

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2020
課題番号：17K09856
研究課題名（和文）骨代謝バランス調節機構におけるpHセンサーの役割

研究課題名（英文）The role of pH sensors in bone metabolism

研究代表者

茂木 千尋 (Mogi, Chihiro)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：00375528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：骨密度は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の活動の影響を受ける。破骨細胞と骨芽細胞の機能はホルモンなど細胞外の要因に強い影響を受ける。本研究は細胞外のpH（H⁺濃度）も重要な役割を担うと考えて行った。pH受容体ノックアウトマウスの骨髄より分化させた骨芽細胞または破骨細胞を用いて実験を行い、pH受容体OGR1ファミリーが発現することを確認すると共に、pH受容体が破骨細胞と骨芽細胞の一部の機能を調節しうる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化による運動機能障害は現代の日本が抱える大きな問題である。慢性疾患による局所的な炎症などを原因とした細胞外酸性化を感知するpH受容体と骨代謝の関係について検討を行った本研究は、将来的には骨粗しょう症などの治療につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：The bone mineral density is regulated by osteoclastic bone resorption and osteoblastic mineralization. It is well known that extracellular factors like hormones and cytokines alter osteoclasts and osteoblasts functions. It seems that pH (the concentration of hydrogen ions) also play the important role in bone metabolism. Proton-sensing G-protein coupled receptors including OGR1, GPR4, TDAG8 are expressed in bone cells. We used differentiated osteoclasts and osteoblasts from pH-receptor bone marrow (BM) cells, and found some pH-receptors are expressed in BM cells and osteoclasts and osteoblasts. pH-receptors have the potential to modify the function or the differentiation of osteoblasts and osteoclast.

研究分野：骨代謝

キーワード：pH Gタンパク質共役型受容体 骨芽細胞 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役型受容体 (GPCR)、OGR1/GPR68、TDAG8/GPR65、GPR4 は細胞外の pH 7.4-6.0 (H^+ 濃度 40 nM-100 nM) により活性化される pH 受容体である。これら受容体が細胞外の pH (水素イオン: H^+) によってヒスチジン (His) 残基を介して活性化し、細胞内にシグナル伝達する pH 受容体であることが私たちを含む国内外のグループにより明らかになった。その後、私たちのグループでは、マクロファージにおける TDAG8、樹状細胞における OGR1、血管内皮細胞の GPR4 など、内在性に発現する pH 受容体が細胞外の低 pH (酸性化) を感知し機能変化することを報告してきた。これらの結果より OGR1 ファミリーは低 pH 環境をいち早く感知し、免疫、血管、骨など、生体の基本的な機能にも関わるセンサーとして機能していると考えられる。

骨は血中の pH 濃度を保つのに重要な器官であり、古くから酸性化が骨代謝に与える影響が古くから報告されてきた。体液性のアシドーシス、関節リウマチや骨髄腫による微小環境のアシドーシスなど、疾患においてしばしば骨はアシドーシスに曝される。一方で、骨量は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成とのバランスによって調節されるが、酸性条件下では破骨細胞の骨吸収が亢進するとされている。このことより、pH 受容体 OGR1 の発見以降、他の研究グループにおいては培養細胞株での OGR1 過剰発現、siRNA によるノックダウンなどの研究が行われてきたが、細胞外 pH と OGR1 の関与、そして細胞機能における役割を明確に証明した論文はない。

これまでの研究で私たちは pH 受容体 OGR1 のノックアウトマウスの骨密度がやや高く、骨形成と骨吸収共に抑制されていることを見出した。GPR4 および TDAG8 ノックアウトマウスで骨密度に有意な差はない。また細胞レベルでは、骨髄細胞から得た破骨前駆細胞から破骨細胞への分化に伴い OGR1 の顕著な発現上昇がみられ、長骨由来の骨芽細胞には OGR1 発現があることから、骨の機能に関わる pH 受容体は OGR1 であると考えられる。しかしながら、通常飼育下で OGR1 ノックアウトが骨代謝に与える影響は大きくない。私たちは、酸性 pH は TDAG8 を介してマクロファージで炎症性サイトカインを抑制すること、慢性炎症の結果として起こるアレルギー性喘息では OGR1 を介した増悪が起こることなど、局所的に酸性化が起こっていると考えられる炎症において pH 受容体は機能していると考えられる結果を示してきた。これらのことから、pH 受容体の生理的な意義は疾患などの特別な状況において機能するのではないかということも考えられた。

