

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08879

研究課題名（和文）微小環境酸性化がpHセンサー受容体を介して骨代謝と寿命に与える影響

研究課題名（英文）Impact of Microenvironmental Acidification via pH-Sensing Receptors on Bone Metabolism and Lifespan

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

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）：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り調節される。細胞外のプロトン（H⁺）を感知するGタンパク質共役型受容体OGR1/GPR68は骨芽細胞と破骨細胞にも発現していることから、骨代謝を調節していると考えられるものの個体レベルで証明されていない。マウスを用いた研究では、アシドーシスがOGR1を介し骨代謝へ与える影響を調べた。魚類のウロコを器官培養系としてウロコの破骨細胞と骨芽細胞が活性化されるかを調べた。魚類からの採血法の確立により実際にサカナの組織および血漿サンプルを用いてステロイドホルモンの測定を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会において運動機能障害は現代の日本が抱える大きな問題である。その要因として加齢による骨密度の低下と筋肉の減少（サルコペニア）は解決すべき課題である。による局所的な炎症などを原因とした細胞外酸性化を感知するpH受容体と骨代謝の関係、また加齢により減少する筋肉に関する本研究の成果はこれらの問題の解決方法の基礎的な知見を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：The bone mineral density is regulated by osteoclastic bone resorption and osteoblastic mineralization. It is well known that extracellular factors like hormones and cytokines alter osteoclast's and osteoblast's function, but it isn't known how extracellular pH (the concentration of hydrogen ions) affect to the bone mineral metabolism. Proton-sensing G-protein coupled receptors including OGR1, GPR4, TDAG8, are expressed in bone cells. This study aimed to clarify how these pH receptors regulate the balance of bone resorption and mineralization and lifespan in whole-body level using mice and fish.

研究分野：骨代謝学

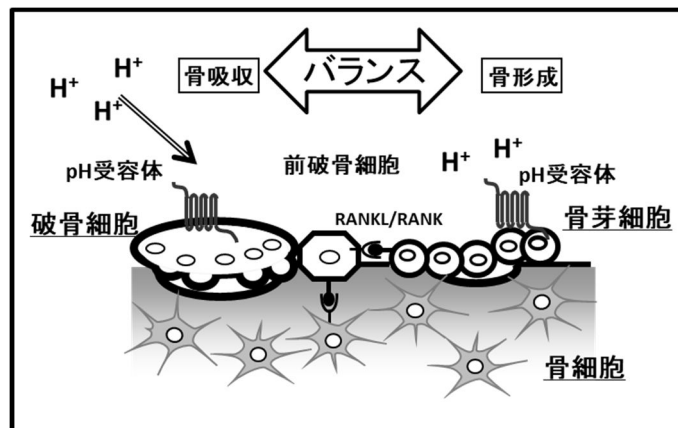
キーワード：pH Gタンパク質共役型受容体 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

タンパク質共役型受容体 (GPCR) である OGR1/GPR68、TDAG8/GPR65、GPR4 は細胞外の pH 7.4-6.0 (H^+ 濃度 40 nM-100 nM) により活性化される pH 受容体である。味覚、痛覚における TRPV1、ASICs が pH4-6 に応答するのに対し、pH 受容体 OGR1 ファミリーは中性に近い pH 6-8 を感知する (図 1)。Ludwig らの OGR1、GPR4 での報告 (Nature, 2003) とほぼ同時期に我々のグループも細胞外のプロトン (水素イオン: H^+) が TDAG8 のヒスチジン残基を介して受容体を活性化し、cAMP 経路にシグナル伝達することを報告した (Wang, Mogi (21人中3番目) et al. J Biol Chem. 2004)。共役する G タンパク質によって細胞内シグナルは異なるものの、pH 受容体は血管平滑筋、血管内皮細胞、好中球、マクロファージ、樹状細胞、膵臓など生体内の様々な細胞に発現している。一方で 2003 年に Ludwig らの論文中で破骨細胞と骨芽細胞で OGR1 が発現していることが示されたにもかかわらず、OGR1 を介して低 pH を感知し個体の骨代謝が変化することを明らかにした論文はない。

体液は pH 7.4-7.35 (H^+ 濃度は 35-40 nM) の狭い範囲に厳密に維持されている。骨は体液の pH 濃度を保つための緩衝器官として重要であり、骨芽細胞もしくは破骨細胞において OGR1 が酸性化を感知して骨吸収シグナルを促進すると考えられる (図 2)。siRNA を用いた別のグループによる研究では単球細胞株から分化誘導した破骨細胞機能の亢進が報告されている (Yang et al, J. Biol.

