

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14845

研究課題名(和文) GPCRを標的とした新規迷走神経制御機構の探索とその生理機能の解析

研究課題名(英文) Screening and profiling of GPCRs in vagal afferent nerve

研究代表者

可野 邦行 (Kano, Kuniyuki)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：50636404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：内臓の環境変化を感知する知覚神経として機能する求心性迷走神経に対し、その新たな感知メカニズムを明らかにすべく、迷走神経に発現するGタンパク質共役型受容体(GPCR)の網羅的な探索を行った。その結果、主に生理活性脂質をリガンドとするGPCRが多数確認され、そのうちのいくつかが実際に迷走神経を活性化させるポテンシャルを有すること、迷走神経を介して呼吸や炎症性サイトカイン、摂食行動を変動させうることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

迷走神経はほぼ全ての内臓機能を支配する神経であり、この神経の活性化によって臓器機能が変化する。最近、迷走神経を標的とした疾患治療戦略が注目されているが、迷走神経の活性化機構の理解が十分ではないことから、電気刺激デバイスを外科的に埋め込むことで迷走神経を活性化させる必要がある。本研究では迷走神経の新たな活性化機構を明らかにすべく、特に脂質を認識する受容体に着目して解析したところ、実際に脂質受容体の作動薬が迷走神経を活性化させ、一部の臓器機能を変化させることを見出した。従って、今後これらのメカニズムをより詳細に解析することで、脂質受容体を通じた迷走神経制御が可能になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：For a comprehensive analysis of gene expression in vagal afferents, we performed RNA sequencing on vagal afferents (nodose ganglia). Many GPCRs for bioactive lipids including LPA, S1P, LysoPS, prostanoid and leukotriene. In situ hybridization analysis revealed that S1P3 was highly expressed in most neurons. In contrast, LPA3, LPA5, LPS3 and CysLT2 were detected in small groups. To know whether these lipid receptors activate vagal afferents, we examined the expression of c-fos, a marker for neuronal activity, in the medulla oblongata. The administration of each GPCR agonist increased c-fos mRNA level, suggesting that afferent vagal nerve is excited by these GPCRs activation. We also found some novel pharmacological actions of each GPCR agonist in vagal afferents-dependent manner. Overall, this study provides a novel lipid receptor-dependent sensing mechanisms in vagal afferents. These receptor agonists have promise as drugs for regulating vagal activity.

研究分野：生理活性脂質

キーワード：求心性迷走神経 生理活性脂質 Gタンパク質共役型受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

求心性迷走神経はほぼ全ての内臓に投射し、末梢で何らかの環境変化を生じた際にこれを感じ、中枢へ情報をフィードバックする知覚神経として機能する。この迷走神経の活性化は生体内の恒常性維持に必須であり、この機構の破綻は様々な疾患と関連することも明らかになっている。従って、近年、迷走神経活性化が新たな創薬ターゲットとして注目されてきている。この求心性迷走神経の活性化機構(感知機構)はこれまで主にイオンチャネルについての研究が進められてきたが、一方で、生体内の様々な代謝物・低分子化合物を認識する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) についての研究はあまり進んでいなかった。最近、研究代表者は生理活性脂質として知られるリゾリン脂質の研究を進める過程で、代表的なリゾリン脂質であるリゾホスファチジン酸 (LPA) の受容体の 1 つ LPA<sub>3</sub> が求心性迷走神経に高発現しており、LPA<sub>3</sub> の活性化によって迷走神経が興奮し心機能を抑制することを見出した。従来、リゾリン脂質やその他の生理活性脂質 (プロスタグランジン等) はそれぞれに特異的な GPCR に認識されることで、疼痛を感じ、知覚神経を活性化させることが明らかとなっていたが、迷走神経における機能はよくわかっていない。従って、このような背景から、迷走神経には LPA<sub>3</sub> 以外にも様々な生理活性脂質の受容体が存在し、生体恒常性の維持に寄与する可能性が想定された。

### 2. 研究の目的

本研究では迷走神経に発現する GPCR を網羅的に探索し、その GPCR の活性化に伴って迷走神経活動が変化し得るか、さらにはその結果として個体レベルにおいて何らかの生理機能が発揮し得るかを明らかにすることを目的とした。特に、様々な GPCR の中でも研究代表者の研究背景である脂質をリガンドとするものを優先的に解析対象とすることで、生理活性脂質による新規迷走神経制御機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

まず研究対象とする GPCR を選別するべく、RNA-sequence (RNA-seq) による網羅的な遺伝子発現の解析と高感度 *in situ* hybridization (ISH) 法を組み合わせることで、求心性迷走神経の神経節において、特定の細胞体に発現している GPCR を探索した。ここで候補となった GPCR について、それらの特異的作動薬をマウスに投与し、一定時間後に延髄弧側角における神経興奮マーカー (c-fos) の発現量を免疫染色または ISH 法で評価を行うことで、迷走神経活性化の有無を検討した。c-fos 陽性細胞増加を明瞭に認めた候補 GPCR に対し、その作動薬投与時に迷走神経興奮によって誘導される薬理作用を徹底的に検証し、さらに迷走神経の外科的切除や薬剤による除神経によって迷走神経依存性を確認した。これら GPCR の内在性の機能はノックアウト (KO) マウスの表現型解析を通じて行った。

