

令和元年5月29日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08145

研究課題名(和文)破骨細胞特異的Gタンパク質共役受容体GPR137Bの機能解析と制御化合物探索

研究課題名(英文) Functional analysis of an osteoclast-specific G protein-coupled receptor, GPR137B, and exploration of its regulatory molecules

研究代表者

石橋 宰 (Ishibashi, Osamu)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：70293214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：GPR137Bはリガンド未同定のオーファンGPCRであり、破骨細胞分化に伴いその発現が亢進することが申請者らにより示された。本研究では、マウス破骨細胞前駆細胞であるマクロファージ・単球系細胞株RAW264におけるGpr137b遺伝子をゲノム編集によりノックアウトし、その破骨細胞分化およびマクロファージ極性化における役割について検討した。その結果、GPR137Bが破骨細胞分化誘導因子RANKLの下流のNF-κBシグナル系を調節し、破骨細胞分化に決定的な役割を果たすこと、および、GPR137Bは抗炎症性マクロファージへの極性化に関わるが、炎症性マクロファージへの極性化には関与しないことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨量減少・骨破壊をもたらす疾患の罹患者は増加し続けているが、現在用いられている薬剤は重篤な副作用の問題等から使用が制限される場合も多く、その対策は喫緊の課題である。本研究成果は、既存の薬剤とは作用機序がまったく異なる新規骨吸収抑制薬の開発の可能性をもたらすものであり、治療薬の選択肢を拡大できる点で臨床的にも非常に有意義である。さらに、本研究においてGPR137Bがマクロファージ極性化にも関わることを示されたことは、GPR137Bが様々な炎症性疾患に対する薬剤開発の標的としても有望であることを意味しており、極めて有意義である。

研究成果の概要(英文)：GPR137B is a ligand-unidentified orphan GPCR, of which expression has been demonstrated to be upregulated through osteoclast differentiation. In this study, the Gpr137b gene in RAW264, a pre-osteoclastic mouse macrophage/monocyte cell line, was knocked out by the Crispr/Cas9 genome editing technique, and its role in osteoclast differentiation and macrophage polarization was investigated. We found that GPR137B regulates the NF-κB signaling system downstream of RANKL, an inducer of osteoclastic differentiation, and thus plays a crucial role in osteoclast differentiation. We further identified that GPR137B is also involved in M2 macrophage polarization but not in M1 macrophage polarization.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：破骨細胞 オーファンGPCR ゲノム編集 CRISPR/Cas9 遺伝子ノックアウト 骨粗鬆症 マクロファージ極性化

1. 研究開始当初の背景

昨今の高度高齢化社会において、骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨量減少・骨破壊をもたらす疾患の罹患者は国内だけで1千万人にも上るとされ、その対策は喫緊の課題である。現在、これらの疾患の治療に、破骨細胞（骨吸収を担う細胞）を標的とする種々の骨吸収阻害剤が用いられているが、bisphosphonate 製剤服用中の歯科処置による顎関節壊死に代表されるように、重篤な副作用の問題等から使用が制限される場合も多い。破骨細胞の分化や機能制御に関わる遺伝子やタンパク質を新たに同定し、それらの機能を分子レベルで解明できれば、この問題を解決するような作用機序が異なる新規骨吸収阻害剤の開発に繋がる可能性がある。

これまでに申請者は、破骨細胞の分化や生理機能に重要な役割を担う遺伝子を探索するために、マウス単球系細胞株 RAW264 から分化させた成熟破骨細胞を純粋に単離する系を確立し、次世代シーケンシングによる網羅的トランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を実施した。その結果、破骨細胞選択的に高発現する 62 種類の遺伝子を見出した。この中には、代表的な破骨細胞マーカーである Cathepsin K や酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) など、既に破骨細胞における発現や機能が明らかにされている遺伝子が多く含まれる一方で、これまでに破骨細胞との関連が全く報告されていない遺伝子も見出された。その1つである Gpr137b は、リガンドが同定されていない G タンパク質共役受容体 (GPCR) をコードする遺伝子である。本遺伝子について、RAW264 細胞およびマウス骨髄細胞由来の培養成熟破骨細胞とマウスの主要臓器における発現を定量的 RT-PCR により解析したところ、破骨細胞において選択的に高発現することが示された。また、ヒトの巨細胞腫（破骨細胞様細胞を多く含む良性腫瘍）組織と主要臓器における比較においても、巨細胞腫組織における Gpr137b の遺伝子発現が顕著に高いことが示された。

