

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591264

研究課題名(和文) GPR3の神経分化メカニズム解析と脳虚血に対する新規神経前駆細胞移植療法への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of G-protein coupled receptor 3 for future applications of novel stroke therapy utilizing neuronal stem cell transplantation

研究代表者

田中 茂 (Tanaka, Shigeru)

広島大学・医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：20512651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：GPR3は中枢神経系に豊富に発現するG蛋白質共役型受容体であり、恒常的にGs蛋白を活性化しcAMPレベルを維持するユニークな機能を有する。本研究ではGPR3のマウス脳での発現分布を詳細に検討し、GPR3が皮質、手綱核、海馬、視床、線条体、小脳、橋、黒質の神経細胞に発現することを明らかにした。さらに、GPR3融合タンパク質を用いた検討により、GPR3が小脳顆粒神経細胞において、形質膜、ゴルジ体、エンドソームに局在することを明らかにした。さらに、GPR3融合タンパク質小胞が神経突起内を経時的に移動し、神経突起先端局所でのPKA活性化に寄与することも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：G-protein coupled receptor 3 (GPR3) belongs to a member of constitutively active Gs-coupled receptors that activate 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and is highly expressed in the brain. In the current study, principal investigator has clarified that GPR3 was distributed in the cortex, striatum, hippocampus, medial habenular nucleus, and cerebellum. The GPR3 subcellular localization analysis using fluorescent-tagged GPR3 revealed that GPR3 was distributed along the plasma membrane and in goldi bodies and endosomes in neurons. Moreover, time-lapse experiments revealed that fluorescent punctae of GPR3 were transported along the neurite, which was associated with the local activation of PKA at the neurite tips.

研究分野：医歯薬学

キーワード：GPCR cAMP PKA

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムプロジェクトの成果により、生理的リガンドが不明なオーファン受容体が多数見いだされ、創薬のターゲットとして注目されている。中でも GPR3, GPR6, GPR12 は中枢神経系に豊富に発現し、リガンド非存在下で恒常的に細胞内 cAMP レベルを維持する非常にユニークな機能を持つ受容体である。研究代表者が世界に先駆けて行った機能解析により、これら受容体は神経突起伸長、生存、分化に関わる重要な因子であることが明らかになった(以下1~3に詳述)。一方、脳卒中はわが国の国民病であり、急性期治療においては tPA を用いた血栓溶解療法が普及しつつあるが、障害を受けた神経細胞保護療法や再生療法は未だ確立されておらず、新規治療方策の開発が望まれている。再生療法においては、神経前駆細胞移植に関する研究が国内外で精力的に行われているが、ES 細胞や iPS 細胞を用いた研究では安全性の問題のみならず、移植神経幹細胞の生着や成熟、シナプス形成が大きな課題として残されている。移植神経細胞の生着に関しては、近年微小血管再構築の重要性が注目されているが、移植後の神経細胞成熟やシナプス形成に関しては未だ殆ど解明されていないのが現状である。

(1) GPR3 はミエリン阻害に拮抗する神経突起伸長作用を有する (Tanaka et al., JBC. 2007)

哺乳類成体の中枢神経は、障害後に稀突起膠細胞由来のミエリン阻害により軸索再生を阻まれる。中枢神経障害後の機能回復には、ミエリン阻害に抵抗する軸索伸長が非常に重要である。近年、神経細胞内 cAMP 上昇が、軸索伸長におけるミエリン抵抗性を発揮し、中枢神経障害後の軸索再生の方策として注目されている。研究代表者らは GPR3、6、12 が神経突起伸長作用を有するだけでなく、ミエリン抵抗性神経突起伸長を示すことを報告した。

(2) GPR3 は脳虚血環境下の神経細胞生存に寄与する

研究代表者は神経細胞における GPR3 の発現が神経細胞生存に非常に重要であることを報告してきた(2007-2010 年米国神経科学学会)。さらに、低酸素培養条件下における神経細胞生存に、GPR3 が保護的に働くこと、GPR3 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して中大脳動脈閉塞後の梗塞巣の拡大が見られる事を明らかにしている。

(3) GPR3 は小脳顆粒神経細胞の分化を修飾する (Tanaka et al., PLoS One. 2009)

小脳顆粒神経細胞は出生後に外顆粒神経細胞層で分裂・増殖し、内顆粒細胞層に移動し成熟神経細胞に分化することが知られてい

る。研究代表者らは、齧歯類小脳発生において GPR3 が内顆粒神経細胞層に豊富に発現し、小脳顆粒神経細胞の分化・成熟に関与することを解明した

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳梗塞の新規治療法開発を目指して、神経発生過程における GPR3 の発現と神経細胞の分化・成熟・シナプス形成に関わる機能を詳細に解析し、GPR3 遺伝子導入が新生神経細胞の分化に与える影響を検討することにある。

