

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500435

研究課題名(和文) 虚血性神経疾患に伴うミクログリア機能亢進と神経細胞死～pH感知性受容体の役割

研究課題名(英文) Role of proton-sensing G protein-coupled receptors on microglial activation and neuronal cell survival in a ischemic situation.

研究代表者

佐藤 幸市 (SATO, Koichi)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00302498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞の原因となる脳虚血では低酸素と弱酸性化が伴うことが知られている。また、脳虚血後の病態制御にはミクログリアや炎症性サイトカインの関与が示唆されている。脳神経系の細胞にもプロトン感知性のOGR1ファミリーGタンパク質共役受容体(OGR1, GPR4, TDAG8, pH 8.0～6.0)が発現しているが、それらの役割は依然不明である。本課題の成果として、ミクログリアにおけるTDAG8の抗炎症性作用と神経系の株細胞におけるOGR1の神経型NOS /cGMP蓄積など機能制御が推測された。このように、脳虚血時のプロトン感知性受容体を介した新しい調節機構が予想され、創薬の可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：OGR1 family G-protein coupled receptors (GPCR), including OGR1, GPR4, and TDAG8, sense extracellular pH of 8.0-6.0, resulting in the activation of intracellular signaling pathways. Extracellular acidic pH of 6.8-6.1 has been shown to take place with ischemia and neurodegenerative. However, the mechanisms underlying acidic pH-induced actions are poorly understood. This study has especially focused on the roles of proton-sensing GPCR in mouse microglia and neuronal cells in acidic pH cultured medium. Our results suggested that acidic pH inhibits lipopolysaccharide-induced IL-1 production through the TDAG8/cAMP pathway in microglia, and stimulates neuronal NO synthase-mediated cGMP accumulation via OGR1/Ca<sup>2+</sup> pathway in N1E115 cells. Thus, the elucidation of the molecular targets for acidic pH actions may provide therapeutic targets of neurodegenerative disorders such as ischemic stroke.

研究分野：生化学

キーワード：プロトン感知性受容体 G蛋白共役型受容体 脳虚血 ミクログリア 脳内炎症 炎症性サイトカイン  
細胞死 酸性ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症部位では pH が酸性に傾くこと、細胞外 pH の低下が多くの炎症細胞や免疫系の細胞の機能に影響を与えることが知られている。ミクログリアやアストロサイトは脳内の免疫防御を担っている。しかし、細胞外 pH 低下と脳内炎症メカニズムや神経の細胞死を伴う病態（脳虚血・梗塞）との関連性は不明である。OGR1、GPR4、TDAG8、G2A は種々の細胞内情報伝達系を活性化するプロトン感知性 (pH 8.0~6.0) の G 蛋白共役型受容体 (GPCR) である。プロトン感知性 GPCR は生理活性脂質の GPCR 研究から派生して同定されてきた。私達もグリオーシスにおける生理活性脂質作用の研究過程で、プロトン感知性 GPCR を介した細胞応答を観察していた。実際、脳神経系の細胞に複数のプロトン感知性 GPCR の発現が認められている。

(2) 私達は、気道平滑筋で pH 低下による OGR1 を介したインターロイキン-6 の産生が高まること報告した (炎症作用)。また、プロトン感知性受容体欠損マウス由来のマクロファージを用い、細胞外 pH 低下による TDAG8 が関与していることを発見した (抗炎症作用)。マクロファージやミクログリアを細菌成分 (LPS) で処理すると TLR を介した炎症性サイトカイン産生が誘導される。私は、弱酸性条件下でミクログリアを処理すると、細胞外への IL-1 $\beta$  産生が抑制されることを予備的に見出していた。このように、プロトン感知性受容体が炎症制御に深く関わっていると予想された。これらを踏まえて、プロトン感知性 GPCR が、脳虚血や梗塞と関連したミクログリアの活性制御や神経の細胞死、神経機能に影響を与えている可能性を推定した。