2. 研究の目的

骨量は骨形成と骨吸収のバランスにより調節され、ホルモンなど細胞外の要因に強い影響を受ける。骨代謝バランスにおいて細胞外の pH (H^+ 濃度) もまた重要な役割を担うと考えられる。細胞外の低 pH 環境を感知する G タンパク質共役型受容体 (OGR1、TDAG8、GPR4) は骨芽細胞、破骨細胞に発現している。本研究では新しい治療薬の開発につながることを目標として、pH 受容体ノックアウトマウスを用い、pH 受容体は疾患に伴うアシドーシスや炎症局所の酸性化をいち早く感知するセンサーとして骨代謝調節に関わることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス脛骨を採取し、EDTAにて4週間で2週間、もしくはモルス液で脱灰後に常法によりパラフィン包埋を行い、薄切した骨組織においてOGR1、TDAG8、GPR4および破骨細胞のマーカースとしてカテプシンKの高感度プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにより発現細胞の同定を行った。

(2) 代謝性アシドーシス誘導モデルとして、2%ショ糖を含む4%塩化アンモニウム溶液をマウスに飲用水の代わりに48時間飲ませた。対照群は2%ショ糖液とした。ヘパリン採血を行い、血漿サンプルを得た。

(3) 骨芽細胞および破骨細胞におけるpH受容体機能を明らかにするために、マウスの大腿骨および脛骨から骨髄細胞を無菌的に取り出した。破骨細胞は骨髄細胞をM-CSFで培養した前駆細胞にsRANKLを加えて多核の細胞を誘導した。多核の細胞をTRAP活性染色することにより破骨細胞であることを確認した。この破骨細胞は、骨基質上で培養すると、骨基質を吸収してその吸収面積を測定することにより、骨吸収活性を評価できることを確認した。骨芽細胞は骨髄細胞をグリセロリン酸とアスコルビン酸により培養して、敷石状に広がる細胞を得た。ALP活性染色により、骨芽細胞であることを確認した。この骨芽細胞は長期の培養により細胞外にカルシウムの沈着を起こす機能的な骨芽細胞であった。破骨細胞においては、TRAP活性により破骨細胞分化能の評価、骨基質上での骨吸収活性、破骨細胞の活性シグナルの評価として転写因子NFATc1の核内へのトランスロケーションを観察した。骨芽細胞については、ALP活性により骨芽細胞分化能の評価、ALP陽性CFU-F形成を調べた。また、骨髄細胞を細胞培養液のみにて長期間培養することによりに自発的に分化した骨芽細胞と破骨細胞が共存する、共培養系での評価も行った。

4. 研究成果

(1) 細胞外の低pH環境を感知するGタンパク質共役型受容体ファミリー(OGR1、TDAG8、GPR4)は骨芽細胞、破骨細胞に発現することを、私たちはマウス骨髄からの初代培養細胞を用いてすでに明らかにしている。一方、組織レベルでの解析は進んでいなかった。Gタンパク質共役型受容体は細胞内でシグナルを増幅する受容体であることからmRNA、タンパク質の発現量が低く、またGPCRを正しく認識する抗体はほとんど作製が困難であるからである。また、骨代謝において機能する細胞は、破骨細胞、骨芽細胞のほかに骨細胞がある。骨に埋まった状態の骨細胞は単離培養が難しいため初代培養によるpH受容体発現確認はできず、組織レベルでの解析が必要である。そこで、脱灰後のマウス脛骨組織をパラフィン包埋した薄切切片にて市販の高感度プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。コントロールとして軟組織であるマウス腎臓を用い、腎臓では検出を行うことができた。しかし、目的の脛骨組織切片では、硬骨組織が処理の段階で剥がれてしまい、残った骨髄細胞では発現は見られたものの、骨表面にある骨芽細胞、破骨細胞は骨と共に剥がれてしまった。いくつかの工夫を試みたものの問題を解決できず、マウス脛骨での骨細胞を含めた組織上での発現確認はできなかった。