3. 研究の方法

(1) 中枢神経系における GPR3 の発現分布

マウス中枢神経系における GPR3 発現分布を詳細に観察する。発現解析には抗 GPR3 抗体を用いた免疫組織化学染色を施行する。抗体等の不具合により、免疫組織が不可能な場合、GPR3 ノックアウト LacZ ノックインマウス(現有)を用いて、X-gal 染色による発現解析を行う。

(2) 神経細胞発生段階における GPR3 の発現変化

神経発生過程における GPR3 の発現は小脳を除いて未だ明らかでない。そこで、E13.5~P21 ラット胎児・新生児から皮質・海馬の各部位毎に mRNA を抽出し、real-time PCR 法により GPR3 経時発現プロファイルを得る。

(3) 神経細胞における GPR3 の局在と動態

さらに、分化段階の時間的・空間的な GPR3 発現を特定するためさらに、神経細胞内の GPR3 局在を詳細に検討するために、GPR3 と HaloTag 又は GFP タグを付加した融合タンパクを発現するプラスミドを構築し、これらの神経細胞への遺伝子導入により GPR3 の神経細胞内局在を観察した。局在解析には各種オルガネラマーカーを用いた蛍光二重染色法を用いて共焦点顕微鏡により解析した。さらに、これら GPR3 導入神経細胞のタイムラプス観察により、経時的な GPR3 の動態を観察した。

(4) 神経細胞における GPR3 発現が局所 PKA 活性化に与える影響

神経細胞における GPR3 の発現局在が、発現局所の PKA 活性化に影響をあたえるか PKA FRET インジケータである AKAR3-EV を用いて検討した。FRET 解析には、CFP/YFP 蛍光イメージを Meta Morph ソフトウェアを用いてレシオイメージを作製し、相対的な PKA 活性化部位を評価した。

4. 研究成果

研究代表者らは、マウス中枢神経系における GPR3 の発現分布を解析するために、抗 GPR3 抗体を用いた免疫組織化学染色を試みたが、

各種市販 GPR3 抗体を用いて特異的な GPR3 発現を観察することはできなかった。そこで、GPR3 ノックアウト LacZ ノックインマウスを用いて、LacZ 発現を指標に脳における GPR3 のプロモーター活性分布を観察したところ、線条体、皮質（V層）、海馬（CA2）、内側手綱核、視床、赤核、黒質、網様核、橋核、前庭神経核、小脳、脊椎前角での GPR3 プロモーター活性上昇を認めた。また、海馬神経細胞の分化に伴い GPR3 発現が増加することが、RT-PCR 法を用いた解析により明らかになり、これは小脳顆粒神経細胞と同様の傾向であった。

さらに、GPR3 と蛍光タンパク質の融合蛋白を発現させたところ、小脳顆粒神経細胞において GPR3 融合タンパク質は形質膜、ゴルジ体、エンドソームに局在することを明らかとなった。また、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いた解析により、GPR3 融合タンパク質小胞が神経突起内を経時的に移動することも新たに発見した。GPR3 融合タンパク質小胞の移動は、ミオシン II の阻害剤であるプレビスタチンにより抑制され、キネシンの阻害剤であるモナストロールでは抑制できなかった。さらに、神経突起先端部での GPR3 融合タンパク質の蛍光は、プレビスタチンにより有意に抑制された。次に、GPR3 の細胞内局所での機能を明らかにするため、PKA の FRET インジケータを用いた検討を加えた。小脳顆粒神経細胞において、GPR3 過剰発現により神経細胞体、突起先端での PKA の活性が上昇し、GPR3siRNA による内在性 GPR3 発現抑制により、神経突起先端部での著明な PKA 活性低下を観察した。また、プレビスタチン投与により GPR3 の動態を抑制すると、神経突起先端部での著明な PKA 活性低下を観察した。以上の結果から、GPR3 は神経細胞の分化において、神経突起先端に運ばれ、局所での PKA 活性化に寄与し、神経極性形成に關与する可能性が明らかとなった。

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 6 件)

