

平成22年 5月10日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790636
 研究課題名（和文） 骨リモデリングにおけるプロトン感知性受容体の役割

研究課題名（英文） The roles of proton-sensing receptors in bone remodeling

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

研究成果の概要（和文）：

骨リモデリングに pH が重要であることは古くから知られているが、その作用機構は不明であった。骨芽細胞および破骨細胞における 4 種の新規プロトン感知性受容体(OGR1、GPR4、TDAG8、G2A)の役割を明らかにするために、ヒト骨芽細胞およびマウス破骨細胞における OGR1 の機能を調べた。また、受容体ノックアウトマウスの骨密度を測定した。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that extracellular pH plays important roles in bone remodeling, but the molecular mechanisms are yet unidentified. To reveal the roles of novel four proton-sensing receptors (OGR1, GPR4, TDAG8, G2A), we investigated the functions of OGR1 in human osteoblasts and murine osteoclasts. Moreover, we examined the bone mineral density in femurs obtained from receptor-knockout mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細胞機能生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：骨芽細胞、破骨細胞、Gタンパク質共役型受容体、プロトン

1. 研究開始当初の背景

(1) OGR1 ファミリー (OGR1 (ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1)、TDAG8 (T-cell death-associated gene 8)、GPR4、G2A) は当初、スフィンゴシルホス

ホリルコリン、サイコシン (ガラクトシルスフィンゴシン) などのリズ脂質分子の受容体として同定された。しかし、Ludwig らの報告 (Nature, 2003) を皮切りに、我々を含む国内外のグループから報告が相次ぎ、OGR1 ファミリー受容体はいずれも、細胞外プロト

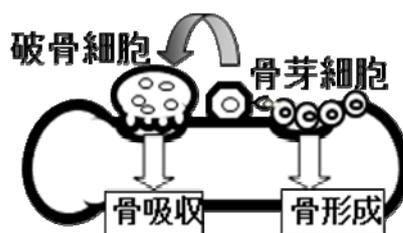
ン (pH) を感知することが明らかとなった。OGR1 受容体、GPR4 受容体はホスホリパーゼ C/カルシウム系、cAMP 系に限らず様々な G タンパク質と共役する多機能性の受容体であり、生理的な pH7.4 で存在する 40nM のプロトン濃度で受容体の一部が既に活性化している。このように、我々のグループを含む国内外の研究は、培養細胞レベルで OGR1 ファミリー受容体が細胞外の pH を感知し、G タンパク質を活性化して細胞内にシグナルを伝える受容体であることを明らかにしてきた。しかし、これまでの研究のほとんどが受容体の過剰発現細胞で行われていることから、今後は生理学的、病態生理学的なプロトン感知性受容体の役割の解明が必要である。

(2) 骨量は絶え間ない骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって調節されている。このバランスが崩れ、例えば、破骨細胞機能が骨芽細胞機能より相対的に強まると骨粗鬆症になり、逆に破骨細胞の機能が減少すると大理石病になる。この骨リモデリングにおいて pH が重要な役割を担っていることは古くから報告されているが、細胞外の pH を感知する分子などについては不明であった。

ごく最近になって、OGR1 が骨芽細胞、破骨細胞に発現していること、OGR1 受容体の発現が破骨細胞の分化に必要であることが培養細胞の実験で報告された。アシドーシスによって破骨細胞が活性化されることも以前報告されており、OGR1 ファミリーが骨リモデリングに果たす役割は興味深い。特に、個体レベルでのプロトン感知性受容体の解析は全く報告されていない。

2. 研究の目的

骨量は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスによって調節されている (図 1)。この骨リモデリングにおいて pH が重要な役割を担っていることは古くから報告されているが、細胞外の pH を感知する分子などについては不明であった。本研究では骨芽細胞と破骨細胞において、プロトン感知性 OGR1 受容体ファミリー受容体が細胞の分化と機能においてどのような役割をしているのか、さらに、細胞内シグナル伝達経路を明らかにしたい。また、個体レベルでのプロトン感知性受容体の解析は全く報告されていない。そこで、培養細胞に加えノックアウトマウス由来の細胞や個体を用いて、プロトン感知性受容体が骨代謝調節に果たす役割の解明を目的とした。



(図 1)