### 2. 研究の目的

中枢神経系の pH 変化は神経機能に重篤な影響を及ぼすと考えられるが、そのメカニズムは依然不明である。本研究では、マウスの両側総頸動脈の狭窄を行う前脳虚血モデルを用いて中枢での酸性ストレスに対するプロトン感知性 GPCR の役割を探索した。また、プロトン感知性 GPCR が脳虚血や梗塞と関連したミクログリアの活性化 (インフラマゾーム活性制御を含む) に関与しているのか、神経の細胞死や神経機能にどのような影響を与えるのか明らかにするため細胞レベルで解析を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) 生体での酸性ストレスに対するプロトン感知性 GPCR の役割を探索した。①前脳組織におけるプロトン感知性 GPCR サブタイプの発現を RT-qPCR で調べた。②前脳虚血手術 (両側総頸動脈の狭窄) を施した後、神経細胞の細胞死など障害の状況を調べた。また、ミクログリアの活性化の検出を試みるため、

細胞特異的なマーカーにて染色を行った。さらに、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  など) の発現解析を行い、生体におけるプロトン感知性 GPCR の役割を調べた。

(2) ミクログリアの炎症性サイトカイン産生における pH 感知性 GPCR の関与を以下のように解析した。①ミクログリアや関連した細胞株におけるプロトン感知性 GPCR サブタイプの発現を RT-qPCR で調べた。②ミクログリアにおいて LPS による炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  など) 産生応答が見られるので、細胞外酸性 pH の影響を調べた。また、酸性条件下での炎症性サイトカインの発現、産生応答にいたる細胞内シグナル伝達経路に特異的な阻害剤を用いて解析した。

(3) 神経細胞に及ぼす酸性ストレスの直接的な影響とその細胞内シグナル機構の解析を行った。①大脳皮質から調整した神経細胞や関連した細胞株におけるプロトン感知性 GPCR サブタイプの発現を RT-qPCR で調べた。②マウス胎仔から調製した神経細胞や受容体の発現プロファイルが似ている神経腫細胞株を用い、低 pH による細胞ダメージなど影響を調べた。OGR1 は Ca<sup>2+</sup>動員を引き起こすので、酸性条件下での Ca<sup>2+</sup>動員や PI3K シグナルを介した応答の細胞内シグナル伝達経路を解析した。GPR4 は Rho シグナル経路に連携するので、細胞の形態への影響や細胞の保護作用についても解析を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 生体での酸性ストレスに対するプロトン感知性 GPCR の役割を探索：RT-qPCR で前脳組織におけるプロトン感知性 GPCR サブタイプを調べ、OGR1、GPR4 と TDAG8 の発現を検出した。両側総頸動脈の狭窄を施したマウス大脳の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) の発現を解析したところ、野生型マウスに比べ TDAG8 欠損マウスにおける発現が高い傾向であった。このように、TDAG8 は中枢神経系の炎症性サイトカイン産生制御において抑制的に関与している可能性が考えられた。

(2) ミクログリアの炎症性サイトカイン産生における pH 感知性 GPCR の関与：マウスのミクログリアを調整して細胞外酸性 pH 応答の作用を調べたところ、酸性 pH は LPS による炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ ) 産生を抑制した。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解除された。また、細胞外 pH 低下には、細胞内 cAMP の蓄積が伴っており、TDAG8 遺伝子の欠損したミクログリアの場合、細胞外 pH による細胞内 cAMP の蓄積はほぼ消失していた。PKA や MAPK に対する特異的阻害剤を用いた実験から、細胞外酸性 pH による抑制作用の一部に TDAG8/アデニル酸シクラーゼ/cAMP/プロテ

インキナーゼ A 系を介する MAPK 活性制御機構の関与が示唆された (図 1)。このように、弱酸性 pH は中枢神経系で抗炎症性の保護作用として機能していると推測された。