Chem, 2006)。これらのことから pH 受容体は骨芽細胞と破骨細胞は疾患によるアシドーシスや、炎症局所細胞の解糖系亢進による酸性化などの微小環境の酸性化をいち早く感知するセンサーの役割をしているのではないかと考えられるが証明に至っていない (図)。



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り調節され、そのバランスはホルモンなどの細胞外の要因に強い影響を受ける。細胞外のプロトン (H^+) により活性化される G タンパク質共役型受容体 OGR1/GPR68 は骨芽細胞と破骨細胞にも発現していることから、OGR1 は低 pH 環境を感知するセンサーとして骨代謝を調節してい

ると考えられる。味覚、痛覚における TRPV1、ASICs が pH4-6 に応答するのに対し、OGR1/GPR68 は細胞外のプロトンにより活性化される受容体で、OGR1 ファミリーは中性に近い pH 6-8 を感知する。このことより、より生理的な条件に応答していると考えられるが、局所での pH への応答などを調べることは技術的に難しい。そこで、本研究は OGR1 ファミリー受容体を KO されたマウスにアシドーシスを誘導し、アシドーシスが pH 受容体を介して骨密度骨代謝へ与える影響を調べる。さらに魚類のウロコには破骨細胞と骨芽細胞が並んでいることに着目し、新たな器官培養システムとして評価することとした。

3. 研究の方法

マウスを用いた実験

マウス個体を用いた実験：OGR1 ノックアウトマウス個体に塩化アンモニウム (NH_4Cl) を飲水に混ぜて飲ませることによりアシドーシスを誘導し、アシドーシスにより破骨細胞が活性化して骨吸収が進む程度を見ることにより、破骨細胞活性に pH 受容体が関与しているかを調べた。塩化アンモニウムを飲ませた後に採血をして血中の骨吸収マーカーを測定した。同じマウスから尿も回収して同様に ELISA により骨吸収マーカーを測定した。また、大腿骨と脛骨も採取し、血中の骨代謝マーカーに差が出たときに測定するために保存した。塩化アンモニウムには苦みがありマウスが飲水しなくなることを想定し、ショ糖を混ぜてあるので、対照群はショ糖のみを飲水に混ぜたものを飲用させたマウスとした。

マウス由来の細胞を用いた実験：マウスから摘出した大腿骨および脛骨をより骨髓を採取する。採取した骨髓細胞に M-CSF 20ng/mL を添加し 2 日後に M-CSF 20ng/mL, sRANKL50ng/mL を添加して破骨細胞へ分化させる。分化の程度を TRAP (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ)、ALP (アルカリホスファターゼ) の染色により評価した。

ゼブラフィッシュを用いた実験

サカナウロコ器官培養：ゼブラフィッシュのウロコを用いて骨代謝評価系を開発した。ウロコを入れた培養液の pH を一過性もしくは長期的に低下させて骨代謝酵素マーカーである TRAP (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ)、ALP (アルカリホスファターゼ) の染色により骨吸収の促進もしくは骨形成の促進を評価した。骨代謝酵素活性染色は抗体を使わないのでマウスでもサカナでも共通して利用できる評価手法である。

ターコイズキリフィッシュを用いた実験

高効率ノックアウトキリフィッシュ作製：CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子編集の際に、標的遺伝子に対し 3 種類のガイド RNA を用いることにより効率よく標的遺伝子をノックアウトした個体を作成する方法を開発した。