GPCR はヒトでは約 800 種類存在し、現在用いられている薬剤の約半数は何かしらの GPCR を標的としている。また、GPCR のうち約 100 種類は、GPR137B と同様にリガンドが同定されていない「オーファン GPCR」である。オーファン GPCR は新たな薬剤開発のための標的分子として、リガンド探索を含めた研究が盛んに行われているが、これまでに、破骨細胞におけるオーファン GPCR に関する研究報告はほとんど存在しない。現在用いられている薬剤の約 4 割は何らかの GPCR に作用する化合物であることから、オーファン GPCR は、新たな薬剤標的として非常に注目されている。なお、Gpr137b は元来腎臓の発生に伴い発現が顕著に上昇する遺伝子として同定されたが (Spangenberg, C. *et al.* Genomics 48, 1998)、その機能に関する報告は未だに存在しない。

2. 研究の目的

本申請研究では、先行研究において申請者が破骨細胞特異的に高発現することを見出したオーファン G タンパク質共役受容体 GPR137B に着目し、破骨細胞における機能を分子細胞生物学的に解析することを目的とした。さらに、本研究で破骨細胞前駆細胞として用いた RAW264 はマクロファージ・単球系の細胞であるため、GPR137B の炎症性 (M1) および抗炎症性 (M2) マクロファージへの極性化における役割についても併せて検討した。

3. 研究の方法

本研究では、まず破骨細胞における GPR137B タンパク質の局在を調べた。次に、ゲノム編集技術により作製した GPR137B 遺伝子ノックアウト (Gpr137b-KO) RAW264 細胞を用いて、同遺伝子の破骨細胞の分化やマクロファージ極性化に対する役割について解析した。具体的な実験方法や手順を以下に示す。

GPR137B タンパク質の破骨細胞における局在解析

まず、GPR137B の抗体作製に適したエピトープ部位を予測し、この部位を含むペプチドでウサギを免疫することにより抗 GPR137B ポリクローナル抗体を作製した。本抗体を用いて、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) 刺激により RAW264 細胞から分化誘導した成熟破骨細胞について蛍光免疫染色 (二次抗体: Alexa488 標識抗ウサギ IgG) を実施した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。

GPR137B の破骨細胞分化およびマクロファージ極性化における役割に関する検討

CRISPR/Cas9 系を用いたゲノム編集により RAW264 の Gpr137b-KO 細胞株およびコントロール (WT) 細胞株をそれぞれ 2 株作製した。これらについて、RANKL 存在下で 4 日間培養することにより破骨細胞分化を誘導し、代表的な破骨細胞マーカー遺伝子である Trap、Cathepsin K および Mmp9 の発現を定量的 RT-PCR により解析した。さらに、Cathepsin K と MMP9 についてはウェスタンブロッティングによるタンパク質レベルの発現解析も行った。さらに、同細胞

を liposaccharide (LPS) および interleukin-4 (IL4) 存在下で培養することにより、それぞれ M1 および M2 マクロファージへの極性を誘導した。

GPR137B の破骨細胞における役割の分子機構に関する解析

Gpr137b-KO 細胞およびコントロール細胞について、それぞれ RANKL による破骨細胞分化誘導、さらに IL4 による M2 マクロファージへの極性化誘導を行い、遺伝子発現マイクロアレイ (Affymetrix human Clariom S Array) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。得られた発現データについて遺伝子ネットワーク解析を行い、破骨細胞の分化や骨吸収活性調節において GPR137B が果たす役割について、その分子機構を推定した。

4. 研究成果

GPR137B タンパク質の破骨細胞における局在

免疫染色の結果、RAW264 細胞から分化誘導された成熟破骨細胞における蛍光シグナルが細胞辺縁部に認められた。このことから、GPR137B タンパク質が成熟破骨細胞の細胞膜に局在することが示唆された。一方、核にもシグナルが認められたが、本タンパク質が核にも存在するか否かについては、さらなる検討が必要である。

