

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591034

研究課題名（和文）細胞外pHストレスを感知するG蛋白連関型受容体と動脈硬化

研究課題名（英文）Role of the G-protein-coupled receptors that sense an extracellular pH-stress in arteriosclerotic functions of vascular cells

研究代表者

戸村 秀明（TOMURA HIDEAKI）

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：70217553

研究成果の概要：正常の血管内膜のpHは7.7前後であるが、動脈硬化症のリポドリッチな部位ではpHが7.1程度まで低下する。細胞外pHの低下は血管を構成する細胞の種々の機能を変化させるがその実体は不明である。本研究では「OGR1ファミリーが、pHセンサーとして機能し、動脈硬化症と関連した血管機能の制御に関与している」との仮説のもとに実験を行った。その結果、この受容体ファミリーが、動脈硬化に関係する種々の血管細胞機能を調節していることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：細胞・組織、シグナル伝達、生理活性、pH、G蛋白連関型受容体

## 1. 研究開始当初の背景

正常の血管内膜のpHは7.7前後であるが、動脈硬化症のリポドリッチな部位ではpHが7.1程度まで低下する。このような細胞外のpH変化は炎症細胞の浸潤、嫌気的な条件下での乳酸産生を伴う解糖系が活発なためと推定される。細胞外pHの低下は血管内皮細胞では細胞接着分子の発現抑制、NO産生亢進、血管平滑筋細胞では、細胞増殖、細胞遊走を変化させることが知られている。このような血管細胞機能は動脈硬化の発症、進展に対し何らかの関わりをもっていると考えられるが、

細胞外pHの低下がどのようなメカニズムで血管細胞機能を制御しているか、またその意義に関しては全く不明である。我々はこれまでに、OGR1ファミリー受容体（OGR1, GPR4, TDAG8, G2A）を解析している途中で、TDAG8がOGR1, GPR4と同様に細胞外pHストレスを感知するG蛋白連関型受容体（GPCR）であること、またヒト血管平滑筋細胞において、短時間（30分以内）の細胞外pHの低下が、OGR1受容体を介してプロスタサイクリンの産生を引き起こすことを明らかにしてきた。このような背景から私は、血管機能に対する未知の

pHセンサーの実体のひとつがOGR1ファミリーであるとの着想を得た。

## 2. 研究の目的

OGR1 受容体ファミリーは、生体内の中性から弱酸性のわずかな pH 変化を感知し、受容体の活性化、G 蛋白、細胞内シグナル伝達系へと情報を伝えることができるユニークな受容体ファミリーである。私は「この新規GPCRファミリーが、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞における pH センサーとして機能し、動脈硬化症と関連した血管機能の制御に関与している」との仮説を立てた。本研究では動脈硬化に関係する血管機能に対する OGR1 受容体ファミリーの関与を調べる。

## 3. 研究の方法

ヒト血管内皮細胞 (HUVEC)、ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (AoSMC) は、購入品を使用した (Whittaker Bioproducts 社、Lonza 社)。siRNA は Dharmacon 社のものを使用した。cAMP 量は RIA 法により測定した。細胞増殖応答はチミジンの取り込み量で測定した。摘出血管の張力はマグヌス法により測定した。mRNA 量は TaqMan PCR 法にて、COX-2 蛋白発現は、western 法を用いて測定した。プロスタサイクリン量は、EIA 法により測定した (Cayman 社)。

## 4. 研究成果

本研究により、以下の研究成果を得た。1. 血管細胞における OGR1 ファミリーの機能：血管内皮細胞 (HUVEC) では GPR4 の発現を観察している。そこで、GPR4 特異的 siRNA を用いて cAMP 応答を解析した。その結果、siRNA 処理により、pH 低下に伴う cAMP 産生量が減少した。すなわち、HUVEC では、細胞外液の酸性化に伴う cAMP 産生が GPR4 を介して引き起こされていることが明らかとなった。次に、OGR1 受容体が細胞増殖応答に係わるかどうか、OGR1 受容体に特異的な siRNA、シクロオキシゲナーゼ阻害剤 (インドメサシン) を用いて、ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (AoSMC) の細胞増殖応答を解析した。PDGF 刺激によって AoSMC のチミジンの取り込みは増加する。そして、細胞外液の pH 低下に伴いその取り込みは抑制された。OGR1siRNA、インドメサシンで AoSMC を処理するとこの抑制応答が、解除される傾向が観察された。しかしながら、その解除の程度は低い。2. 摘出血管での張力測定：ラット、マウス大動脈平滑筋の張力は、細胞外 pH の低下により低下する。この弛緩作用はインドメサシンによって減弱する傾向が観察された。しかしながら、その減弱の程度は低い。3. OGR1 受容体ファミリー発現：マウスの血管平滑筋における OGR1 ファミリーの mRNA 発現量を測定した。その結

