

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21069

研究課題名（和文）骨の生理的・病的酸性化がもたらす骨代謝の変化における骨細胞の役割の解明

研究課題名（英文）Extracellular pH regulates bone turnover regulation by osteocytes

研究代表者

天田 かおり（AMADA, KAORI）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90966186

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、骨細胞による骨代謝制御に細胞外酸性化が与える影響を分子レベルで明らかにすることで、細胞外酸性化が骨代謝にどのような影響を与えるかを解明することを目的としている。我々は、骨細胞によるスクレロスチンとOPGの発現・分泌が細胞外酸性化で促進されることを発見した。骨細胞の細胞外酸性化受容機構の解明に関して、細胞外酸性化の受容体としてGPR68/OGR1の可能性が高いと考えられるため、GPR68/OGR1を遮断することで骨代謝制御を行うことができるのではないかと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨細胞を酸性下に培養することで骨形成を抑制するスクレロスチンの発現が増加することが発見された。骨細胞の細胞外酸性化の受容体として、GPR68/OGR1の可能性が高いことが示唆されている。酸性環境下での骨代謝回転の制御を理解することは、がんの骨転移をはじめとする病的酸性化を生じる骨疾患に対する治療に有用な情報をもたらすことが期待され、臨床的意義は非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify how extracellular acidification affects bone metabolism by clarifying the effect of extracellular acidification on bone metabolism control by bone cells at the molecular level. We found that the expression and secretion of sclerostin and OPG by bone cells is promoted by extracellular acidification. Regarding the elucidation of the mechanism of extracellular acidification reception in bone cells, it is highly likely that GPR68/OGR1 is a receptor for extracellular acidification, and therefore it is thought that bone metabolism can be controlled by blocking GPR68/OGR1.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 骨代謝 細胞外酸性化 骨のリモデリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨細胞の機能の解明は重要である

破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返す、骨のリモデリングにより骨は形と強度を維持している。一方、骨細胞は骨基質 1mm³ あたり数万個存在すると言われている。骨を構成する細胞の 90%を占め、骨では最も数が多い細胞である。近年、骨細胞の機能が次第に明らかになってきた。骨細胞は破骨細胞分化を誘導する RANKL を細胞膜上に発現する一方で、破骨細胞を抑制するオステオプロテグリン (OPG) を分泌する。また、骨芽細胞分化を抑制するスクレロスチンを分泌する。このように骨細胞は骨のリモデリングに重要な役割を担っている。

(2) 酸性環境への暴露による骨代謝回転への影響を解明することは重要である

生体内にはさまざまな要因で酸性状態が起こり得る。例えば、炎症やがん細胞の Warburg 効果による乳酸産生亢進などの病的酸性化、破骨細胞によるプロトン放出による生理的な酸性化などがあげられる。現在、悪性腫瘍の骨転移は非常に大きな問題となっている。報告者は、臨床現場において、癌の骨転移の治療後の外科処置による顎骨壊死の症例に遭遇し、根本的に骨転移が生じた場合の骨代謝メカニズムに対して疑問を感じていた。

(3) 骨細胞の酸性条件下での機能は解明されていない

骨細胞は、骨芽細胞が分化し、骨芽細胞が生成した骨基質内に存在する。深部に行くにつれて、低酸素になるが、表層に近い骨細胞はある程度の酸素が存在するのではないかと考え、酸素のある条件で培養していた。骨細胞は低酸素環境に存在するという考えが広まっているが、酸素環境に存在するという考えは少ない。低酸素は、乳酸アシドーシスの原因となる。また、細胞外液の交換が十分でない場合、重炭酸イオンと水素イオンの除去が不十分になるため、環境が酸性化しやすい。さらに、がんの骨転移や炎症による骨髄炎など、様々な要因で、骨細胞が酸性環境に暴露されることは多くあると考えられる。

