

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06767

研究課題名(和文) 虚血性神経疾患に伴うミクログリアや神経細胞機能変化とpH感知性受容体

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

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解糖系の亢進に基づく弱酸性化が伴うことが推測されている。脳神経系にも細胞外のpH(プロトン)を感知する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、虚血再灌流モデルの脳梗塞においてTDAG8が抑制的に機能しており、ミクログリアにおけるTDAG8を介した抗炎症性作用が推測された。また、OGR1、GPR4を介した神経機能制御が推測された。このように、脳虚血時のpH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)：Extracellular acidic pH of ~6.5 has been shown to take place with ischemia and neurodegenerative. However, the mechanisms underlying acidic pH-induced actions are poorly understood. Proton-sensing OGR1 family G-protein coupled receptors (GPCRs, including OGR1, GPR4, and TDAG8) have been shown to be expressed in brain. This study has focused on the roles of proton-sensing GPCRs in the brain injury in a mouse ischemia reperfusion model. We also analyzed roles of proton-sensing GPCRs in mouse microglia and neuronal cells in acidic pH medium. Our results suggested that acidic pH /TDAG8 functions protectively for cerebral infarction by the mouse ischemia model possibly due to the mechanism involving inhibitory actions against microglia function. And also we showed the involvement of OGR1 and/or GPR4 in the acidic pH regulation of neuronal cell functions. Thus, the elucidation of acidic pH actions may provide therapeutic targets of neurodegenerative disorders such as ischemic stroke.

研究分野：神経機能学

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳梗塞や脳障害の原因となる脳虚血では低酸素と酸性化(低 pH)が伴うことが知られている。これは酸素供給の低下とそれを反映した解糖系の亢進による乳酸産生の増加に基づく。また、脳虚血後の病態制御にはミクログリアや浸潤マクロファージの炎症性シグナルの関与が示唆されている。しかし、酸性 pH 下に暴露された細胞応答の分子メカニズム、また、虚血をおこした個体での細胞外 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との関連性は不明である。最近、私達を含む国内外のグループによって、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 G タンパク質共役受容体(GPCR)であることが報告された。これらの受容体は細胞外 pH 変動(pH 8.0~6.0)を感知するのが特徴で、生理的ないし炎症部位での役割が想定される。

(2) 私達はグリオシスにおける研究過程で、pH 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 pH 感知性 GPCR の発現が認められている。酸性 pH に対する神経系細胞の応答としては、ミクログリアで pH 低下による TDAG8 を介した炎症性サイトカイン産生抑制応答を報告した(抗炎症作用)。また、神経細胞解析に先立ち、培養神経細胞における OGR1 を介した一酸化窒素合成酵素の活性制御など、細胞外 pH 低下による細胞傷害を弱めるような応答を観察していた(細胞保護作用)。このように、虚血に伴う細胞外 pH 低下と pH 感知性 GPCR が脳内炎症制御に深く関わっていると考えられた。これらを踏まえて、pH 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探索した。

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。脳神経系には複数の pH 8.0~6.0 を感知する pH 感知性 GPCR が発現している。本研究では、(1) 脳虚血や梗塞と関連した生体での pH 感知性 GPCR の役割を個体レベルで探索した。また、(2) pH 感知性 GPCR を介したミクログリア活性制御、神経の細胞死や神経機能への影響についてインビトロで解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) 生体における pH 感知性 GPCR の役割についてマウス脳梗塞モデルを用いて探索した。中大脳動脈の虚血(閉塞・再灌流)によりマウス脳組織における Iba1、GFAP、pH 感知性 GPCR 発現を調べた。虚血を施した後、マウスの運動機能、梗塞領域への影響を調べた。また、HE 染色、TUNEL 法、免疫染色

などによって神経細胞の壊死、グリア細胞(ミクログリアやアストロサイト)の状況を観察し、生体における pH 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 の関与を解析した。マウス脳組織において Iba1 陽性細胞に pH 感知性 TDAG8 の発現が確認されたので、ミクログリアや関連した細胞株における受容体サブタイプの発現を調べた。ミクログリアにおいて LPS による炎症性サイトカイン産生応答(TNF- α 、IL-1 など)その酸性条件下での抑制応答を細胞内シグナル伝達経路に特異的な阻害剤等を用いて解析した。

