

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05954

研究課題名(和文) リガンド非依存的GPCR活性化による破骨細胞の分化・機能制御の機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism underlying osteoclastic differentiation and functional regulation by ligand-independent GPCR activation

研究代表者

石橋 宰 (ISHIBASHI, OSAMU)

大阪公立大学・大学院農学研究科 ・准教授

研究者番号：70293214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、マウス単球系細胞株Raw264から分化させた成熟破骨細胞について、RNA-seq解析を実施し、リガンド未同定のG蛋白質共役受容体であるGPR137Bが破骨細胞選択的に高発現することを明らかにした。そこで、Gpr137b遺伝子を過剰発現させたRaw264細胞株、およびGpr137b遺伝子欠損マウスを製作し、破骨細胞分化におけるGPR137Bの機能解析を行った。その結果、GPR137Bがカルシトニン受容体遺伝子の発現を制御し、カルシトニンの作用調節に関わる可能性が示唆された。しかし、GPR137b遺伝子欠損マウスの骨形態に顕著な異常は認められておらず、さらに詳細な解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのGPCRは約800種類存在し、現在用いられている薬剤の約半数は何らかのGPCRを標的としている。したがって、破骨細胞選択的に発現しているGPR137Bが同細胞の分化や機能に関与していれば、骨粗鬆症治療薬開発のための薬剤標的として非常に魅力的である。本研究の成果として、GPR137Bが破骨細胞に対するカルシトニンの作用調節に関わる可能性が示唆された。しかし、Gpr137b遺伝子ノックアウトマウスの骨形態や破骨細胞の分化・性状を解析したところ、顕著な異常は認められなかった。よって、in vivoでは、より微細な骨構造への影響や、他のGPCRによる機能的代償を受けている可能性等が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The applicants previously performed RNA-seq analysis on mature osteoclasts differentiated from the mouse monocytic cell line Raw264, and found that GPR137B, an orphan G protein-coupled receptor, was highly expressed selectively in osteoclasts. Therefore, we generated Raw264-derived GPR137B-overexpressing cell lines and Gpr137b gene-knockout mice to analyze the function of GPR137B in osteoclast differentiation. Our in vitro analyses revealed that GPR137B could be involved in the action of calcitonin through the regulation of calcitonin receptor expression in osteoclasts. However, the Gpr137b gene knockout mice did not show significant abnormality in bone histology. Therefore, more detailed analyses are ongoing.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：破骨細胞 G蛋白質共役型受容体 ゲノム編集 ノックアウトマウス 骨髄細胞 CRISPR/Cas9 Raw264

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高度高齢化社会において、骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨量減少・骨破壊をもたらす疾患の罹患者は国内だけで1千万人にも上るとされ、その対策は喫緊の課題である。現在、これらの疾患の治療に、破骨細胞（骨吸収を担う細胞）を標的とする種々の骨吸収阻害剤が用いられているが、bisphosphonate 製剤服用中の歯科処置による顎関節壊死に代表されるように、重篤な副作用の問題等から使用が制限される場合も多い。破骨細胞の分化や機能制御に関わる遺伝子や蛋白質を新たに同定し、これらの機能を分子レベルで解明できれば、作用機序が異なる新規骨吸収阻害剤の開発に繋がり、上記問題の解決への糸口となる可能性がある。

これまでに申請者は、マウス単球系細胞株 Raw264 から分化させ単離した成熟破骨細胞について、次世代シーケンシングによる網羅的トランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) を実施し、リガンド未同定の G 蛋白質共役受容体 (GPCR) である GPR137B が破骨細胞選択的に高発現することを明らかにした。GPCR はヒトでは約 800 種類存在し、現在用いられている薬剤の約半数は何かしらの GPCR を標的としている。また、GPCR のうち約 100 種類は、GPR137B と同様にリガンドが同定されていない「オーファン GPCR」である。オーファン GPCR は新たな薬剤開発のための標的分子として、リガンド探索を含めた研究が盛んに行われているが、これまでに、破骨細胞におけるオーファン GPCR に関する研究報告はほとんど存在しない。現在用いられている薬剤の約 4 割は何らかの GPCR に作用する化合物であることから、100 種類以上の存在が知られているリガンド未同定 GPCR (オーファン GPCR) は、新たな薬剤開発のための標的分子として非常に注目されている。

