

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34306

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06727

研究課題名(和文)Gタンパク共役型脂質受容体の消化管炎症の調節における役割の解明

研究課題名(英文)Roles of lipid G protein-coupled receptors in the regulation of gastrointestinal inflammation.

研究代表者

塚原 卓矢 (Tsukahara, Takuya)

京都薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：70755925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：GPR35の活性化は大腸上皮細胞の修復を促進し、さらに大腸炎を抑制することが判明した。その作用機序として、GiタンパクカップリングによるcAMP低下、フィブロネクチンおよびインテグリン5発現亢進およびERK活性化作用を介すると推察された。一方、GPR40活性化はDSS誘起大腸炎の発生および治癒に対して保護作用を発揮することが判明した。この作用は、GLP-2産生の増大を介するものと推察される。これらの結果より、GPR35およびGPR40を代表とするGタンパク共役型脂質受容体は炎症性腸疾患の新規治療標的として有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：GPR35 activation promoted wound repair by colonic epithelial cells, and ameliorated onset of DSS-induced colitis via coupling of Gi protein, decrease in cAMP, upregulation of fibronectin and integrin 5 expression, and ERK phosphorylation in colonic epithelial cells. GPR40 stimulation was effective in both onset and mucosal healing of DSS-induced colitis, mediated by increase in GLP-2 production. Our results indicates that lipid G protein-coupled receptors such as GPR35 and GPR40 may be novel candidates for therapeutic target in inflammatory bowel disease.

研究分野：消化器内科学、薬理学

キーワード：Gタンパク共役型脂質受容体 炎症性腸疾患 GPR35 GPR40

1. 研究開始当初の背景

脂質は生物において必須の栄養素であるとともに、生体内におけるシグナル伝達の重要なリガンドとして注目されている。近年、脂質をリガンドとする G タンパク共役型受容体 (GPR) が数多く同定されたが消化管炎症における役割の解析はまだ十分になされていない。研究代表者は GPR35 および GPR40 に注目した。

GPR35 はホスファチジル酸やキヌレン酸をリガンドとする受容体であり、正常消化管上皮に発現していることが報告されている。近年、GPR35 の遺伝子変異が炎症性腸疾患 (IBD: クロウン病および潰瘍性大腸炎) の発症のリスクファクターとして非常に重要であることが報告され、IBD 患者での GPR35 機能の欠失が推察されている。また、GPR35 リガンド処置は小腸上皮細胞の遊走促進および炎症抑制作用を示し、大腸炎モデルで有効性を示すことが報告されているが、GPR35 の IBD への直接的な関与を示す検討は未だ認めない。そのため、大腸上皮機能に対する GPR35 の生理的および病理学的な役割を解明することは重要であった。

一方、研究代表者は、長鎖遊離脂肪酸受容体 GPR40 活性化が Glucagon like peptide (GLP)-2 分泌促進作用を有することを見出した。GLP-2 は消化管内分泌細胞 (L 細胞) から分泌されるプログルカゴン由来ペプチドのひとつで、腸管粘膜増殖、消化吸収促進、腸管粘膜の恒常性維持、さらには抗炎症作用などを有することが報告されている。現在、GLP-2 アナログの短腸症候群に対する臨床応用が開始されている。また、GLP-2 あるいはそのアナログがクロウン病などの IBD、あるいは非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) や抗がん剤により誘起される腸炎に対して有効であることが動物実験レベルで報告されており、GPR40 活性化が種々の炎症性消化管疾患に対して有効である可能性が示され

ているが、まだ直接的な証明はなされていない。

2. 研究の目的

本研究は炎症性消化管疾患に対する脂質 GPR の役割を明らかにすることを目的とし、以下の 2 点を検討した。

- (1) マウス正常大腸上皮細胞株およびマウス大腸炎モデルを用いて、大腸上皮機能および炎症性腸疾患における GPR35 の役割を明らかにする。
- (2) 炎症性腸疾患の発症および治癒における GPR40 の役割についてマウス大腸炎モデルを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞株