(3) 神経細胞の生体膜上で微妙な pH の調節が行われることが示唆されており、細胞外 pH 低下による神経細胞の機能制御機構が予想された。そこで、神経細胞における酸性 pH ダメージと pH 感知性 GPCR を介する細胞内シグナル機構の解析を行った。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 pH 感知性 GPCR サブタイプの発現を調べた。マウス胎仔から調製した神経細胞や神経細胞株を用い、低 pH による細胞機能に対するダメージを調べた。また、酸性条件下での pH 感知性 GPCR を介する細胞内 Ca²⁺動員応答、Rho シグナル経路に連携する細胞の形態変化や保護作用を細胞内シグナル伝達経路に特異的な阻害剤等を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) マウス脳梗塞モデルにおける pH 感知性 GPCR の役割を探索：
脳虚血後の細胞ダメージとその回復過程に pH 感知性 GPCR がどのような役割を担っているか、これら受容体欠損マウスの脳虚血モデルを用いて解析した。中大脳動脈の虚血(閉塞・再灌流)によりマウス脳組織における Iba1 や GFAP 発現が誘導される。これに類似して pH 感知性 GPCR サブタイプの TDAG8 発現誘導が観察され、OGR1、GPR4 発現変動はなかった。TDAG8 発現は脳組織の Iba1 陽性細胞において観察され、培養ミクログリアにおいても認められた。脳虚血マウスの運動機能、梗塞領域への影響を調べたところ、脳虚血マウスでは対象マウスと比較して明らかな運動機能傷害を示すが、TDAG8 欠損マウスではさらに悪化していた。また、脳梗塞領域は TDAG8 欠損マウスで有意に増加した。このように、ミクログリアの TDAG8 は虚血による脳梗塞に対して抑制的に機能していると推測された。一方、TDAG8 以外の pH 感知性 GPCR 欠損による影響も考えられた。

(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：
虚血による脳梗塞において炎症性サイトカインの関与が報告されており、培養ミクログリ

アでは酸性 pH で LPS による炎症性サイトカイン産生応答 (TNF- α 、IL-1 など) の抑制が観察される。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る。そこで、TDAG8 介したミクログリアにおける酸性 pH 応答の作用機構を解析した。新生仔マウス由来のミクログリアを酸性 pH 処理すると TDAG8 依存的に細胞内 cAMP 蓄積を促進した。酸性 pH による LPS/炎症性サイトカイン産生応答の抑制は PKA 阻害薬で解除された。この酸性 pH 様の抑制応答は cAMP 誘導体によっても観察された。LPS から炎症性サイトカイン産生過程のどの段階で TDAG8 シグナルが効果を発揮しているか、MAP キナーゼ阻害薬や NF- κ B 阻害薬を用い解析した。ミクログリアにおける LPS/炎症性サイトカイン産生過程には MAP キナーゼや NF- κ B 活性化が伴うが、酸性 pH による抑制応答の一部に TDAG8/アデニル酸シクラーゼ/cAMP/PKA を介する MAP キナーゼ制御機構が推測された。このように、TDAG8 は中大脳動脈の虚血再灌流時の梗塞に対して抑制的に機能しており、ミクログリアにおける TDAG8 を介する抗炎症性作用の関与が予想された。

(3) 神経細胞に及ぼす酸性 pH の直接的な影響と受容体介する作用の解析:

