

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591349

研究課題名(和文) 骨代謝バランスとその破綻～pH受容体欠損マウスを用いた解析

研究課題名(英文) Bone metabolism and its disruption in pH receptor knockout mice

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨量は骨形成と骨吸収のバランスによって調節されておりホルモンなど細胞外の要因に影響される。骨代謝において酸性条件下では骨吸収が亢進するといわれていたものの、その具体的な分子機構やシグナルについては明らかではなかった。そこで低pHを感知する4種類のpH受容体(OGR1、TDAG8、GPR4、G2A)が骨芽細胞、破骨細胞に発現していることに着目し、骨代謝バランスの崩れにおけるpH受容体の役割を明らかにすることを試みた。またその病態モデルとして、炎症細胞の集積により酸性化が起こっていると想定される関節炎について調べた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that extracellular pH plays important roles in bone metabolism, but the molecular mechanisms are yet unidentified. To reveal the roles of novel four proton-sensing receptors (OGR1, GPR4, TDAG8, G2A) in bone remodeling, we generated osteoclasts and osteoblasts from bone marrow cells from pH-receptor knockout mice. These results indicate the relationship between OGR1 family and bone metabolism. We also assessed rheumatoid arthritis as in vivo model for studying acidification by accumulation of inflammatory cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：pH Gタンパク質共役型受容体 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨量は骨芽細胞と破骨細胞の機能のバランスによって調節されている。このバランスはホルモンやサイトカインなど細胞外の要因に大きく影響される。骨代謝バランスにおいて細胞外プロトン濃度(pH)も重要な役割を担っている。体液性のアシドーシス、関節リウマチ、悪性腫瘍による骨の微小環境のアシドーシスなど、疾患に伴い骨はしばしば酸性環境に曝されている。

OGR1 (ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1)、TDAG8 (T-cell death associated gene 8)、GPR4、G2A)は、近年報告された細胞外の酸性化を感知する pH 受容体である。2003年に Ludwig らが OGR1、GPR4 で細胞外プロトン(pH)の受容体であると報告したの続き、TDAG8 と G2A もまたプロトンを感じ共役する G タンパク質を活性化し、細胞内にシグナル伝達する受容体であることが報告された(Wang JQ. et al., 2004、Ishii S. et al., 2005、Murakami N. et al., 2005)。

pH 受容体発見時より OGR1 と骨代謝との関係は示唆されていた(Ludwig et al, 2003)。骨は血中の pH 濃度を保つのに重要な器官であり、プロトン受容体が骨代謝に作用すると考えられる。培養破骨細胞で OGR1 が発現し(Yang et al., 2006)一方骨芽細胞では、ヒト初代骨芽細胞で強く発現する OGR1 を介して細胞外 pH 低下は COX-2 発現、PGE₂ 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(Tomura H, et al, 2008)。これまで申請者によるノックアウトマウス骨密度解析により、pH 受容体ノックアウトマウスでは骨密度が上昇する結果を得ており(投稿準備中)、骨代謝において pH 受容体が骨吸収を促進していると考えられる。

また、破骨細胞が病的に活性化される関節炎においては、炎症性細胞の集積による低 pH に加えて、炎症性細胞からのサイトカインもまた破骨細胞を介して骨吸収を促進することから、pH 受容体の機能を調べる良い病態モデルであると考えられる。

2. 研究の目的

アシドーシスによって骨吸収が促進されることは以前より報告されているが受容体の関与など、直接的な証明は行われていな

い。

他のグループからの報告では、pH 受容体 OGR1 が破骨細胞分化に関わっている可能性が示唆されているが培養細胞株での研究であり、ノックアウトマウスを用いた初代培養細胞や個体での報告はほとんどない。骨芽細胞の発現する RANKL は破骨細胞の分化に必須であり骨芽細胞と破骨細胞の機能は密接に関係している。pH 受容体を介した骨代謝への影響を明らかにしたい。個体レベルでの解析に加え、pH 受容体ノックアウトマウスの初代培養による骨芽細胞と破骨細胞の機能解析により骨代謝における pH 受容体の役割を明らかにしたい。

