

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390016

研究課題名（和文）リゾ脂質受容体の新しい機能～プロトン感知性とその生体機能

研究課題名（英文）Novel roles of lysolipid receptors: proton sensing and its biological function

研究代表者

岡島 史和 (OKAJIMA FUMIKAZU)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30142748

研究成果の概要（和文）：細胞外 pH 変化によって機能変化が知られている炎症、血管、骨代謝を中心に、これらの機能制御におけるプロトン感知性受容体の役割とその作用機構に関して解析した。その結果、プロトン感知性受容体の中で TDAG8 は Gs/cAMP 系を介してマクロファージにおける炎症性サイトカイン産生抑制や好中球の O_2^- 産生抑制に、また、OGR1 が血管平滑筋細胞の COX-2 発現制御や骨代謝に重要な役割をはたしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The roles of proton-sensing GPCRs in inflammation, vascular biology, and bone remodeling in response to extracellular pH change were investigated. Our results suggested that TDAG8/Gs/cAMP is involved in the inhibition of inflammatory cytokine production and superoxide anion production in macrophages and neutrophils and OGR1 is in the stimulation of COX-2 expression in smooth muscle cells and osteoblast cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生理化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：プロトン感知性受容体、TDAG8、OGR1、細胞外 pH、炎症性サイトカイン、マクロファージ、血管平滑筋細胞、骨代謝

1. 研究開始当初の背景
従来、細胞外 pH を感知する機構としてはカ

プサイシン受容体、Acid-sensing ion channel (ASIC) などのイオンチャンネルを

介した痛覚、味覚応答などが知られている。このようなイオトロピックな応答は知覚神経を経て中枢に伝達される。一方で、細胞外の pH 変化は神経応答とは無縁な種々の細胞機能も変化させることが広く認められているが、その詳細なメカニズムは不明である。OGR1 受容体ファミリーに分類されるリゾ脂質性シグナル分子 G 蛋白質共役受容体 (GPCR) (OGR1, GPR4, TDAG8, G2A) は当初スフィンゴシルホスホリルコリンなどのリゾ脂質の受容体として同定されたが、細胞外プロトン感知機構、即ち pH センサー機能など従来の GPCR にはない新しい機能が存在することが我々を含む国内外のグループで明らかにされてきた。受容体の遺伝子改変実験から受容体のヒスチジン残基が細胞外 pH のわずかな変化を感知し、種々の G 蛋白質を介して細胞内にシグナルを伝えること、また、これらの受容体は pH 7.4 で存在する 40 nM のプロトンで十分活性化され通常の状態下ですでに活性化していることが推定された。このように、OGR1 受容体ファミリーは実体が不明であったメタトロピックなプロトンセンサーとして機能していると推定される。しかし、これらの研究は受容体を過剰に発現した細胞での解析が中心であり、内在性に受容体を発現した細胞での解析は我々が行ったヒト血管平滑筋細胞、骨芽細胞における OGR1 受容体のプロスタグランジン産生制御など、その例は非常に限られている。細胞外 pH 変化によって様々な細胞機能が変わることは数多く報告されており、従来、単に pH 感受性と片付けられてきた細胞応答の多くが、OGR1 受容体ファミリーで説明される可能性がある。また、アシドーシスによる個体レベルでの応答変化も数多く報告されているが、その詳細な機構は不明である。

2. 研究の目的

我々は最近、プロトン感知性受容体欠損マウスの作成に成功した。そこで、本研究では細胞外 pH 変化によって機能変化が知られている炎症、血管、骨代謝を中心に、これらの機能制御におけるプロトン感知性受容体の役割とその作用機構に関して解析する。

3. 研究の方法

マクロファージ、好中球は既知の方法にて調製した。ヒト血管平滑筋細胞は市販品を用いた。炎症性サイトカインをはじめアッセイ方法、試薬の供給先並びに実験方法の詳細はすでに発表したオリジナル論文 (5. 主な発表論文 [雑誌論文] にリストした中で、特に、10、15、17) を参照 願いたい。

