

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09880

研究課題名(和文) GABA受容体rho2の破骨細胞分化調節機構の解明とそのアゴニストの臨床応用

研究課題名(英文) Role of GABA receptor rho2 (Gabrr2) and GABA C receptor agonist, TACA, in osteoclast differentiation.

研究代表者

玉村 禎宏 (TAMAMURA, Yoshihiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：70431963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：GABA受容体rho2(Gabrr2)は、Cl⁻-チャンネル型GABAC受容体を構成するサブユニットのひとつであるが、骨関連細胞における機能について報告は無い。本研究ではGabrr2の破骨細胞分化に対する作用をin vitroにおいて検討した。Gabrr2の過剰発現および機能阻害実験、Gabrr2のアゴニストTACAを用いた実験により、Gabrr2は破骨細胞分化を抑制する作用を持つことが判明し、その作用はcalcineurinを介したNfatc1活性の阻害やNFkappaBシグナル伝達の阻害であることが示唆された。以上から、Gabrr2は破骨細胞活性を低下させる治療標的の新たな候補である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年骨形成において、骨吸収を終えた破骨細胞から骨芽細胞へ骨形成開始の指令が出されるとカップリングが注目されている。すなわち、過度の破骨細胞分化抑制は、骨形成抑制につながる可能性があるため、骨芽細胞分化促進と破骨細胞分化抑制の両方の作用を併せ持つ分子が骨粗鬆症の理想的な治療標的と考えられる。本研究では、Gabrr2の破骨細胞抑制作用明らかにし、さらに、Gabrr2の骨骨粗鬆症の髄間質細胞の初期骨芽細胞分化に対する促進作用も明らかにした。これらのことからGabrr2が骨粗鬆症の理想的な治療標的となる可能性が考えられ、本研究は社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gabrr2 is a subunit of GABAC receptor that functions as a chloride ion channel, however its expression and function in osteoclast differentiation are largely unknown. In this study, we examined the expression and function of Gabrr2 in vitro using bone marrow-derived primary osteoclasts. Gabrr2 expression was upregulated in parallel with the expression of osteoclast differentiation marker genes. Retroviral overexpression of Gabrr2 or treatment with its agonist TACA resulted in the reduction of TRAP staining and the decreased expression of TRAP, Nfatc1 and Cathepsin K. In contrast, treatment with shGabrr2 enhanced expression of these genes. Moreover, upregulation of Nfatc1 by shGabrr2 was blunted by the treatment with calcineurin inhibitor FK506. Also, Gabrr2 overexpression resulted in the reduction of phospho-Ikba after TNF treatment. These results indicate that Gabrr2 has an inhibitory role for the osteoclast differentiation by inhibiting calcineurin activity or NFkappaB signaling.

研究分野：骨軟骨代謝

キーワード：GABA受容体rho2 破骨細胞分化 骨芽細胞分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨量は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収によって維持されるが、加齢や閉経の影響で骨芽細胞の活性低下や破骨細胞の活性上昇がおこると骨量低下に至る。従って、骨芽細胞分化の促進もしくは破骨細胞分化の抑制を促す分子の探索が重要である。しかし、骨吸収を終えた破骨細胞から骨芽細胞へ骨形成開始の指令が出されるため、過度の破骨細胞分化抑制は、骨形成抑制につながる可能性がある。すなわち、骨芽細胞分化促進と破骨細胞分化抑制の両方の作用を併せ持つ分子が骨粗鬆症の理想的な治療薬である。

GABA 受容体は、塩化物イオン(Cl⁻)チャンネル型の GABA-A および GABA-C 受容体と G 蛋白質結合型の GABA-B 受容体に分類され、GABA 受容体 rho2 (Gabrr2)は GABA-C 受容体ファミリーに属する。これまでに GABA-B 受容体の骨芽細胞分化に関する報告はあるが、Cl⁻チャンネル型 GABA 受容体の骨組織における役割に関する報告はない。