3. 研究の方法

- (1) pH 受容体ノックアウトマウス長骨を pQCT 骨密度測定装置により骨密度を測定する。雌性 OGR1 ノックアウトマウスは骨密度が高く pH 受容体 OGR1 は骨吸収に働いている。骨代謝には女性ホルモンが影響する。そこで、卵巣摘出したマウスでも骨密度を測定した。
- (2) ノックアウトマウス脛骨の骨形態計測を行う。サンプリング前に一定の期間を置いてカルセインを投与し、沈着したカルセインの距離を測定することにより骨の成長速度を調べる。骨芽細胞、破骨細胞の数や接する骨の面積など、骨の組織学的検討と測定から破骨細胞と骨芽細胞のそれぞれの機能を計測した。
- (3) pH 受容体ノックアウトマウスでコラーゲン関節炎(CIA)モデルを作成して、その増悪度をスコアリングにより評価した。
- (4) マウス骨髄より分化誘導した骨芽細胞を用い pH 低下による骨形成に関わる活性(アルカリホスファターゼ、骨石灰化など)を評価した。
- (5) M-CSF、RANKL により誘導される破骨細胞分化(酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性と多核形成)には OGR1 の発現が伴う。骨髄を用いて破骨細胞の形成と破骨細胞の骨吸収能(骨吸収窩の面積)を調べた。

4. 研究成果

- (1) pH ノックアウトマウス長骨を pQCT 骨密度測定装置により骨密度を測定した。雌性 OGR1 ノックアウトマウスは骨密度が高かったのに対し、雄性では有意な差はみられなかった。そのため、女性ホルモンの関与が示唆される。OGR1 は骨吸収を亢進していることが示唆された。
- (2) pH 受容体ノックアウトマウス脛骨を用いて骨形態計測を行った。骨成長速度は変わらないのに対し、骨芽細胞、破骨細胞の数や接する骨の面積など、骨の組織学的検討と測定から破骨細胞と骨芽細胞のそれぞれの機能が OGR1 ノックアウトの影響を受けていた。このことより、OGR1 は骨芽細胞機能、破骨細胞機能それぞれに影響していることが考えられる。
- (3) 破骨細胞分化と機能における pH 受容体の役割を野生型、および OGR1 ノックアウトマウスより骨髄を採取し、破骨細胞への分化誘導を行った。分化誘導因子 (M-CSF、RANKL) により誘導される破骨細胞分化を、破骨細胞のマーカーとして TRAP (酒石酸耐性酸性ホスファターゼ) 陽性であること、多核形成を基準として評価した。骨芽細胞もグリセロリン酸とアスコルビン酸により分化誘導を行いマーカーとして ALP (骨型アルカリホスファターゼ) を用い、活性染色をして形態観察を行った。破骨細胞、骨芽細胞共に OGR1 が強く発現していた。細胞培養液中の pH を酸性 (pH7.4-pH6.0) にして NFATc1 の核移行を調べたが有意な差は見られなかった。酸性環境は破骨細胞の分化と吸収能(骨吸収窩の面積)を促進したが OGR1 ノックアウトマウスではその抑制は見られなかった。
- (4) コラーゲン誘導関節炎モデルは C57BL/6 系統では誘導効率が悪くノックアウトの影響を見ることが困難であったため、Balb/c 系統抗にバッククロスしたマウスを用いてコラーゲン抗体関節炎モデルにより増悪度をスコアリングにより評価した。例数が十分ではないが、関節炎の増悪度は OGR1 ノックアウトマウスで減弱し

ていたが統計学的に有意な差は見られなかった。

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 12 件)

Ichijo Y, Mochimaru Y, Azuma M, Satou K, Negishi J, Nakakura T, Oshima N, Mogi C, Sato K, Matsuda K, Okajima F, Tomura H.