GPR137B の破骨細胞分化における役割

破骨細胞における GPR137B の機能を解明するため、ゲノム編集により、Gpr137b-KO を施した RAW264 細胞株を作製した。なお、マウスにおいては Gpr137b と 97% の相同性を示す偽遺伝子 Gpr137b-ps が存在するが、得られた Gpr137b-KO 細胞クローンでは Gpr137b 遺伝子の両アリルのみに 188 塩基対の欠損が認められ、Gpr137b-ps 遺伝子は無傷であることが確認された。

次に、Gpr137b-KO RAW264 およびコントロール (WT) 細胞株を RANKL 存在下で培養し、これらの破骨細胞分化能について解析した。その結果、Gpr137b-KO RAW264 細胞では、Trap, Ctsk, Mmp9 といった代表的破骨細胞マーカー遺伝子の発現誘導が顕著に抑制されることが明らかとなった (図 1)。さらに、タンパク質レベルにおいても、Cathepsin K と MMP9 の発現誘導抑制が認められた。このことから、Gpr137b が破骨細胞分化に重要な役割を担う遺伝子であることが示唆された。さらに、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析およびパスウェイ解析の結果、Gpr137b が破骨細胞分化に決定的な役割を果たす nuclear factor kappa-B (NF- κ B) パスウェイの制御に関与することが示唆された。

GPR137B のマクロファージ極性化における役割

Gpr137b は、分化前の RAW264 細胞やマクロファージ前駆細胞 (単球) を含む骨髄細胞においても、他の主要な臓器と比較して顕著に高いレベルで発現していた。そこで、本研究では Gpr137b がマクロファージの機能にも関与している可能性についても追求した。マクロファージは炎症性の M1 と抗炎症性の M2 の 2 種類のサブクラスに大別され、それぞれ RAW264 細胞を LPS と IL4 で処理することにより実験的に誘導することが可能である。Gpr137b-KO およびコントロール (WT) RAW264 細胞を IL4 存在下で培養し、マイクロアレイと qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った結果、代表的な M2 マーカー遺伝子の発現誘導が Gpr137b-KO 細胞で顕著に抑制されていたことから、

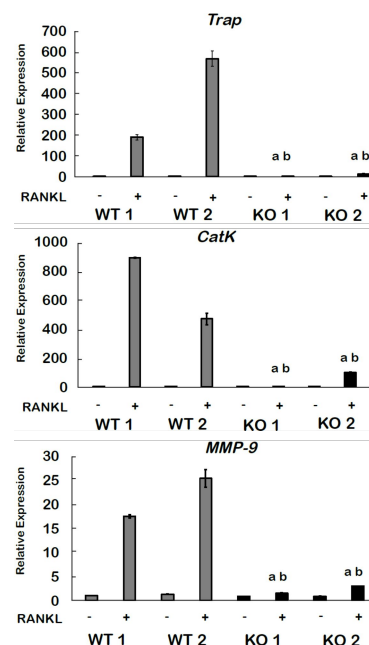


図 1 Gpr137b-KO RAW264 細胞における RANKL 誘導性破骨細胞マーカー発現

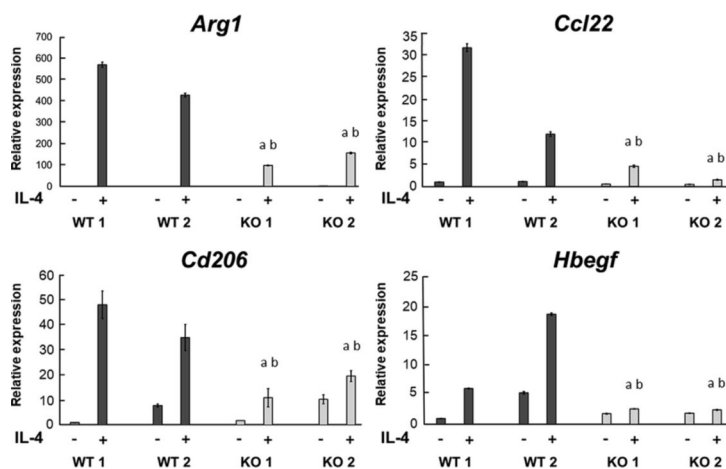


図 2 Gpr137b-KO RAW264 細胞における M2 マーカーの発現

Gpr137b は M2 極性化に関わることが示された (図 2)。一方、qRT-PCR の結果、Gpr137b-KO は LPS 処理による M1 マーカーの誘導に影響を与えず、M1 極性化には関与しないことが明らかとなった (図 3)。

