

令和 5 年 4 月 14 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07078

研究課題名(和文) オーファンGタンパク質共役型受容体GPR35の炎症性腸疾患の病態における役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenic role of orphan G protein coupled receptor GPR35 in inflammatory bowel diseases

研究代表者

加藤 伸一 (Kato, Shinichi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90281500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：オーファンGタンパク質共役型受容体GPR35のIBDの病態における役割について検討した。GPR35KOマウスではWTマウスと比較してDSS誘起大腸炎が有意に増悪した。粘液分泌およびタイトジャンクション関連タンパク質発現は、WTとGPR35KOマウスの間に差は認められなかった。一方、骨髄から分化誘導したマクロファージにおけるLPS誘起サイトカイン発現の増大は、GPR35KOマウスではWTマウスと比較して有意に増強した。以上の結果より、GPR35は大腸炎の病態に保護的に機能していることが判明した。この作用には、腸上皮バリア機能の制御は関与しておらず、炎症免疫応答の抑制に起因しているものと視察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GPR35は未だ内因性リガンドが同定されていないオーファンGPCRであり、消化管に比較的高発現していることが知られているが、その生理学および病態生理学的役割については不明である。本研究では、GPR35遺伝子欠損マウスを新たに作出し検討を行い、GPR35が炎症性腸疾患の病態において保護的に機能していることを明らかにした。さらに、その機序として、GPR35のマクロファージレベルにおける炎症免疫応答の抑制が関与していることを明らかにした。これらの知見は、GPR35が炎症性腸疾患に対する新たな治療標的として有用であることを示すとともに、炎症免疫応答の異常に起因する他の自己免疫疾患にも展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the role of orphan G protein-coupled receptor GPR35 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Seven days DSS treatment produced severe colitis in mice. The severity of DSS-induced colitis was significantly aggravated in GPR35-deficient (KO) mice when compared with wild-type (WT) mice. There is no difference in mucus secretion and tight junction-related protein expressions between WT and GPR35KO mice. In contrast, in bone marrow-derived macrophages, LPS-induced up-regulation of cytokines expression was significantly augmented in GPR35KO mice when compared with WT mice. These findings suggest that GPR35 plays a protective role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. This action may be accounted for by inhibition of immune and inflammatory responses at macrophage levels but not regulation of epithelial barrier functions. Thus, GPR35 may be a promising target for treatment of inflammatory bowel disease.

研究分野：消化器薬理・炎症免疫薬理

キーワード：GPR35 炎症性腸疾患 マクロファージ サイトカイン 粘液分泌 タイトジャンクション関連タンパク質

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。

1. 研究開始当初の背景

GPR35 は、1998 年に同定されたオーファン G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、消化管に高発現しているほか、肺、心血管系、さらにはマクロファージ、リンパ球、肥満細胞などの炎症・免疫細胞にも発現している。GPR35 の内因性リガンドとしては、キヌレン酸やリゾホスファチジン酸(LPA)、CXCL17 などが報告されているが、親和性や特異性、種差などの点から内因性リガンドとしては疑問視されている。ゆえに、GPR35 の生体における役割については、内因性リガンドも含めて未だ不明な部分が多い。

潰瘍性大腸炎(UC)やクローン病(CD)に代表される炎症性腸疾患(IBD)は、原因不明の慢性の炎症性疾患であり、患者数は UC と CD を合わせると、世界で 500 万人以上、わが国でも 30 万人を超えている。近年、生物学的製剤の登場により、IBD の治療は大きく進歩したが、治療抵抗例や生物学的製剤を使用できない例も多く、さらなる治療オプションの開発が望まれている。

我々は最近、GPR35 作動薬であるパモ酸の投与が実験的大腸炎を抑制すること、またこの作用には腸上皮の修復促進が関与することを見出した[Tsukahara, Kato et al., Pharmacol Res, 2017]。しかし、パモ酸の大腸炎抑制効果が GPR35 を介したものであるかについては完全に証明できていない。また、GPR35 は炎症・免疫細胞にも発現していることから、炎症・免疫応答の制御を介している可能性も推察される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、IBD とその合併症の病態における GPR35 の役割を明らかにし、GPR35 を標的とした新たな治療理論を提案することである。本研究を効果的に進めるため、応募者は GPR35 遺伝子欠損(KO)マウスを新たに作製した。本研究では、GPR35KO マウスを用いた個体レベルでの検討により、1) IBD の病態および 2) 腸上皮バリア機能制御における GPR35 の役割、さらにマウス骨髄分化マクロファージを用いて、3) 炎症免疫応答制御における GPR35 の役割について検討した。

