

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591157

研究課題名（和文）「細胞外 pH をセンスする G 蛋白共役型受容体」を介した骨・関節の代謝調節機構の解析

研究課題名（英文）Role of the G-protein-coupled receptors that sense an extracellular pH in a bone and a joint function

研究代表者

戸村 秀明（TOMURA HIDEAKI）

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：70217553

研究成果の概要（和文）：細胞外 pH の低下は、骨・関節機能に多大な影響を及ぼすことが知られている。関節炎・リウマチなどの炎症部位では細胞外 pH が低下しており、これらの病態の進展に影響を及ぼしていると予想される。本研究では、これら病態の進展に大きな役割を果たすマクロファージの炎症応答に細胞外 pH をセンスする G 蛋白共役型受容体が関与することを示した。この成果は今後、上記病態の進展に対して新たな視点からの知識を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Extracellular acidification has great influence on a bone and a joint function. Extracellular acidification is occurred at the inflammation parts of arthritis and rheumatism and could have influence on the progression of these diseases. The inflammation responses of macrophages play an important role in the progression of these diseases. In this research, we showed that the G-protein-coupled receptors, which sense an extracellular pH, participate in the inflammation responses of macrophages. The result obtained in this research offers a new knowledge to understand the molecular mechanisms of the progression of these diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：シグナル伝達・骨・プロトン・G 蛋白共役型受容体・生理活性

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P)、リゾフォスファチジン酸 (LPA)、

スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC)、リゾフォスファチジルコリン (LPC)、サイコシ

ンなどの生理活性脂質に着目し、研究を進めてきた。生理活性脂質に対する G 蛋白共役型受容体 (GPCR) は、S1P、LPA をリガンドとする Edg 受容体ファミリー (LPA1-4, S1P1-5) と、SPC、LPC、サイコシンをリガンドとする OGR1 受容体ファミリー (OGR1, GPR4, TDAG8, G2A) とに現在、大別されている。これらの生理活性脂質は、各 GPCR に作用後、種々の細胞内情報伝達系を活性化し、生理作用を発揮する。たとえば、ヒト関節リウマチ由来の滑膜細胞では、LPA が LPA1 を介して COX-2 の発現誘導と、関節痛の原因である PGE2 の産生を引き起こすことを最近、我々は明らかにした。しかしながら、Edg 受容体ファミリーのリガンドが LPA、S1P であることは広く認められている一方、OGR1 受容体ファミリーのリガンドが生理活性脂質であることに関しては未だ議論が多いのが現状である。

Ludwig らは、この OGR1 受容体ファミリーの中で OGR1、GPR4 が、Murakami らは G2A が、我々は TDAG8 が、細胞外プロトンも感知し細胞内シグナル系を活性化することを見出した。すなわち OGR1 受容体ファミリーはプロトン感知性 GPCR であることが明らかとなった。また我々は、TDAG8 のアゴニストとして報告されたサイコシンが、プロトン感知性 GPCR に対してアンタゴニストとして作用すること、プロトン感知性 GPCR が多様なシグナル系を活性化すること、ヒト血管平滑筋細胞ではプロトンが OGR1 を介して PGI2 産生を引き起こすことなどを、明らかにしてきた。さらに最近、ヒト骨芽細胞において、プロトンが OGR1 を介して COX-2 の発現誘導と PGE2 の産生増加を引き起こすことを明らかにした。

腎機能低下に伴うアシドーシス時には、骨のミネラルが溶出し骨密度が低下すること。細胞外 pH の低下は、骨芽細胞の骨形成能の

低下と破骨細胞の骨吸収活性の促進を引き起こすこと。また、関節炎・リウマチなど炎症部位では LPA の産生に加え、pH が低下すると予想されることから、上記研究結果をふまえ、本研究では、骨・関節機能におけるプロトン感知性 GPCR の役割に着目した。