### 4. 研究成果

マウスから求心性迷走神経の神経節 (NG: nodose ganglion) を回収して RNA-seq を行ったところ、50 種類以上の GPCR が、上述の既に迷走神経を興奮させる機能が明らかとなっている LPA<sub>3</sub> 受容体と同等あるいはそれ以上のレベルで発現していることがわかった。この中で脂質をリガンドとする GPCR として、LPA、リゾホスファチジルセリン (LysoPS)、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P)、プロスタグランジン (PG)、システニルロイコトリエン (CysLT)、酸化リノール酸含有リン脂質 (oxDLPLs) をリガンドとする GPCR が含まれていた。また、リガンド既知の GPCR だけではなく、リガンド及びその機能が全く不明な GPCR (orphan GPCR) も 10 数種類ほど高発現していた。すなわちこれらの候補の中に、迷走神経制御を担う未解明の GPCR が多く含まれていることが強く示唆された。

次に、これらの GPCR の mRNA の NG における局在を RNAscope を用いた高感度 ISH 法でそれぞれ評価を行った。その結果、NG に発現している GPCR は、(1) ほぼ全ての迷走神経に発現しているもの、(2) 特定の迷走神経に限局して発現しているもの、(3) グリア細胞等の迷走神経以外に発現しているもの、に選別できた。さらに、既存の、あるいは研究代表者の所属する研究室で独自に開発された、各 GPCR の作動薬をマウスに静脈内投与し、迷走神経の活性化を c-fos 発現レベルの変化を元に評価した。その結果、(1) および (2) を満たし、かつ、作動薬の投与で迷走神経を活性化させる脂質 GPCR として、LPA<sub>3</sub>・LPA<sub>5</sub> (LPA 受容体)、LPS<sub>3</sub> (LysoPS 受容体)、S1P<sub>3</sub> (S1P 受容体)、CysLT<sub>2</sub> (CysLT 受容体)、Mrgb5 (oxDLPLs 受容体) を選別できた。特に、(2) の発現パターンを示す LPA<sub>3</sub>、LPA<sub>5</sub>、LPS<sub>3</sub> および Mrgb5 は、特定の臓器を支配する迷走神経を限局的に制御する可能性が強く示唆された。また、orphan GPCR ではあるが、迷走神経特異的に、顕著な発現を示した GPR149 も候補に加え、計 7 種類の GPCR を迷走神経制御 GPCR として想定し、次の解析に進めた。

これら GPCR の迷走神経を介した個体レベルでの機能を明らかにするため、各作動薬の迷走神経依存的な薬理作用を探索した。まず、LPA<sub>3</sub> 作動薬 (T13) を用いた解析からは、既知の心機能抑制作用 (降圧・徐脈) だけではなく、気管内投与によって迷走神経依存的な呼吸リズムの変動 (浅く早い呼吸への変化) が認められた。同様の現象は Mrgb5 作動薬 (oxDLPLs) においても

迷走神経依存的に認められたことから、生理活性脂質をリガンドとする複数の GPCR が肺に投射する迷走神経の制御を担っている可能性が示唆された。また、LPA<sub>3</sub> 作動薬の投与によってマウス個体において一般に迷走神経の活性化が関与するとされている、摂食量の低下、炎症性サイトカイン (TNF $\alpha$ 、IL-6) の抑制を示すことも明らかとなった。一方、S1P<sub>3</sub> 作動薬投与によって、血糖値上昇という新たな薬理作用を見出したが、迷走神経切除によって影響を受けなかったことから、迷走神経以外に発現している S1P<sub>3</sub> を介した作用であることが想定された。また、様々な肺疾患 (肺繊維症モデル・誤嚥性肺炎モデル) 腹膜炎性敗血症モデルを作成し、病態局所 (肺胞洗浄液、腹腔洗浄液) の解析を最先端の LC-MS/MS システムを用いて行ったところ、これらの生理活性リゾリン脂質のレベルが顕著に上昇することを見出した。従って、これらの病理的状況下で特異的に産生されたリゾリン脂質が迷走神経を介して作用していることが強く示唆され、今後、KO マウスや産生酵素の阻害剤を用いた迷走神経活性の変化について解析が望まれる。最後に、リガンド未知の GPR149 の迷走神経における機能を明らかにすべく、GPR149 の恒常活性化を試みた。そこで、いくつかの GPCR で恒常活性化を促すことが知られている膜貫通領域アミノ酸の点変異を GPR149 に導入したが、残念ながら GPR149 の活性化は確認できなかった。そこで、マウス個体レベルでの解析を行うべく、GPR149 欠損マウスを CRISPR-Cas9 システムで作成し、機能欠失していると思われる複数の KO ラインの樹立に成功した。今後、この KO マウスの表現型解析から GPR149 の迷走神経における機能が明らかになることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kano Kuniyuki, Matsumoto Hirota, Inoue Asuka, Yukiura Hiroshi, Kanai Motomu, Chun Jerold, Ishii Satoshi, Shimizu Takao, Aoki Junken	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular mechanism of lysophosphatidic acid-induced hypertensive response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-39041-4	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

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 可野邦行
2. 発表標題 迷走神経とGPCR
3. 学会等名 第18回生物化学若手研究者セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuniyuki Kano
2. 発表標題 Screening of novel G protein-coupled receptors regulating afferent vagal activity
3. 学会等名 ICBL 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuniyuki Kano
2. 発表標題 Imaging MS analysis of lysophospholipids using AP-MALDI-MS
3. 学会等名 International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤悠喜飛、可野邦行、菅野真由、青木淳賢
2. 発表標題 迷走神経を制御する新規GPCRの探索
3. 学会等名 第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤悠喜飛、可野邦行、青木淳賢
2. 発表標題 迷走神経におけるGPCRを介した新規受容機構の解析
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅野真由、可野邦行、佐藤悠喜飛、青木淳賢
2. 発表標題 求心性迷走神経を活性化する新規GPCRの探索
3. 学会等名 第57回日本薬学会東北支部会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----