GPR137B に関しては、元来腎臓の発生に伴い発現が顕著に上昇する遺伝子として同定されたが [1]、その生理機能に関する報告は未だに存在しない。そこで、申請者らは Crispr/Cas9 系により GPR137B 遺伝子が欠損した Raw264 細胞クローンを作製、解析した結果、GPR137B が破骨細胞の分化に必須な GPCR であることを明らかにした。さらに、遺伝子発現変化に基づくパスウェイ解析の結果、GPR137B が破骨細胞分化に重要であることが知られている Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) パスウェイを調節していることが示唆された。

一方、Raw264 細胞は、破骨細胞の前駆細胞のみならず、単球・マクロファージ系細胞としての性質も併せ持つ。マクロファージは、主に感染防御に関わる M1 型と、主に組織修復に関わる M2 型に大別される。申請者らは、GPR137B が破骨細胞分化のみならず Interleukin-4 刺激による M2 型マクロファージの誘導に関わる一方、Lipopolysaccharide 刺激による M1 型マクロファージの誘導には関与しないことを明らかにした [2]。

## 2. 研究の目的

本研究では、GPR137B の機能を介した破骨細胞分化制御の詳細について解析する。具体的には、GPR137B を安定的に過剰発現させた前破骨細胞株の破骨細胞分化能について解析する。さらに、GPR137B ノックアウトマウスを作製し、その骨形態を観察すること、および同マウス由来骨髄細胞の破骨細胞分化能について解析することにより、本 GPCR の薬剤開発のための標的分子としての妥当性を評価する。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず GPR137B を安定的に過剰発現させた Raw264 細胞クローン株を作製し、その破骨細胞分化能をコントロール（非過剰発現）細胞株のそれと比較した。次に、ゲノム編集技術により作製した GPR137B 遺伝子ノックアウトマウスの表現型について解析するとともに、その骨髄細胞を用いて、同遺伝子の破骨細胞の分化に対する役割について解析した。具体的な実験方法や手順を以下に示す。

### ① GPR137B 安定的過剰発現 Raw264 細胞株の作製と GPR137B 蛋白質の発現・局在解析

RAW264 細胞を 48 ウェルプレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で一晩インキュベーションを行なった。被感染細胞数の 10 倍量の Myc タグ融合 GPR137B 発現レンチウイルスベクター (ORIGENE) を含む培地にて 20 時間処理した後、新鮮な培地に交換し、さらに一晩培養した。細胞を剥離、回収後、90 mm 径ディッシュに播種し、それぞれ 3.0  $\mu$ g/mL ピューロマイシン (ナカライテスク) 存在下または非存在下で 10 日間培養を行った。ディッシュ上に形成されたウイルス感染細胞のピューロマイシン耐性コロニー、および非感染細胞のコロニーをペニシリンカップによりクロニングし、それぞれをコントロール (CN) 株、および GPR137B 過剰発現 (OE) 株とした。CN 株、および OE 株についてそれぞれ 8 コロニーずつをクロニングに供し、CN1-8 株および OE1-8 株 とした。これらの細胞を継代培養後、細胞抽出液について抗 GPR137B 抗体を用いたウェスタンブロットティングおよび免疫染色を施した。

## ② GPR137B 安定的過剰発現 Raw264 細胞株の破骨細胞分化能に関する解析

上記の CN 株および OE 株を適切な条件にて 24 時間培養した後、50 ng/mL RANKL (オリエンタル酵母) を含む培地 (分化誘導培地) にて計 96 時間分化誘導を行った。その後、これらの細胞の破骨細胞への分化を、破骨細胞のマーカーである酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) の組織化学染色により評価した。また、定法により RNA を抽出後、qRT-PCR による破骨細胞マーカー遺伝子の発現解析を実施した。なお、TRAP 染色は、TRAP/ALP 染色キット (和光純薬) を用いて行い、核数が 3 個以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞として計数した。