(4) 骨細胞を酸性条件下で培養すると骨代謝回転は抑制される

我々は、マウス骨細胞である Ocy454 細胞を酸性環境にて培養することで、骨芽細胞分化を抑制するスクレロスチンの分泌を促進し、破骨細胞分化を抑制するオステオプロテグリン (OPG) の分泌も促進することを発見した。これは、遺伝子レベルでも確認することができた。破骨細胞分化を促進する RANKL タンパク質は pH の低下で増加したが、遺伝子レベルでは確認できなかった。糖尿病や悪性腫瘍は、L-乳酸産生により体内を酸性化する。乳酸の細胞内取り込みと細胞膜乳酸受容体である L-乳酸に特異性が高いが、D 体と L 体で同様の作用が見られたことから、細胞外酸性化が上記の作用を発揮したと考えられる。

(5) GPR68/OGR1 は骨細胞の骨代謝回転の起点となりうる

これまでの研究から骨細胞の細胞外酸性化の受容体として、GPR68/OGR1 の可能性が高いことが考えられる (Marie GL et al.: Nature 425:93–98, 2003, Nancy S et al.: Kidney Int 89:565–573, 2016)。そこで、骨細胞の細胞外酸性化受容体の解明を目指して、Ocy454 細胞で GPR68/OGR1 の発現を抑制し、スクレロスチンと OPG の発現・分泌の変化を観察した。

2. 研究の目的

生体レベルで生じる酸性化は、病的酸性化と生理的酸性化がある。酸性化が骨代謝に与える影響を検証することは、がんの骨転移をはじめとする病的酸性化を伴う骨疾患に対する治療に有用な情報をもたらす。我々が発見した、酸性化による骨細胞を介した骨代謝回転制御のメカニズムを解明することは、生体内で生じる酸性環境下での骨代謝回転の制御を理解することにつながる。

3. 研究の方法

我々は、マウス骨細胞である Ocy454 細胞を酸性環境にて培養することで、骨芽細胞分化を抑制するスクレロスチンの分泌を促進し、破骨細胞分化を抑制する OPG の分泌も促進することを発見した (Ikezaki-Amada K et al., Biochem Biophys Res Commun 597:44–51, 2022)。これらよりスクレロスチンの分泌メカニズムを解明するために以下の研究を計画した。

(1) スクレロスチン遺伝子 (*Sost*) の発現は転写因子 MEF2 によって誘導される。この MEF2 による転写は、HDAC5 によって抑制されることから、マウス骨細胞株 Ocy454 細胞を酸性条件である pH6.2 と中性条件である pH7.4 の培地で 48 時間培養を行い、HDAC5 のタンパク質同定を蛍光免疫染色と western blotting にて解析した。

(2) HDAC5 はカルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) によってリン酸化されることで核外へ移行する。CaMK は細胞内カルシウムの上昇によって活性化される。そこで、カルシウムの

蛍光プローブを取り込ませた Ocy454 細胞の培地の pH を 7.4 あるいは 6.2 にし、経時的に蛍光強度を測定した。さらに、カルモジュリン依存性キナーゼ の阻害剤 KN-62 にて *Sost* の発現を確認した。

(3) マウス骨細胞株 Ocy45 細胞へ GPR68/OGR1 shRNA を導入する。GPR68/OGR1 shRNA を導入された Ocy454 を pH6.2 と pH7.4 の培地で培養し、その Ocy454 細胞を抗 GPR68/OGR1 抗体でマウスの骨組織を骨細胞マーカー抗体と抗 GPR68/OGR1 抗体で二重免疫染色 GPR68/OGR1 を解析した。さらに、Ocy454 細胞への GPR68/OGR1 shRNA の導入、GPR68/OGR1 遺伝子欠損マウスを導入し、細胞の単離、GPR68/OGR1 に対する既知のアゴニスト・アンタゴニスト(CuCl_2)の利用などの実験系を用いて、酸性化によるスクレロスチンと OPG の発現及び分泌に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) Ocy454 細胞の核内 HDAC5 を蛍光免疫染色した結果、pH6.2 で培養した Ocy454 細胞の HDAC5 が減少した。また、western blot より pH6.2 で培養した Ocy454 細胞の核内 HDAC5 が減少したことを確認した。これは、細胞外酸性化により核内の HDAC5 の核外移行を誘導したことが示唆される。