2. 研究の目的

プロトン感知性 GPCR は、生体内の中性から弱酸性のわずかな pH 変化を感知し、受容体の活性化、G 蛋白質、細胞内シグナル伝達系へと情報を伝えることができるユニークな受容体ファミリーである。我々は、「プロトン感知性 GPCR が、pH センサーとして機能し、骨・関節機能の制御に関与している」と仮説をたてた。

本研究ではその仮説を検証する第一歩として、OGR1・GPR4・TDAG8 遺伝子欠損マウス個体・細胞を主に用いて、骨・関節機能に対するプロトン感知性 GPCR の役割を解析した。

3. 研究の方法

(1) マウスマクロファージからの炎症性サイトカイン産生に対するプロトン感知性 GPCR の役割の解析: 正常マウスまたはプロトン感知性 GPCR 欠損マウス (OGR1 欠損マウス、TDAG8 欠損マウス) の腹腔より、マクロファージを採取する。得られたマクロファージをリボポリサッカライド (LPS) で刺激後、各種 pH に調節した培養液中で培養し、培養上清中と細胞内に産生された炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-6) を ELISA 法にて定量した。また、TNF α 、IL-6 産生に対する TDAG8 を介した抑制応答に関与するシグナル伝達系を解析するために、cAMP のアナログである dbcAMP や cAMP ホスホジエステラーゼ阻害薬である IBMX の添加実験、アデニル酸シクラーゼを活性化するアゴニスト (プロスタグランジン、 β -アドレナリンアゴニスト) など

の添加実験を行った。またさらに cAMP のシグナル伝達系を解析するため、Gs α に対する siRNA、プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害薬である H89 処理を行った。

(2) プロトン感知性 GPCR 欠損マウスの骨計測：正常マウス、プロトン感知性 GPCR 欠損マウス (OGR1 欠損マウス、GPR4 欠損マウス) 由来の大腿骨の皮質骨、海綿骨の骨密度を、pQCT 骨密度測定装置を用いて測定した。

(3) GPR4 欠損マウスにおける関節炎モデルの作成と解析：C57BL6 系統マウスは関節炎が誘導されにくいため、ほぼ 100% の割合で関節炎の誘導がかかる DBA1 系統へのバッククロスを行った。

つぎにバッククロスを行った正常マウスと GPR4 欠損マウスに、牛タイプ II コラーゲンを投与し、関節炎を誘導した。そして関節部位の観察を行い、GPR4 の関節炎への役割を検討した。

4. 研究成果

マクロファージからの炎症性サイトカインの産生は、骨・関節機能の調節に深く関係し、その破たんは関節炎・リウマチの発症と深くかかわっている。そこでマウスマクロファージを用いて炎症性サイトカイン産生に対するプロトン感知性 GPCR の役割を解析した。マクロファージには TDAG8、OGR1 の発現が観察された。そこで、TDAG8、OGR1 受容体欠損マウス由来のマクロファージを使用して実験を行った。

マウスマクロファージにリポポリサッカライド (LPS) を作用させると炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) 産生が増加した。これら炎症性サイトカインの産生は細胞外 pH の低下に伴い抑制された。この細胞外 pH の低下による炎症性サイトカインの産生抑制応答は、OGR1 欠損マウス由来のマクロファージ

では変化がなかったが、TDAG8 欠損マウス由来のマクロファージでは一部阻害されていた。

TDAG8 を過剰発現させた細胞を用いた、これまでの我々の解析結果により、細胞外 pH の低下は Gs を介し、アデニル酸シクラーゼ/cAMP 系を活性化することが明らかとなっている。そこで、cAMP 誘導体、cAMP ホスホジエステラーゼ阻害薬、アデニル酸シクラーゼを活性化するアゴニスト (プロスタグランジン、 β -アドレナリンアゴニストなど) などで細胞内 cAMP 濃度を上昇させても、炎症性サイトカイン産生が細胞外 pH の低下に伴う産生抑制と同様に、抑制されるかどうかを調べた。その結果、cAMP がこの抑制作用を仲介していることが判明した。そこで次に cAMP 系をより詳細に解析した。Gs α に対する siRNA、プロテインキナーゼ A (PKA) 阻害薬である H89 により抑制作用が阻害された。これらの結果から、細胞外 pH の低下に伴うマクロファージからの炎症性サイトカイン産生の抑制応答は一部 TDAG8/Gs/cAMP/PKA を介しているものと推定された。

