘息の重要な抗原であるハウスダストマイト (HDM) を用いて、OGR1 欠損の効果調べた。HDM 懸濁液の点鼻によって作成したモデル系で、肺胞洗浄液中の好酸球、リンパ球、好中球の上昇が確認できたが、この作用は OGR1 欠損で有意に抑制していることが判明した。さらに、洗浄液中の IL-4 などの Th2 サイトカイン産生に対しても、OGR1 欠損は抑制的であった。これらの結果は、これまで、報告してきた、卵白アルブミン感作モデルと同様に、HDM でも OGR1 が喘息発症に関与していることを示唆している。

TDAG8 欠損マウスでも OVA の感作による喘息モデル実験をおこなった。その結果、肺組織において、MUC5AC 発現と TDAG8 発現が OVA 感作で増加した。また、肺胞洗浄液中の好酸球は OVA 感作で増加した。これらの OVA による変化はいずれも TDAG8 欠損マウスでは低下していた。このように、TDAG8 は OVA 気管支喘息モデルにおいて、OGR1 と同様に増悪因子として関わっていることが推定された。

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 16 件)

1. Nagasaka A, Mogi C, Ono H, Nishi T, Horii Y, Ohba Y, Sato K, Nakaya M, Okajima F, Kurose H.: The proton-sensing G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) shows cardioprotective

- effects against myocardial infarction. *Sci Rep.* 7:7812 (2017) Aug 10; doi: 10.1038/s41598-017-07573-2.
2. Morizawa YM, Hirayama Y, Ohno N, Shibata S, Shigetomi E, Sui Y, Nabekura J, Sato K, Okajima F, Takebayashi H, Okano H, Koizumi S.: Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. *Nat Commun.* 8:28 (2017) Jun 22; doi: 10.1038/s41467-017-00037-1.
 3. Parry DA, Smith CE, El-Sayed W, Poulter JA, Shore RC, Logan CV, Mogi C, Sato K, Okajima F, Harada A, Zhang H, Koruyucu M, Seymen F, Hu JC, Simmer JP, Ahmed M, Jafri H, Johnson CA, Inglehearn CF, Mighell AJ.: Mutations in the pH-Sensing G-protein-Coupled Receptor GPR68 Cause Amelogenesis Imperfecta. *Am J Hum Genet.* 2016 Oct 6;99(4):984-990. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.08.020. Epub 2016 Sep 29.
 4. Fukuda H, Ito S, Watari K, Mogi C, Arisawa M, Okajima F, Kurose H, Shuto S: Identification of a Potent and Selective GPR4 Antagonist as a Drug Lead for the Treatment of Myocardial Infarction. *ACS Medicinal Chemistry Letters.* 7:493-497 (2016). doi: 10.1021/acsmchemlett.6b00014.
 5. 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.* 10:e0129334 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0129334.
 6. Tsurumaki H, Mogi C, Aoki-Saito H, Tobo M, Kamide Y, Yatomi M, Sato K, Dobashi K, Ishizuka T, Hisada T, Yamada M, and Okajima F: Protective role of proton-sensing TDAG8 in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *International Journal of Molecular Sciences* 16:28931-28942. (2015). doi: 10.3390/ijms161226145.

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 当房文香、佐藤幸市、当房雅之、茂木千尋、岡島史和：プロトン感知性受容体 GPR4 選択的阻害物質の特性解析：imidazopyridine 化合物による負のアルロステリック作用。第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015) 2015 年 12 月 1 日～4 日(神戸ポートアイランド,神戸)
2. 佐藤幸市、当房文香、当房雅之、茂木千尋、岡島史和：脳虚血再灌流モデルマウスの脳障害におけるプロトン感知性受容体 TDAG8 の役割。第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015) 2015 年 12 月 1 日～4 日(神戸ポートアイランド,神戸)

〔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〕

ホームページ等

<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)

青森大学・薬学部・教授

研究者番号：30142748

(2) 研究分担者

佐藤 幸市 (SATOH Koichi)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00302498

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

茂木 千尋 (MOGI Chihiro)

青木 悠 (AOKI Haruka)

久田 剛志 (HISADA Takeshi)