

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07362

研究課題名(和文) 虚血性脳炎症疾患に伴うミクログリアや微小血管機能変化とpH感知性受容体

研究課題名(英文) Role of proton-sensing G-protein-coupled receptors in the regulation of microglia and microvessel endothelial cell function in the brain stroke 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) 3,400,000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、脳微小血管におけるバリア機能制御にGPR4の関与が予想された。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と創薬の可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では虚血性神経性疾患で報告されている低pH環境変動が中枢神経系細胞群の活性制御を介して神経機能に何らかの作用を及ぼし、脳内恒常性の破綻に関わっているのではないかという仮説を実証しようとしたものである。微小環境因子としてのpH変動は中枢神経系を含む様々な炎症性疾患で生じていると想定されており、このような環境変化を感知する受容体分子の究明は炎症性疾患の新しい治療戦略の構築に寄与すると期待される。また、本研究の成果は細胞外pH変化による多彩な生物作用の分子基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Extracellular acidic pH of ~6.0 has been shown to take place with brain ischemia. However, their mechanisms for signaling an acidic pH in a cerebral injury during ischemia have been poorly elucidated. Proton-sensing OGR1 family G-protein coupled receptors (GPCRs, including OGR1, GPR4, and TDAG8) have been shown to be expressed in central nervous system. This study has focused on the roles of proton-sensing GPCRs in the brain injury in a mouse ischemia reperfusion model. Our results suggested that acidic pH/TDAG8 functions protectively for cerebral infarction by the ischemia model possibly due to the mechanism involving inhibitory actions against microglia function. We also found the involvement of acidic pH/GPR4 in the expression of adhesion molecules in endothelial cells. Thus, although further studies are necessary to clarify the roles of proton-sensing GPCRs in ischemic brain functions, they may help to identify the therapeutic targets for a brain injury accompanied by acidosis.

研究分野：細胞生物学、病態神経科学

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 微小血管内皮細胞 脳内炎症 細胞死 酸性pH

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳虚血部位では低酸素に加え、pH 低下が伴うことが知られている。これは虚血部位の酸素供給の不足により、解糖系 / 乳酸産生が亢進するためと考えられる。一方、脳虚血時には血球系細胞が脳実質内へと浸潤し脳炎症に関わると考えられている。実際、低酸素においては HIF-1 を中心とした解析が先行しており、HIF-1 が血管新生、トランスポーター、アポトーシスの回避に関わる分子群の転写を高め、低酸素から細胞を守っている。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 低下と血球系細胞の浸潤など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。私達を含む国内外のグループによって、細胞外 pH 変動 (pH 8.0~6.0) を感知する OGR1 ファミリー受容体 (OGR1, GPR4, TDAG8) が報告された。これらは G タンパク質共役型受容体であり、生理的ないし炎症部位での役割が想定されている。

(2) 私達は酸性 pH に対する神経系細胞の応答として、ミクログリアにおける炎症性サイトカイン産生抑制応答、培養神経細胞における細胞傷害を弱めるような応答を確認していた。また、末梢の血管内皮細胞において酸性 pH による接着分子の発現制御を観察していた。脳神経系の細胞群 (神経細胞 OGR1、ミクログリア TDAG8、内皮細胞 GPR4) にプロトン感知性受容体の発現を観察していた。このように、虚血に伴う細胞外 pH 低下とプロトン感知性受容体が脳微小血管のバリア機能や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、個体レベルの脳虚血モデル実験の解析に加え、培養細胞を用いた解析も組み合わせ、中枢神経系におけるプロトン感知性受容体の役割を探索した。

