

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 27 年 3 月 31 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薬効安全性学
職 名 准教授
研究代表者 仲矢 道雄

下記のとおり平成 26 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 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 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 心機能を解析	
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: 14012)

6. 共同研究計画

I. 心筋梗塞後の TDAG8 の発現量確認:

野生型(WT)マウスに心筋梗塞処置を行い、経時的に発現量の変化を Real-time PCR で測定する。発現量の変化する時期に焦点を当て、解析を行う。

II. TDAG8 モノクローナル抗体の作製:

TDAG8 遺伝子欠損 (KO) マウスに TDAG8 高発現細胞株を免疫し、抗体価を上昇させ、ハイブリドーマを作製する。その後、FACS または免疫染色で使用可能な抗体をスクリーニングして、TDAG8 モノクローナル抗体を獲得する。

III. WT マウスと TDAG8 欠損 (KO) マウスの心筋梗塞後の病態比較:

WT マウスと TDAG8 KO マウスに心筋梗塞処置を行い、生存率や心機能を測定する。【I】の検討結果より、TDAG8 の発現量が最も変化する時期に、炎症関連遺伝子、心肥大関連遺伝子、線維化関連遺伝子などの Real-time PCR を行い、心筋梗塞時の TDAG8 作用ならびに TDAG8 発現細胞を推定する。その後、TDAG8 モノクローナル抗体を用い、TDAG8 発現細胞を同定する。FACS や組織染色を行い、WT と KO マウスで比較して、心筋梗塞に関与する TDAG8 発現細胞の働きを調べる。

IV. TDAG8 発現細胞の *in vitro* 解析

セルソーターを用いて TDAG8 発現細胞を単離し、*in vitro* による評価を行う。

7. 共同研究の成果 **上記の6. 共同研究計画の項目にそれぞれ対応して記述する。**

I. 心筋梗塞後の TDAG8 の発現量確認:

WT マウスに心筋梗塞処置を行うと、TDAG8 は梗塞処置 3-7 日後に発現量がピーク(約 8 倍)を迎え、4 週間後には低下することを見出した。

II. TDAG8 モノクローナル抗体の作製:

マウス細胞株に TDAG8 を安定発現させた細胞株を樹立する事に成功し、この細胞株を抗原とし、TDAG8 欠損マウスに 10 回免疫をした。その結果、少しずつではあるが、順調に抗体価が上昇している。

III. WT マウスと TDAG8 KO マウスの心筋梗塞後の病態比較:

TDAG8 KO マウスに心筋梗塞処置を施すと、WT マウスに比べ、生存率が有意に低下する (WT 47.8% ⇒ TDAG8 KO 19.4%) し、心機能が有意に低下することを見出した。以上の結果から、TDAG8 が心保護的に作用することが、明らかとなった。心筋梗塞処置3日後の炎症関連遺伝子、心肥大関連遺伝子、線維化関連遺伝子の発現量には、有意な差が認められなかったが、心筋梗塞処置後 3 日目の心臓を詳細に調べると、TDAG8 KO マウスでは、梗塞部位のアポトーシスが有意に亢進していることを見出した。以上の結果から、TDAG8 はアポトーシス抑制に作用することで、心保護的に作用していると考えられる。

IV. TDAG8 発現細胞の *in vitro* 解析:

抗体価が上昇してきていることから、来年度にはモノクローナル抗体が完成すると思われる。完成次第、その抗体を用いて TDAG8 発現細胞の *in vitro* 解析を行う予定である。

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。)

【現在投稿中論文】

1. Tobo A, Tobo M, Nakakura T, Ebara M, Mogi C, Im DS, Murata N, Kuwabara A, Itoh S, Hukuda 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 response. **PLoS ONE submitted**