様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 24 年 4 月 5 日

群馬大学生体調節研究所長　殿

所属機関名　九州大学大学院薬学研究院
職名　教授
研究代表者　黒瀬　等
勤務先所在地　〒812－8582
福岡県福岡市東区馬出 3－1－1
電話番号　092－642-6884
ファックス番号　092－642-6884
E-メール　kurose@phar.kyushu-u.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

（課題番号　11025　　）

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	研究プロジェクト名： 代謝シグナル機能研究プロジェクト 共同研究課題名： 心臓の線維化とプロトン感知性受容体
2. 共同研究目的	心筋の線維化は心機能不全を引き起こす要因である。この線維化は心臓が虚血や機械進展刺激などの様々なストレスにさらされたときに誘導される。本研究では虚血後に予想される細胞外 pH の低下が線維化で果たす役割を検討するため、pH 低下を感知するプロトン感知性 GPCR 欠損マウスを用いて解析する。
3. 共同研究期間	平成 23 年 4 月 1 日　～　平成 24 年 3 月 31 日

4. 共同研究組織

氏　名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担
（研究代表者） 黒瀬　等	56	薬学研究院	教授	プロトン感知性受容体の in vivo での役割解析
（分担研究者） 仲矢　道雄	34	薬学研究院	助教	プロトン感知性受容体の in vitro での役割解析

5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	シグナル伝達	氏名	岡島史和

※　次の6，7，8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6，7，8の項目全体では1頁に収めて下さい。

（課題番号　11025　　）

6. 共同研究計画

心臓は虚血や持続的な圧負荷などのストレスにさらされると肥大する。肥大に伴い細胞外にコラーゲン（タイプⅠおよびⅢ）が蓄積する線維化が引き起こされる。コラーゲンは臓器実質細胞の機能を果たすことができないため、線維化の亢進により臓器の機能が低下する。心臓での線維化は、心機能（とくに拡張能）の低下と密接に関連しているとされており、また認可されている線維化そのものをターゲットとした薬は現在までのところ一つであり、線維化のメカニズムの解析に基づく新たなターゲット分子の同定および薬の開発は緊急の課題となっている。現在までのところ、線維化にはさまざまな神経液性因子やホルモンが関与していることが知られている。

細胞外 pH の低下は、ストレスにさらされた様々な組織で生じることが報告されている。この細胞外 pH の低下（すなわちプロトン濃度の上昇）がどのようなメカニズムで引き起こされているのか、上昇したプロトン濃度がどのような役割を果たしているのかなどについてはほとんど報告されていない。細胞外ロトン濃度の上昇により活性化されるシグナリング分子としてイオンチャネルとプロトン感知性 G タンパク質共役型受容体（プロトン感知性受容体と略す）が知られている。イオンチャネルとしては、ASIC（acid-sensing ion channels）、TRPV1 および TRPV4 などが知られている。細胞外プロトンによって活性化され、細胞内へのイオン流入を促進させる。一方、プロトン感知性受容体として、GPR4、OGR1、TDAG8、G2A の 4 種が存在している。G2A は pH7.4 ですでに十分活性化されているのに対し、残り 3 種のプロトン感知性受容体は pH が生理的な pH より低くなると活性化される。

本申請では、心臓がストレスにさらされた時に観察される細胞外 pH の低下が持つ役割をノックアウトマウスおよび in vitro の解析系により検討することにより、プロトン感知性受容体の役割を明らかにする。また、選択的な化合物の作用を開発することで将来の薬の開発へと結び付ける。

本年度は次のことを行う。

1. 心臓には、4 種のプロトン感知性受容体（GPR4、OGR1、G2A および TDAG8）のうち、どのタイプが発現しているかを RT-PCR にて測定する。もっとも発現の高い受容体を以後の解析に用いる。
2. もっとも発現の高かったプロトン感知性受容体の KO マウスとマウスの野生型マウスの冠動脈を閉塞し、心筋梗塞モデルを作成する（虚血モデル）。また、横行大動脈を結紮し心臓に圧負荷をかける（圧負荷モデル）。虚血モデルおよび圧負荷モデルでの心臓の線維化を、コラーゲン染色、線維化因子遺伝子の発現、心機能などを測定する。野生型とノックアウトマウスの結果を比較することで、プロトン感知性受容体の役割を明らかにする。
3. 4 種のプロトン感知性受容体のうち、GPR4 に対しては製薬会社より拮抗薬と考えられる化合物の特許が取られている。そこで、GPR4 が心臓に発現しているのであれば、この化合物を合成しマウスでの効果を検討する。化合物は血管の手術後に投与することが可能で、心臓にストレスをかけた後に投与することで遺伝子をノックアウトさせた状態を作り出せる。

本年度は、上記のことを行い来年度につなげる。

7. 共同研究の成果

心臓を丸ごとすりつぶし RT-PCR を行った結果、GPR4 の発現が最も高かった。そこで、GPR4 の作用に拮抗する化合物が協和キリン株式会社より特許の形で報告されているため、その化合物を合成した。通常のノックアウトマウスを用いた in vivo 解析では、マウスが生まれたときからその遺伝子が欠損しているため、その機能を補完するように個体が変化している可能性がある。そこで、化合物を合成してもらい活性を評価した。特許に記載されている最終化合物に至るさまざまな化合物も併せて活性を評価し、どの段階で GPR4 選択性が与えられたのかを明らかにする。

活性評価は、cAMP 産生を間接的に測定する CRE-ルシフェラーゼおよび Rho の活性化を測定する SRE-ルシフェラーゼによって行った。合計 17 種の化合物の活性を測定したところ、合成途中の化合物でも活性を示した。野生型マウス個体に高用量で投与しても毒性は見かけ上観察されなかったことから、化合物自体が望ましくない応答を引き起こしていないことが明らかになった。今後、ストレスをかけた後に化合物を投与し、GPR4 がどのような働きを持っているのかを検討する予定である。また、GPR4 以外のプロトン感知性受容体への作用も検討し、選択性についても明らかにする。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

（本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。）

なし