魚類血中ステロイドホルモン測定法の開発：ターコイズキリフィッシュの生理学的な解析を行う際、マウスでは当たり前に行われている、血液中のホルモン測定技術の確立を目指した。ゼブラフィッシュの採血方法を参考にして、経皮吸収によるトリカイン麻酔したサカナの脊椎に沿って先を細くしたガラスキャピラリーを刺して繰り返し採血できた。この血液の血漿からステロイドホルモンを測定するために、島津 LCMS-8050 による質量分析により種々の条件を検討した。標準品として、魚の主なアンドロゲンである 11-ケトテストステロン (11-Ketotestosterone)、テストステロン (Testosterone)、エストロゲンである -エストラジオール (-Estradiol)、ヒドロコルチゾン (Hydrocortisone) を用いた。

4. 研究成果

マウスを用いた実験

マウス個体を用いた実験：OGR1 ノックアウトマウス個体に塩化アンモニウム (NH_4Cl) を飲水に混ぜて飲ませることによりアシドーシスを誘導した後に採決をして血中の骨代謝マーカーを測定した。また、大腿骨と脛骨も採取し、血中の骨代謝マーカーに差が出たときに測定するために保存した。塩化アンモニウムには苦みがありマウスが飲水しなくなることを想定し、ショ糖を混ぜてあるので、対照群はショ糖のみを飲水に混ぜたものを飲用させたマウスとした。血中と尿中の骨吸収マーカー (I型コラーゲン架橋 C 末端テロペプチド (CTX-I)) と、血中の骨吸収マーカー (破骨細胞由来 TRAP5b 活性) を測定した。

マウス由来の細胞を用いた実験：マウスから摘出した大腿骨および脛骨をより骨髄を採取し、骨髄細胞に M-CSF 20ng/mL を添加し 2 日後に M-CSF 20ng/mL, sRANKL50ng/mL を添加して破骨細胞へ分化させる。分化の程度を TRAP (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ)、ALP (アルカリホスファターゼ) の染色により評価した。結果は安定せず、pH を細胞の活性に影響なく安定的に保つ方法の開発が必要であるという結果となった。

ゼブラフィッシュを用いた実験

サカナウロコの器官培養：ゼブラフィッシュのウロコを用いて骨代謝評価系を開発した。ウロコを入れた培養液の pH を一過性もしくは長期的に低下させて骨代謝酵素マーカーである TRAP (酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ)、ALP (アルカリホスファターゼ) の染色により骨吸収の促進もしくは骨形成の促進を評価した。骨代謝酵素活性染色は抗体を使わないのでマウスでもサカナでも共通して利用できる評価手法である。ゼブラフィッシュのウロコは、古いウロコを取り除くことにより再生される。再生されたウロコでは古いウロコよりも破骨細胞の活性が高いことを明らかにした。pH 低下によって OGR1KO ゼブラフィッシュ由来のウロコと WT 由来のウロコに想定された有意な差は認められず、さらなる工夫が必要なが示された。

ゼブラフィッシュ組織解析：細胞老化により前がん状態となった細胞に追加の変異が入る

と細胞塊が形成され、そこには SASP (Senescence-associated secretory phenotype) によって誘導された単球などが浸潤していることを明らかにした。

ターコイズキリフィッシュを用いた実験

高効率ノックアウトキリフィッシュ作製：CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子編集の際に、標的遺伝子に対し3種類のガイドRNAを用いることにより効率よく標的遺伝子をノックアウトした個体を作成する方法を開発した。この方法だとノックアウトフィッシュ作製の際に行うバッククロスなどの時間を短縮できるという点でも優れている方法であった。

