

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 15日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790844

研究課題名（和文） 骨リモデリングにおけるpH感知性Gタンパク質共役型受容体の役割

研究課題名（英文） The role of proton-sensing G protein coupled receptor 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、受容体ノックアウトマウスの骨密度計測と組織学的検討を行い、骨リモデリングにOGR1ファミリーの関与が示唆された。

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 assessed the bone mineral density and histology in pH-receptor knockout mice. These results suggested the relationship between OGR1 family and bone metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：細胞・組織、シグナル伝達、生理活性、生理学、生体分子、骨代謝

1. 研究開始当初の背景

- (1) 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ている。この骨形成と骨吸収のバランスの崩れ、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。

- (2) 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）などのリゾ脂質分子の受容体として同定された。しかし、LudwigらのOGR1、GPR4での報告を皮切りに、私達はTDAG8が、ShimizuらのグループはG2A、TDAG8が細胞外プロトン（pH）を感知することを報告した。さらに、OGR1、GPR4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pH受容体であり、生理的なpH7.4で存在する40nMのプロトン（H⁺）濃度で受容体の一部が既に活性化している。このように、私達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。

- (3) 最近、OGR1、GPR4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。また、培養細胞レベルではあるが私達も初代骨芽細胞で強く発現するOGR1を介して細胞外pHを低下するとCOX-2発現、プロスタグランジンE₂産生が起り、アシドーシスが骨芽細胞に影響する可能性を示した。

2. 研究の目的

これまでの研究の背景により、骨リモデリングにpH受容体の関与が強く示唆される。骨芽細胞の発現するRANKLは破骨細胞の分化に必須であるなど、骨芽細胞と破骨細胞の機能は密接に関係しており（図1）、双方の機能とpH受容体の関係を明らかにするためにも個体レベルでの詳細な解析が必要である。OGR1欠損マウスでの骨密度と骨形態計測解析により、骨リモデリングに関係していると思われるプロトン感知性受容体の生理的な機能を明らかにすることを目的とした。



図1・RANKL/RANKLを介する骨吸収と骨形成のバランスをpH受容体が調整していることが推測される。

3. 研究の方法

雌性および雄性マウスにおいて、12週齢で骨の評価をし、pH受容体（OGR1）ノックアウトもしくは同腹の野生型を比較した。骨密度測定には右大腿骨を使用し、評価にはDEXA法（二重エネルギーX線吸収測定法）およびpQCT法（末梢骨定量的コンピュータ断層法）を用い、骨塩量および骨密度を測定した。骨形態計測による組織学的な検討には12週齢のpH受容体（OGR1）ノックアウトもしくは同腹の野生型より摘出した脛骨を使用した。骨の摘出4日前と1日前、三日間の間隔を空けてカルセイン（蛍光色素）を皮下投与した。皮下投与したカルセインは骨表面に定着するので、2回分のラベルされた骨の距離を測定することにより骨の形成速度を調べた。また、この脛骨の近位成長板付近を縦断面にて組織評価し、個体レベルでの骨芽細胞と破骨細胞の機能評価を行った（図2）。

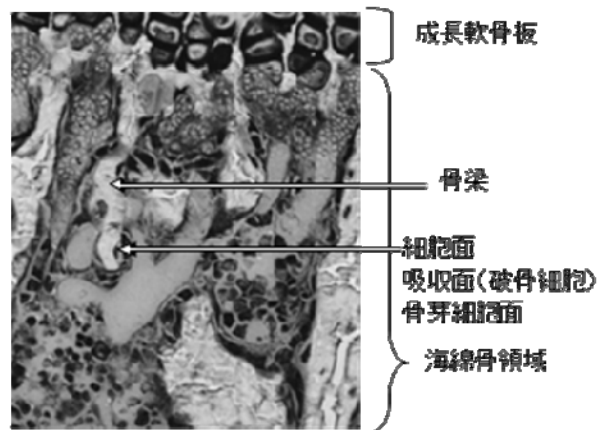


図2・成長板付近の骨芽細胞面と吸収面

4. 研究成果

(1) 骨密度測定

OGR1ノックアウトマウスの雌性および雄性マウスの骨密度をDEXA法およびpQCT骨密度測定装置により測定した。DEXA法による測定では大腿骨遠位の骨密度に差がある傾向が見られた。また、pQCTによる骨密度測定では、野生型マウスと比較して、皮質骨はOGR1ノックアウトの効果は特に観察されないが、海面骨の骨密度はノックアウトマウスで高い傾向が観察された。雌性でノックアウトの効果は顕著であることからエストロゲンなど女性ホルモンとOGR1のクロストークの存在が推定された。今後、この雌雄の差を明らかにするために卵巣摘出マウスを用いた解析、

さらに、細胞レベルでの詳細な解析が必要である。

(2) 骨形態計測による組織学的検討
骨密度の結果を反映して、骨形態計測の結果も単位骨量が雌性の OGR1 ノックアウトマウスで高い傾向が観察された。しかしながらカルセインラベルによる結果は差が見られなかった。骨芽細胞面と吸収面（破骨細胞の機能を反映）については個体差が大きく、さらなる研究が必要であった。

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 Komachi M, Sato K, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Ohta H, Tomura H, Kimura T, Im DS, Yanagida K, Ishii S, Takeyoshi I, Okajima F. Orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. *Cancer Sci.* 査読有. 2012. in press
- ② 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.* 査読有, 2011;415(4):627-31.
- ③ Matsuzaki S, Ishizuka T, Yamada H, 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.* 査読有 2011;413(4):499-503.
- ④ 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.* 査読有, 2010;299(4):L567-77.

⑤ 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.* 査読有, 2010;299(3):H731-42.

⑥ 戸村秀明、茂木千尋、佐藤幸市、岡島史和、細胞外pH環境を感知するプロトン感知性GPCRの機能と作用機構、*日本薬理学雑誌*、2010、査読有、135、240-244

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.* 査読有, 2010; 61(6): sa499-505.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 茂木千尋、青木悠、石塚全、岡島史和、プロトン受容体OGR1 の喘息における役割、*日本薬学会第 132 回年会*、2012 年 3 月 30 日、札幌
- ② 戸村秀明、茂木千尋、当房雅之、佐藤幸市、岡島史和、細胞外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 06 月 14 日、群馬県伊香保

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

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：