果、GPR4 の発現が優位であることを見出した。また、週齢の違いによって GPR4 発現の優位性は変化しなかった。4. プロスタサイクリンは血小板凝集阻害や細胞増殖・遊走の抑制など、血管機能に関与する。長期間 (数時間) の細胞外 pH の低下に伴い、AoSMC において、COX-2 の発現誘導 (mRNA レベル、蛋白レベル) と、その結果、さらなるプロスタサイクリンの産生が引き起こされることを、見出した。この COX-2 発現誘導に対する、OGR1 ファミリーの関与を OGR1 に特異的な siRNA を用いて解析した。その結果、細胞外 pH の低下による COX-2 の発現誘導とプロスタサイクリンの産生は OGR1siRNA 処理により減弱した。一方、インターロイキン-1 $\alpha$  刺激による COX-2 発現誘導は、OGR1siRNA 処理により影響を受けなかった。従って、pH 低下に伴う COX-2 発現誘導には OGR1 が関与していることが明らかとなった。次に、関与する三量体 G 蛋白を調べた。その結果、この応答には Gi, Gq が関与することが明らかとなった。さらにその下流のシグナル系を解析したところ、PKC に対する阻害剤でプロスタサイクリン産生が抑制されたことから、PKC が関与していることが推定された。以上の結果から、OGR1 受容体ファミリーが、動脈硬化に関係する種々の血管機能を調節していることが明らかとなったが、その関与の程度は機能により異なっていることが示唆された。

## 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 14 件)

- ① Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T, Sato T, Kihara Y, Ishii S, Harada A, and Okajima F. (査読有): Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages *J Immunol.* 182:3243-51, 2009
- ② Komachi M, \*Tomura H, Malchinkhuu E, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Kimura T, Kuwabara A, Ohta H, Im DS, Kurose H, Takeyoshi I, Sato K, and Okajima F. (査読有): LPA1 receptors mediate

- stimulation, whereas LPA2 receptors mediate inhibition, of migration of pancreatic cancer cells in response to lysophosphatidic acid and malignant ascites **Carcinogenesis** 30:457-65, 2009 (\*corresponding author).
- ③ Kimura T, Mogi C, Tomura H, Kuwabara A, Im DS, Sato K, Kurose H, Murakami M, and Okajima F. (査読有): Induction of scavenger receptor class B type I is critical for simvastatin enhancement of high-density lipoprotein-induced anti-inflammatory actions in endothelial cells **J Immunol.** 181:7332-40, 2008
- ④ Nochi H, Tomura H, Tobo M, Tanaka N, Sato K, Shinozaki T, Kobayashi T, Takagishi K, Ohta H, Okajima F, and Tamoto K. (査読有): Stimulatory role of lysophosphatidic acid in cyclooxygenase-2 induction by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in fibroblast-like synovial cells **J Immunol.** 181:5111-9, 2008
- ⑤ Enya M, Horikawa Y, Kuroda E, Yonemaru K, Tonooka N, Tomura H, Oda N, Yokoi N, Yamagata K, Shihara N, Iizuka K, Saibara T, Seino S, and Takeda J. (査読有): Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients **Hum Mutat.** 29:E271-7, 2008
- ⑥ Jo JY, Kim HL, Lee YK, Tomura H, Bae YS, Okajima F, and Im DS. (査読有): N,N-Dimethyl-D-erythro-sphingosine inhibits store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in U937 monocytes **J Pharmacol Sci.** 107:303-7, 2008
- ⑦ \*Tomura H, Wang JQ, Liu Jp, Komachi M, Damirin A, Mogi C, Tobo M, Nochi H, Tamoto K, Im DS, Sato K, and Okajima F. (査読有): Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production in Response to Acidic pH Through OGR1 in A Human Osteoblastic Cell Line **J Bone Miner Res.** 23:1129-39, 2008 (\* corresponding author).
- ⑧ Malchinkhuu E, Sato K, Maehama T, Mogi C, Tomura H, Ishiuchi S, Yoshimoto Y, Kurose H, and Okajima F. (査読有): S1P(2) receptors mediate inhibition of glioma cell migration through Rho signaling pathways independent of PTEN. **Biochem Biophys Res Commun.** 366: 963-8, 2008
- ⑨ Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, Mogi C, Tomura H, Tosaka M, Yoshimoto Y, Kuwabara A, and Okajima F. (査読有): Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. **J Neurochem.** 103: 2610-19, 2007
- ⑩ Sato K, Malchinkhuu E, Horiuchi Y, Mogi C, Tomura H, Tosaka M, Yoshimoto Y, Kuwabara A, and Okajima F. (査読有): HDL-like lipoproteins in cerebrospinal fluid affect neural cell activity through lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate. **Biochem Biophys Res Commun.** 359: 649-54, 2007
- ⑪ Tobo M, Tomura H, Mogi C, Wang JQ, Liu JP, Komachi M, Damirin A, Kimura T, Murata N, Kurose H, Sato K, and Okajima

