

総説

細胞外 pH 環境を感知する
プロトン感知性 GPCR の機能と作用機構

戸村 秀明, 茂木 千尋, 佐藤 幸市, 岡島 史和

要約: OGR1 (Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1), GPR4, TDAG8 (T-cell death-associated gene 8), G2A (G2 accumulation) は, お互いのアミノ酸の相同性が 40-50% の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である. これらの受容体は最初, 脂質性メディエーターに対する受容体として報告されたが, 2003 年の Ludwig らによる報告以降, これらの受容体が細胞外プロトンを感じ取るプロトン感知性 GPCR であることが, 明らかとなった. OGR1, GPR4, G2A が脂質性メディエーターである sphingosylphosphorylcholine (SPC) や lysophosphatidylcholine (LPC) に対する受容体であるとの説は, 受容体への結合実験の再現性の問題から, 現在は疑問視されている. 細胞外 pH の低下に伴いプロトン感知性 GPCR は, 受容体中のヒスチジンがプロトネーションされる結果, 立体構造が活性型に移行し, 種々の三量体 G タンパク質を介して, 多様な細胞内情報伝達系を活性化させると考えられている. G2A に関しては生理的な pH 条件下で恒常的な活性化が観察されるので, 別の活性化機構が提唱されている. 生体内の pH は 7.4 付近に厳密に調節されていることから, 細胞外 pH の低下は炎症部位やがんなど局所的に起こっていることが予想される. 実際, 炎症やがんなどで, プロトン感知性 GPCR を介した作用が, 我々の報告を含め, 細胞レベル, 個体レベルで報告されている. これまでの研究結果から, 発現するプロトン感知性 GPCR の種類の違いにより, 炎症部位で異なる応答が惹起される可能性が浮上してきた. さらに最近, 各受容体の欠損マウスの報告が出そろい, プロトン感知性 GPCR の研究は新たな段階に入ってきた. プロトン感知性 GPCR の研究は, 炎症やがんに対する新たな視点からの創薬へのきっかけにつながる可能性

を秘めている.

はじめに

OGR1 (Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1), GPR4, TDAG8 (T-cell death-associated gene 8), G2A (G2 accumulation) は, お互いのアミノ酸の相同性が 40-50% の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である. これらの GPCR は最初, sphingosylphosphorylcholine (SPC), lysophosphatidylcholine (LPC), psychosine などの脂質性メディエーターに対する受容体として報告された(1). しかしながら, 2003 年に Ludwig らにより OGR1, GPR4 が(2), そして 2004 年から 2005 年にかけて我々を含む複数のグループにより TDAG8(3, 4), G2A(5) が, 細胞外プロトンを感じ取るプロトン感知性 GPCR であることを報告した.

プロトン感知性 GPCR の作用に関しては, 細胞を用いた *in vitro* での研究に加え, 最近では各受容体を欠損するマウスを使用した *in vivo* での研究がなされるようになってきた.

本総説では, プロトン感知性 GPCR の活性化機構に加え, 炎症, がんに対するプロトン感知性 GPCR の役割に関する研究の現況を紹介したい.

1. プロトン感知性 GPCR の活性化機構

プロトン感知性 GPCR は, 細胞外プロトンにより活性化され, 他の GPCR と同様に三量体 G タンパク質を介して, 細胞内情報伝達系を活性化する. Ludwig らの最初の報告(2) では, OGR1 は phospholipase C (PLC) /Ca²⁺系を活性化すること, GPR4 は cAMP 産生系を活性化することが示されている. TDAG8 に関

しては、我々が cAMP 産生系を活性化すること (3), Ishii らは cAMP 系に加え RhoA を活性化すること (4) を示した。G2A に関しては Murakami らにより、Rho 系を介した zif268 プロモーターの活性化と PLC/Ca²⁺ 系の活性化を引き起こすことが示された (5)。さらに我々は、GPR4 が異なる種類の三量体 G タンパク質を介して、cAMP 産生系以外に、G₁₃/Rho 系、G_{q/11}/PLC 系など、多様な情報伝達系を活性化することを示した (6)。以上の知見は受容体を過剰発現して得られた結果であるが、プロトン感知性 GPCR をネイティブに発現する細胞においても、細胞外 pH の低下がプロトン感知性 GPCR を介して、種々の細胞内情報伝達系を活性化することは、我々を含めて報告されている (7-11)。