4. 研究成果

4.1. 炎症機能とプロトン感知性受容体

4.1.1 マクロファージにおける細胞外 pH 低下による炎症性サイトカイン産生抑制と TDAG8

マクロファージにおいて炎症性サイトカイン分泌は細胞外 pH の低下で抑制されるがその機構は不明である。マウスマクロファージを用い、リポポリサッカライド (LPS)、ポリ (I : C) などの TLR4、TLR3 のアゴニストによる TNF- α 、IL-6 産生とそのサイトカイン産生に対する細胞外 pH 低下による抑制効果を調べた。その結果 (1) マウスマクロファージにリポポリサッカライド (LPS) (TLR4 アゴニスト) を作用させると TNF- α 、IL-6 産生が増加するが、この応答は細胞外 pH 低下によって抑制される。これらの細胞ではプロトン感知性受容体の中では TDAG8、OGR1 が多く発現している。そこで、TDAG8 受容体欠損マウス由来の細胞で同様の実験を行ったところ、細胞外 pH 低下による応答抑制は TDAG8 欠損マウス由来のマクロファージでは作用が抑制された。(2) TDAG8 の過剰発現細胞を用いた解析では細胞外 pH 低下は Gs を介し、アデニル酸シクラーゼ/cAMP 系を活性化する。そこで、cAMP 誘導体、cAMP ホスホジエステラーゼ阻害薬、アデニル酸シクラーゼを活性化するアゴニスト (プロスタグランジン、b-アドレナリンアゴニストなど) などでも同様にサイトカイン産生が抑制されるかどうかを調べたところ、cAMP 増加がこの抑制作用を仲介していることが判明した。(3) Gsa に対する siRNA、プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害薬 H89 でも作用が抑制された。また、PKA に作用する cAMP 誘導体では細胞外 pH 低下と同様に炎症性サイトカイン産生を抑制したが、Epac に作用する cAMP 誘導体では抑制効果が観察されなかった。

これらの結果から、細胞外 pH 低下による炎症性サイトカイン産生抑制は TDAG8/Gs/cAMP/PKA を介していると推定された。研究成果は J Immunol (2009) に発表した。

4.1.2 好中球における細胞外 pH 低下によるスーパーオキシド (O_2^-) 産生抑制と TDAG8

好中球では細胞外 pH 低下は O_2^- 産生を抑制する。そこで、ヒト由来好中球や好中球に分化した HL60 細胞を用いてそのメカニズムを解析した。その結果、(1) 好中球を化学走化性因子である fMLP や補体成分の C5a で処理すると O_2^- 産生が亢進するが、酸性 pH 低下はこの応答を抑制する。しかし、プロテインキナーゼ C の活性化薬である PMA と Ca イオノフォアによる応答には無効である。(2) 好中球でもプロトン感知性受容体の中では TDAG8 mRNA が著明に発現している。pH 低下による O_2^- 産生抑制には cAMP 産生増加が伴っていた。

(3)酸性pHによるO₂産生抑制作用はPKAの阻害薬であるH89で一部解除された。これらの結果は、細胞外pH低下はTDAG8/cAMP/PKAを介してO₂産生を抑制していることを示唆している。これらの研究成果はMurata Net al, Cell Immunol (2009)に発表した。

4.2. 血管機能とOGR1ファミリー

動脈硬化症の部位では炎症の進展のために細胞外pHの低下、また、酸化LDLの蓄積が報告されている。この酸化LDLにはリゾホスファチジン酸(LPA)などの生理活性脂質分子が含まれている。そこで、ヒト血管平滑筋細胞を用いて、平滑筋細胞の増殖(DNA合成)や機能に関わることが予想されるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2発現、プロスタグランジン(PG)I₂産生、MAPK phosphatase-1(MKP-1)発現、plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)発現を指標に細胞外pH低下あるいはLPAによる効果を調べた。その結果、以下の結果を得た。(1)特異的な抗体はないため、mRNAで受容体の発現を評価した。血管平滑筋細胞にはOGR1が主要なプロトン感知性受容体として、一方、LPA受容体ではLPA1が発現していた。他のプロトン感知性受容体mRNA、LPA受容体mRNAは検出されなかった。(2)OGR1やLPA1受容体の関与を調べるためsiRNAによって受容体をノックダウンして解析した。その結果、COX-2発現、PGI₂産生、MKP-1発現は細胞外pH低下で活性化され、LPAは細胞外pH低下による効果を相乗的に増強した。これらのpH低下作用はOGR1のノックダウンで抑制された。一方、DNA合成は酸性pHで低下、PAI-1発現は酸性pHで活性化したが、これらのpH効果はOGR1のノックダウンで影響をうけなかった。

このように、血管平滑筋細胞において細胞外pH低下は様々な作用を引き起こすが、COX-2発現、PGI₂産生、MKP-1発現のようにOGR1を介しているもの、DNA合成抑制、PAI-1発現のようにOGR1を介さないpH効果の存在も示唆された。興味あることに、OGR1を介しているものはLPA1受容体とのクロストークにより、更に活性化されることがわかった。COX-2発現、PGI₂産生、MKP-1発現は血管平滑筋細胞を弛緩させ、また、細胞増殖に対して抑制的に機能することが予想され、いずれも抗動脈硬化性の作用である。従来、LPAは動脈硬化に対しては増悪因子として考えられてきたが、酸性条件下においては抗動脈硬化性の作用も発揮できることが示唆された。今後、さらに詳細なメカニズムを調べることで動脈硬化症に対する新たな治療戦略の構築が可能となることが期待される。これらの研究成果はAm J Physiol (2010)に発表した。