3. 研究の方法

(1) ヒト培養骨芽細胞を用いた解析
ヒト初代培養骨芽細胞 (NHOst) にはプロトン感知性受容体の中で OGR1 が著明に発現している。この細胞では pH を低下すると COX-2 発現、プロスタグランジン E₂ 産生が起こる。そこで OGR1 に対する siRNA を用いこれらの応答に OGR1 が介しているかどうかを調べる。また、この骨芽細胞培養株に対してシグナル伝達系の阻害剤を用いて、細胞外 pH の低下が G タンパク質を介してどのように COX-2 発現を調節しているかを明らかにする。

(2) 破骨細胞分化と機能における役割：
マウス骨髄細胞は M-CSF と RANKL により刺激すると、破骨細胞に分化することが知られている。この分化培養系を用いて、破骨細胞における pH 受容体の役割を調べる。破骨細胞では細胞外 pH 低下と RANKL 添加で NFATc1 の活性化がおこる。破骨細胞の分化と機能において、細胞外 pH の影響を調べる。

(3) 個体レベルの骨密度変化
プロトン感知性受容体ノックアウトマウス長骨を pQCT 骨密度測定装置により、皮質骨と海綿骨それぞれの骨密度を測定する。また、骨の組織学的検討を行い、破骨細胞の数、カルセインラベルによる骨形成の程度など、個体レベルでのプロトン感知性受容体の役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 骨量は骨芽細胞などによる骨形成と破骨細胞などによる骨吸収のバランスによって調節されている。このことより、ヒト初代培養骨芽細胞 (NHOst) を用い、細胞外の pH 低下 (酸性化) が骨芽細胞機能にどのように作用するかを調べた。

- ① ヒト骨芽細胞においては OGR1 が優位に発現していた。
- ② 細胞外 pH を下げると COX-2 発現とプロスタグランジン E₂ 産生が起こった。
- ③ siRNA の導入実験により、この応答は

抑制されることから OGR1 を介した応答であることが確認された。

- ④ シグナル伝達系の各種阻害剤を用いて調べた結果、OGR1 を介した細胞外 pH シグナルについて、ホスホリパーゼ C、プロテインキナーゼ C の関与が示唆された。

しかしながらこの COX-2 発現が骨芽細胞の機能調節にどのように関与しているのかについては十分に明らかではなく、今後の検討課題である。

- (2) プロトン感知性受容体が破骨細胞の機能に直接影響しているかどうかについては骨髄細胞を M-CSF および RANKL による分化誘導系により検討した。

- ① マウス骨髄より骨髄細胞を採取し、M-CSF による二日間の培養後に、M-CSF に加えて RANKL を添加して培養を継続すると、多核の巨大な細胞が現れ、染色により酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 陽性であった。
- ② マウス破骨細胞の分化の進行に伴い OGR1 の mRNA 発現が上昇した。
- ③ この破骨細胞分化培養系を用いて破骨細胞への分化誘導に細胞外 pH への影響を調べた。しかし、細胞外 pH 低下だけでは分化への影響を十分に見ることはできなかった。

骨芽細胞の機能と破骨細胞の機能が RANKL/RANK 系のような相互に調節しあう関係であるため、骨芽細胞と破骨細胞との共培養系などの実験による検討が今後必要であると考えられる。

- (3) プロトン感知性受容体の骨における機能については、培養細胞レベルでの報告はあるが、マウスを用いるなど個体レベルでの研究報告はほとんどない。プロトン感知性受容体ノックアウトマウスを用いて個体レベルでの解析を行った。

- ① プロトン感知性受容体ノックアウトマウスより大腿骨を採取し、骨密度を DEXA および pQCT 骨密度測定装置で測定した。共にノックアウトマウスにおいて骨密度が高い傾向があった。
- ② プロトン感知性受容体ノックアウトマウスの脛骨を採取し、組織学的検討を行った。破骨細胞の機能に差があることが示唆された。

これらの個体レベルでの研究により、プロトン感知性受容体ノックアウトマウスでは骨密度が高く、破骨細胞の機能に影響があることを示唆する結果となったが、個体差が大きく、今後はさらに例数を増やした検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Kimura T, Tomura H, Sato K, Ito M, Matsuoka I, Im DS, Kuwabara A, Mogi C, Itoh H, Kurose H, Murakami M, Okajima F: Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. **J Biol Chem.** 285 4387-97 (2010) 査読有