プロトンの受容体への結合は、直接測定することができない。そこで我々は、プロトンが直接に受容体を活性化しうることを、TDAG8 過剰発現細胞の細胞膜標品を用いて報告した (3)。プロトン感知性 GPCR は、受容体中のヒスチジンのプロトネーションにより活性化するというモデルが、提唱されている (2)。実際、ヒスチジンをフェニルアラニンに変異させた受容体では、活性化が減弱する (2, 3, 5)。なお G2A に関しては、プロトンによる受容体の活性化に疑問を呈する報告もなされている (9)。G2A のアミノ酸配列を OGR1, GPR4, TDAG8 のそれと比較すると、プロトンを感じ取るヒスチジンの位置に、塩基性アミノ酸であるリジン残基やアルギニン残基が存在している。このため、生理的 pH では G2A はすでに活性化しているとの仮説が提唱されている (12)。実際、G2A は生理的な pH 条件下で活性化している (5, 6)。次に述べるように、G2A は別の機構によりその活性が調節されている可能性が高い。

SPC や LPC の OGR1, GPR4, G2A への特異的な結合が再現できないことや、我々を含めこれら脂質性メディエーターのアゴニスト作用が観察できない場合も多いため、プロトン感知性 GPCR が SPC や LPC に対する受容体であるとの説は、現在、疑問視されている。プロトン感知性 GPCR を最初に報告したノバルティスのグループでは、OGR1, GPR4 に対してプロトン以外のリガンドは見いだせないことを報告している (13)。実際、SPC や LPC が受容体を活性化するデータは我々も得ていない (7, 8)。しかしながら依然として、これら脂質性メディエーターがプロトン感知性 GPCR を発現する細胞に対して、各種細胞応答を引き起こすとの報告は、続いている (14-27)。また 9-HODE が G2A のリガンドあるとの報告 (28) もなされており、プロトン感知性 GPCR の活性調節に脂質性メディエーターが何

らかの作用を及ぼしていることは確かと思われる。脂質性メディエーターは、単独で受容体を活性化する (1, 29), プロトンによる受容体の活性化を阻害する (3, 5, 30), 受容体の細胞内から細胞膜への発現に関与する (25, 31) など、種々の報告が混在している。しかしながら、上述したように LPC, SPC の OGR1, GPR4, G2A への特異的な結合を報告した論文は、再現性の問題から撤回されており、これらの結果の解釈には注意が必要である。また活性化の阻害に関しては、LPC を除き脂質性メディエーターの濃度が生理的な濃度とかけ離れており、実際に生体内で作用しているものとは考えにくい。その点、G2A の細胞膜への発現に LPC が関するとの報告 (25, 31) は、上述のように恒常的に活性化している G2A に対する LPC の新たな活性調節機構として、注目される。

2. プロトン感知性 GPCR の生理、病態生理的な作用

生体内の pH は 7.4 付近に厳密に調節されている。しかしながら、細胞外 pH の低下は炎症部位やがんなどで、局所的に引き起こされている。本総説では、炎症、がんを中心に、プロトン感知性 GPCR を介する作用を紹介したい。

1) 炎症応答とプロトン感知性 GPCR

生体は各種ストレスにさらされると、ストレス周辺の細胞やその部位に遊走、浸潤してきた免疫細胞から、プロスタグランジン類や炎症性サイトカインなどの炎症関連物質が産生され、炎症応答が惹起される。また炎症部位は、感染した細菌からの脂肪酸の産生や炎症周辺の細胞での解糖系の亢進による乳酸産生の増加などにより、pH が低下する。細胞外液の pH の低下が、炎症部位の細胞の機能に多彩な影響を及ぼすことはよく知られているが、その分子機構はほとんど明らかとなっていない。