3. 研究の方法

1) デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘起大腸炎

野生型(WT)および GPR35KO マウスに 2%DSS 溶液を 7 日間自由飲水投与した。投与期間中の体重変化と下痢・血便の程度、7 日目における大腸の長さと同組織学的評価を行った。

2) 腸上皮バリア機能の評価

WT および GPR35KO マウスの大腸における粘液分泌はアルシアンブルー・PAS 染色および MUC2 の免疫組織染色により評価した。また、各種タイトジャンクションタンパク質発現は Western blot により評価した。

3) 炎症免疫応答の評価

WT および GPR35KO マウスから骨髄細胞を採取し、M-CSF 存在下に 7 日間培養することでマクロファージに分化誘導した。骨髄分化マクロファージに LPS (100 ng/mL) を処置し、2 時間後におけるサイトカイン発現を定量 RT-PCR により評価した。

4. 研究成果

1) DSS 誘起大腸炎に対する GPR35 遺伝子欠損の影響

2%DSS 溶液の 7 日間自由飲水投与は、4 日目以降から体重減少および下痢・下血を誘起し、7 日目には大腸の短縮を伴う大腸炎の発生が観察された。GPR35KO マウスでは、WT マウスと比較して、大腸炎の程度は有意に増悪した。この結果より、GPR35 は大腸炎の病態において保護的に機能していることが判明した。

2) 大腸炎粘液分泌およびタイトジャンクション関連タンパク質発現に対する GPR35 遺伝子欠損の影響

大腸におけるアルシアンブルー・PAS 陽性細胞数および MUC2 陽性細胞数は、WT および GPR35KO マウスの間で差は認められなかった。大腸における E-cadherin、occludin、claudin-3 および claudin-7 などのタイトジャンクション関連タンパク質発現も同様に、WT および GPR35KO

マウス間に差は認められなかった。これらの結果より、GPR35 は腸上皮バリア機能制御におけるは少ないことが判明した。

3) 骨髄分化マクロファージにおけるサイトカイン発現に対する GPR35 遺伝子欠損の影響

LPS 処置はマウス骨髄から分化誘導したマクロファージの TNF- α mRNA 発現を顕著に増大させたが、その増大は GPR35KO マウスでは WT マウスと比較してさらに有意に増強された。また、GPR35 活性化作用を有するリゾホスファチジン酸処置は、WT マウスの分化マクロファージにおける LPS による TNF- α 発現の増大を有意に抑制したが、この抑制作用は GPR35KO マウスの分化マクロファージでは観察されなかった。これらの結果より、GPR35 がマクロファージにおけるサイトカイン発現に対して抑制的に機能していることが判明した。

本研究より、GPR35 は DSS 誘起大腸炎に対して保護的に機能していることが判明した。この GPR35 の作用には上皮バリア機能の制御は関与しておらず、マクロファージにおけるサイトカイン発現抑制などを介した炎症免疫の抑制が関与しているものと推察される。ゆえに、GPR35 は IBD、さらには炎症免疫応答に異常に起因する自己免疫疾患に対する新たな治療標的として有用である可能性が推察される。

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fouad A, Matsumoto K, Amagase K, Yasuda H, Tominaga M, Kato S	4. 巻 82
2. 論文標題 Protective Effect of TRPM8 against Indomethacin-Induced Small Intestinal Injury via the Release of Calcitonin Gene-Related Peptide in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 1235-1246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00045	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 元川典子、枋岡実思、杉本彩貴、徳山玗雅、榎原梨華、斉藤美知子、安田浩之、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 オーファンGタンパク質共役型受容体GPR35の腸炎における抗炎症的役割
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 枋岡実思、元川典子、杉本彩貴、徳山玗雅、榎原梨華、斉藤美知子、安田浩之、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 オーファンGタンパク質共役型受容体GPR35の腸炎に対する保護的役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳山玗雅、橘 佑輔、岸 采花、村瀬由衣、安田浩之、斉藤美知子、松本健次郎、加藤伸一
2. 発表標題 オーファンGタンパク質共役型受容体GPR35の腸炎の病態における役割
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022（静岡）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayaka Kishi, Yusuke Tachibana, Yui Murase, Koga Tokuyama, Michiko Saito, Hiroyuki Yasuda, Kenjiro Matsumoto, Shinichi Kato
2. 発表標題 Orphan G protein-coupled receptor GPR35 contributes to the pathogenesis of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023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

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