1. Tanaka, S., Miyagi, T., Dohi, E., Seki, T., Hide, I., Sotomaru, Y., Saeki, .Y., Antonio Chiocca, E., Matsumoto, M., Sakai, N. Developmental expression of GPR3 in rodent cerebellar granule neurons is associated with cell survival and protects neurons from various apoptotic stimuli. *Neurobiol Dis*, 68C: 215-227, 2014. (査読有)
2. Yamamoto, K., Seki, T., Yamamoto, H., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N., Sakai, N. Deregulation of the actin cytoskeleton and macropinocytosis in

response to phorbol ester by the mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14. *Front Physiol*, 126: 2014. (査読有)

3. Taniguchi, T., Tanaka, S., Ishii, A., Watanabe, M., Fujitani, N., Sugeo, A., Gotoh, S. Ohta, T., Hiyoshi, M., Matsuzaki, H., Sakai, N. and Konishi, H. A brain-specific Grb2-associated regulator of Erk/MAPK(GAREM) subtype, GAREM2, contributes to neurite outgrowth of neuroblastoma cell by regulating Erk signaling. *J. Biol. Chem*, 288: 29934-29942, 2013. (査読有)
4. Ogawa, K., Seki, T., Onji, T., Adachi, N., Tanaka, S., Hide, I., Saito, N. and Sakai, N. Mutant PKC that causes spinocerebellar ataxia type 14 upregulates Hsp70, which protects cells from the mutant's cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 440: 25-30, 2013. (査読有)
5. Fujiwara M, Yamamoto H, Miyagi T, Seki T, Tanaka S, Hide I, Sakai N. Effects of the chemical chaperone 4-phenylbutylate on the function of the serotonin transporter (SERT) expressed in COS-7 cells. *J Pharmacol Sci*, 122: 71-83, 2013. (査読有)
6. Yamamoto H, Tanaka S, Tanaka A, Hide I, Seki T, Sakai N. Long-term exposure of RN46A cells expressing serotonin transporter (SERT) to a cAMP analog up-regulates SERT activity and is accompanied by neural differentiation of the cells. *J Pharmacol Sci*, 121: 25-38. 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計 39 件)

1. 田中茂、宮城達博、土肥栄祐、秀和泉、佐伯嘉修、E. Antonio Chiocca、松本昌泰、酒井規雄 虚血性脳障害において神経細胞生存に關連する G 蛋白共役型受容体 GPR3, 第 40 回日本脳卒中学会総会 29 Mar 2015, 広島
2. 神垣真由美、秀和泉、白神紘子、柳瀬雄輝、田中茂、白藤俊彦、秀道広、酒井規雄 TLR4 活性化ミクログリアは GM-CSF シグナルを上方制御しその生存を維持する 第 88 回日本薬理学会年会, 18 Mar 2015, 名古屋
3. 田中茂、佐伯嘉修、E. Antonio Chiocca、酒井規雄 神経細胞における恒常的 Gs 活性化受容体 GPR3 の機能, 第 88 回日本薬理学会年会シンポジウム, 20 Mar 2015, 名古屋