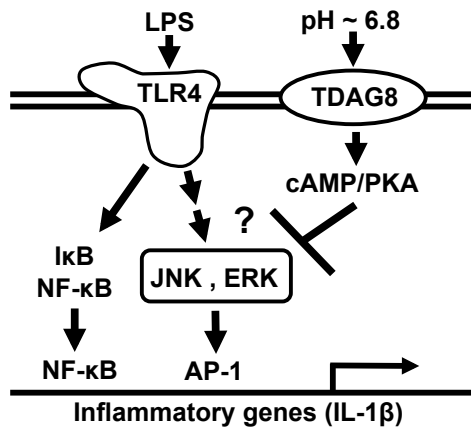


図1. マウスミクログリアにおけるプロトン感知性 TDAG8 受容体/cAMP系を介した細胞外酸性 pH によるインターロイキン-1β 産生抑制作用

(3) 神経細胞に及ぼす酸性ストレスの直接的な影響とその細胞内シグナル機構の解析：マウス胎仔の脳皮質から調製した神経細胞にはプロトン感知性 GPCR (OGR1、GPR4) が発現していた。発現プロファイルが似ている神経腫細胞株 (N1E115) を用いた解析から、細胞外 pH 低下による神経細胞の機能発現として細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動員や神経型一酸化窒素合成酵素の活性化が観察された。受容体分子の siRNA を用いた結果、これら応答にプロトン感知性 GPCR の関与が示唆された。このように、プロトン感知性 GPCR を介する作用が神経細胞の機能調節に関わっていると推測された (図 2)。一方、プロトン感知性 GPCR 欠損マウスから調整した神経細胞を用いて解析を試みたところ、低 pH による細胞ダメージや細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動員シグナルの変動にプロトン感知性 GPCR が関与すると考えられた。

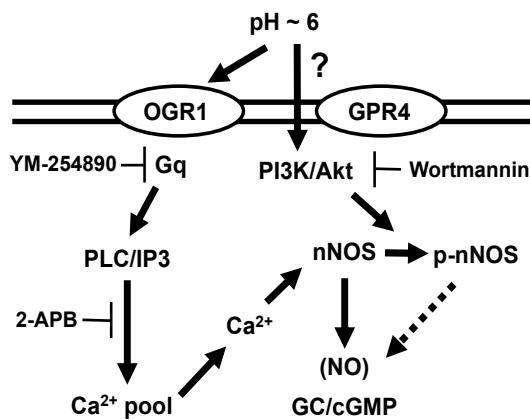


図2. N1E-115 神経細胞において、酸性 pH は OGR1/ホスホリパーゼ C/カルシウム/nNOS 経路を経て cGMP を産生する

(4) 本研究で得られた成果と今後の展望：プロトン感知性 GPCR が脳虚血や梗塞と関連

したミクログリアの活性化に関与しているのか、神経の細胞死や神経機能にどのような影響を与えるのか探索するため、本研究では主にプロトン感知性受容体欠損マウス由来の細胞を用いて検討してきた。ミクログリアでは脳虚血に関連する炎症に TDAG8 を介した抑制作用が推測された。また、両側総頸動脈の狭窄マウスを用いた実験から、TDAG8 は中枢神経系における抗炎症作用に関与している可能性が考えられた。今後、局所脳梗塞モデル (中大脳動脈の閉塞) を用いて検討して行きたい。一方、神経細胞ではプロトン感知性 GPCR が神経細胞の機能調節に関わっていると推測された。今後、神経細胞の機能制御におけるプロトン感知性 GPCR の役割について、細胞、組織や個体レベルで明らかにして行きたい。

### 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 15 件)

① Yuta Ichijo, Yuta Mochimaru, Morio Azuma, Kazuhiro Satou, Jun Negishi, Takashi Nakakura, Natsuki Oshima, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Kouhei Matsuda, Fumikazu Okajima, Hideaki Tomura, Two zebrafish G2A homologs activate multiple intracellular signaling pathways in acidic environment, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 469, 2016, pp. 81-86, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.11.075

② Hiroaki Tsurumaki, Chihiro Mogi, Haruka Aoki-Saito, Masayuki Tobo, Yosuke Kamide, Masakiyo Yatomi, Koichi Sato, Kunio Dobashi, Tamotsu Ishizuka, Takeshi Hisada, Masanobu Yamada, Fumikazu Okajima, Protective role of proton-sensing TDAG8 in lipopolysaccharide-induced acute lung injury, *Int. J. Mol. Sci.*, 査読有, Vol. 16, 2015, pp. 28931-28942, DOI: 10.3390/ijms161226145

③ Tsuyoshi Uchiyama, Shoichi Tomono, Koichi Sato, Tetsuya Nakamura, Masahiko Kurabayashi, Fumikazu Okajima, Angiotensin II Reduces Lipoprotein Lipase Expression in Visceral Adipose Tissue via Phospholipase C β4 Depending on Feeding but Increases Lipoprotein Lipase Expression in Subcutaneous Adipose Tissue via c-Src, *PLoS One*, 査読有, Vol. 10, 2015, e0139638, DOI: 10.1371/journal.pone.0139638

④ Yosuke Kamide, Tamotsu Ishizuka, Masayuki Tobo, Hiroaki Tsurumaki, Haruka Aoki, Chihiro Mogi, Takashi Nakakura,