2. 研究の目的

本研究は、Gabrr2 による破骨細胞分化調節機構の解明とそのアゴニスト TACA の骨粗鬆症治療薬としての応用性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

単球・マクロファージ系前駆細胞を 8 週齢雌マウス骨髄より単離し、破骨細胞分化過程における Gabrr2 の発現を real-time PCR 法により検討する。また、同細胞に retrovirus を用いて、Gabrr2 の過剰発現もしくは Gabrr2 に対する shRNA (shGabrr2)を発現させた後、破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現の検討により Gabrr2 の破骨細胞分化に対する作用を調べる。また、同細胞に GABA-C 受容体アゴニスト TACA (trans-4-Aminocrotonic acid)処理を行い、破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現を検討する。さらに破骨細胞分化に重要な NF-kappaB シグナル伝達経路に対する Gabrr2 の作用をウエスタンブロット法により検討する。また、骨髄間質細胞株 ST-2 に対する Gabrr2 の過剰発現を行い、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現検討により、Gabrr2 の初期骨芽細胞分化に対する作用を検討する。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞分化における Gabrr2 の発現

GABA-A 受容体は、α, β, δ, γなどのサブユニットのうち、2つのα, βとその他のサブユニットによる 5 量体で構成される。一方、GABA-C 受容体は、rho サブユニットのみで構成される 5 量体である。マウス骨髄より単離した前駆細胞を RANKL 刺激により破骨細胞分化させ、培養 5 日後の GABA 受容体サブユニットの発現を調べたところ、α 4, 5, 6, γ 1, および rho2 の発現が検出されたが、βサブユニット発現は検出されなかった(図 1)。このことから、破骨細胞では、GABA 受容体 rho2 サブユニット(Gabrr2)により GABA-C 受容体が形成されると考えられた。そこで本研究では Gabrr2 の破骨細胞分化に対する作用に着目した。また、破骨細胞分化における Gabrr2 の発現を調べたところ、分化と共に発現が上昇した(図 2)。

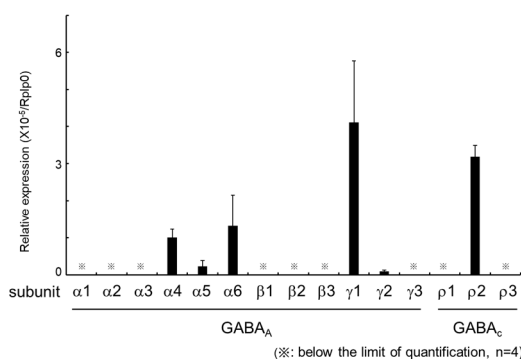


図 1 破骨細胞における GABA-A および GABA-C ファミリー遺伝子の発現

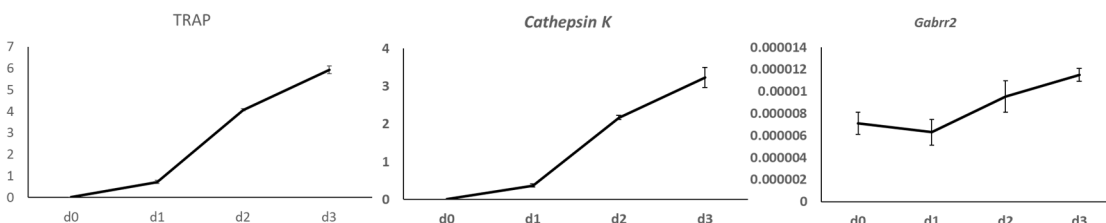


図 2 破骨細胞分化における Gabrr2 の発現

(2) 破骨細胞分化に対する Gabrr2 の作用

骨髄前駆細胞に Gabrr2 を過剰発現させた後、破骨細胞分化させたところ、GFP 発現群と比較して TRAP 染色の低下および破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現低下が認められた(図 3a,

b) 逆に、骨髄前駆細胞に Gabrr2 に対する shRNA (shGabrr2)を発現させ、Gabrr2 の機能阻害を行ったところ、TRAP 染色の亢進および破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現上昇が認められた (図 3c, d)。以上の結果より、Gabrr2 は破骨細胞分化を抑制する作用を持つことが判明した。

