

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860056

研究課題名(和文) 心筋梗塞におけるプロトン感知性受容体「GPR4」の生理的役割の解析

研究課題名(英文) Investigation the roles of GPR4 in myocardial infarction

研究代表者

長坂 明臣 (NAGASAKA, AKIOMI)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10723877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：GPR4は細胞外のプロトン濃度の上昇で活性化する受容体である。心筋梗塞時には細胞外のpHが低下することから、野生型マウスとGPR4遺伝子欠損マウスに心筋梗塞処置を施したところ、GPR4遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比べて、生存率や心機能が低下することを見出した。また心筋梗塞時のGPR4発現細胞を間接的に同定する事に成功し、GPR4は心筋梗塞時に炎症に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：GPR4 is a receptor which recognizes extracellular protons. Because pH of the heart at the time of myocardial infarction (MI) falls, we produced MI model mice with wild type and GPR4 deficient mice to investigate the roles of GPR4 in MI. We found that GPR4 deficient mice showed a decrease of survival rate and cardiac functions. We also identified GPR4 expressing cells which involved in inflammation after MI.

研究分野：分子生物学

キーワード：GPR4 プロトン感知性受容体

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞時の過剰な炎症応答は、心筋細胞の壊死などといった組織障害を引き起こすことが報告されている。従って、炎症応答の厳密な制御は心臓の病態時に極めて重要である。一般的に炎症時においては、組織の pH が低下することが知られている。心筋梗塞時における pH の低下は、嫌気呼吸により生成する乳酸の蓄積などにより生じ、病態時の心臓へ何らかの影響を及ぼすと考えられてきた(図1)。

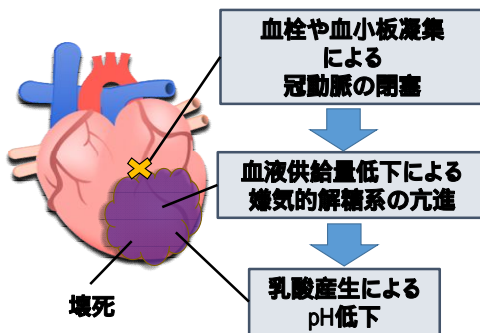


図1. 心筋梗塞時に起こる環境変化

そこで我々は、細胞外 pH の低下によって活性化される G タンパク共役型受容体(GPCR)に着目した。プロトン感知性受容体は、これまでに4種(GPR4、OGR1、TDAG8、G2A)同定されている。我々の研究室で、心臓でのこれら受容体の発現量を Real-time PCR 法を用いて調べたところ、GPR4 の発現が最も高かった。そこで、GPR4-KO マウスを入手し、冠動脈の左前下行枝を閉塞させ、心筋梗塞モデルマウスを作製したところ、28日後には、野生型に比べて死亡率が減少していた。さらに、死細胞が減少し、心肥大や線維化が抑制されるとともに、心機能も保持されていた(図2)。

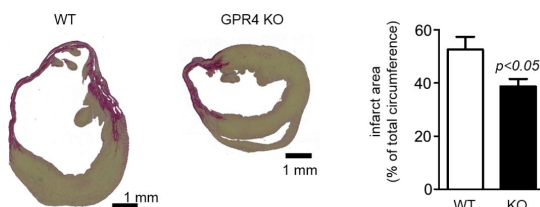


図2. GPR4 KO マウスは心肥大や線維化が抑制される

以上の結果は、心筋梗塞時に細胞が GPR4 を介してプロトン濃度の変化を感知することは、心筋梗塞の病態に大きな影響を与えることを示している。

2. 研究の目的

本研究は、心臓における GPR4 の機能を解析することにより、心筋梗塞時における pH 変化の生理的意義を見出す。具体的には以下の点を明らかにする。

- 1) 野生型マウスと GPR4-KO マウスの心筋梗塞後の病態比較を詳細に行い、GPR4 が心筋梗塞のそれぞれの病態形成においてどの程度寄与しているのか、またその時期を明確にする。
- 2) 心筋梗塞の病態を悪化させる原因である GPR4 発現細胞を同定する。
- 3) GPR4 発現細胞が、心筋梗塞後に発現誘導する遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