マウス大腸上皮細胞株 (YAMC) およびラット小腸上皮細胞株 (IEC-6) を使用した。YAMC 細胞は 5 % FBS、抗生剤 (100 U/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシン: PS 溶液)、insulin-transferrin-selenium (ITS) premix および 5 U/mL マウスインターフェロン-γ を含む RPMI1640 を用い、33 °C で培養した。IEC-6 細胞は 10 % FBS、および PS 溶液を含む DMEM を用い、37 °C で培養した。

(2) 実験動物

雄性 C57BL6 (9 週齢; 21-25 g) を使用した。マウスは乱数法により群分けした。

(3) Wound healing assay

両細胞株を単層培養後に無血清培地下で直径 1 mm の傷害 (wound) を作製し、経時的に修復 (wound healing) を観察した。GPR35 作動薬 (YE120、zaprinast および pamoic acid: PA) は wound 作製直後に添加した。GPR35 拮抗薬 (CID2745687) forskolin、PLC 阻害薬 (Go6983) および PKC 阻害薬 (U73122) は GPR35 作動薬添加 1 時間前に処置した。さらに百日咳毒素 (PTX) は

GPR35 作動薬の添加 24 時間前に処置した。

(4) 細胞増殖測定

培養条件下で MTT assay を使用した。

(5) DSS 大腸炎発生モデル作製および評価
大腸炎発生はマウスに 2 % DSS 溶液を 7 日間(day0-7)自由飲水させ惹起した。GPR35 作動薬である PA は 1 日 1 回 7 日間皮下投与した。GPR40 作動薬は 1 日 1 回 7 日間経口投与した。GPR40 特異的拮抗薬である DC260126 および GLP-2 拮抗薬である GLP-2 (3-33)は 1 日 1 回 7 日間腹腔内投与した。溶媒は 0.5 % CMC を使用した。

(6) DSS 大腸炎治癒モデル作製および評価
マウスに 2%DSS 溶液を 6 日間(day 0-6)自由飲水させ、その後通常飼育のとおりろ過水飲水に変更(day 6-13)し治癒を観察する新たなモデルを作製した。GPR40 作動薬は day 6 より 1 日 1 回 7 日間経口投与した。溶媒は 0.5 % CMC を使用した。

両大腸モデルともに評価項目として、病勢を反映する Disease Activity Index (DAI; 体重、下痢および血便の状態)スコア、大腸長、大腸重量を測定した。また、大腸組織の組織学的傷害評価は HE 染色を用いて行った。さらに大腸組織よりタンパクおよび mRNA 抽出を抽出した。mRNA 発現(炎症性サイトカイン、フィブロネクチン: FN、およびインテグリン $\alpha 5$: INTA5)、タンパク発現 (FN および INTA5)、GLP-2 定量、タンパク分布および急性炎症の程度はそれぞれ定量的リアルタイム RT-PCR、western blot、EIA、免疫染色法およびミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性測定を用いて検討した。

(7) 統計解析

結果は mean \pm SEM で表記した。パラメトリック検定は Student's t-検定 および 1-way ANOVA 検定を用いて評価し、post-hoc test として Dunnett's 検定を行った。またノンパラメトリック検定は Mann-Whitney U 検定 および Kruskal-Wallis 検定を用いて評価し、

post-hoc test として Steel 検定を行った。P<0.05 を有意とした。

4. 研究成果

(1) 消化管上皮細胞の傷害修復に対する GPR35 の役割

GPR35 作動薬 (YE120、zaprinast および PA) は YAMC 細胞の傷害修復を促進した(図 1)。この作用は GPR35 拮抗薬 (CID2745687)、PTX および forskolin により拮抗された。同様の反応は IEC-6 細胞でも確認された。

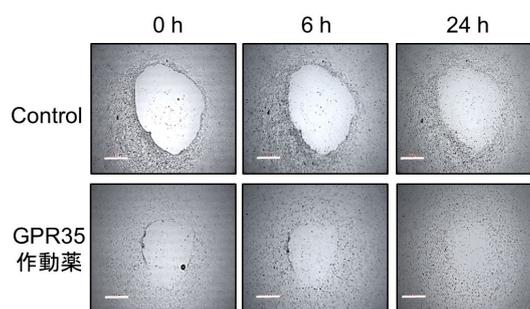


図 1 YAMC 細胞における GPR35 作動薬の傷害修復作用

一方、YE120 処理は高濃度においても、YAMC 細胞の増殖活性に影響を与えなかった。FN および ITGA5 の mRNA 発現は YE120 処理 3 時間後より有意に増加した(図 2)。それらの作用は CID2745687 および forskolin 処理により拮抗された。また ERK リン酸化は YE120 処理 6 時間後に増加し、その作用は CID2745687 および forskolin 処理により拮抗された。