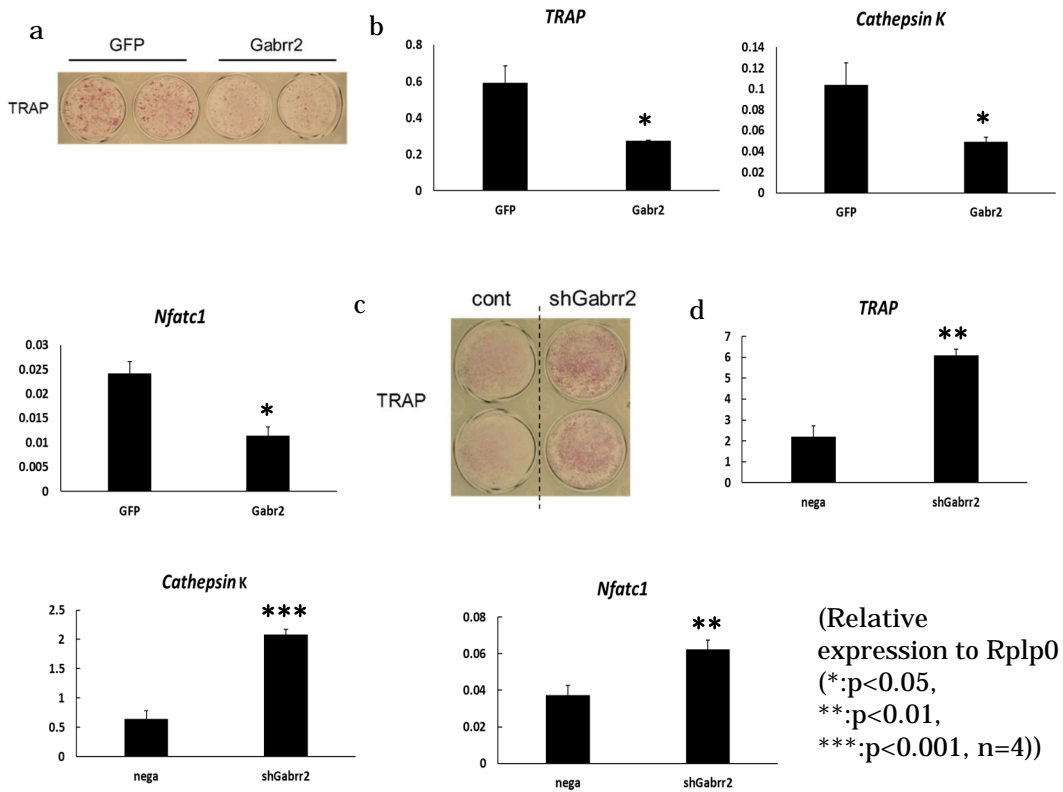


図3 破骨細胞分化に対する Gabrr2 の作用

(3) 破骨細胞分化に対する GABA-C 受容体アゴニスト TACA の作用

骨髄前駆細胞の破骨細胞分化において、TACA 処理したところ、未処理群と比較して濃度依存的に TRAP 染色の低下および破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現低下が認められた (図 4a, b)。また、TACA による抑制作用は shGabrr2 発現によりキャンセルされた (図 4C)。これらの結果より TACA は破骨細胞分化を抑制し、その作用は Gabrr2 を介することが示された。

