

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 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591086

研究課題名（和文）神経突起伸長・生存・分化を促進する GPR6 の虚血脳における機能解析と治療への応用

研究課題名（英文）Functional analysis of G-protein coupled receptor 6 following brain ischemia

研究代表者

田中 茂 (Tanaka Shigeru)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20512651

研究成果の概要（和文）：

GPR3, GPR6, GPR12 は中枢神経系に豊富に発現する G 蛋白質共役型受容体(GPR)であり、恒常的に Gs と結合し細胞内 cAMP レベルを維持するユニークな機能を持つ受容体である。研究代表者らは GPR3, GPR6, GPR12 が小脳顆粒神経細胞において細胞生存に寄与し、低酸素環境下においても抗アポトーシス効果をもたらすことを明らかにした。さらに、脳虚血環境下においても GPR3 が梗塞巣サイズに影響を与えることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

G-protein coupled receptor (GPR) 3, GPR6, and GPR12 are predominantly expressed in the mammalian central nervous system and make up a subfamily of GPRs that constitutively activate adenylate cyclases. In the current study, principal investigator has clarified that expression of GPR3, GPR6, and GPR12 in rat primary neurons facilitates neuronal survival. In addition, GPR3 provides a survival advantage to cerebellar granular neurons under the hypoxic condition. Furthermore, GPR3 knockout mice exhibit a larger infarct area after transient middle cerebral artery occlusion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 神経内科学

キーワード：GPCR

1. 研究開始当初の背景

①研究の学術的背景

(1) 神経細胞に特異的に発現する GPR3、GPR6、GPR12 は、恒常的に細胞内 cAMP を上昇させる非常にユニークな G 蛋白共役型受容体である

G 蛋白質共役型受容体ファミリー(GPCR)はこれまでに多数同定され、細胞内 G 蛋白質を介して様々な細胞内伝達物質の活性化や抑制に関わっている。その生理的機能は生命にとって重要で近年創薬のターゲットとして非常に注目されている。中でも GPR3, GPR6,

GPR12 は中枢神経系に豊富に発現し、恒常的にGsと結合し細胞内cAMPレベルを上昇させる非常にユニークな機能を持つ受容体である。研究代表者らのグループは世界に先駆けて、これらの受容体の機能解析に取り組んできた(Tanaka et al., JBC 2007)。

(2)cAMP は中枢神経障害後の神経機能再生におけるKey factorである。

cAMPは神経細胞の神経突起伸張、生存、分化に関わる重要な細胞内情報メディエーターであり、中枢神経障害後の神経機能再生との関与を強く示唆する知見が多い。

① cAMPと軸索再生

哺乳類成体の中枢神経は、障害後に軸索を再生させることができない。その理由の一つに障害部位で稀突起膠細胞由来のミエリン類縁物質の存在が報告されている。中枢神経障害後の機能回復にはこのミエリン阻害に打ち勝って軸索伸展することが非常に重要である。近年、神経細胞内のcAMP上昇によりミエリン阻害に抵抗して軸索を伸展させる現象が多数報告され、中枢神経障害後の軸索再生の方策として非常に注目されている。

② cAMPと神経細胞保護

近年、脳虚血下において、細胞内cAMPを上昇させるリガンドPACAPが神経細胞保護的に働くことが示されている。従って、脳虚血障害下でcAMPは神経保護的に働く可能性が高いと考えられる。

③ cAMPと神経細胞分化

哺乳類脳では、海馬歯状回と側脳室に神経幹細胞が存在し、生涯にわたって新しい神経細胞を産生している。さらに、脳虚血障害後には傷害側半球で神経幹細胞の分裂が増加し、分化した神経芽細胞が梗塞巣に集積することが確認されている。一方で、虚血下での新生神経細胞の増加がcAMP下流のCREBのリン酸化と密接に関わっていることも明らかになっている。従って、cAMPは神経前駆細胞から成熟神経細胞への分化に深く関わっている可能性が高く、脳虚血障害後の神経再生を増強する可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虚血性脳障害の新規治療法開発を目指して、神経細胞が元来持つ神経保護・再生能力を、中枢神経細胞に豊富に発現するレセプターGPR3, GPR6, GPR12を通じて解析し、その基礎データを基に虚血性脳障害後のこれらの遺伝子導入が、神経細胞の生存・再生能力を高めるかを検討するとともに、脳梗塞治療への応用を模索することにある。