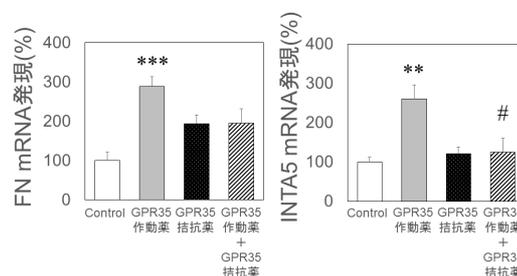


図 2 YAMC 細胞の FN および ITGA5 発現に対する GPR35 の役割

(2) マウス DSS 誘起大腸炎の大腸上皮細胞

傷害修復に対する GPR35 の役割

day7 において、DSS 惹起大腸炎の病態悪化 (DAI 上昇、大腸の短縮および大腸重量の増加)、MPO 活性の増大、および炎症性サイトカイン発現増加が認められた。PA の連続投与はこの増悪を有意に抑制した。また、大腸粘膜での FN および ITGA5 発現は PA 投与により増加し(図 3)、大腸上皮で GPR35 と共発現していた。

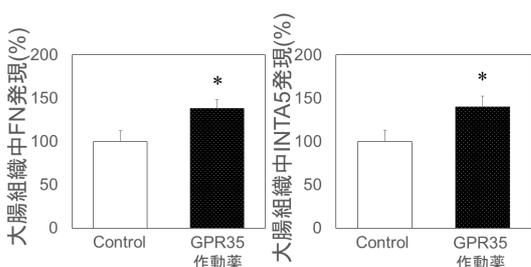


図 3 DSS 誘起大腸炎モデルにおける大腸粘膜での FN および ITGA5 発現に対する GPR35 作動薬連続投与の効果

GPR35 活性化は大腸上皮細胞の傷害修復を促進し、大腸炎を抑制することが判明した。その作用機序として、Gi タンパクによる cAMP 低下、FN および ITGA5 発現亢進および ERK 活性化作用を介すると推察された。GPR35 は腸管の創傷治癒を促進し、腸上皮バリア機能を維持していると考えられる。

(3) マウス DSS 誘起大腸炎の発症に対する GPR40 作動薬の効果

DSS 投与開始 Day 7 において、対照群と比較して GPR40 作動薬投与群では用量依存的かつ有意に DAI の増大を抑制した(図 4)。

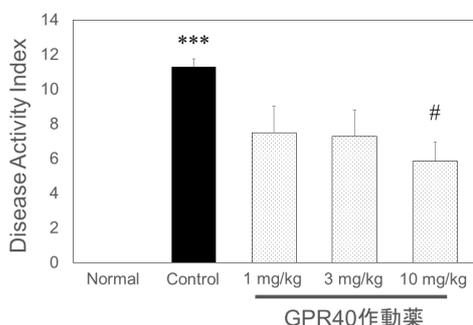


図 4 DSS 誘起大腸炎の発症に対する GPR40 作動薬の効果
大腸の短縮、組織学的傷害、MPO 活性およ

び炎症性サイトカイン発現の増大もまた GPR40 作動薬投与によりいずれも有意に抑制された。これらの抑制効果は、GPR40 特異的拮抗薬 DC260126 および GLP-2 拮抗薬 GLP-2 (3-33)投与により拮抗された。また、GPR40 作動薬投与は、大腸組織中 GLP-2 産生を有意に増大させたが、この作用もまた DC260126 により拮抗された。

(4) マウス DSS 誘起大腸炎の治癒に対する GPR40 作動薬の効果

DSS 投与開始 day 5 より DAI が増加し、day 7 をピークに、その後減少した。DSS 投与終了後 7 日目(day 13)において、GPR40 作動薬投与は対照群と比較して有意に治癒を促進した(図 5)。