## ③ *Gpr137b* 遺伝子ノックアウトマウスの作製と骨組織形態解析

CRISPR/Cas9 法により、*Gpr137b* 遺伝子の第 3 エクソン領域を含む 713 塩基対を欠失させたゲノム編集 C57BL/6J マウスを作製し (筑波大学トランスポーター医学研究センターにて作製)、野生型 (WT) C57BL/6J マウス (日本クレア) と交配させることによりヘテロノックアウト型 (*Gpr137b*<sup>+/-</sup>) マウスを得た。その後、ヘテロノックアウト型 (HET) マウス同士を交配させることによりホモノックアウト型 (KO) マウス (*Gpr137b*<sup>-/-</sup>) を産出した。なお、各個体の遺伝子型の決定は、耳朶または尾部の組織から抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR により行った (図 1)。その際、PCR には KOD FX Neo (東洋紡) およびマウス *Gpr137b* 遺伝子の第 3 エクソン領域を増幅するプライマーを使用した。得られた同腹の新生 WT および KO マウスについて、透明骨格標本作製した。また、同マウスの大腿骨を脱灰後パラフィン包埋組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色と TRAP 染色に供した。

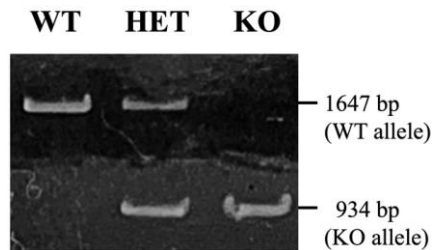


図 1 PCR によるマウス遺伝子型の判定

1647 bp および 934 bp の PCR 産物はそれぞれ WT および *Gpr137b* 遺伝子を欠損した対立遺伝子に由来する。

## 4. 研究成果

### ① *Gpr137b* 安定的過剰発現 Raw264 細胞株の取得と発現解析

上記細胞クローニングにより、*Gpr137b* 過剰発現株とコントロール株をそれぞれ 8 クローンずつ取得した。qRT-PCR の結果、OE 株では CN 株と比較して *Gpr137b* mRNA が顕著に高発現していることが確認された (データ掲載省略)。

次に、CN 株 3 株 (CN-1, -5, -7) と ON 株 3 株 (OE-4, -6, -8) から調整した細胞抽出液について、ウェスタンブロッティングにより GPR137B 蛋白質の発現を調べた。その結果、GPR137B 蛋白質はコントロール株では検出限界以下であったが、OE 株においてはいずれも顕著に高いレベルで発現していることが示された (図 2)。

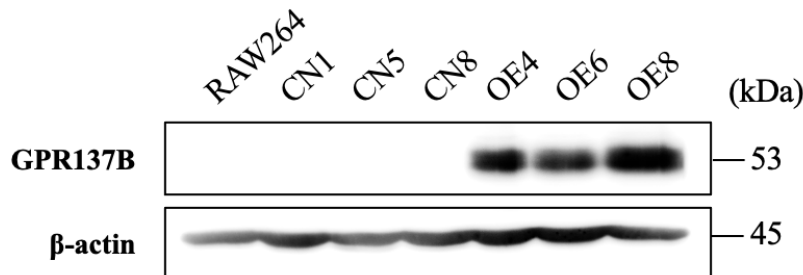


図 2 ウェスタンブロッティングによる GPR137B 蛋白質の発現量評価

$\beta$ -actin を内部標準として使用した。なお、別のウェスタンブロッティング実験にて、CN-2, -4 および OE-3, -5 の発現についても確認している (データ掲載省略)

### ② *Gpr137b* 安定的過剰発現 Raw264 細胞株における GPR137B 蛋白質の局在

各細胞クローンについて、GPR137B、およびその C 末に付加した Myc タグを免疫染色により検出した結果、これらの局在を示す蛍光シグナルの強度が、CN 株と比較して OE 株において顕著に強かったことから、OE 株における GPR137B の過剰発現が確かめられた。また、CN 株における蛍光シグナルは微弱なため、内在性 GPR137B 蛋白質の詳細な局在は不明であるが、OE 株における GPR137B 蛋白質の局在は、リソソームと思われる構造体上に認められた (図 3)。この結果は、Gao らの報告 [3] と整合するものである。