3. 研究の方法

(1) GPR3, GPR6, GPR12を介した神経細胞保護効果

小脳顆粒細胞は高カリウム(25~30mM)培養条件下では生存、分化するが、低カリウム濃度(5~10mM)に戻すと、その殆どが細胞がアポトーシスを起こすことが知られている。GPR3, GPR6, GPR12を介した神経細胞保護効果を検討のため、このラット小脳顆粒神経細胞のアポトーシスマデルを使用した。小脳顆粒神経細胞を既報の方法により採取し、電気穿孔法を用いて上記受容体を細胞内に遺伝子導入した。神経保護効果の評価にはWST-1 assay法による生存細胞評価に加え、TUNEL染色法を用いたアポトーシス細胞数の評価も行った。更に、GPR3ノックアウトマウスを用いてWild-typeマウスまたはGPR3ノックアウトマウスから小脳顆粒神経細胞を採取し、通常培養における神経細胞死をTUNEL染色法により評価した。

(2) 低酸素環境下におけるGPR3を介した神経細胞保護効果

低酸素環境下における細胞保護効果の検討のため、小脳顆粒神経細胞にGPR3遺伝子導入後に、1%O₂, 5%CO₂低酸素チャンバー内にて培養を行い、GPR3遺伝子導入が低酸素環境においても細胞死を抑制するか? TUNEL染色法により検討する。更に、小脳顆粒神経細胞が分化に伴って内因性に発現するGPR3をsiRNAで抑制することにより、神経細胞死が修飾されるか検討する。

(3) 脳虚血環境下におけるGPR3の神経細胞保護効果

In vivoにおけるGPR3の神経細胞保護効果を検討するため、GPR3ノックアウトマウス又は野生型マウスに中大脳動脈閉塞モデルを作製し、梗塞巣をTTC染色により評価した。

4. 研究成果

まず、これら受容体の神経細胞生存に与える影響を検討した。初代小脳顆粒細胞は高カリウム(25~30mM)培養条件下では生存、分化するが、低カリウム濃度(5~10mM)に戻すと、その細胞の殆どがアポトーシスを起こすことが知られている。研究代表者らは、この小脳顆粒細胞のアポトーシスマデルを用いて、これら受容体の神経細胞生存への効果と、抗アポトーシス効果をWST-1アッセイ法とTUNEL染色法によりそれぞれ解析、検討した。予測通り、GPR3, GPR6, GPR12を神経細胞に導入した群は、コントロール群に比し、低カリウム培養条件下での生存が増強され、アポトーシス陽性細胞は減少した。一方、GPR3ノックアウトマウスから採取した小脳顆粒細胞は、野生型マウスから採取した細胞と比しアポトーシス陽性細胞は増加していた。さらに、低酸素下(1% O₂/ 5% CO₂)におけるGPR3の抗アポトーシス効果をTUNEL染色にて検

討したところ、GPR3siRNA を小脳顆粒細胞に導入し遺伝子発現を抑制した群では、コントロール群と比し、有意なアポトーシス陽性細胞数の増加が観察された。従って、GPR3, GPR6, GPR12 が神経細胞生存効果を有し、低酸素条件下に於いても神経保護効果が明らかになった。さらに、GPR3 の脳虚血環境下での神経細胞保護効果を検討するために、7 週齢の GPR3 ノックアウトマウスと野生型マウスに一過性中大脳動脈閉塞モデルを作製し、梗塞サイズを TTC 染色により解析した。GPR3 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して線状体を中心に梗塞サイズの拡大を認めた。これらの成果は、GPR3 の神経保護効果を *in vivo* においても示すものであり、今後治療へと応用を考える上でも非常に重要な知見が得られたと考えられる。

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 7 件)