### 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。脳神経系にも複数の pH 8.0~6.0 を感知するプロトン感知性受容体が発現している。本研究では、(1) マウスに中大脳動脈閉塞手術を施し、虚血・再灌流後の酸性ストレスによる脳梗塞の進展にこれらの受容体がどのように関わっているかを探索した。また、プロトン感知性受容体を介した (2) ミクログリア活性制御について、(3) 脳微小血管のバリア機能制御についてインビトロで解析を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) 脳虚血・再灌流後の細胞ダメージとその回復過程にそれぞれのプロトン感知性受容体がどのように関わっているか、野生型と各受容体欠損マウスを用いた中大脳動脈虚血モデルにて解析した。脳虚血・再灌流後の脳組織における pH 変動を調べた。脳組織のプロトン感知性受容体サブタイプの発現への影響を調べた。マウス運動機能 (神経学的スコア)、生存率、梗塞領域への影響を調べた。

(2) TDAG8 欠損では脳梗塞領域の拡大する傾向であったことから、TDAG8 欠損マウスに焦点をあて、低 pH 環境変化がミクログリアの活性制御に TDAG8 を介して関わるのか解析を試みた。

TDAG8 欠損による脳梗塞悪化に関与しているのがミクログリアであるかを検証するため、脳虚血・再灌流後の脳組織における炎症性サイトカインの発現を調べた。脳虚血・再灌流後の生体組織における神経系細胞マーカーの変動を調べた。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用いて、培養ミクログリアにおける酸性 pH と LPS シグナルに対する効果、虚血モデルにおける影響を調べた。

(3) GPR4 欠損では梗塞領域の低下する傾向であったことから、低 pH 環境変化が脳微小血管のバリア機能制御に GPR4 を介したシグナルが関わるのか、酸性 pH の影響について内皮細胞を用いて解析した。脳微小血管のバリア機能制御における GPR4 欠損の影響を調べるため、血漿成分の脳実質内へ漏出を調べた。マウス脳微小血管由来の内皮細胞を用いて、TNF- $\alpha$  による接着分子の発現調節を調べ、TNF- $\alpha$  シグナルに対する酸性 pH/GPR4 効果に関するシグナル伝達機構を解析した。

### 4. 研究成果

(1) マウス脳梗塞モデルにおけるプロトン感知性受容体の役割:

虚血・再灌流後の脳組織における pH 変動を調べた。また、脳虚血後のダメージにプロトン感知性受容体がどのような役割を担っているか、マウスの脳虚血モデルを用いて解析した。マイクロ pH センサーを用いて脳組織における pH 変動を調べたところ、中大脳動脈を閉塞すると血流支配領域の pH 低下が観察された。プロトン感知性受容体サブタイプ発現への虚血・再灌流による影響を調べた。大脳組織において TDAG8、GPR4、OGR1 は明らかに発現しており、虚血・再灌流処置による TDAG8 の誘導が観察された。プロトン感知性受容体欠損による脳虚血マウスの運動機能、梗塞領域への影響を調べた。TDAG8 欠損では虚血・再灌流による運動機能低下や梗塞領域が軽減されていた。また、GPR4 欠損では梗塞領域の低下する傾向が見られた。このように、脳組織は虚血によって弱酸性 pH に暴露され、プロトン感知性受容体が pH 変化を感知し、脳虚血後のダメージに対して何らかの作用を及ぼしていると推測された。

( 2 ) プロトン感知性受容体を介したミクログリア活性制御 :

低 pH 環境変化がミクログリアの活性制御に TDAG8 を介して関わるのか、マウスの脳虚血モデルを用いて解析した。虚血・再灌流後の脳組織における炎症性サイトカインの mRNA 発現を調べたところ、TDAG8 欠損による TNF- $\alpha$  や IL-1 の上昇が観察された。虚血・梗塞領域における活性化型ミクログリアの変動を調べたところ、TDAG8 欠損マウスの梗塞層境界領域においてより高い誘導が見られた。単離したミクログリアにおいて LPS シグナルに対するミノサイクリンの効果は有効であった。そこで、ミノサイクリン投与マウスを用いて調べたところ、TDAG8 欠損マウスにおける運動機能低下や梗塞悪化が有意に軽減された。このように、脳組織は虚血によって弱酸性 pH に暴露され、ミクログリアに発現している TDAG8 が pH 変化を感知し、脳虚血後のダメージに対して保護作用を及ぼしていると推測された。