4. Kamigaki M, Hide I, Yanase Y, **Tanaka S**, Shirafuji T, Hide M, Sakai N Mechanism of TLR4-mediated survival of microglia: Roles of GM-CSF self-production and the activation of JAK2/STAT5 signaling pathways Society for Neuroscience meeting 2014, 18 Nov 2014, Washoington DC, USA.
5. **Tanaka S**, Miyagi T, Hide I, Shirafuji T, and Sakai N Neuronal expression of GPR3 in rodent brain is associated with cell survival Society for Neuroscience meeting 2014, 19 Nov 2014, Washoington DC, USA.
6. Miyagi T, **Tanaka S**, Hide I, Shirafuji T, and Sakai N The subcellular localization and local function of Gs-linked receptor GPR3 in neuronal cells Society for Neuroscience meeting 2014, 18 Nov 2014, Washoington DC, USA.
7. 宮城達博、**田中茂**、秀和泉、白藤俊彦、酒井規雄 小脳顆粒神経細胞における恒常的 Gs 活性型受容体 GPR3 の局在と機能, 第 126 回薬理学会近畿部会, 24 Oct 2014, 和歌山
8. 神垣真由美、秀和泉、柳瀬雄輝、白榊紘子、**田中茂**、白藤俊彦、秀道広、酒井規雄 GM-CSF 自己産生と JAK2/STAT5 シグナル伝達が TLR4 活性化ミクログリアの生存に関与する 第 57 回日本神経化学大会, 1 Oct 2014, 奈良
9. **田中茂**、宮城達博、秀和泉、白藤俊彦、酒井規雄 GPR3 は様々なアポトーシス刺激に対し神経保護的に働く, 第 57 回日本神経化学大会, 1 Oct 2014, 奈良
10. 宮城達博、**田中茂**、秀和泉、白藤俊彦、酒井規雄 神経細胞における Gs 共役型受容体 GPR3 の細胞内動態と機能, 第 57 回日本神経化学大会, 30 Sep 2014, 奈良
11. **田中茂** 脳虚血環境下における神経細胞生存の分子メカニズム, WNNM 研究会, 16 Sep. 2014, 広島
12. 神垣真由美、秀和泉、柳瀬雄輝、**田中茂**、白藤俊彦、秀道広、酒井規雄 TLR4 活性化ミクログリアは GM-CSF の自己産生と JAK2/STAT5 シグナル伝達を介して生存を維持する 第 125 回日本薬理学会近畿部会, 20 June 2014, 岡山
13. 秀和泉、神垣真由美、柳瀬雄輝、関貴弘、**田中茂**、白藤俊彦、秀道広、酒井規雄 TLR4 を介したアデノシン A2a 受容体活性化によるミクログリア機能の調節, 第 87 回日本薬理学会年会, 21 Mar 2014, 仙台
14. 宮城達博、**田中茂**、秀和泉、白藤俊彦、酒井規雄 神経細胞における恒常的 Gs 活性化受容体 GPR3 の細胞内局在と機能, 第 87 回日本薬理学会年会, 19 Mar 2014, 仙台
15. **田中茂**、宮城達博、秀和泉、白藤俊彦、E. Antonio Chiocca、酒井規雄 GPR3 は様々なアポトーシス刺激に対し神経保護的に働く, 第 87 回日本薬理学会年会, 20 Mar 2014, 仙台
16. Dohi E, **Tanaka S**, Seki T, Hide I, **Matsumoto M**, and Sakai N Possible relationship between decreased expression of lysosomal-associated membrane protein type 2A and delayed neuronal death after brain ischemia. Neuroscience meeting 2013, 12 Nov 2013, San Diego, USA.
17. **Tanaka S**, Miyagi T, Hide I, Seki T, and Sakai N GPR3 protects neurons from apoptosis via Phosphatidylinositol 3-Kinase and mitogen-activated protein-kinase signaling pathway. Neuroscience meeting 2013, 11 Nov 2013, San Diego, USA.
18. 酒井規雄、藤原雅幸、山本光、宮城達博、関貴弘、**田中茂**、秀和泉 セロトニントランスポーター機能調節に対するケミカルシャペロン 4-phenylbutylate(4-PBA)の効果, 第 43 回神経精神薬理学会総会, 26 Oct 2013, 沖縄
19. 関貴弘、吉野健一、**田中茂**、土肥栄祐、隠地智也、秀和泉、Henly Paulson、齋藤尚亮、酒井規雄 蛍光イメージングを用いた神経細胞でのシャペロン介在性オートファジー活性の解析, 第 43 回神経精神薬理学会総会, 25 Oct 2013, 沖縄
20. 宮城達博、**田中茂**、秀和泉、関貴弘、酒井規雄 中枢神経系における恒常的 Gs 活性化型受容体 GPR3 の局在と機能, 第 43 回神経精神薬理学会総会, 25 Oct 2013, 沖縄
21. 酒井規雄、藤原雅幸、山本光、浅野昌也 **田中茂**、関貴弘、秀和泉 膜輸送によるセロトニントランスポーター調節機構, 第 17 回活性アミンに関するワークショップ, 24 Aug 2013, 福井
22. 宮城達博、**田中茂**、秀和泉、関貴弘、酒井規雄 神経細胞における恒常的 Gs 活性化受容体 GPR3 の局在と機能, Neuro2013, 21 June, 京都
23. 神垣真由美、秀和泉、柳瀬雄輝、田中芳樹、原田佳奈、関貴弘、**田中茂**、秀道広、酒井規雄 TLR4 活性化によるミクログリアの生存維持に GM-CSF 自己産生と TNF/TNFR2 シグナルが関与する, Neuro2013, 21 June, 京都
24. 酒井規雄、吉野健一、**田中茂**、土肥栄祐、隠地智也、山本和央、秀和泉、Henly L Paulson、齋藤尚亮、関貴弘 イメージング