心筋梗塞モデルマウス作製は、8-10 週齢の雄性マウスに心筋梗塞処置を施し、心筋梗塞モデルマウスとして実験に用いた。具体的には、心筋梗塞施術は肋骨左側の第二肋間の切開によって心臓を露出させ、左冠動脈前下行枝を縫合糸で結紮する。以上の処置を施したマウスを心筋梗塞群とし、冠動脈の結紮以外は同様の処置を施したマウスを偽処置群とした。

心筋梗塞処置マウスにおける GPR4 の mRNA の定量には、マウス心室から Total RNA を抽出後、逆転写反応を行い、Real time RT-PCR を行った。発現細胞同定には、健常マウス心室から各種構成細胞をフローサイトメーターにより単離後、RNA を抽出し、逆転写反応を行い、Real time RT-PCR により解析を行った。

in situ hybridization 法による GPR4 mRNA の検出には、まず 8-10 週齢のマウス心臓を摘

出し、液体窒素にて凍結させた。その凍結切片を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、GPR4 mRNA に対するアンチセンス RNA プローブを反応させた。アルカリホスファターゼ標識された抗ジゴキシゲニン抗体で、アンチセンス RNA プローブに標識されていたジゴキシゲニンを認識させた。その後、アルカリホスファターゼの基質である 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate と nitro blue tetrazolium を反応させた。

4 . 研究成果

マウスに心筋梗塞処置を施し、GPR4 の発現量変化(1~28 日)を Real time RT-PCR で確認した。その結果、GPR4 は心筋梗塞時において余り発現量が変化しないことが明らかとなった。この結果により、GPR4 の発現細胞は、梗塞時に浸潤してくる免疫細胞ではないことが示唆された。GPR4 KO マウスでは、野生型マウスと比べて心筋梗塞初期段階で生存率が悪化する事と、Real-time RT-PCR の結果と合わせて考えると、心筋梗塞処置後初期の段階で元々心臓に存在する GPR4 発現細胞が病態に関与していることが考えられる。そこで、心臓組織から各種細胞を分取し、mRNA の発現を調べたところ、ある細胞のみが顕著に GPR4 の発現が高かった。また、*in situ* hybridization により GPR4 発現細胞を確認したところ、Real time RT-PCR の結果と同じ細胞が染色されたことから、間接的であるが発現細胞を同定することに成功した。次に、心筋梗塞時に GPR4 発現細胞に関連する遺伝子を Real time RT-PCR で測定したところ、心筋梗塞処置後 1 日目の GPR4 KO マウスは野生型マウスの炎症関連遺伝子の発現量が有意に低下していることを見出した。以上の結果から GPR4 発現細胞は心筋梗塞時に炎症を亢進させ、生存率や心機能を悪化させる可能性が示唆された。

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 1 件)

1 . Nagasaka A, Ohba Y, Kurose H, Nakaya M. Novel functions of GRK6 in macrophages by phosphorylating the non-GPCRs substrates Macrophage, 2, 2015, (査読あり) DOI: 10.14800/macrophage.1021

[学会発表] (計 2 件)

1 . 西俊英、長坂明臣、仲矢道雄、黒瀬等 心筋梗塞時におけるプロトン感知性受容体 (TDAG8) の役割解明 第 88 回 日本薬理学会年会、2015 年 3 月、愛知

2 . 小野達貴、西俊英、長坂明臣、仲矢道雄、岡島史和、黒瀬等 心筋梗塞時におけるプロトン感知性受容体 T cell death-associated gene 8 (TDAG8) の役割解明 第 131 回 日本薬学会年会、2016 年 3 月、神奈川

[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 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ :
<http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

長坂 明臣 (NAGASAKA, Akiomi)
九州大学・薬学研究院・助教
研究者番号 : 10723877

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

研究者番号：