① OGR1

OGR1 は、多くの組織でその発現が観察される。動脈硬化は血管に生じる炎症の一種であり、血管平滑筋細胞の脱分化に伴う増殖・遊走が、動脈硬化の維持、進展に大きな役割を果たす。我々はヒト大動脈血管平滑筋細胞 (AoSMC) を用い、細胞外 pH の低下は OGR1 を介して、PLC/extracellular signal-regulated kinase (ERK) /cyclooxygenase (COX) を活性化し、PGI₂ の産生を引き起こし、PGI₂ 受容体を介して AoSMC の cAMP 産生を増加させることを報告した (7)。PGI₂ は抗動脈硬化作用を示すこと、cAMP は血管平滑筋細胞の増殖や遊走を抑制することから、OGR1 は動脈硬化

を調節する可能性がある。さらに我々は、細胞外 pH の低下が OGR1/G_{q/11}/COX-2 を介して、ヒト骨芽細胞 (NHost) において PGE₂ の産生を引き起こすことも報告した(8)。COX-2 は各種炎症物質によりその発現が誘導される、プロスタグランジン産生酵素である。我々は細胞外 pH の低下が COX-2 の発現を誘導すること、そしてこの発現の誘導も、OGR1 を介して引き起こされていることを明らかにした(8) (Liu 他, 未発表データ)。これらの結果は、OGR1 が炎症時の細胞外 pH の低下に伴う COX-2 の発現やプロスタグランジン類の産生に関与することを示している。

炎症性サイトカインの産生にも OGR1 は関与する。喘息では、気管支内の pH が低下している。我々はヒト気管支平滑筋細胞を用い、細胞外 pH の低下が OGR1 を介して IL-6 の発現や産生を誘導することを見出している (Ichimonji 他, 未発表データ)。

このように OGR1 は細胞外 pH に伴うプロスタグランジン類や炎症性サイトカインなどの炎症関連物質の産生を促進し、炎症応答を調節する可能性がある。

実際に OGR1 が炎症応答に関与していることは、OGR1 欠損マウスで示された。チオグリコレート処理による炎症モデルでは、欠損マウスでは腹腔内マクロファージの数が少ないこと、また欠損マウスのマクロファージは LPS による ERK の活性化や NO 産生が減弱していることが示されている(32)。

他、細胞外 pH の低下が OGR1 を介して、破骨細胞の生存、分化、活性化に関与することが報告されている(33-35)。上述のように OGR1 は骨芽細胞の細胞応答も引き起こすことから、OGR1 欠損マウスでは骨組織に何らかの異常があることが予想されたが、正常マウスと大きな差は観察されていない(32)。アシドーシスなど生体にストレスを負荷することにより、正常と欠損マウス間で差が検出されるのかもしれない。

② TDAG8

TDAG8 は、血球系細胞に非常に強い発現が観察されることから、これらの細胞での作用解析が進んでいる。感染による炎症時には、好中球から活性酸素が産生され、感染を防御する。ヒト好中球では FMLP により産生される活性酸素量が細胞外 pH の低下に伴い抑制されるが、この抑制は過剰な炎症応答に対する一種のネガティブフィードバック作用と考えられる。我々は TDAG8 の発現が、ヒト白血病細胞株である HL60 が好中球様に分化する過程で増加すること、細胞外 pH の低下に伴い TDAG8 は cAMP 産生系を活性化すること、活性酸素の産生の抑制には cAMP/protein kinase A (PKA) 経路が関与していることを見出し、こ

の抑制作用に TDAG8 が関与している可能性を示唆した(36)。さらに我々は実際に生体内で TDAG8 が炎症応答を抑制する可能性を、TDAG8 欠損マウス由来の腹腔内マクロファージを用いて示した。マクロファージでは、細胞外 pH の低下に伴い LPS 刺激に伴う TNF α や IL-6 の産生が抑制される。TDAG8 欠損マウス由来の腹腔内マクロファージでは、この抑制が部分的に解除されていた。そしてその部分的な抑制には TDAG8 を介した G_s/cAMP/PKA 経路が関与していることを示した(10)。このように TDAG8 は炎症性サイトカインや活性酸素の産生を抑制することで、炎症応答を調節している可能性がある。これは、OGR1 がプロスタグランジン類や炎症性サイトカインの産生を促進するのとは対照的である。プロトン感知性 GPCR の種類によって、細胞外 pH の低下が炎症反応に対して異なる応答を惹起する可能性がある (図 1)。