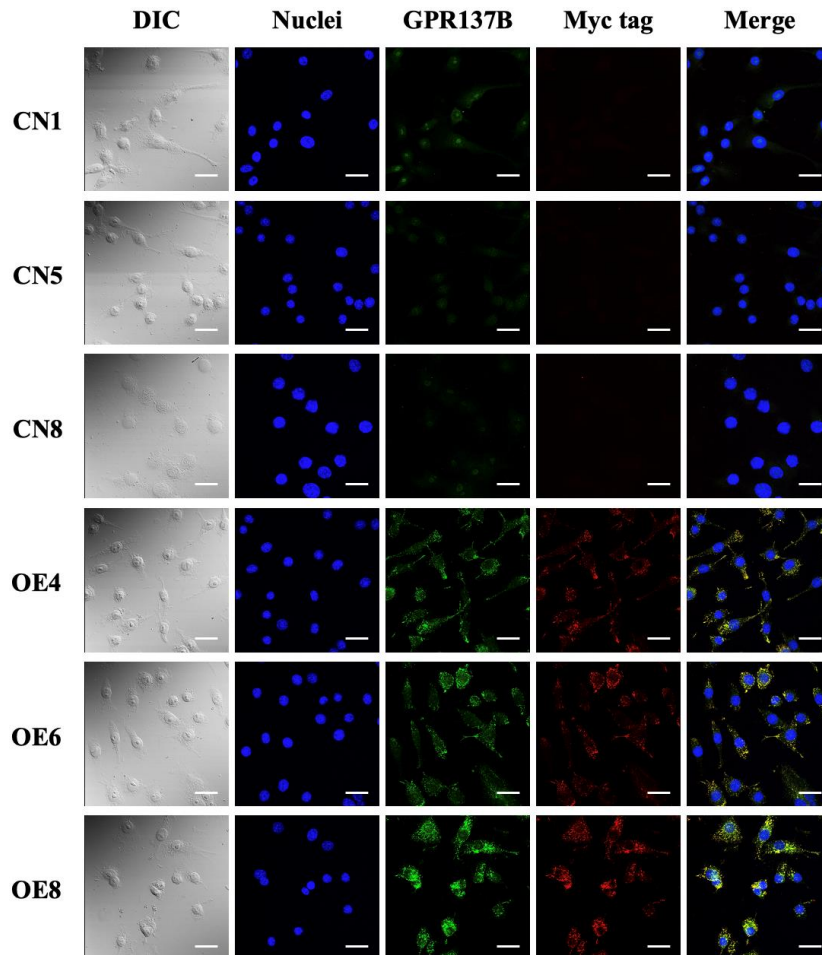


図3 免疫蛍光染色による GPR137B の過剰発現と局在の確認  
DIC は微分干渉像を示す。Myc タグは過剰発現させた GPR137B の C 末端に融合しており、同一の局在を示す。スケールバーは 25  $\mu\text{m}$  を示す。

### ③ *Gpr137b* 安定的過剰発現 Raw264 細胞株の破骨細胞分化能

破骨細胞誘導後の CN 株 5 株 (CN-1, -2, -4, -5, -8) と OE 株 (OE-3, -4, -5, -6, -8) について TRAP 染色を施し、3 核以上の成熟破骨細胞数を計数した結果、OE 株では CN 株と比較して破骨細胞数が有意に減少した (図 4)。また、破骨細胞マーカーである TRAP と CTSK の遺伝子発現について qRT-PCR による解析を行った結果、同様に OE 株において有意に発現が低下した (データ掲載省略)。以上より、GPR137B の過剰発現は破骨細胞分化を抑制することが明らかになった。