Masakiyo Yatomi, Akihiro Ono, Yasuhiko Koga, Koichi Sato, Takeshi Hisada, Kunio Dobashi, Masanobu Yamada, Fumikazu Okajima, Acidic environment augments Fc $\epsilon$ RI-mediated production of IL-6 and IL-13 in mast cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 464, 2015, pp. 949-955, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.07.077

⑤ Jung-Min Kim, Kyoung-Pil Lee, Soo-Jin Park, Saeromi Kang, Jin Huang, Jung-Min Lee, Koichi Sato, Hae-Young Chung, Fumikazu Okajima, Dong-Soon Im, Omega-3 fatty acids induce Ca<sup>2+</sup> mobilization responses in human colon epithelial cell lines endogenously expressing FFA4, *Acta Pharmacol. Sin.*, 査読有, Vol. 36, 2015, pp. 813-820, DOI: 10.1038/aps.2015.29

⑥ Ayaka Tobo, Masayuki Tobo, Takashi Nakakura, Masashi Ebara, Hideaki Tomura, Chihiro Mogi, Dong-Soon Im, Naoya Murata, Atsushi Kuwabara, Saki Ito, Hayato Fukuda, Mitsuhiro Arisawa, Satoshi Shuto, Michio Nakaya, Hitoshi Kurose, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Characterization of Imidazopyridine Compounds as Negative Allosteric Modulators of Proton-Sensing GPR4 in Extracellular Acidification-Induced Responses, *PLoS One*, 査読有, Vol. 10, 2015, e0129334, DOI: 10.1371/journal.pone.0129334

⑦ Caiyan An, Koichi Sato, Taoya Wu, Muqiri Bao, Liang Bao, Masayuki Tobo, Alatangaole Damirin, Extracellular acidification synergizes with PDGF to stimulate migration of mouse embryo fibroblasts through activation of p38MAPK with a PTX-sensitive manner, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 460, 2015, pp. 191-197, DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.006

⑧ Yuta Mochimaru, Morio Azuma, Natsuki Oshima, Yuta Ichijo, Kazuhiro Satou, Kouhei Matsuda, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Hideaki Tomura, Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebra fish, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 457, 2015, pp. 493-499, DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.105

⑨ Mie Kotake, Koichi Sato, Chihiro Mogi, Masayuki Tobo, Haruka Aoki, Tamotsu Ishizuka, Noriaki Sunaga, Hisao Imai, Kyoichi Kaira, Takeshi Hisada, Masanobu

Yamada, Fumikazu Okajima, Acidic pH increases cGMP accumulation through the OGR1/phospholipase C/Ca<sup>2+</sup>/neuronal NOS pathway in N1E-115 neuronal cells, *Cell. Signal.*, 査読有, Vol. 26, 2014, pp. 2326-2332, DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.07.010

⑩ Soo-Jin Park, Kyoung-Pil Lee, Saeromi Kang, Jaewon Lee, Koichi Sato, Hae-Young Chung, Fumikazu Okajima, Dong-Soon Im, Sphingosine 1-phosphate induced anti-atherogenic and atheroprotective M2 macrophage polarization through IL-4, *Cell. Signal.*, 査読有, Vol. 26, 2014, pp. 2249-2258, DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.07.009

⑪ Ye Jin, Koichi Sato, Ayaka Tobo, Chihiro Mogi, Masayuki Tobo, Naoya Murata, Satoshi Ishii, Dong-Soon Im, Fumikazu Okajima, Inhibition of interleukin-1 $\beta$  production by extracellular acidification through the TDAG8/cAMP pathway in mouse microglia, 査読有, Vol. 129, 2014, pp. 683-695, DOI: 10.1111/jnc.12661

⑫ Koichi Sato, Masayuki Tobo, Chihiro Mogi, Naoya Murata, Mie Kotake, Atsushi Kuwabara, Dong-Soon Im, Fumikazu Okajima, Lipoprotein-associated lysolipids are differentially involved in high-density lipoprotein- and its oxidized form-induced neurite remodeling in PC12 cells, *Neurochem. Int.*, 査読有, Vol. 68, 2014, pp. 38-47, DOI: 10.1016/j.neuint.2014.02.005