4.3. 骨代謝とプロトン感知性受容体

骨量の変化は絶え間ない骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって調節されている。このバランスが崩れると、例えば、破骨細胞機能が骨芽細胞機能より相対的に強まると骨粗鬆症になる。この骨リモデリングにおいて細胞外pHが骨吸収に働くことが知られているがその機構は不明である。そこで、プロトン感知性GPCRの関与を調べた。マウス頭蓋から骨芽細胞、骨髄から破骨細胞を分化させる際に細胞外pHを変化させてその影響を調べたが、現時点では、著明な効果を得るに至っていない。一方、個体レベルで骨密度を測定したが、OGR1欠損マウスで野生型マウスに比較して有意な骨密度の増加が観察された。今後、骨形態計測をおこない、破骨細胞の変化なのか、骨芽細胞の変化なのかを明らかにする必要があるが、OGR1が骨粗鬆症の創薬標的になると考えられ、今後、さらに解析する必要がある。研究成果は「細胞外プロトンをリガンドとするGタンパク質共役受容体の骨リモデリングにおける役割」というタイトルで第82回日本内分泌学会学術総会(平成21年4月23-25日、群馬県民会館)で発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計20件)

1. Komachi M, Sato K, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Ohta H, Tomura H, Kimura T, Im DS, Yanagida K, Ishii S, Takeyoshi I, and **Okajima F.**: An orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. **Cancer Sci** in press (2012) 査読有

2. He XD, Tobo M, Mogi C, Nakakura T, Komachi M, Murata N, Takano M, Tomura H, Sato K, **Okajima F.**: Involvement of proton-sensing receptor TDAG8 in the anti-inflammatory actions of dexamethasone in peritoneal macrophages. **Biochem Biophys Res Commun.** 415:627-631 (2011) 査読有

3. Matsuzaki S, Ishizuka T, Yamada H, Kamide Y, Hisada T, Ichimonji I, Aoki H, Yatomi M, Komachi M, Tsurumaki H, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Mogi C, Sato K, Tomura H, Mori M, and **Okajima F.**: Extracellular acidification induces connective tissue growth factor production through proton-sensing receptor OGR1 in human

airway smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 413:499-503 (2011) 査読有

4. Uchiyama T, Tomono S, Utsugi T, Ohyama Y, Nakamura T, Tomura H, Kawazu S, Okajima F, and Kurabayashi M.: Constitutively active heat shock factor 1 enhances glucose-driven insulin secretion. **Metabolism** 60:789-798 (2011) 査読有,

5. Sato K, Horiuchi Y, Jin Y, Malchinkhuu E, Komachi M, Kondo T, Okajima F.: Unmasking of LPA(1) receptor-mediated migration response to lysophosphatidic acid by interleukin-1 β -induced attenuation of Rho signaling pathways in rat astrocytes. **J Neurochem** 117:164-174 (2011) 査読有

6. Sato K, Okajima F.: Role of sphingosine 1-phosphate in anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein. **World J Biol Chem** 1:327-337 (2010) 査読有

7. Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Ono A, Koga Y, Sunaga N, Nakakura T, Okajima F, Dobashi K, Mori M. : Protective effect of resolvin E1 on the development of asthmatic airway inflammation. **Biochem Biophys Res Commun.** 400:128-133 (2010) 査読有

8. Matsuzaki S, Ishizuka T, Hisada T, Aoki H, Komachi M, Ichimonji I, Utsugi M, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Kurose H, Tomura H, Mori M, Okajima F.: Lysophosphatidic acid inhibits CCL5/RANTES production by blocking IRF-1-mediated gene transcription in human bronchial epithelial cells. **J Immunol** 185:4863-4872 (2010) 査読有

9. Ichimonji I, Tomura H, Mogi C, Sato K, Aoki H, Hisada H, Dobashi K, Ishizuka T, Mori M, Okajima F.: Extracellular acidification stimulates IL-6 production and Ca^{2+} mobilization through proton-sensing OGR1 receptors in human airway smooth muscle cells. **Am J Physiol--Lung Cell Mol Physiol** 299:L567-577 (2010) 査読有

10. Liu JP, Komachi M, Tomura H, Mogi C, Damirin A, Tobo M, Takano M, Nochi H, Tamoto K, Sato K, Okajima F.: Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1-dependent and -independent vascular

actions to acidic pH in human aortic smooth muscle cells. **Am J Physiol--Heart Circ Physiol.** 299:731-742 (2010) 査読有

11. Liu JP, Nakakura T, Tomura H, Tobo M, Mogi C, Wang JQ, He XD, Takano M, Damirin A, Komachi M, Sato K, Okajima F.: Each one of certain histidine residues in G-protein-coupled receptor GPR4 is critical for extracellular proton-induced stimulation of multiple G-protein-signaling pathways. **Pharmacol Res** 61: 499-505 (2010) 査読有