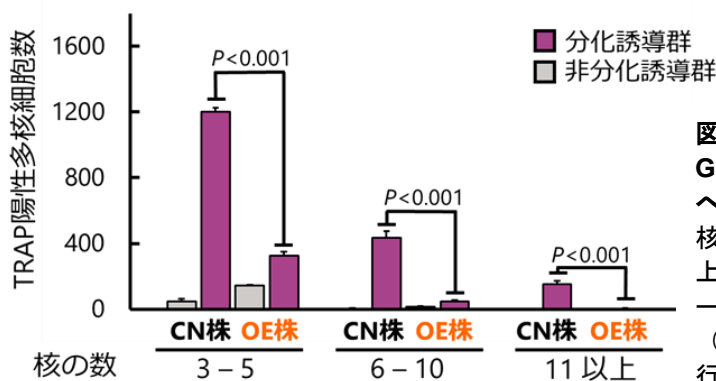
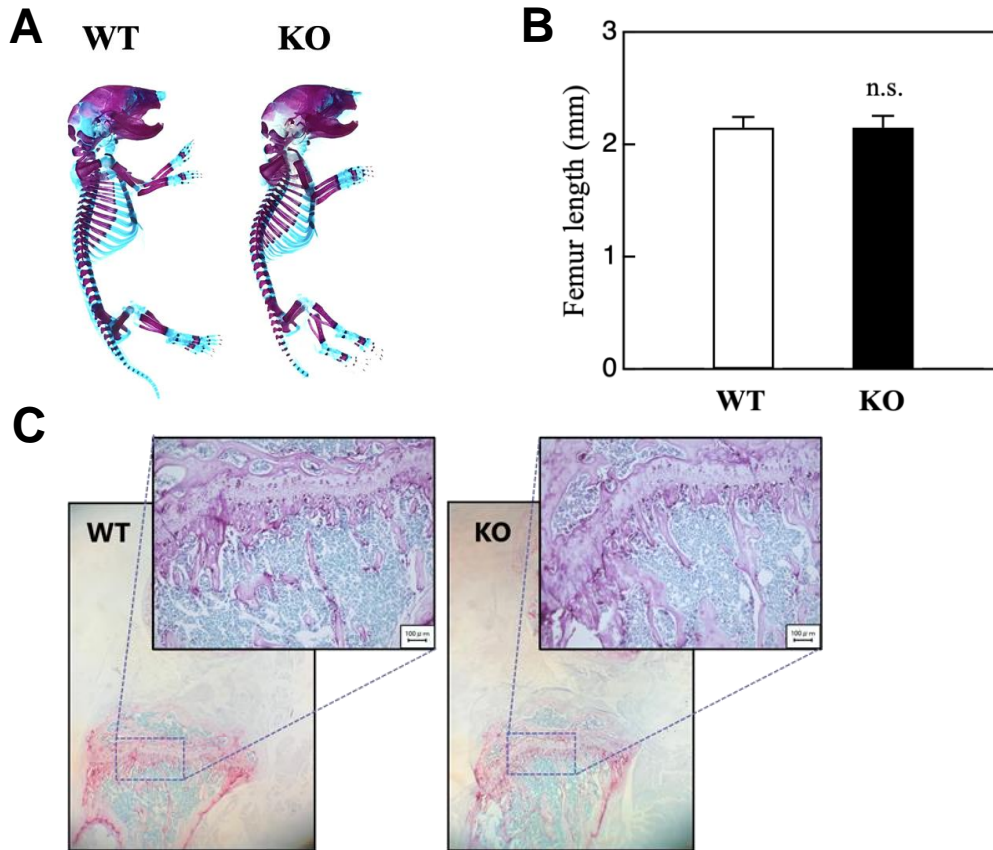


図 4 Raw264 細胞における GPR137B 過剰発現の破骨細胞分化への影響  
核の数が 3-5 個、6-10 個、11 個以上の TRAP 陽性細胞数を示した。データは平均値  $\pm$  標準偏差で表し (n=3)、Student's t-test で検定を行った。

### ④ *Gpr137b* 遺伝子ノックアウトマウスの骨形態

新生 WT および KO マウスの透明骨格標本を比較観察した結果、両者に明らかな差異は認められなかった (図 5A)。さらに、これらの標本から大腿骨を分離し骨長を測定したが、両マウスにおける大腿骨長の有意な差は認められなかった (図 5B)。

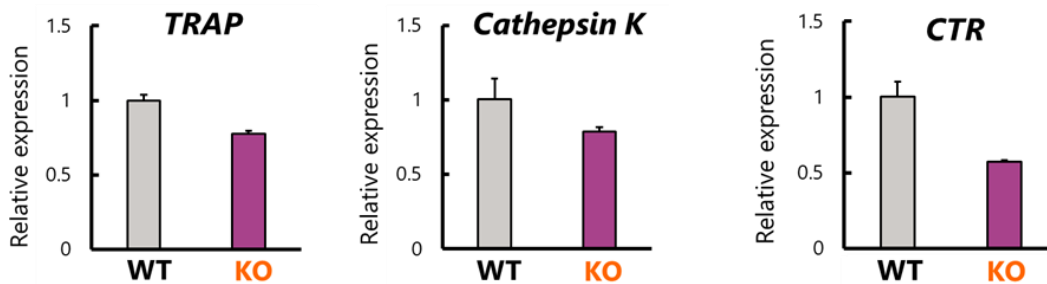
また、大腿骨遠位骨端部組織切片の HE 染色像 (データ掲載省略) および TRAP 染色像 (図 5C) においても、WT マウスと KO マウスとの間に見かけ上の差異は認められなかった。すなわち、パラフィン包埋組織レベルにおいては、*Gpr137b* 遺伝子欠損による骨形態や破骨細胞数への影響は認められなかった。今後、非脱灰骨組織標本を用いた微細形態計測などにより、より詳細な解析を実施する予定である。