TDAG8 は血球系細胞のアポトーシスにも関与する。好中球の分化には G-CSF/STAT3 系の活性化が必要である。STAT3 α の過剰発現は、好中球の細胞死を抑制する。STAT3 の発現により TDAG8 が誘導されることから、TDAG8 が cAMP 系の活性化を介して好中球の細胞死の抑制に関与する可能性が報告されている(37)。実際、TDAG8 が血球系細胞のアポトーシスの抑制に関与することは、TDAG8 欠損マウスを用いて報告されている。マウスの気管アレルギーモデルにおいて、肺での好酸球数の増加が欠損マウスでは少ないこと、TDAG8 欠損マウス由来の好酸球では pH 低下で cAMP 産生が増加しないことが示されている。この結果は、

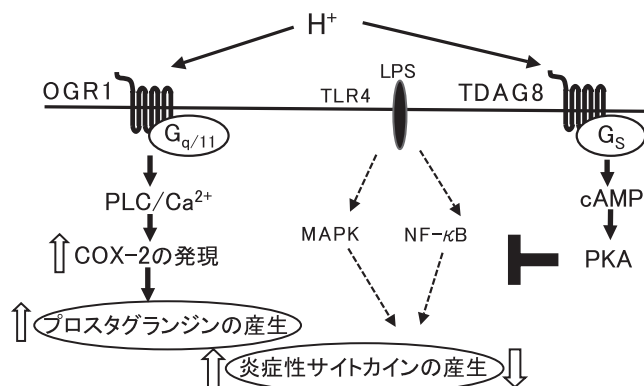


図1 プロトン感知性 GPCR の違いによる炎症関連物質の産生促進と抑制

炎症時の細胞外 pH の低下に伴い、OGR1 は COX-2 の発現誘導を引き起こす (Tomura, et al. JBMR 2008 (文献 8), Liu, et al. 未発表データ)。またプロスタグランジン類や (Tomura, et al. JBC 2005 (文献 7), Tomura, et al. JBMR 2008 (文献 8)), 炎症性サイトカイン (Ichimonji, et al. 未発表データ) などの炎症関連物質の産生を促進する。一方、TDAG8 は cAMP の産生を介して、炎症性サイトカインの産生を抑制する (Mogi, et al. JI 2009 (文献 10))。

TDAG8 が cAMP 産生を介して好酸球のアポトーシスを抑制することで、アレルギー条件下での好酸球の増加を促進することを示している (11)。

一方、TDAG8 の欠損マウスの免疫組織の形態、機能は正常なものと同様であることから、TDAG8 の作用は不明であることの報告もなされている (38)。上述のように TDAG8 は、炎症時など生体がストレスにさらされた時に、その作用を発揮するのかもしれない。

他、炎症時の神経の痛覚症状などにプロトンが関与することが知られている。プロトン感知性 GPCR が新たな痛覚センサーである可能性があることから、神経系においても TDAG8 に関する細胞レベルでの解析の報告がなされている (39-41)。

③ GPR4

GPR4 は多くの組織でその発現が観察されるが、血管内皮細胞で強い発現が観察されることから、現在までにこの受容体の血管系への作用を解析した報告が多い。

ヒト胎盤血管内皮細胞 (HUVEC) では、細胞外 pH の低下に伴い cAMP 産生が起こること、その産生は GPR4 を HUVEC に過剰発現させると促進されること、GPR4 は HUVEC の遊走を pH 依存的に抑制することが、Yang らにより報告されており (42)、細胞外 pH の低下が GPR4/cAMP を介して細胞の遊走を抑制することが予想された。実際 Yang らは、正常マウスと欠損マウスより大動脈を単離し、細胞外 pH の低下に伴う細胞の遊走と増殖活性の抑制の程度が、欠損マウスでは減弱することを示した (42)。この結果は、GPR4 が炎症時に内皮細胞の増殖や遊走を調節する可能性を示唆している。実際、ヒト頭毛細血管内皮細胞では、炎症性サイトカインである TNF α で GPR4 の発現が上昇する (16)。また Yang らは、欠損マウスの一部に微小血管からの出血や血管の変形も観察しており、正常の微小血管の形成や維持にも GPR4 が関与することを示している (42)。