1. Dohi E, Tanaka S, Seki T, Miyagi T, Hide I, Takahashi T, Matsumoto M, Sakai N, Hypoxic stress activates chaperone-mediated autophagy and modulates neuronal cell survival, *Neurochemistry International*, 査読有, 60 巻, 2012, 431-442
2. Seki T, Yoshino KI, Tanaka S, Dohi E, Onji T, Yamamoto K, Hide I, Paulson HL, Saito N, Sakai N, Establishment of a novel fluorescence-based method to evaluate chaperone-mediated autophagy in a single neuron, *PLoS One*, 査読有, 7 巻, 2012, e31232
3. Harada K, Hide I, Seki T, Tanaka S, Nakata Y, Sakai N, Extracellular ATP differentially modulates Toll-like receptor 4-mediated cell survival and death of microglia, *J Neurochem*, 査読有, 116 巻, 2011, 1138-47
4. Yamamoto K, Seki T, Adachi N, Takahashi T, Tanaka S, Hide I, Saito N and Sakai N, Mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) is selectively degraded by autophagy, *Genes to Cells*, 査読有, 15 巻, 2010, 425-38
5. Seki T, Abe-Seki N, Kikawada T, Takahashi H, Yamamoto K, Adachi N, Tanaka S, Hide I, Saito N, Sakai N. Effect of trehalose on the properties of mutant {gamma}PKC, which causes spinocerebellar ataxia type 14, in neuronal cell lines and cultured Purkinje cells, *J Biol Chem*, 査読有, 285 巻, 2010, 33352-64

6. Seki T, Takahashi H, Yamamoto K, Ogawa K, Onji T, Adachi N, Tanaka S, Hide I, Saito N, Sakai N. Congo red, an amyloid-inhibiting compound, alleviates various types of cellular dysfunction triggered by mutant protein kinase γ that causes spinocerebellar ataxia type 14 (SCA14) by inhibiting oligomerization and aggregation, *J Pharmacol Sci*, 査読有, 114 巻, 2010, 206-16

7. Tanaka S, Shaikh IM, Chiocca EA and Saeki Y, The Gs-Linked receptor GPR3 inhibits the proliferation of cerebellar granule cells during postnatal development, *PLoS One*, 査読有, 15 巻, 2009, e5922

[学会発表] (計 23 件)

1. 田中茂, 酒井規雄 他, Involvement of GPR3 against apoptotic neuronal cell death during cerebellar development, 第 43 回 広島神経医科学研究会, 30 Jan 2012, 広島
2. 宮城達博, 田中茂, 酒井規雄 他, 齧歯類脳における恒常的 Gs 活性化受容体 GPR3 の発現と神経細胞内局在, 第 8 5 回薬理学会年会, 15 Mar 2012, 京都
3. 田中茂, 酒井規雄 他, 低酸素環境下における Gs 共役型受容体 GPR3 の神経細胞保護作用, 第 8 5 回薬理学会年会, 14 Mar 2012, 京都
4. 土肥栄佑, 田中茂, 酒井規雄 他, シヤペロン介在性オートファジーは低酸素ストレスによる神経細胞死に対し保護的に働く, 第 8 5 回薬理学会年会, 14 Mar 2012, 京都
5. 山本光, 田中茂, 酒井規雄 他, cAMP アナログの長期処置による RN46A 細胞におけるセロトニントランスポーター機能上昇の分子機序の解析, 第 8 5 回薬理学会年会, 15 Mar 2012, 京都
6. 秀和泉, 田中茂, 酒井規雄 他, ミクログリアの Toll-like 受容体 4 活性化に対する異なる細胞反応とプリン受容体を介した調節, 第 8 5 回薬理学会年会, 16 Mar 2012, 京都
7. Tanaka S, Dohi E, Miyagi T, Seki T, Hide I, Saeki Y, Chiocca EA, Matsumoto M and Sakai N, Neural expression of G Protein-coupled receptors GPR3 modulates survival of cerebellar granular neurons under hypoxic conditions, 第 4 1 回 広島神経医科学研究会, 28 Jan 2011, 広島
8. 酒井規雄, 田中茂 他, 遺伝性脊髄小脳失調症 1 4 型 (SCA14) の発症原因となる変異 γ PKC の分解にオートファジーが関与する, 第 5 2 回日本神経学会, 19 Sep 2011, 名古屋
9. 土肥栄佑, 田中茂, 酒井規雄 他, 低酸