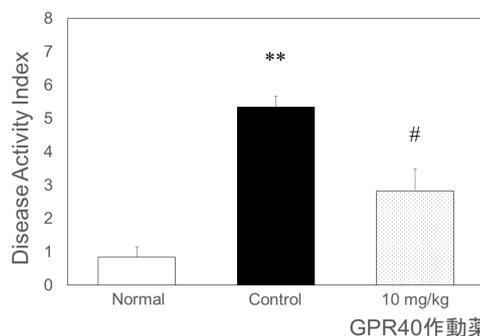


図 5 DSS 誘起大腸炎の治癒に対する GPR40 作動薬の効果

また大腸炎による大腸の短縮、組織学的傷害、MPO 活性および炎症性サイトカイン発現の増大も GPR40 作動薬投与により抑制された。GPR40 活性化は DSS 誘起大腸炎の発症および治癒に対して保護作用を発揮することが判明した。この作用は、GLP-2 産生の増大を介すると推察される。

GPR35 および GPR40 は炎症性腸疾患の新規治療標的として有用であると考えられる。

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 3 件)

Yokota H, Tsuzuki A, Shimada Y, Imai A, Utsumi D, Tsukahara T, Matsumoto M,

Amagase K, Iwata K, Nakamura A, Yabe-Nishimura C, Kato S. NOX1/NADPH Oxidase Expressed in Colonic Macrophages Contributes to the Pathogenesis of Colonic Inflammation in Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Murine Colitis. *J Pharmacol Exp Ther.* 360(1) 192-200 (2017) 査読あり

塚原 卓矢、内海 大地、松本 健次郎、天ヶ瀬 紀久子、加藤 伸一、G タンパク共役型受容体 GPR35 の大腸上皮細胞の遊走における役割 *Ulcer research* 44 102 (2017) 査読なし

Tsukahara T, Hamouda N, Utsumi D, Matsumoto K, Amagase K, Kato S, G Protein-Coupled Receptor 35 Contributes to Mucosal Repair in Mice via Migration of Colonic Epithelial Cells. *Pharmacol Res.* (2017) in press 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

塚原 卓矢、渡辺 俊雄、藤原 靖弘、加藤 伸一、荒川 哲男 クローム病患者小腸粘膜における TNF- α による GPR120 発現上昇を介した GLP-2 分泌抑制作用, 第127回日本薬理学会近畿部会 2015年6月(岐阜)

Takuya Tsukahara, Nahla Hamouda, Daich Utsumi, Kenjiro Matsumoto, Kikuko Amagase, Shinichi Kato, G Protein-Coupled Receptor 35 (GPR35) Contributes to Mucosal Healing in Mouse Colonic Epithelial Cells. *Digestive Disease Week (DDW)* 2016, 2016年5月 (San Diego, USA)

山崎 さやか、塚原 卓矢、松本 健次郎、天ヶ瀬 紀久子、加藤 伸一 G タンパク共役型受容体 GPR35 の大腸上皮細胞における傷害修復を促進する 次世代を担う創薬・医療

薬理シンポジウム 2016、2016年8月(仙台)

塚原 卓矢、内海 大地、松本 健次郎、天ヶ瀬 紀久子、加藤 伸一、大腸上皮細胞の遊走に対する G タンパク共役型受容体 GPR35 の役割 第44回日本潰瘍学会 2016年9月(旭川)

橋本 奈生子、塚原 卓矢、松本 健次郎、天ヶ瀬 紀久子、加藤 伸一、GPR35 シグナルを介した大腸上皮修復促進および大腸炎抑制作用 第137回日本薬学会 2017年3月(仙台)

磯山 加奈、塚原 卓矢、松本 健次郎、天ヶ瀬 紀久子、加藤 伸一、GPR40 活性化によるマウスデキストラン硫酸ナトリウム誘起大腸炎に対する保護的役割 第137回日本薬学会 2017年3月(仙台)

Takuya Tsukahara, Nahla Hamouda, Daich Utsumi, Kenjiro Matsumoto, Kikuko Amagase, Shinichi Kato, G Protein-Coupled Receptor 35 Signaling Promotes Mucosal Repair via Migration of Colonic Epithelial Cells in Mice. *Experimental Biology (EB)* 2017, 2017年4月 (Chicago, USA)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原 卓矢 (TSUKAHARA TAKUYA)

京都薬科大学薬学部

研究員

研究者番号: 70755925