(2) 短期的なアシドーシスが塩化アンモニウム飲用により起こっているかの評価のためにOGR1ノックアウトマウスおよび野生型マウスの、塩化アンモニウム飲用群と対照群に分けて血漿サンプルを採取した。この条件で静脈血pHが下がることは確認済みである。一方

で、塩化アンモニウム飲用で引き起こされたアシドーシスが骨代謝に影響を与えるにはさらに飲用期間を長くする可能性が考えられたため、十分な数の個体数確保のために解析は今後の課題となった。

(3) マウス骨髄細胞より骨芽細胞、破骨細胞を純粹に培養する系を確立できたので、OGR1 もしくは GPR4 ノックアウトマウスおよび野生型のマウス由来の骨芽細胞を用いて、その機能を比較した。骨髄細胞より骨芽細胞と破骨細胞をそれぞれ分化させることができる分化誘導系は、個体間のばらつきを少なくする上でも有用な培養法に見えたが、個体間のばらつき、実験間のばらつきが大きく、破骨細胞と骨芽細胞の分化や機能に有意な差を見出すことができなかった。特に培養液中の pH の調整については、培養液中の pH を安定させるために添加した HEPES の毒性が骨の細胞には出やすく、塩酸や炭酸水素ナトリウムの添加などにより調節を試みたものの、分化に必要な長期間での安定した細胞外 pH の調整はうまくゆかなかった。また、骨代謝にはエストロジェンの影響も考慮する必要性が考えられた。しかし、共培養系の可能性を示す結果が見られたので、今後は細胞外 pH の影響は短時間にするなどの実験計画の工夫により何らかの結果が出る可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagasaka A, Mogi C, Ono H, Nishi T, Horii Y, Ohba Y, Sato K, Nakaya M, Okajima F, Kurose H.	4. 巻 7
2. 論文標題 The proton-sensing G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) shows cardioprotective effects against myocardial infarction.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 7812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-07573-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Koichi, Mogi Chihiro, Mighell Alan J., Okajima Fumikazu	4. 巻 526
2. 論文標題 A missense mutation of Leu74Pro of OGR1 found in familial amelogenesis imperfecta actually causes the loss of the pH-sensing mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 920 ~ 926
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Koichi, Tobo Ayaka, Mogi Chihiro, Tobo Masayuki, Yamane Nobuhiro, Tosaka Masahiko, Tomura Hideaki, Im Dong-Soon, Okajima Fumikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 The protective role of proton-sensing TDAG8 in the brain injury in a mouse ischemia reperfusion model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74372-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hidekazu Ikeuchi ¹ , Maaya Awata ¹ , Chihiro Mogi ² , Takeshi Shimosato ³
2. 発表標題 1.Effect of the pH-sensitive G protein-associated receptor OGR1 on the intestinal microbiota
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies 2020 Daejeon, Korea (IUMS 2020), Fully Virtual Congress, 16(Mon)-20(Fri) November（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤幸市1、茂木千尋1、Alan J. Mighe12、岡島史和3
2. 発表標題 2. エナメル質形成不全症の家系から発見されたプロトン感知性受容体OGR1変異体Leu74P 口頭発表
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 一般演題 (2020年9/14-16、パシフィコ横浜)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Tsurumaki, Haruka Saito-Aoki, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Takashi Nakakura, Yasuhiko Koga, Masakiyo Yatomi, Makiko Sato, Kunio Dobashi, Fumikazu Okajima and Takeshi Hisada
2. 発表標題 T cell death associated gene 8 mediates MUC5AC expressions in the ovalbumin-induced asthma model.
3. 学会等名 XXIV WORLD CONGRESS OF ASTHMA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学生体調節研究所シグナル伝達グループホームページ https://signal-transduction.imcr.gunma-u.ac.jp/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------