神経細胞に焦点をあて細胞外酸性 pH 応答の作用機構を調べた。pH 感知性 GPCR の欠損マウスの脳虚血実験から、TDAG8 が炎症性サイトカイン産生制御を介して梗塞領域の低下に関与していると推測された。また、TDAG8 以外の pH 感知性 GPCR 欠損による影響も考えられた。神経細胞の生体膜上で微妙な pH の調節が行われることが示唆されており、細胞外 pH 低下による神経細胞の機能制御機構が予想された。神経細胞には OGR1、GPR4 の発現が認められた。神経腫細胞株では神経細胞の機能発現として細胞内 Ca²⁺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。また、pH 感知性 GPCR 欠損マウスから調整した神経細胞を用いた解析から、低 pH による細胞ダメージや細胞内 Ca²⁺動員シグナルの変動に pH 感知性 GPCR の関与が予想された。このように、脳虚血に伴う pH 低下が pH 感知性 GPCR を介して梗塞に影響を及ぼすと考えられた。

(4) 本研究で得られた成果と今後の展望: 脳梗塞の原因となる脳虚血では低酸素と解糖系の亢進に基づく弱酸性化が伴うことが推測されている。脳神経系の細胞にも pH 感知性 OGR1 ファミリー受容体 (OGR1、GPR4、TDAG8) が発現しているが、それらの役割は明らかでなかった。本課題の成果として、局所脳梗塞モデル (中大脳動脈の閉塞) の脳梗塞において TDAG8 が抑制的に機能しており、ミクログリアにおける TDAG8 を介した抗炎症性作用が推測された。また、OGR1、GPR4 を介した神経機能制御が観察された。このように、

脳虚血時の pH 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。今後、ミクログリアにおける TDAG8 の抗炎症性作用が脳梗塞モデルの脳梗塞に対して抑制的に機能しているのか、ミクログリア機能を改善する薬物やミクログリアを減少させる薬物の投与を組み合わせ、より詳細な検討を加える。一方、神経系細胞ではないが、虚血時に重要な役割を發揮する内皮細胞では GPR4 が発現している。そこで、虚血性の応答におけるミクログリアを含む内皮細胞の機能制御と pH 感知性 GPCR の役割について解析を試みたい。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計14件)

Akiomi Nagasaka, Chihiro Mogi, Hiroki Ono, Toshihide Nishi, Yuma Horii, Yuki Ohba, Koichi Sato, Michio Nakaya, Fumikazu Okajima, Hitoshi Kurose, The proton-sensing G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) shows cardioprotective effects against myocardial infarction, *Sci. Rep.*, 査読有, Vol. 7, 2017, 7812, DOI: 10.1038/s41598-017-07573-2

Jun Negishi, Yuka Omori, Mami Shindo, Hayate Takanashi, Shiori Musha, Suminori Nagayama, Jun Hirayama, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Yuta Mochimaru, Hideaki Tomura, Manganese and cobalt activate zebrafish ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 but not GPR4, *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 査読有, Vol. 37, 2017, pp. 401-408, DOI: 10.1080/10799893.2017.1298130

Yosuke M Morizawa, Yuri Hirayama, Nobuhiko Ohno, Shinsuke Shibata, Eiji Shigetomi, Yang Sui, Junichi Nabekura, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Hirohide Takebayashi, Hideyuki Okano, Schuichi Koizumi, Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway, *Nat. Commun.*, 査読有, Vol. 8, 2017, 28, DOI: 10.1038/s41467-017-00037-1

Tsuyoshi Uchiyama, Fumikazu Okajima, Chihiro Mogi, Ayaka Tobo, Shoichi Tomono, Koichi Sato, Alamandine reduces leptin expression through the c-Src/p38 MAP kinase pathway in adipose tissue, *PLoS One*, 査読有, Vol. 12, 2017, e0178769, DOI: 10.1371/journal.pone.0178769

Kyoung-Pil Lee, Soo-Jin Park, Saeromi

Kang, Jung-Min Koh, Koichi Sato, Hae-Young Chung, Fumikazu Okajima, Dong-Soon Im, Omega-3 polyunsaturated fatty acids accelerate airway repair by activating FFA4 in club cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 査読有, Vol. 312, 2017, pp. L835-L844, DOI: 10.1152/ajplung.00350.2016