他、GPR4 は、血管内皮細胞における単球のトランスマイグレーション (17) や、血管のバリアー機能 (19) に関与することが報告されている。なおこれらの報告では、プロトンよりはむしろ LPC がこれらの応答に関与することが示されている。しかしながら、上述したように LPC の GPR4 への結合を報告した論文は再現性の問題から撤回されており、この結果の解釈には注意が必要である。G2A で報告されているように、LPC が GPR4 の細胞膜への発現に関与している可能性もある。SPC が内皮細胞の管空形成、増殖、生存、遊走に GPR4 を介して関与することが報告されている (20)。この報

告も LPC の場合と同様の理由により、結果の解釈には注意が必要である。

④ G2A

上述のように G2A は生理的 pH では恒常的に活性化しており、また LPC により活性調節をうけることから、単純にプロトン感知性 GPCR とはいえないかもしれない。しかしながらこの受容体に対するこれまでの知見は、今後、OGR1、TDAG8、GPR4 が関与する作用の解明の手がかりになる可能性がある。

G2A は TDAG8 と同様に、血球系の細胞に非常に強い発現が観察されることから、これらの細胞での作用の解析が主に行われてきている。G2A は、LPC が引き起こすマクロファージや T 細胞の遊走に (22, 23)、LPC による好中球やマクロファージの活性化に (24-27)、単球細胞のどん食作用に (14) 関与することが、これまでに報告されている。これらの応答は炎症時に観察される応答であり、G2A は炎症応答を調節している可能性が高い。

G2A 欠損マウスに関しては、高齢で自己免疫様の疾患症状を呈することが報告されたが (43)、最近、使用したマウスの遺伝的背景によっては自己免疫疾患様の症状を呈さない例も報告されている (44)。また免疫細胞の遊走や浸潤応答を介して、動脈硬化の維持、進展に G2A が関与することも報告されている (45, 46)。さらに最近、肝臓に発現する G2A が HDL の産生を抑制しているとの報告もなされている (47)。このように個体レベルにおいても、炎症応答に G2A が関与することを示す報告がなされている。

2) がんとプロトン感知性 GPCR

がんは解糖系が亢進し、不十分な血管形成により酸素の供給が不足するので、その組織内の pH は低下している。pH の低下は細胞の増殖や遊走を始め、さまざまな応答を変化させるので、プロトン感知性 GPCR が抗がん剤の新たなターゲットとなる可能性があることから、がんとプロトン感知性 GPCR との関係は、興味を持たれている。

OGR1 はヒト筋芽腫組織や細胞に発現し、細胞外 pH の低下に伴い、細胞内 Ca²⁺ の上昇、PLC 活性の上昇、ERK の活性化を引き起こすことが報告されている (48)。またヒト前立腺がんでは、OGR1 の発現量に比例して浸潤能が低下することが示されている (49)。実際にメラノーマ細胞による腫瘍化は、OGR1 欠損マウスで抑制されることが報告され (32)、がんの腫瘍化と OGR1 の関連が個体レベルで示唆されている。GPR4、TDAG8 に関しては、細胞レベルで、またはヌードマウスへの接種実験による個体レベルで、これらの受容

体がリガンド非依存性にかん化を引き起こすがん遺伝子である可能性が報告されている(49). さらに実際のがん細胞において, これらの受容体が過剰発現していることも示されている(49). また, ヒト TDAG8 の遺伝子が白血病と関連する遺伝子座付近にあることも報告されている(50). G2A に関しては, 発見当初, この受容体はヒト白血病がん遺伝子である BCR-ABL チロシンキナーゼの標的遺伝子として同定された経緯がある. そこでこの白血病に対する G2A の作用が解析されている. マウスにおける BCR-ABL による白血病誘導モデルにおいて, この受容体が欠損すると白血病の進行が早まることが示された(51). すなわち, この受容体はがん抑制遺伝子である可能性が示唆されている.

以上のように, プロトン感知性 GPCR はがんの機能に対して何らかの役割を担っている可能性が高い.

おわりに

プロトン感知性 GPCR の研究は, 各受容体の欠損マウスの報告が出そろったことで, 新たな段階に入ってきた. 今後, 細胞を用いた *in vitro* の研究と, 受容体欠損マウスなどを用いた *in vivo* の研究の発展とともに, プロトン感知性 GPCR の生理, 病態生理学的な役割が明らかになっていくものと思われる. プロトン感知性 GPCR の研究の発展は, 炎症やがんに対して, 新たな視点からの創薬へのきっかけにつながっていく可能性を秘めている.