- を活用した新たなシャペロン介在性オートファジーの解析方法の確立, 第 54 回神経学会総会, 31 May 2013, 東京
25. 土肥栄祐, **田中茂**, 関貴弘, 宮城達博, 秀和泉, 高橋哲也, **松本昌泰**, 酒井規雄 齧歯類脳虚血モデルにおける CMA 関連蛋白 LAMP-2A の経時的発現変化, 第 54 回神経学会総会, 29 May-1 June 2013, 東京
26. 神垣真由美, 秀和泉, 柳瀬雄輝, 原田佳奈, 関貴弘, **田中茂**, 秀道広, 酒井規雄 Toll 様受容体 4 活性化により生存するミクログリアは顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を自己産生する, 第 86 回薬理学会年会, 23 Mar 2013, 福岡
27. **田中茂**, 宮城達博, 秀和泉, 関貴弘, 酒井規雄 GPR3 を介した突起伸長に Gbetagamma を介する経路が部分的に関与する, 第 86 回薬理学会年会, 22 Mar 2013, 福岡
28. 秀和泉, 神垣真由美, 柳瀬雄輝, 原田佳奈, 関貴弘, **田中茂**, 秀道広, 酒井規雄 ミクログリアの死細胞貪食における P2Y2 受容体の役割 第 122 回日本薬理学会近畿部会, 16 Nov 2012, 大阪
29. **田中茂**, 土肥栄祐, 関貴弘, 秀和泉, **松本昌泰**, 酒井規雄 虚血脳におけるシャペロン介在性オートファジーの役割 第 24 回脳循環代謝学会総会シンポジウム, 8-9 Nov 2012, 広島
30. Dohi E, **Tanaka S**, Seki T, Miyagi T, Hide I, Takahashi T, **Matsumoto M**, and Sakai N. Contribution of chaperone-mediated autophagy to the survival of cells under the hypoxic conditions. Transpacific Workshop on Stroke, 17-18 Oct 2012, New Orleans, USA.
31. **Tanaka S**, Miyagi T, Dohi E, Seki T, Hide I, Saeki Y, Chiocca EA, **Matsumoto M** and Sakai N. GPR3 protects neurons from apoptosis, induced by different stimuli Transpacific Workshop on Stroke, 17-18 Oct 2012, New Orleans, USA.
32. Yamamoto H, **Tanaka S**, Hide I, Seki T, and Sakai N. Long-term exposure of cAMP analogue up-regulates the function of serotonin transporter (SERT) in RN46A cells. Neuroscience meeting 2012, 13-17 Oct 2012, New Orleans, USA.
33. Dohi E, **Tanaka S**, Seki T, Miyagi T, Hide I, Takahashi T, **Matsumoto M**, and Sakai N. Time dependent alternations of lysosomal-associated membrane protein type 2A in rodent brain following cerebral ischemia. Neuroscience meeting 2012, 13-17 Oct 2012, New Orleans, USA.
34. **Tanaka S**, Miyagi T, Dohi E, Hide I, Seki

- T, and Sakai N. Phosphatidylinositol 3-Kinase and mitogen-activated protein-kinase signaling pathway play a role in the GPR3-mediated neurite outgrowth, Neuroscience meeting 2012, 13-17 Oct 2012, New Orleans, USA.
35. 秀和泉, 柳瀬雄輝, 神垣真由美, 原田佳奈, 関貴弘, **田中茂**, 秀道広, 酒井規雄 Enhance survival and phagocytic activity by Toll-like receptor 4 activation in rat microglia. 第 55 回日本神経化学学会, 30-31 Sep 2012, 神戸
36. **田中茂**, 宮城達博, 土肥栄祐, 関貴弘, 秀和泉, 佐伯嘉修, E. Antonio Chiocca, **松本昌泰**, 酒井規雄 GPR3 protects neurons from apoptosis under the hypoxic conditions 第 55 回日本神経化学学会, 30-31 Sep 2012, 神戸
37. **田中茂**, 宮城達博, 秀和泉, 関貴弘, 酒井規雄 GPR3 依存的な神経突起伸長に PI3 キナーゼ, MAP キナーゼの活性化が寄与する 第 35 回神経科学学会, 18-21 Sep 2012, 名古屋
38. 土肥栄祐, **田中茂**, 関貴弘, 宮城達博, 秀和泉, 高橋哲也, **松本昌泰**, 酒井規雄 低酸素ストレスにより活性化されるシャペロン介在性オートファジーの細胞保護効果 第 121 回薬理学会近畿部会, 29 June 2012 徳島
39. Hide I, Harada K, Yanase Y, Seki T, **Tanaka S**, and Sakai N. Toll-Like Receptor 4 Activation Promotes Survival and Phagocytic Clearance in Microglia: Possible Involvement of Purinergic Receptors. International Symposium on Purinergic Signaling in New Strategy of Drug Discovery, 31 May - 2 June 2012, Fukuoka.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 茂 (Tanaka Shigeru)
広島大学・医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：20512651

(2) 研究分担者

松本 昌泰 (Matsumoto Masayasu)
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：20192346

(3) 連携研究者

なし