次に骨・関節形成やそれらの機能維持にプロトン感知性 GPCR が関与しているのかどうかを調べた。OGR1 欠損マウスの骨密度を測定した。その結果、OGR1 欠損マウスではコントロールマウスと比べ、骨量が高い傾向が観察された。また欠損マウスとコントロールマウス間で雌雄で骨量の差に違いがある傾向が観察された。しかしながら現在までに、有意な差は得られていない。さらに GPR4 欠損マウスの骨計測も行ったが、現在までにコントロールマウスとの間に有意な差は観察されていない。

これらの結果からプロトン感知性 GPCR は骨・関節においてアシドーシスや炎症時など、緊急応答時にその作用を発揮している可能

性が考えられた。そこで、関節炎に対する GPR4 の作用を解析するため、コラーゲン誘導性の関節炎実験を行った。まず、DBA 正常マウスと GPR4 を欠損する DBA マウスを作製した。次にこれらのマウスを用いてコラーゲン誘導性の関節炎実験を行った。その結果、GPR4 欠損マウスと正常マウス間で関節炎の進行度に差が存在するとの予備的な結果を得た。

グルココルチコイドは抗炎症作用を有することが知られているステロイドホルモンである。一方、グルココルチコイドは TDAG8 の発現を誘導することも明らかとなっているが、両者の関係は不明であった。そこでグルココルチコイドの抗炎症作用に TDAG8 が関与しうる可能性を検討した。その結果、TDAG8 が酸性条件下におけるグルココルチコイドの抗炎症作用に関与しうる結果を得た。これらの結果を総合すると、骨、関節の機能に関してプロトン感知性 GPCR は炎症その他、緊急応答時に何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

本研究で得られたこれらの結果は、関節炎・リウマチなどの骨・関節の代謝異常に伴う疾患の治療に対して、新たな視点からの情報を提供する可能性を秘めている。

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 12 件)

1. He, XD., Tobo, M., Mogi, C., Nakakura, T., Komachi, M., Murata, N., Takano, M., Tomura, H., Sato, K. & Okajima, F. Involvement of proton-sensing receptor TDAG8 in the anti-inflammatory actions of dexamethasone in peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 415, 627-631 (2011) 査読有

2. Matsuzaki, S., Ishizuka, T., Yamada, T., Kamide, Y., Hisada, T., Ichimonji, I., Aoki, H., Yatomi, M., Komachi, M., Tsurumaki, H., Ono, A., Koga, Y., Dobashi, K., Mogi, C., Sato, K., Tomura, H., Mori, M. & Okajima, F. Extracellular acidification induces connective tissue growth factor production through proton-sensing receptor OGR1 in human airway smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 413, 499-503 (2011) 査読有
3. Matsuzaki, S., Ishizuka, T., Hisada, T., Aoki, H., Komachi, M., Ichimonji, I., Utsugi, M., Ono, A., Koga, Y., Dobashi, K., Kurose, H., Tomura, H., Mori, M. & Okajima, F. Lysophosphatidic Acid Inhibits CC Chemokine Ligand 5/RANTES Production by Blocking IRF-1-Mediated Gene Transcription in Human Bronchial Epithelial Cells. *J Immunol.* 185, 4863-4872 (2010) 査読有
4. Uchiyama, T., Tomono, S., Utsugii, T., Ohyama, Y., Nakamura, T., Tomura, H., Kawazu, S., Okajima, F. & Kurabayashi, M. Constitutively active heat shock factor 1 enhances glucose-driven insulin secretion. *Metabolism.* 60, 789-798 (2011) 査読有
5. Ichimonji, I., Tomura, H., Mogi, C., Sato, K., Aoki, H., Hisada, T., Dobashi, K., Ishizuka, T., Mori, M. & Okajima, F. Extracellular acidification stimulates IL-6 production and Ca(2+) mobilization through proton-sensing OGR1 receptors in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 299, L567-577 (2010) 査読有