**図5 *Gpr137b* 遺伝子ノックアウトマウスの骨形態解析**  
 新生マウスについて解析を行った。(A) 透明骨格標本 (B) 大腿骨骨長。n=8 (WT)、n=7 (KO)。  
 n.s.: not significant (C) 大腿骨組織切片のTRAP染色像。

⑤ *Gpr137b* 遺伝子ノックアウトマウス由来骨髄細胞の破骨細胞分化能

WTおよびKOマウス由来の骨髄細胞について、*in vitro*にて破骨細胞分化誘導を施した後、代表的な破骨細胞マーカー遺伝子 (*RANK*、*TRAP*、および *CTR*) の遺伝子発現量を比較解析した。その結果、*Gpr137b* 遺伝子 KO による *CTR* の顕著な発現低下が示された (図6)。その他のマーカー遺伝子についても低下傾向が認められたが、低下の程度はわずかであった (図6)。以上の結果より、GPR137Bは、カルシトニン受容体の発現制御を介したカルシトニンの作用調節に関わる可能性が考えられる。一方、その破骨細胞分化への関与についてはさらなる解析が必要である。



**図6 マウスの骨髄細胞における破骨細胞マーカーの発現量評価**  
 縦軸は野生型マウスにおける発現量1としたときの各遺伝子の相対発現量である

なお、申請者らは、先行研究の結果 [2] を受け、同じく *Gpr137b* 遺伝子 KO マウスの骨髄細胞を用いたマクロファージ極性化に関する解析も行っており、興味深い知見が得られている。

【参考文献】

1. Spangenberg C, Winterpacht A, Zabel BU, Löbbert RW. Cloning and characterization of a novel gene (TM7SF1) encoding a putative seven-pass transmembrane protein that is upregulated during kidney development. *Genomics*. 1998;48:178-185.
2. Islam Z, Inui T, Ishibashi O. *Gpr137b* is an orphan G-protein-coupled receptor associated with M2 macrophage polarization. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;509:657-663.
3. Gao J, Xia L, Lu M, et al. TM7SF1 (GPR137B): a novel lysosome integral membrane protein. *Mol Biol Rep*. 2012;39:8883-8889.



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ishibashi Osamu, Muljo Stefan A., Islam Zohirul	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of Macrophage Polarization in Allergy by Noncoding RNAs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Non-Coding RNA	6. 最初と最後の頁 75 ~ 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ncrna9060075	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水上 直哉, 高橋 智, 水野 聖哉, 杉山 文博, 乾 隆, 石橋 宰
2. 発表標題 破骨細胞で高発現するGpr137b遺伝子の欠損マウスの作出とその骨形態評価
3. 学会等名 第9回大阪府立大学バイオ・メディカル・フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Islam Zohirul
2. 発表標題 Macrophages Can be an Attractive Targets for Potential Novel Therapies to Treat Gastroenteric diseases
3. 学会等名 Gastroenterology 2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 琉那, 水上 直哉, 高橋 智, 水野 聖哉, 杉山 文博, 乾 隆, 石橋 宰
2. 発表標題 遺伝子欠損マウスを用いた GPR137B の破骨細胞分化に対する寄与の検討
3. 学会等名 Biomedical Forum 2024
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

【謝辞】  
Gpr137b遺伝子ノックアウトマウスの作製に御協力いただきました筑波大学の高橋 智 教授、水野 聖哉 教授、および、杉山 文博 教授に、心より感謝申し上げます。

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	目良 恒  (Mera Hisashi)  (70650381)	新潟大学・医歯学総合病院・特任講師   (13101)	
研究分担者	乾 隆  (Inui Takashi)  (80352912)	大阪公立大学・大学院農学研究科 ・教授   (24405)	

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			
米国	The National Institutes of Health (NIH)			