12. Kimura T, Sato K, Tomura H, Okajima F: Cross-talk Between Exogenous Statins and Endogenous High-density Lipoprotein in Anti-inflammatory and Anti-atherogenic Actions. **Endocrine, Metabolic and Immune Disorder-Drug Targets (EMID-DT)** 10:8-15 (2010) 査読有

13. Kimura T, Tomura H, Sato K, Ito M, Matsuoka I, Im DS, Kuwabara A, Mogi C, Itoh H, Kurose H, Murakami M, Okajima F.: Mechanism and role of high-density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. **J Biol Chem** 285:4387-4397 (2010) 査読有

14. Malchinkhuu E, Sato K, Maehama T, Ishiuchi S, Yoshimoto Y, Mogi C, Kimura T, Kurose H, Tomura H, Okajima F: Role of Rap1B and tumor suppressor PTEN in the negative regulation of lysophosphatidic acid-induced migration by isoproterenol in glioma cells. **Mol Biol Cell** 20:5156-5165 (2009) 査読有

15. Murata N, Mogi C, Tobo M, Nakakura T, Sato K, Tomura H, Okajima F.: Inhibition of superoxide anion production by extracellular acidification in neutrophils. **Cell Immunol** 259:21-26 (2009) 査読有

16. Sackett SJ, Chung HY, Okajima F, Im DS. : Increase in sphingolipid catabolic enzyme activity during aging. **Acta Pharmacol Sin.** 30:1454-1461 (2009) 査読有

17. 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, Okajima F: Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced

inhibition of pro-inflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J Immunol* 182: 3243-3251 (2009) 査読有

18. 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, Okajima F: 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: 457-465 (2009) 査読有

19. Komachi M, Damirin A, Malchinkhuu E, Mogi C, Tobo M, Ohta H, Sato K, Tomura H, Okajima F: Signaling pathways involved in DNA synthesis and migration in response to lysophosphatidic acid and low-density lipoprotein in coronary artery smooth muscle cells. *Vasc Pharmacol* 50: 178-184 (2009) 査読有

20. Okajima F, Sato K, Kimura T: Anti-atherogenic actions of high-density lipoprotein through sphingosine 1-phosphate receptors and scavenger receptor class B type I. *Endocrine J* 56: 315-332 (2009) 査読有

[学会発表] (計 30 件)

1. 青木悠、茂木千尋、久田剛志、岩崎靖樹、鶴巻寛朗、山田秀典、石塚全、土橋邦生、岡島史和、森昌朋、プロトン感知性 G タンパク質共役型受容体 OGR1 の気管支喘息における関与について、第 61 回日本アレルギー学会秋季学術大会、2011 年 11 月 10~12 日、グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール (東京)

2. 岡島史和、OGR1 ファミリー-GPCR によるプロトン感知機構とその機能、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21~24 日、国立京都国際会館 (京都)

3. 佐藤幸市、茂木千尋、岡島史和、血漿ならびにリポ蛋白質 HDL 中スフィンゴシン 1-リン酸濃度調節における ABCA1 トランスポーターの役割、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21~24 日、国立京都国際会館 (京都)

4. 岡島史和、細胞外 pH を感知する G タンパク質共役型受容体、日本薬学会第 131 年会シンポジウム “G タンパク質共役型受容体の

カッピングエッジ” (紙上発表)、2011 年 3 月 28~31 日、(静岡)

5. 小町麻由美、佐藤幸市、茂木千尋、当房雅之、山田敬之、戸村秀明、岡島史和、ヒト膵臓癌細胞株のインビボ転移・浸潤に対するリゾホスファチジン酸受容体アンタゴニスト Ki16198 の抑制作用、BMB2010 第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学会 合同学会平成 22 年 2010 年 12 月 7~10 日、神戸ポートアイランド (神戸)

6. 戸村秀明、茂木千尋、当房雅之、佐藤幸市、岡島史和、細胞外プロトンセンスする G タンパク共役型受容体の情報交換機構と生体機能 (シンポジウム)、第 52 回日本脂質生化学会、2010 年 6 月 14~15 日、森秋旅館 (伊香保)

7. 岡島史和、抗動脈硬化性・抗炎症性作用におけるスタチンと高密度リポ蛋白質のクロストーク、日本薬学会第 130 年会シンポジウム “血管病発症のシグナル伝達と新たな治療戦略” 2010 年 3 月 28 日~30 日、岡山コンベンションセンター (岡山)

8. 茂木千尋、岡島史和、細胞外プロトンを受容体とする G タンパク質共役型受容体の骨リモデリングにおける役割、第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009 年 4 月 23~25 日、群馬県民会館 (前橋)

[その他]

ホームページアドレス

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡島 史和 (OKAJIMA FUMIKAZU)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30142748

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：