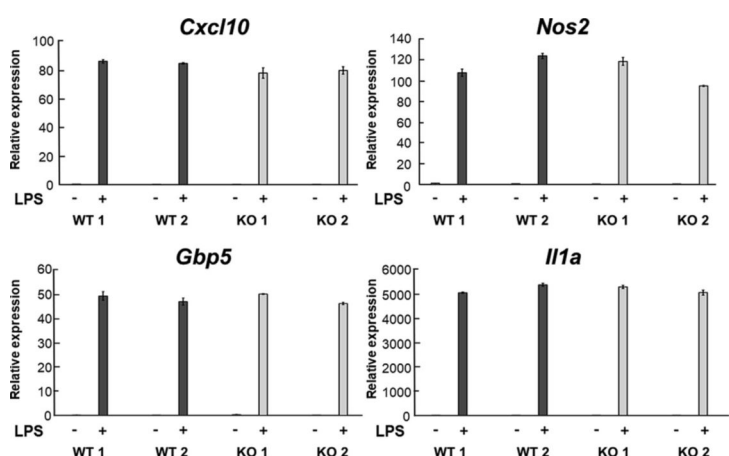


図 3 Gpr137b-KO RAW264 細胞における M1 マーカーの発現

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Islam Z, Inui T, Ishibashi O, Datasets of microarray analysis to identify Gpr137b-dependent interleukin-4-responsive genes in the mouse macrophage cell line RAW264, Data in Brief, 査読有, 103669, 2019
<https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.01.017>

Islam Z, Inui T, Ishibashi O, Gpr137b is an orphan G-protein-coupled receptor associated with M2 macrophage polarization, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, Vol. 509, No. 3, 2019, 657-663
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.140>

〔学会発表〕(計 4 件)

Islam Z, Macrophages Can be an Attractive Targets for Potential Novel Therapies to Treat Gastroenteric diseases, 3rd World Congress on Gastroenterology, April 25–26, 2019, Osaka, Japan

Islam Z, Horikawa A, Inui T, Ishibashi O, Gpr137b is an orphan G-protein-coupled receptor that regulates Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression, 第 41 回日本分子生物学会年会, 11 月 30 日, 2018, 横浜

Islam Z, Horikawa A, Inui T, Ishibashi O, Gpr137b is an orphan G-protein-coupled receptor that regulates M2 macrophage polarization, 第 91 回日本生化学会大会, 9 月 25 日, 2018, 京都

Islam Z, Kotani Y, Akimitsu N, Imamura K, Imamachi N, Suzuki M, Horikawa A, Inui T, Ishibashi O, Functional analysis of an orphan GPCRs, Gpr137b, in osteoclast differentiation. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 12 月 6 日, 2017, 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/biol-macromol/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：乾 隆
ローマ字氏名：INUI, Takashi
所属研究機関名：大阪府立大学
部局名：生命環境科学研究科
職名：教授
研究者番号 (8 桁)：80352912

研究分担者氏名：池亀 美華
ローマ字氏名：IKEGAME, Mika
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯(薬)学総合研究科
職名：准教授
研究者番号 (8 桁)：70282986

(2)連携研究者

連携研究者氏名：目良 恒
ローマ字氏名：MERA, Hisashi
所属研究機関名：新潟大学 (※本課題申請時は武庫川女子大学)
部局名：医歯学総合病院
職名：特任講師
研究者番号 (8 桁)：70650381

(3)研究協力者

研究協力者氏名：吉矢 晋一
ローマ字氏名：YOSHIYA, Shin-ichi

(4)研究協力者

研究協力者氏名：Zohirul Islam
ローマ字氏名：ISLAM, Zohirul

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。