( 3 ) プロトン感知性受容体を介した脳微小血管のバリア機能制御 :

虚血による低 pH 環境変化が脳微小血管のバリア機能制御に GPR4 が関わるのか調べた。また、酸性 pH による内皮細胞の接着分子発現調節におけるシグナル伝達機構を解析した。野生型マウスに対して GPR4 欠損マウスでは虚血・再灌流後の梗塞領域が縮小、また、血漿成分の脳実質内へ漏出が減少する傾向であった。TNF- $\alpha$  による単球の内皮細胞への接着応答を調べたところ、TNF- $\alpha$  作用に対する酸性 pH による増強効果が観察された。また、酸性 pH 刺激による GPR4 (cAMP、Rho シグナル系) を介した接着分子の発現調節作用が観察された。このように、脳組織は虚血によって弱酸性 pH に暴露され、内皮細胞に発現している GPR4 が pH 変化を感知し、虚血後の脳病態に影響を及ぼすと推測された。

( 4 ) 本研究で得られた成果と今後の展望 :

本課題の成果として、虚血による pH 変化に伴うミクログリアの TDAG8 を介した抗炎症性作用がマウス脳梗塞モデルでの検討から推測された。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。一方、GPR4 が脳微小血管の構造変化に影響を及ぼすとマウス内皮由来細胞を用いた検討から予想されたが、虚血後の血球系細胞の浸潤に関する定量的解析、マウス脳微小血管と内皮細胞を用いるインビトロでの解析が十分でなかった。今後も継続して、脳虚血・再灌流後の微小血管のバリア機能制御と組織傷害に OGR1 受容体ファミリーがどのように関わっているか、虚血実験を用いた経時的な解析を試みたい。また、組織培養や細胞培養におけるミクログリアと浸潤血球系細胞による炎症反応への酸性 pH 影響について、OGR1 受容体ファミリーの役割を追究する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Koichi, Toba Ayaka, Mogi Chihiro, Toba Masayuki, Yamane Nobuhiro, Tosaka Masahiko, Tomura Hideaki, Im Dong-Soon, Okajima Fumikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 The protective role of proton-sensing TDAG8 in the brain injury in a mouse ischemia reperfusion model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74372-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato Koichi, Mogi Chihiro, Mighell Alan J., Okajima Fumikazu	4. 巻 526
2. 論文標題 A missense mutation of Leu74Pro of OGR1 found in familial amelogenesis imperfecta actually causes the loss of the pH-sensing mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 920 ~ 926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Musha Shiori, Yoshida Saishu, Murakami Syo, Kojima Ryotaro, Deai Masahito, Saso Naoshi, Mogi Chihiro, Sato Koichi, Okajima Fumikazu, Tomura Hideaki	4. 巻 66
2. 論文標題 Involvement of GPR4 in increased <i>growth hormone</i> and <i>prolactin</i> expressions by extracellular acidification in MtT/S cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 175 ~ 180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1262/jrd.2019-159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Syo, Mochimaru Yuta, Musha Shiori, Kojima Ryotaro, Deai Masahito, Mogi Chihiro, Sato Koichi, Okajima Fumikazu, Tomura Hideaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Species-Dependent Enhancement of Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1 Activation by Ogerin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 103 ~ 103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs190106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Ryotaro, Horiguchi Kotaro, Mochimaru Yuta, Musha Shiori, Murakami Syo, Deai Masahito, Mogi Chihiro, Sato Koichi, Okajima Fumikazu, Tomura Hideaki	4. 巻 517