⑬ 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, Masanobu Yamada, Masatomo Mori, Tamotsu Ishizuka, Fumikazu Okajima, Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells is required for airway responses in a murine asthma model, *PLoS One*, 査読有, Vol. 8, 2013, e79985, DOI: 10.1371/journal.pone.0079985

⑭ Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Masayuki Tobo, Hideaki Tomura, Koichi Sato, Masaki Kobayashi, Hiroshi Ohnishi, Shigeyasu Tanaka, Mitsutoshi Wayama, Tetsuya Sugiyama, Tadahiro Kitamura, Akihiro Harada, and Fumikazu Okajima, Deficiency of Proton-Sensing Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1

Attenuates Glucose-Stimulated Insulin Secretion, *Endocrinology*, 査読有, Vol. 153, 2012, pp. 4171-4180, DOI: 10.1210/en.2012-1164

⑮ Mayumi Komachi, Koichi Sato, Masayuki Tobo, Chihiro Mogi, Takayuki Yamada, Hideo Ohta, Hideaki Tomura, Takao Kimura, Dong-Soon Im, Keisuke Yanagida, Satoshi Ishii, Izumi Takeyoshi, Fumikazu Okajima, An orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo, *Cancer Sci.*, 査読有, Vol. 103, 2012, pp. 1099-1104, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02246.x

[学会発表] (計 11 件)

① 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傷害におけるプロトン感知性受容体 TDAG8 の役割、BMB2015 (日本分子生物学会年会、日本生化学会)、2015. 12. 1-4、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

② 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ロステリック作用、BMB2015 (日本分子生物学会年会、日本生化学会)、2015. 12. 1-4、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

③ Koichi Sato, Ye Jin, Ayaka Tobo, Masayuki Tobo, Chihiro Mogi, and Fumikazu Okajima, Acidic pH inhibits interleukin-1 $\beta$  production by down-regulation of mitogen-activated protein kinase activity through the TDAG8/protein kinase A pathway in mouse microglia, 第 58 回日本神経化学学会大会、2015. 9. 11-13、大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市)

④ 中嶋克行、佐藤幸市、岡島史和、宮下和也、今村茂行、小林淳二、白川尚史、下村洋之助、町田哲男、角野博之、村上正巳、血中リポ蛋白リパーゼとレムナント・リポ蛋白の相互関係について、第 57 回日本脂質生化学会、2015. 5. 28-29、一橋大学一橋講堂 (東京都・千代田区)

⑤ 佐藤幸市、金嘩、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 $\beta$  産生を抑制する、第 87 回日本生化学会、2014. 10. 15-18、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

⑥ 一條祐太、東森生、松田恒平、茂木千尋、

佐藤幸市、岡島史和、戸村秀明、ゼブラフィッシュ G2A の機能解析、第 87 回日本生化学会、2014. 10. 15-18、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

⑦ 大嶋菜月、持丸雄太、東森生、松田恒平、中倉敬、茂木千尋、佐藤幸市、岡島史和、戸村秀明、ゼブラフィッシュ GPR4、OGR1 の分子的特徴、第 87 回日本生化学会、2014. 10. 15-18、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

⑧ 小竹美絵、佐藤幸市、岡島史和、N1E115 神経細胞における細胞外酸性 pH による cGMP 産生機構、第 86 回日本生化学会、2013. 9. 11-13、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

⑨ 佐藤幸市、小竹美絵、岡島史和、N1E115 神経細胞における細胞外酸性 pH による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動員、Akt リン酸化とプロトン感知性受容体の関与、第 85 回日本生化学会、2012. 12. 14-16、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

⑩ Ye Jin, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Involvement of TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of interleukin-1 $\beta$  production in microglia, 第 85 回日本生化学会、2012. 12. 14-16、福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

⑪ 佐藤幸市、小町麻由美、当房雅之、茂木千尋、岡島史和、ヒト膵臓がん細胞の浸潤・転移に対する経口可能なリゾホスファチジン酸受容体アンタゴニスト Ki16198 の抑制作用、第 54 回日本脂質生化学会、2012. 6. 7-8、九州大学医学部百年講堂 (福岡県・福岡市)

[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：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

群馬大学生体調節研究所ホームページ  
<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/>

生体調節研究所シグナル伝達グループホームページ  
<http://signal-transduction.imcr.gunma-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 幸市 (SATO, Koichi)  
群馬大学・生体調節研究所・准教授  
研究者番号：00302498

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：