(2) Ocy454 細胞のカルシウムイオン濃度を経時的に測定したところ、pH7.4 に比較して pH6.2 で培養した Ocy454 細胞の核内のカルシウムイオン濃度は上昇した。また、KN-62 を添加した場合、pH6.2 における Ocy454 細胞の *Sost* の発現は低下させた。

(3) マウス骨細胞株 Ocy454 細胞への GPR68/OGR1 shRNA の導入により、骨細胞の分化前後での骨細胞マーカーの発現状態に違いが生じた。
また、GPR68/OGR1 に対する既知のアンタゴニスト(CuCl_2)添加培地にて Ocy454 細胞を pH6.2 と pH7.4 の培地で培養したところ、 CuCl_2 はスクレロスチンの発現を抑制した。これらの結果は、骨細胞が GPR68/OGR1 で細胞外 pH の変化を受容し、骨代謝調節を行っていることを示唆する。

以上の結果より、細胞外酸性化によるスクレロスチンの上昇メカニズムは下記のようなメカニズムを考えられる。細胞外 pH の低下が GPR68 などの受容体を介して細胞内カルシウムを上昇させ、カルモジュリン依存性キナーゼ が活性化することで、HDAC5 のリン酸化と核外輸送が起こり、*Sost* 遺伝子の転写が誘導され、スクレロスチンの分泌が増えたことが示唆される(図)。

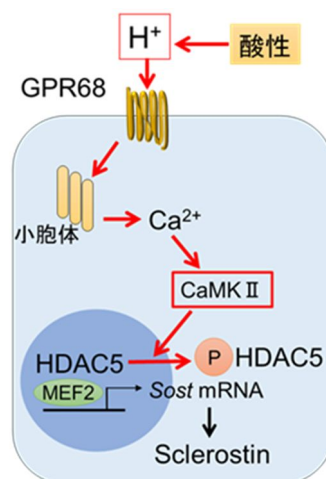


図. 骨細胞によるスクレロスチン産生の酸性化による促進機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 氷見 奈々絵, 高松 弘貴, 安田 有沙, 天田 かおり, 渡邊 匡崇, 前村 美希, 佐藤 大輔, 栗原 祐史, 代田 達夫	4. 巻 22
2. 論文標題 カスタムメイドチタンメッシュプレートと自家腸骨海綿骨細片移植による顎骨再建後にインプラント治療を施行した顎骨中心性巨細胞肉芽腫の1例	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Maxillo Facial Implants	6. 最初と最後の頁 87-94
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 -

1. 著者名 Ikezaki-Amada K, Sasa K, Yamada A, Kinoshita M, Yoshimura K, Kawai R, Yano F, Shiota T, Kamiyo R	4. 巻 597
2. 論文標題 Extracellular acidification augments sclerostin and osteoprotegerin production by Ocy454 mouse osteocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 44-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.111	査読の有無 無
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 Kinoshita M, Yamada A, Sasa K, Ikezaki K, Shiota T, Kamiyo R	4. 巻 11
2. 論文標題 Phorbol-12-myristate 13-acetate inhibits Nephronectin gene expression via Protein kinase C alpha and c-Jun/c-Fos transcription factors.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 20360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00034-x	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天田 かおり, 祝部亜紗美, 高松弘貴, 佐藤 仁, 代田達夫, 上條竜太郎	
2. 発表標題 細胞外pHは骨細胞による 骨代謝回転調節を制御する	
3. 学会等名 第76回 日本口腔科学会学術集会	
4. 発表年 2022年	

1. 発表者名 Kaori Ikezaki-Amada, Yoichi Miyamoto, Ryutaro Kamijo
2. 発表標題 Enhanced sclerostin production by osteocytes in response to acid stimulation
3. 学会等名 IADR/APR 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天田かおり, 宮本洋一, 上條竜太郎
2. 発表標題 細胞外酸性化は骨細胞による骨代謝回転を抑制する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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