- ② Malchinkhuu E, Sato K, Maehama T, Ishiuchi S, Yoshimoto Y, Mogi C, Kimura T, Kurose H, Tomura H, and Okajima F: Role of Rap1B and Tumor Suppressor PTEN in the Negative Regulation of Lysophosphatidic Acid-induced Migration by Isoproterenol in Glioma Cells. **Mol Biol Cell.** 20: 5156-65 (2009) 査読有

- ③ § Murata N, § Mogi C, (§ equally contributed) Tobo M, Nakakura T, Sato K, Tomura H, and Okajima F: Inhibition of superoxide anion production by extracellular acidification in neutrophils. **Cell Immunol** 259:21-26 (2009) 査読有

- ④ Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T, Sato T, Kihara Y, Ishii S, Harada A, and Okajima F: Involvement of Proton-Sensing TDAG8 in Extracellular Acidification-Induced Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokine Production In Peritoneal Macrophages. **J Immunol** 182: 3243-3251 (2009) 査読有

- ⑤ Komachi M, Tomura H, Malchinkhuu E, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Kimura T, Kuwabara A, Ohta H, Im DS, Kurose H, Takeyoshi I, Sato K, and Okajima F: LPA1 receptors mediate stimulation, whereas LPA2 receptors mediate inhibition, of migration of pancreatic cancer cells in response to lysophosphatidic acid and malignant ascites. **Carcinogenesis** 30: 457-465 (2009) 査読有

- ⑥ § Kimura T, § Mogi C, (§ equally contributed) Tomura H, Kuwabara A, Im DS, Sato K, Kurose H, Murakami M, and

Okajima F: Induction of Scavenger Receptor Class B Type I is Critical for Simvastatin Enhancement of High-Density Lipoprotein-induced Anti-Inflammatory Actions in Endothelial Cells. **J Immunol** 181: 7332-7340 (2008) 査読有

⑦ Tomura H, Wang JQ, Liu JP, Komachi M, Damirin A, Mogi C, Tobo M, Mochi H, Tamoto K, Im DS, Sato K, and Okajima F. Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in response to acidic pH through OGR1 in a human osteoblastic cell line. **J Bone Miner Res.** 23:1129-1139 (2008) 査読有

[学会発表] (計7件)

①戸村秀明、劉進朋、茂木千尋、小町麻由美、当房雅之、中倉敬、佐藤幸市、岡島史和
ヒト大動脈平滑筋細胞における細胞外プロトン/OGR1 受容体を介したシクロゲナーゼ2の発現のリゾホスファチジン酸による増加
第82回日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸

②戸村秀明、茂木千尋、当房雅之、中倉敬、岡島史和
マウスマクロファージの酸性下での炎症性サイトカインの産生低下におけるTDAG8の関与
日本動物学会第80回大会、2009年9月17日-20日、静岡

③劉進朋、戸村秀明、茂木千尋、小町麻由美、当房雅之、佐藤幸市、岡島史和
ヒト大動脈血管平滑筋細胞のCOX-2発現/プロスタサイクリン産生応答におけるプロトン感知性GPCRとLPA受容体のクロストーク
第51回日本脂質生化学会 2009年7月30-31日、名古屋

④茂木千尋、岡島史和
細胞外プロトンをリガンドとするGタンパク質共役受容体の骨リモデリングにおける役割
第82回日本内分化学会学術総会、2009年4月23-25日、前橋

⑤Chihiro Mogi, Masayuki Tobo, Hideaki Tomura, Naoya Murata, Xiao-dong He, Koichi Sato, Akihiro Harada, and Fumikazu Okajima
Role of TDAG8 in Extracellular Acidification-induced Inhibition of

Pro-inflammatory Cytokine Production in Peritoneal Macrophages

第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9-12日、神戸

⑥戸村秀明、一文字功、石塚全、小町麻由美、当房雅之、佐藤幸市、茂木千尋、森昌朋、岡島史和
細胞外pHの低下はOGR1受容体を介してヒト大動脈平滑筋細胞におけるシクロゲナーゼ2の発現誘導とプロスタサイクリン産生の増加を引き起こす
第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9-12日、神戸

⑦劉進朋、戸村秀明、小町麻由美、当房雅之、佐藤幸市、茂木千尋、岡島史和
細胞外pHの低下はOGR1受容体を介してヒト大動脈平滑筋細胞におけるシクロゲナーゼ2の発現誘導とプロスタサイクリン産生の増加を引き起こす
第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月9-12日、神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/sigtra/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：