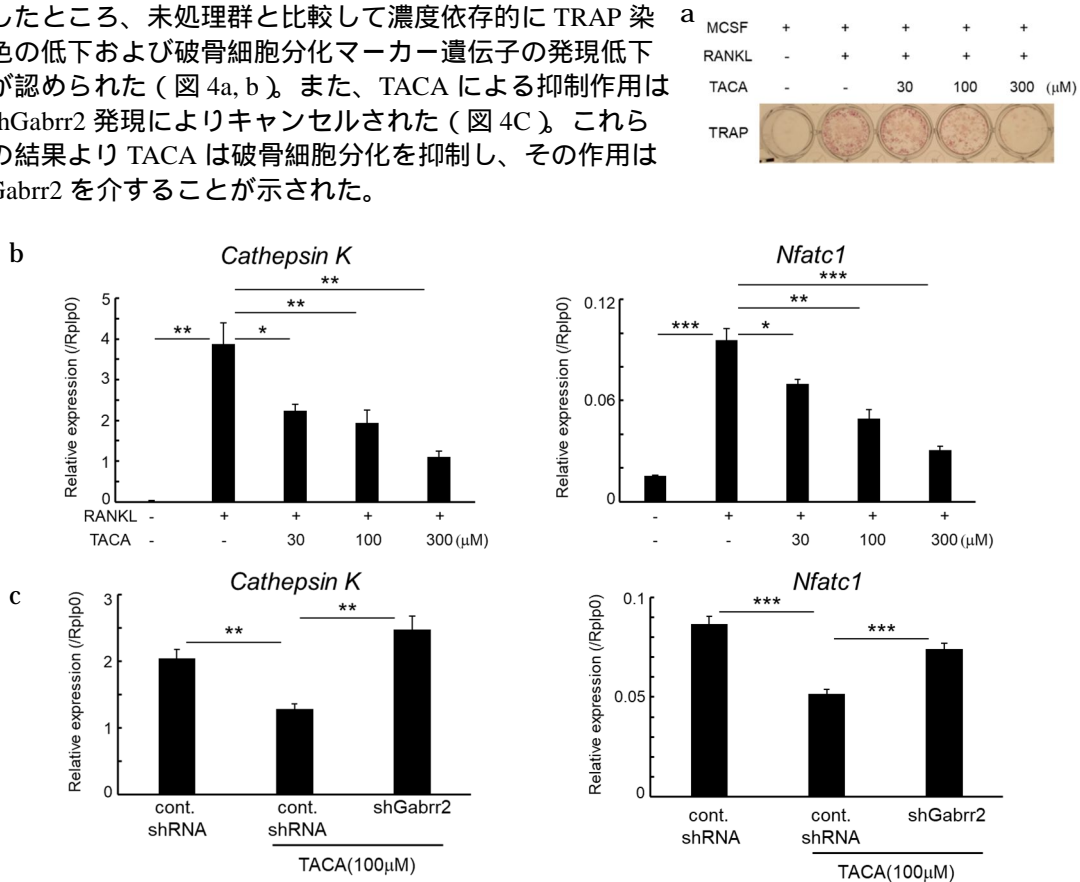


図4 破骨細胞分化に対する GABA-C 受容体リガンド TACA の作用

(4) 破骨細胞分化における calcineurin を介するシグナル伝達に対する Gabrr2 の作用

破骨細胞分化に重要な calcineurin を介するシグナル伝達経路に対する Gabrr2 の作用を調べるために、骨髄前駆細胞に shGabrr2 を発現させた後、calcineurin 阻害薬 FK506 の存在下で破骨細胞分化させた。

その結果、Gabrr2 機能阻害によって発現上昇した Cathepsin K や Nfatc1 発現が FK506 処理によりコントロール発現 (nega) レベルまで低下した (図 5)。この結果より、Gabrr2 は calcineurin を介するシグナル伝達経路の抑制により破骨細胞分化を抑制することが示された。