文 献

- 1) Xu Y. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1582:81-88.
- 2) Ludwig MG, et al. *Nature*. 2003;425:93-98.
- 3) Wang JQ, et al. *J Biol Chem*. 2004;279:45626-45633.
- 4) Ishii S, et al. *J Biol Chem*. 2005;280:9083-9087.
- 5) Murakami N, et al. *J Biol Chem*. 2004;279:42484-42491.
- 6) Tobo M, et al. *Cell Signal*. 2007;19:1745-1753.
- 7) Tomura H, et al. *J Biol Chem*. 2005;280:34458-34464.
- 8) Tomura H, et al. *J Bone Miner Res*. 2008;23:1129-1139.
- 9) Radu CG, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:1632-1637.
- 10) Mogi C, et al. *J Immunol*. 2009;182:3243-3251.
- 11) Kottyan LC, et al. *Blood*. 2009;114:2774-2782.
- 12) Kostenis E. *J Cell Biochem*. 2004;92:923-936.
- 13) Seuwen K, et al. *J Recept Signal Transduct Res*. 2006;26:599-610.
- 14) Peter C, et al. *J Biol Chem*. 2008;283:5296-5305.
- 15) Jin Y, et al. *Eur J Immunol*. 2005;35:2699-2708.
- 16) Lum H, et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1786-H1789.
- 17) Huang F, et al. *Endothelium*. 2007;14:25-34.
- 18) Zou Y, et al. *Febs J*. 2007;274:2573-2584.
- 19) Qiao J, et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291:L91-L101.
- 20) Kim KS, et al. *Faseb J*. 2005;19:819-821.
- 21) Singh LS, et al. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:1313-1327.
- 22) Yang LV, et al. *Blood*. 2005;105:1127-1134.
- 23) Radu CG, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:245-250.
- 24) Yan JJ, et al. *Nat Med*. 2004;10:161-167.
- 25) Frasch SC, et al. *J Immunol*. 2007;178:6540-6548.
- 26) Frasch SC, et al. *J Biol Chem*. 2008;283:33736-33749.
- 27) Chen G, et al. *J Lipid Res*. 2005;46:623-627.
- 28) Obinata H, et al. *J Biol Chem*. 2005;280:40676-40683.
- 29) Im DS, et al. *J Cell Biol*. 2001;153:429-434.
- 30) Mogi C, et al. *J Pharmacol Sci*. 2005;99:160-167.
- 31) Wang L, et al. *Mol Biol Cell*. 2005;16:2234-2247.
- 32) Li H, et al. *PLoS One*. 2009;4:e5705.
- 33) Yang M, et al. *J Biol Chem*. 2006;281:23598-23605.
- 34) Iwai K, et al. *J Bone Miner Res*. 2007;22:1612-1620.
- 35) Pereverzev A, et al. *Bone*. 2008;42:150-161.
- 36) Murata N, et al. *Cell Immunol*. 2009;259:21-26.
- 37) Redell MS, et al. *J Leukoc Biol*. 2007;82:975-985.
- 38) Radu CG, et al. *Mol Cell Biol*. 2006;26:668-677.
- 39) Chen YJ, et al. *Mol Pain*. 2009;5:39.
- 40) McGuire J, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;386:420-425.
- 41) Huang CW, et al. *Mol Cell Neurosci*. 2007;36:195-210.
- 42) Yang LV, et al. *Mol Cell Biol*. 2007;27:1334-1347.
- 43) Le LQ, et al. *Immunity*. 2001;14:561-571.
- 44) Osmers I, et al. *J Neuroimmunol*. 2009;207:18-23.
- 45) Parks BW, et al. *J Lipid Res*. 2005;46:1405-1415.
- 46) Parks BW, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2703-2709.
- 47) Parks BW, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:539-547.
- 48) Huang WC, et al. *Curr Biol*. 2008;18:781-785.
- 49) Sin WC, et al. *Oncogene*. 2004;23:6299-6303.
- 50) Kyaw H, et al. *DNA Cell Biol*. 1998;17:493-500.
- 51) Le LQ, et al. *Cancer Cell*. 2002;1:381-391.