

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 28 年 4 月 15 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 准教授
研究代表者 仲矢 道雄

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 14012)

| | | | |
|-----------------------------|---|----------|------------------------|
| 1. 共同研究課題名 | 心筋梗塞時におけるプロトン感知性受容体の役割解析 | | |
| 2. 共同研究目的 | 心筋梗塞が生じた心臓の細胞外 pH は酸性になる。しかしながら、pH 変化が心筋梗塞時の応答に与える影響についてはこれまでほとんど解析されていない。本研究では、pH 感知性受容体の役割について、ノックアウトマウスを用いて明らかにする。 | | |
| 3. 共同研究期間 | 平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日 | | |
| 4. 共同研究組織 | | | |
| 氏 名 | 所属部局等 | 職名等 | 役割分担 |
| (研究代表者) 仲矢 道雄 | 九州大学薬学研究院 | 准教授 | 心筋梗塞モデルの作成 |
| (分担研究者) 長坂 明臣 黒瀬 等 | 九州大学薬学研究院 九州大学薬学研究院 | 助教 教授 | モノクローナル抗体の作成 心機能の解析 |
| 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。

6. 共同研究計画

我々は、前年度から心筋梗塞時の心臓に発現するプロトン感知性受容体、TDAG8 の心筋梗塞時の役割について研究を行ってきた。前年度までの共同研究により、(1)TDAG8 が心筋梗塞モデル処置後に急激に発現誘導されること、(2)TDAG8 ノックアウト(KO)マウスに心筋梗塞処置を施すと、野生型(WT)のマウスに比べ、処置後の生存率が有意に低下する(WT47.8%⇒TDAG8KO19.4%)ことを見出した。

そこで本年度は、以上の結果を踏まえ、心筋梗塞モデル処置後の WT マウスと TDAG8KO マウスの心臓病態の違いを TDAG8 の発現がピークを迎えるタイミングを中心に比較、検討する。一方で、心筋梗塞時に TDAG8 を発現する細胞を同定する。これら解析により心筋梗塞時における TDAG8 の役割、および心筋梗塞時の pH 低下の影響を明らかにする。

7. 共同研究の成果

心筋梗塞後後の TDAG8 の発現量変化を、心筋梗塞処置後 0、3、7、28 日目の心臓から RNA を抽出し、Real time RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、TDAG8 は心筋梗塞処置後 3-7 日目に発現量が顕著に増加することが明らかとなった。上述の様に、TDAG8 KO マウスは WT マウスと比べて心筋梗塞処置後の生存率が顕著に低下したが、その生存率の違いは、TDAG8 の発現上昇が顕著に観察される心筋梗塞処置後 3-7 日目に観察された。さらに心筋梗塞処置後 4 週目の心機能を心エコー法で測定したところ、TDAG8 KO マウスでは、WT マウスと比べて有意に心機能が低下していた。以上の結果から、TDAG8 は心筋梗塞時に心保護的に働く分子であることが明らかとなった。

次に心筋梗塞時における TDAG8 発現細胞の同定を行うため、TDAG8 に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。TDAG8 KO マウスに TDAG8 高発現細胞株を免疫後、抗体価の上昇が見られたためハイブリドーマを作製した。しかしながら、免疫染色で使用できる抗体を得ることができなかった。そこで、心筋梗塞処置 3 日目の野生型マウスから各種細胞を単離し Real time PCR を行うことにより、間接的に TDAG8 発現細胞の同定を試みた。その結果、TDAG8 は T 細胞、好中球、マクロファージといったリンパ球に強く発現し、一方、心筋細胞や線維芽細胞には殆ど発現していないことを見出した。この結果を踏まえ、心筋梗塞処置 1、3、7 日目の炎症関連遺伝子を調べたところ、心筋梗塞処置を施した TDAG8 KO マウスは顕著に IL-17A の発現が増加していた。これまでの報告から、心筋梗塞時における IL-17A の生理的役割は、①アポトーシスの亢進、②線維化の亢進が知られている。そこで、TUNEL 染色とピクロシリウスレッド染色により、アポトーシスと線維化の程度を評価したところ、TDAG8 KO マウスでは有意に細胞死と線維化が亢進していた。以上の結果から、TDAG8 KO マウスでは、IL-17A の過剰産生によりアポトーシスと線維化が亢進する結果、生存率と心機能が低下する可能性が示唆された。

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を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

<学会発表>

2016.3.27 日本薬学会第 131 年会

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) の役割解析

○小野 達貴, 西 俊英, 長坂 明臣, 仲矢 道雄, 岡島史和, 黒瀬 等

<研究論文>

Tobo A, Tobo M, Nakamura T, Ebara M, Tomura H, Mogi C, Im DS, Murata N, Kuwabara A, Ito S, Fukuda H, Arisawa M, Shuto S, Nakaya M, Kurose H, Sato K, Okajima F.

Characterization of Imidazopyridine Compounds as Negative Allosteric Modulators of Proton-Sensing GPR4 in Extracellular Acidification-Induced Responses.

PloS one. 2015;10(6):e0129334.