6. Liu, JP., Komachi, M., Tomura, H., Mogi, C., Damirin, A., Tobo, M., Takano, M., Nochi, H., Tamoto, K., Sato, K. & Okajima, F. Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1-dependent and -independent vascular actions to acidic pH in human aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299, H731-742 (2010) 査読有
7. Liu, JP., Nakakura, T., Tomura, H., Tobo, M., Mogi, C., Wang, JQ., He, XD., Takano, M., Damirin, A., Komachi, M., Sato, K. & Okajima, F. Each one of certain histidine residues in G-protein-coupled receptor GPR4 is critical for extracellular proton-induced stimulation of multiple G-protein-signaling pathways. *Pharmacol Res.* 61, 499-505 (2010) 査読有
8. 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, 4387-4397 (2010) 査読有
9. Malchinkhuu, E., Sato, K., Maehama, T., Ishiuchi, S., Yoshimoto, Y., Mogi, C., Kimura, T., Kurose, H., Tomura, H. & Okajima, F. Role of Rap 1B and tumor suppressor PTEN in the negative regulation of lysophosphatidic acid-induced migration by isopreterenol in glioma cells. *M Biol Cell.* 20, 156-165 (2009) 査読有
10. Komachi, M., Damirin, A., Malchinkhuu, E., Mogi, C., Tobo, M., Ohta, H., Sato, K., Tomura, H. & Okajima, F. Signaling pathways involved in DNA synthesis and migration in response to lysophosphatidic acid and low-density lipoprotein in coronary artery smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol.* 50, 178-184 (2009) 査読有
11. Murata, N., Mogi, C., Tobo, M., Nakakura, T., Sato, K., Tomura, H. & Okajima, F. Inhibition of superoxide anion production by extracellular acidification in neutrophils. *Cell Immunol.* 259, 21-26, (2009) 査読有
12. 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. & Okajima, F. Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J Immunol.* 182, 3243-3251, (2009) 査読有
- [学会発表] (計 7 件)
1. 戸村秀明、「酸性ストレスによる血管平滑筋細胞からのプロスタサイクリン産生機構」、第 38 回日本神経内分泌学会、2011 年 11 月 23-26 日、都道府県会館 (東京)
2. 戸村秀明、「低 pH 条件下における血管平滑筋細胞からのプロスタサイクリン産生応答に対するプロトン感知性 GPCR の関与」、第 104 回日本繁殖生物学会、2011 年 9 月 15-17 日、いわて県民情報交流センター・アイーナ (岩手)
3. 戸村秀明、「生理活性物質とシグナル伝達に関する最近の話題」、第 26 回日本下垂体

研究会、2011年8月26-27日、せと
うち児島ホテル（岡山）

4. 戸村 秀明、「Each one of specified histidine residues in GPR4 is important for acidic pH-induced stimulation of multiple signaling pathways」、BMB2010、2010年12月7日、神戸ポートアイランド（兵庫）
5. 戸村 秀明、「プロトンをセンスするGタンパク共役型受容体の情報変換機構と生体機能」、第52回日本脂質生化学会、2010年6月14日、伊香保（群馬）
6. 戸村 秀明、「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」、第80回日本動物学会、2009年9月17-20日、静岡グランドシップ（静岡）
7. 戸村 秀明、「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オキシゲナーゼ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、2009年10月21-24日、神戸ポートアイランド（兵庫）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸村 秀明 (TOMURA HIDEAKI)
明治大学・農学部・准教授
研究者番号：70217553