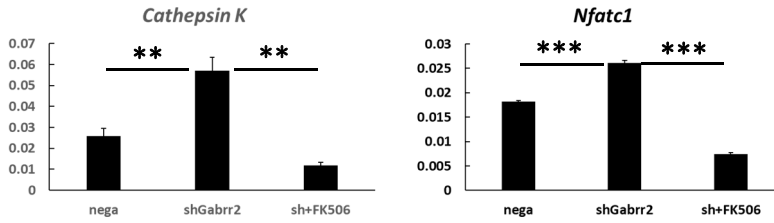


図 5 calcineurin を介するシグナル伝達に対する Gabrr2 の作用

(5) 破骨細胞分化における NF-kappaB シグナル伝達に対する Gabrr2 の作用

破骨細胞分化における NF-kappaB シグナル伝達経路に対する Gabrr2 の作用を調べるために、骨髄前駆細胞に Gabrr2 を発現させた後、TNF α 処理を行い、リン酸化 I κ B α の量をウエスタンブロット法により検討した。その結果、コントロール群で5分後にみられる TNF α 処理による I κ B α のリン酸化が Gabrr2 発現群では顕著に減少した。この結果より、Gabrr2 は NF-kappaB シグナル伝達経路を抑制することが判明した (図 6)。

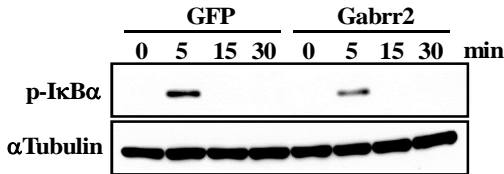


図 6 NF-kappaB シグナル伝達に対する Gabrr2 の作用

(6) 骨髄間質細胞の骨芽細胞分化に対する Gabrr2 の作用

骨髄間質細胞の骨芽細胞分化に対する Gabrr2 の作用を調べるために、骨髄間質細胞株 ST-2 に Gabrr2 もしくは shGabrr2 を発現させた後、骨芽細胞分化誘導を行い、培養 9 日後に ALP 染色および骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、Gabrr2 発現群で ALP 染色が亢進し、骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現が顕著に上昇した (図 7)。逆に shGabrr2 発現により骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現が低下した (図 7)。これらの結果から、Gabrr2 は骨髄間質細胞の骨芽細胞分化を促進する作用を持つことが判明した。

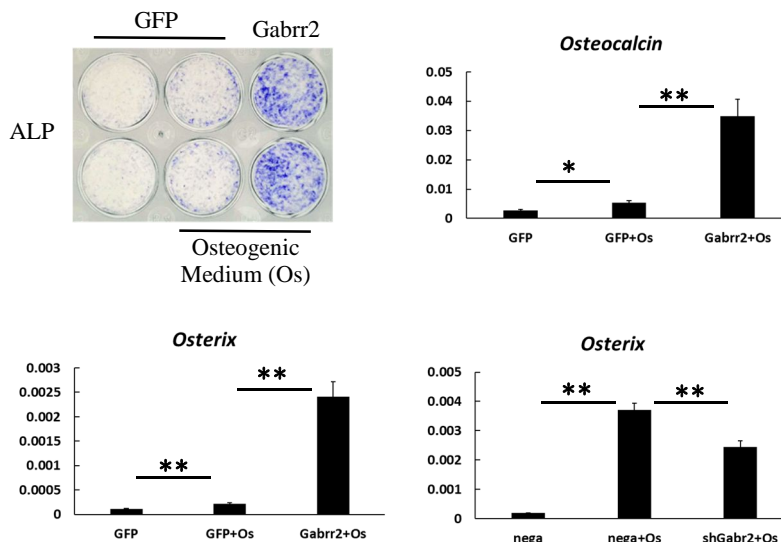


図 7 骨髄間質細胞の骨芽細胞分化に対する Gabrr2 の作用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉村 禎宏、木戸 玲子、下北 英輔、鶴尾 吉宏
2. 発表標題 破骨細胞分化におけるGABA受容体rho2の発現と役割に関して
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	山口 朗 (YAMAGUCHI Akira) (00142430)	東京歯科大学・歯学部・客員教授 (32650)	

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
---------	---------