

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 26 年 4 月 21 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 - 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. 共同研究課題名	心筋の線維化のホルモン性制御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の一つであり、様々な因子が関わっている。この線維化は、心臓が圧負荷や虚血などのストレスに曝されると誘導される。虚血時には細胞外 pH の低下が生じるとされている。本研究では pH の低下を感知するプロトン感知性受容体の線維化への関与を明らかにするため、プロトン感知性受容体の遺伝子欠損マウスを用いて解析する。				
3. 共同研究期間	平成 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 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	58	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	36	薬学研究院	准教授	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	シグナル伝達分野		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

細胞外の微小環境が細胞応答に影響を与えることについては、これまでに多くの報告がある。微小環境として、細胞外マトリクスやイオン濃度が有名である。いずれもこれらを感じ細胞内にその変動・変化を伝えるシグナリング系が存在している。プ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ン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。イオンチャンネルとしては、ASIC(酸感知性イオンチャンネル)や電位非依存性陽イオンチャンネル(TRPV1 および TRPV4)などが知られている。これらイオンチャンネルは、プロトン濃度の上昇によって活性化され、細胞内へのイオン流入が促進させる。一方、プロトン感知性受容体として、GPR4、OGR1、TDAG8、G2A の4種が報告されている。このうち、G2A は生理的な pH である pH7.4 ですですでに十分活性化されているため、恒常的に活性化されているプロトン感知性受容体と考えられている。一方、G2A を除く3種のプロトン感知性受容体は細胞外 pH が生理的な pH より低くなる(すなわちプロトン濃度が上昇する)と活性化される。プロトン感知性受容体の役割については、これまでに炎症やがんなどで解析が行われているのみで、心臓での解析は行われてこなかった。

心臓の細胞外プロトン濃度が上昇する条件として虚血が知られている。心臓は虚血に曝されると、代謝系が酸化的リン酸化から解糖系へと変わるため、代謝産物として乳酸が増加する。このため細胞外環境は酸性に傾く。細胞外が酸性すなわちプロトン濃度が上昇すると、上記のシグナリング系のいずれかあるいは全てが活性化されると考えられる。しかしながら、これまで虚血時(ここでは心筋梗塞をモデルとする)に活性化されていると考えられるプロトン感知性受容体については何ら報告がなされてこなかった。本研究では、プロトン感知性受容体と線維化の関係に焦点を当てることにした。心筋梗塞時には、組織の壊死によりその間隙を埋めるようにコラーゲンが蓄積する線維化が生じる。線維化の原因となるコラーゲンは臓器の形態を維持させることができるものの機能を補うことができないため、線維化により臓器の機能は低下する。コラーゲンの産生は、いくつかの起源(由来)の異なる筋線維芽細胞により行われる。そこで、本研究ではプロトン感知性受容体の心筋梗塞における役割を *in vitro*(心臓より単離した心室筋細胞および筋線維芽細胞を用いる)および *in vivo*(野生型およびノックアウトマウスを用いる)の両面から解析する。特に、心筋梗塞時における筋線維芽細胞の役割にプロトン感知性受容体がどのように関わっているのかについて焦点を当てる。また、本研究では、選択的に作用を示す化合物を開発することで、将来の薬の開発へと結び付ける。

7. 共同研究の成果

4種のプロトン感知性受容体(GPR4、OGR1、G2A および TDAG8)のうち、心臓では GPR4 の発現が最も高かった。そこで、野生型および GPR4 ノックアウトマウス(GPR4-KO マウス)の左冠動脈前下降枝を結紮し心筋梗塞処置とした。その結果、GPR4-KO マウスは、①心筋梗塞処置後の生存率が改善すること、②炎症応答が減弱していること、③線維化が抑制されていることなどが明らかになった。しかしながら、どの細胞に GPR4 が発現しているのかを示すことができず、プロトン濃度の上昇が支配する初期応答の解析が困難であった。そこで、マウスの解析と並行して GPR4 に対するモノクローナル抗体を作成し、この抗体を用いた免疫染色により細胞を同定するとともに、抗体を用いて GPR4 発現細胞を単離しどのような応答が起こっているのかを解析することを開始した(抗体は作成中)。作成中の抗体と GPR4 のアゴニストを組み合わせると、心筋梗塞後に生じる応答の中から GPR4 を介して引き起こされる応答を細胞レベルで解析できる。アゴニストを得るために、はじめに GPR4 と CRE-Luciferase を安定に発現している HEK293 細胞を樹立した。安定発現細胞は活性評価の再現性を得るためには必須である。溶液の pH 8.0 を basal 活性とし、pH 6.8 を活性化された条件とした。Luciferase 活性に影響を与える DMSO の溶液での濃度は 0.1% であり、この濃度では活性に影響を与えないことを確認した。9,600 種よりなる化合物ライブラリーをスクリーニングし、pH 6.8 の Luciferase 活性を 60% 以上阻害する化合物 26 種、80% 以上阻害する化合物 9 種を得た。一方、pH 6.8 という受容体がほぼ最大に活性化されている条件にもかかわらず、さらに活性を 20% 増加させる化合物 6 種を得た。活性を増加させる化合物はアゴニストとして作用すると考えられる。これら GPR4 に対し拮抗作用または活性化作用を示す化合物の各種プロトン感知性受容体に対する受容体選択性を検討した後、抗体と組み合わせた実験を行っていく。

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