2. 論文標題 Characterization of molecular mechanisms of extracellular acidification-induced intracellular Ca <sup>2+</sup> increase in L T2 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 636 ~ 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Musha Shiori, Nagayama Suminori, Murakami Syo, Kojima Ryotaro, Deai Masahito, Sato Koichi, Okajima Fumikazu, Ueharu Hiroki, Tomura Hideaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Protons Differentially Activate TDAG8 Homologs from Various Species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 105 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs180128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kadowaki Maiko, Yamada Hidenori, Sato Koichi, Shigemi Hiroko, Umeda Yukihiro, Morikawa Miwa, Waseda Yuko, Anzai Masaki, Kamide Yosuke, Aoki-Saito Haruka, Hisada Takeshi, Okajima Fumikazu, Ishizuka Tamotsu	4. 巻 16
2. 論文標題 Extracellular acidification-induced CXCL8 production through a proton-sensing receptor OGR1 in human airway smooth muscle cells: a response inhibited by dexamethasone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Inflammation	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12950-019-0207-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mochimaru Yuta, Negishi Jun, Murakami Syo, Musha Shiori, Sato Koichi, Okajima Fumikazu, Tomura Hideaki	4. 巻 35
2. 論文標題 Metals Differentially Activate Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1 in Various Species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 109 ~ 114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs170145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤幸市、茂木千尋、MigheII A.J.、岡島史和
2. 発表標題 エナメル質形成不全症の家系から発見されたプロトン感知性受容体OGR1変異体Leu74Proの機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門脇麻衣子、佐藤幸市、神尾尚志、熊谷信、梅田幸寛、早稲田優子、安斎正樹、重見博子、齋藤悠、久田剛志、岡島史和、石塚全
2. 発表標題 金属刺激によるヒト気道平滑筋細胞のIL-6産生とステロイドの抑制効果
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Tsurumaki, H. Saito-Aoki, C. Mogi, K. Sato, T. Nakakura, Y. Koga, M. Yatomi, M. Sato, K. Dobashi, F. Okajima, T. Hisada
2. 発表標題 T cell death associated gene 8 mediates MUC5AC expression in acidic conditions.
3. 学会等名 European Respiratory Society International Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門脇麻衣子、佐藤幸市、熊谷信、神尾尚志、本定千知、重見博子、梅田幸寛、森川美羽、早稲田優子、安斎正樹、齋藤悠、久田剛志、岡島史和、石塚全
2. 発表標題 金属刺激によるヒト気道平滑筋細胞のIL-6産生
3. 学会等名 第50回日本職業・環境アレルギー学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴巻寛朗、齋藤悠、茂木千尋、佐藤幸市、中倉敬、古賀康彦、矢富正清、佐藤真季子、石塚全、土橋邦生、岡島史和、久田剛志
2. 発表標題 T cell death associated gene 8はOvalbumin誘導喘息モデルにおいてMUC5ACを制御する
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Tsurumaki, H. Saito-Aoki, C. Mogi, K. Sato, T. Nakakura, Y. Koga, M. Yatomi, M. Sato, K. Dobashi, F. Okajima, T. Hisada
2. 発表標題 T cell death associated gene 8 mediates MUC5AC expressions in the ovalbumin-induced asthma model.
3. 学会等名 XXIV World Congress of Asthma 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長澤拓海、佐藤幸市、宮下かずや、深町勇、中嶋克行、町田哲男、村上正巳、安部由美子
2. 発表標題 固相化リポ蛋白リパーゼ(LPL)抗体を用いた血中レムナントリポ蛋白の単離の試み
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生体調節研究所シグナル伝達グループホームページ <a href="https://signal-transduction.imcr.gunma-u.ac.jp/index.html">https://signal-transduction.imcr.gunma-u.ac.jp/index.html</a> 群馬大学生体調節研究所ホームページ <a href="https://www.imcr.gunma-u.ac.jp">https://www.imcr.gunma-u.ac.jp</a> 群馬大学ホームページ <a href="https://www.imcr.gunma-u.ac.jp">https://www.imcr.gunma-u.ac.jp</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	Kyung Hee University			
英国	University of Leeds			