F. (査読有): Previously postulated "ligand-independent" signaling of GPR4 is mediated through proton-sensing mechanisms. **Cell Signal.** 19:1745-53, 2007

- ⑫ Damirin A, Tomura H, Komachi M, Liu JP, Mogi C, Tobo M, Wang JQ, Kimura T, Kuwabara A, Yamazaki Y, Ohta H, Im DS, Sato K, and Okajima F. (査読有): Role of lipoprotein-associated lysophospholipids in migratory activity of coronary artery smooth muscle cells. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 292:H2513-22, 2007.
- ⑬ Yajima S, Kubota M, Nakakura T, Hasegawa T, Katagiri N, Tomura H, Sasayama Y, Suzuki M, and Tanaka S. (査読有): Cloning and expression of vacuolar proton-pumping ATPase subunits in the follicular epithelium of the bullfrog endolymphatic sac. **Zoolog Sci.** 24:147-57, 2007.
- ⑭ Uchiyama T, Atsuta H, Utsugi T, Oguri M, Hasegawa A, Nakamura T, Nakai A, Nakata M, Maruyama I, Tomura H, Okajima F, Tomono S, Kawazu S, Nagai R, and Kurabayashi M. (査読有): HSF1 and constitutively active HSF1 improve vascular endothelial function (heat shock proteins improve vascular endothelial function). **Atherosclerosis.** 190: 321-9, 2007.

[学会発表] (計4件)

- ① 戸村秀明、一文字功、石塚全、小町麻由美、当房雅之、佐藤幸市、茂木千尋、森昌朋、岡島史和「細胞外pHの低下に伴うヒト気管支平滑筋細胞からのインター

ロイキン6の産生は、OGR1受容体を介して引き起こされる」、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会、2008年12月11日、神戸

- ② 戸村秀明、劉進朋、当房雅之、Doon-Soon Im、茂木千尋、岡島史和「ヒト骨芽細胞における細胞外pHの低下に伴うCOX-2発現誘導・PGE2産生とOGR1受容体の関連解析」第50回日本脂質生化学会、2008年6月5日、徳島
- ③ Hideaki Tomura, Jin-peng Liu, Mayumi Komachi, Wang Ju Qiang, Masayuki Tobo, Hiromi Nochi, Koichi Tamoto, Alatangaole Damirin, Koichi Sato, Chihiro Mogi, and Fumikazu Okajima 「Acidic pH Induced Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production through Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) in Human Osteoblasts」、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、2007年12月14日、横浜
- ④ 戸村秀明、当房雅之、茂木千尋、岡島史和「細胞外pHを関知するG蛋白連関型受容体の細胞内情報伝達機構」第32回日本比較内分泌学会、2007年10月12-13日、日光

[その他]

ホームページ等

アドレス

<http://imcr.showa.gunma-u.ac.jp/lab/signal/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

戸村 秀明 (TOMURA HIDEAKI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：70217553