David A. Parry, Claire E. L. Smith, Walid El-Sayed, James A. Poulter, Roger C. Shore, Clare V. Logan, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Akihiro Harada, Hong Zhang, Mine Koruyucu, Figen Seymen, Jan C.-C. Hu, James P. Simmer, Mushtaq Ahmed, Hussain Jafri, Colin A. Johnson, Chris F. Inglehearn, Alan J. Mighell, Mutations in the pH Sensing G-protein Coupled Receptor GPR68 cause Amelogenesis Imperfecta, *Am. J. Hum. Genet.*, 査読有, Vol. 99, 2016, pp. 984-990, DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.08.020

Koichi Sato, Fumikazu Okajima, Kazuya Miyashita, Shigeyuki Imamura, Junji Kobayashi, Kimber L. Stanhope, Peter J. Havel, Tetsuo Machida, Hiroyuki Sumino, Masami Murakami, Ernst Schaefer, Katsuyuki Nakajima, The majority of lipoprotein lipase in plasma is bound to remnant lipoproteins: A new definition of remnant lipoproteins, *Clin. Chim. Acta*, 査読有, Vol. 461, 2016, pp. 114-125, DOI: 10.1016/j.cca.2016.06.020

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

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

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 4 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

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 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

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 Ca²⁺ 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

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

Caiyan An, Koichi Sato, Taoya Wu, Muqiri Bao, Liang Bao, Masayuki Tobo, Alatangole Damin, 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

〔学会発表〕(計10件)

佐藤 幸市、茂木 千尋、岡島 史和、脳虚血再灌流モデルマウスの脳病態におけるプロトン感知性受容体 TDAG8 の役割、

ConBio2017、2017.12.6-9、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

佐藤 幸市、岡島 史和、脳虚血傷害マウスにおけるプロトン感知性受容体TDAG8の役割、第56回日本薬学会東北支部大会、2017.6.21、青森大学（青森県・青森市）

Hiroaki Tsurumaki, Chihiro Mogi, Haruka Saito-Aoki1, Koichi Sato, Takashi Nakakura, Masakiyo Yatomi, Yasuhiko Koga, Yoshimasa Hachisu, Akihiro Ono, Kunio Dobashi, Fumikazu Okajima, Takeshi Hisada, Absence of proton-sensing TDAG8 protects against ovalbumin-induced allergic airway inflammation、European Respiratory Society International Congress 2017、2017.9.9-13、Milan（Italy）

鶴巻 寛朗、齋藤 悠、茂木 千尋、佐藤 幸市、佐藤 真季子、矢富 正清、蜂巢 克昌、古賀 康彦、小野 昭浩、澤田 友里、村田 圭祐、前野 敏孝、石塚 全、土橋 邦生、岡島 史和、久田 剛志、T cell death associated gene 8 欠損マウスでは好酸球性気道炎症は抑制される、第66回日本アレルギー学会学術大会、2017.6.16-18、東京国際フォーラム（東京都・千代田区）

Hiroaki Tsurumaki, Takeshi Hisada, Chihiro Mogi, Haruka Aoki-Saito, Masakiyo Yatomi, Yosuke Kamide, Masayuki Tobo, Koichi Sato, Yasuhiko Koga, Akihiro Ono, Kunio Dobashi, Tamotsu Ishizuka, Masanobu Yamada, Fumikazu Okajima, Proton-sensing TDAG8 exhibits the protective role in lipopolysaccharide-induced acute lung injury、European Respiratory Society International Congress 2016、2016.9.3-7、London（UK）

鶴巻 寛朗、齋藤（青木）悠、茂木 千尋、久田 剛志、石塚 全、上出 庸介、矢富 正清、古賀 康彦、小野 昭浩、佐藤 幸市、土橋 邦生、山田 正信、岡島 史和、TDAG8はLPS誘導性急性肺損傷において抑制的に働く、第56回呼吸器学会学術講演会、2016.4.8-10、国立京都国際会館（京都府・京都市）

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）

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）

Koichi Sato, Ye Jin, Ayaka Tobo, Masayuki Tobo, Chihiro Mogi, and Fumikazu Okajima, Acidic pH inhibits interleukin-1 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）

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）

〔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：

(4)研究協力者
()