魚類血中ステロイドホルモン測定法の開発：ターコイズキリフィッシュの生理学的な解析を行う際、マウスでは当たり前に行われている、血液中のホルモン測定技術の確立を目指した。ゼブラフィッシュの採血方法を参考にして、経皮吸収によるトリカイン麻酔したサカナの脊椎に沿って先を細くしたガラスキャピラリーを刺して繰り返し採血できた。この血液の血漿からステロイドホルモンを測定するために、島津 LCMS-8050 による質量分析により種々の条件を検討した。標準品として、魚の主なアンドロゲンである 11-ケトテストステロン (11-Ketotestosterone)、テストステロン (Testosterone)、エストロゲンである -エストラジオール (-Estradiol)、ヒドロコルチゾン (Hydrocortisone) を用いた。測定方法の性質上、-エストラジオールの値は低く出る結果となった。そのため検体をダンシル化することにより高感度で測定でき、少量の血液でも -エストラジオールの増減を評価できるようになった。ステロイドホルモンは、タンパク質と違って哺乳類、魚類でも共通の構造をしているため動物種を超えて有効な評価パラメーターである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Abe Kota, Ino Hikaru, Niwa Tomomi, Semmy Daniel, Takauchi Ayami, Nishimura Takashi, Mogi Chihiro, Uenaka Maki, Ishii Masaru, Tanaka Kaori, Ohkawa Yasuyuki, Ishitani Tohru	4. 巻 10
2. 論文標題 Sex-dependent regulation of vertebrate somatic growth and aging by germ cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadi1621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adi1621	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 -
1. 著者名 Oginuma Masayuki, Nishida Moana, Ohmura-Adachi Tomomi, Abe Kota, Ogamino Shohei, Mogi Chihiro, Matsui Hideaki, Ishitani Tohru	4. 巻 12
2. 論文標題 Rapid reverse genetics systems for <i>Nothobranchius furzeri</i> , a suitable model organism to study vertebrate aging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-15972-3	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 -
1. 著者名 Haraoka Yukinari, Akieda Yuki, Nagai Yuri, Mogi Chihiro, Ishitani Tohru	4. 巻 13
2. 論文標題 Zebrafish imaging reveals TP53 mutation switching oncogene-induced senescence from suppressor to driver in primary tumorigenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29061-6	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 -
1. 著者名 Sato K, Tobo A, Mogi C, Tobo M, Yamane N, Tosaka M, Tomura H, Im DS, Okajima F.	4. 巻 10
2. 論文標題 The protective role of proton-sensing TDAG8 in the brain injury in a mouse ischemia reperfusion model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74372-7.	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

1. 著者名 Murakami S, Mochimaru Y, Musha S, Kojima R, Deai M, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H.	4. 巻 37
2. 論文標題 Species-Dependent Enhancement of Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1 Activation by Ogerin.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoolog Sci.	6. 最初と最後の頁 103-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs190106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Mogi C, Mighell AJ, Okajima F.	4. 巻 526
2. 論文標題 A missense mutation of Leu74Pro of OGR1 found in familial amelogenesis imperfecta actually causes the loss of the pH-sensing mechanism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 920-926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.04.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Musha S, Yoshida S, Murakami S, Kojima R, Deai M, Saso N, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H.	4. 巻 66
2. 論文標題 Involvement of GPR4 in increased growth hormone and prolactin expressions by extracellular acidification in MtT/S cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 175-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2019-159.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 阿部 耕太、小神野 翔平、茂木 千尋、荻沼 政之、前野 哲輝、石谷太	4. 巻 52
2. 論文標題 ターコイズキリフィッシュ : 新たな個体老化モデル	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 23-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大継美来、茂木千尋、戸村秀明
2. 発表標題 高血清と酸性条件下におけるRAW267.4細胞の応答変化とプロトン感知性GPCR
3. 学会等名 日本動物学会 第94回大会 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hidekazu Ikeuchi, Maaya Awata, Chihiro Mogi, Takeshi Shimosato
2. 発表標題 1.Effect of the pH-sensitive G protein-associated receptor OGR1 on the intestinal microbiota
3. 学会等名 International Union of Microbiological Societies 2020 Daejeon, Korea (IUMS 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤幸市、茂木千尋、Alan J. Mighell、岡島史和
2. 発表標題 2. エナメル質形成不全症の家系から発見されたプロトン感知性受容体OGR1変異体Leu74P
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 茂木千尋（共著）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典（末光隆志総編集）	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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