素ストレス環境下における LAMP-2A 陽性リソソームの関与と役割, 第 5 2 回日本神経学会, 20 May 2011, 名古屋

10. 酒井規雄、藤原雅幸、**田中茂** 他, セロトニントランスポーター機能に対するケミカルシヤペロン 4-phenylbutylate(4-PBA) の効果, 第 1 1 9 回薬理学会近畿部会, 8 July 2011, 名古屋

11. 酒井規雄、**田中茂**、藤原雅幸 他, ケミカルシヤペロンがセロトニントランスポーター機能に及ぼす影響, 第 1 5 回活性化アミンに関するワークショップ, 11Aug 2011, 徳島

12. 山本光、**田中茂**、酒井規雄 他, cAMP アナログ処置によるセロトニントランスポーター (SERT) の機能変化, 第 1 5 回活性化アミンに関するワークショップ, 11Aug 2011, 徳島

13. 土肥栄祐、**田中茂**、酒井規雄他, 低酸素環境下におけるシヤペロン介在性オートファジーの役割, 第 3 4 回日本神経科学会, 14-17 Sep 2011, 横浜

14. **田中茂**、酒井規雄 他, Involvement of GPR3 against apoptotic cell death during cerebellar development, 第 3 4 回日本神経科学会, 14-17 Sep 2011, 横浜

15. 山本光、**田中茂**、酒井規雄 他, cAMP アナログの長期投与は RNA46A 細胞においてセロトニントランスポーターの機能を亢進させる, 第 5 4 回神経化学学会大会, 27 Sep 2011, 石川

16. 酒井規雄、**田中茂**、藤原雅幸 他, ケミカルシヤペロンのセロトニントランスポーター機能に対する影響, 第 5 4 回神経化学学会大会, 27 Sep 2011, 石川

17. 土肥栄祐、**田中茂**、酒井規雄他, Contribution of chaperone-mediated autophagy to the survival of cells under hypoxic condition, Neuroscience meeting 2011, 12-16 Nov 2011, Washington DC, USA

18. **田中茂**、酒井規雄 他, Involvement of GPR3 against apoptotic neuronal cell death during cerebellar development, Neuroscience meeting 2011, 12-16 Nov 2011, Washington DC, USA

19. **田中茂**、土肥栄祐、E. Antonio Chiocca, 佐伯嘉修、松本昌泰、酒井規雄, 中枢神経系に発現する G 蛋白共役型受容体 GPR3 の低酸素下における神経細胞生存への関与, 第 35 回脳卒中学会総会, 16 April 2010, 盛岡

20. **Tanaka S**, Dohi E, Miyagi T, Seki T, Hide I, Saeki Y, Chiocca EA, Matsumoto M and Sakai N, 神経細胞に発現する G 蛋白共役型受容体 GPR3 の低酸素下における神経細胞生存への関与 Neural expression of G Protein-coupled receptors GPR3 modulates survival of neurons under hypoxic

conditions, 第 33 回日本神経科学学会総会, 3 Sep 2010, 兵庫

21. **Tanaka S**, Dohi E, Miyagi T, Seki T, Hide I, Saeki Y, Chiocca EA, Matsumoto M and Sakai N, Neural expression of G Protein-coupled receptors GPR3 modulates survival of cerebellar granular neurons under hypoxic conditions, 40th 米国神経学会, 14 Nov 2010, SanDiego, USA

22. **Tanaka S**, Shaikh IM, Chiocca EA, Sakai N and Saeki Y, 小脳顆粒前駆細胞の増殖と分化を修飾するGs共役型受容体GPR3, 第32回日本神経科学大会, 16 Sep 2009, 名古屋.

23. **Tanaka S**, Saeki Y, Chiocca EA, Matsumoto M and Sakai N, Upregulated expression of GPR3 promotes survival of neurons under hypoxic conditions, 第39回米国神経学会, 17 Oct 2009, Chicago, USA.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 茂 (Tanaka Shigeru)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20512651

(2) 研究分担者

松本 昌泰 (Matsumoto Masayasu)

広島大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20192346

(3) 連携研究者

()

研究者番号：