Two zebrafish G2A homologs activate multiple intracellular signaling pathways in acidic environment. *Biochem Biophys Res Commun.*

469(1):81-6. (2016) 査読有

Tsurumaki H, Mogi C, Aoki-Saito H, Tobo M, Kamide Y, Yatomi M, Sato K, Dobashi K, Ishizuka T, Hisada T, Yamada M, Okajima F.

Protective Role of Proton-Sensing TDAG8 in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury.

Int J Mol Sci. 4;16(12):28931-42. (2015) 査読有

Kamide Y, Ishizuka T, Tobo M, Tsurumaki H, Aoki H, Mogi C, Nakakura T, Yatomi M, Ono A, Koga Y, Sato K, Hisada T, Dobashi K, Yamada M, Okajima F.

Acidic environment augments FcεRI-mediated production of IL-6 and IL-13 in mast cells.

Biochem Biophys Res Commun. 464(3): 949-55. (2015) 査読有

Tobo A, Tobo M, Nakakura T, Ebara M, Tomura H, Mogi C, Im DS, Murata N, Kuwabara A, Ito S, Fukuda H, Arisawa M, Shuto S, Nakaya M, Kurose H, Sato K, Okajima F.

Characterization of Imidazopyridine Compounds as Negative Allosteric Modulators of Proton-Sensing GPR4 in Extracellular Acidification-Induced Responses.

PLoS One. 10(6): e0129334. (2015) 査読有

Mochimaru Y, Azuma M, Oshima N, Ichijo Y, Satou K, Matsuda K, Asaoka Y, Nishina H, Nakakura T, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H.

Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebra fish.

Biochem Biophys Res Commun. 457(4):493-9. (2015) 査読有

Aoki H, Mogi C, Okajima F.

Ionotropic and Metabotropic Proton-Sensing Receptors Involved in Airway Inflammation in Allergic Asthma.

Mediators Inflamm. 2014: 712962.

(2014) Reviw 査読有

Kotake M, Sato K, Mogi C, Tobo M, Aoki H, Ishizuka T, Sunaga N, Imai H, Kaira K, Hisada T, Yamada M, Okajima F.

Acidic pH increases cGMP accumulation through the OGR1/phospholipase C/Ca²⁺/neuronal NOS pathway in N1E-115 neuronal cells.

Cell Signal. 26(11):2326-32. (2014) 査読有

Sato K, Tobo M, Mogi C, Murata N, Kotake M, Kuwabara A, Im DS, Okajima F.

Lipoprotein-associated lysolipids are differentially involved in high-density lipoprotein- and its oxidized form-induced neurite remodeling in PC12 cells.

Neurochem Int. 68:38-47. (2014) 査読有

Jin Y, Sato K, Tobo A, Mogi C, Tobo M, Murata N, Ishii S, Im DS, Okajima F.

Inhibition of interleukin-1 β production by extracellular acidification through the TDAG8/cAMP pathway in mouse microglia.

J Neurochem. 129(4):683-95. (2014) 査読有

Mogi C, Nakakura T, Okajima F.

Role of extracellular proton-sensing OGR1 in regulation of insulin secretion and pancreatic β -cell functions.

Endocr J. 61(2):101-10. (2014) 査読有
§Aoki H, §Mogi C, (§equally contributed)
Hisada T, Nakakura T, Kamide Y, Ichimonji I, Tomura H, Tobo M, Sato K, Tsurumaki H, Dobashi K, Mori T, Harada A, Yamada M, Mori M, Ishizuka T, Okajima F.

Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells is required for airway responses in a murine asthma model.

PLoS One. 8(11):e79985. (2013) 査読有
§Nakakura T, §Mogi C, (§equally contributed) Tobo M, Tomura H, Sato K, Kobayashi M, Ohnishi H, Tanaka S, Wayama M, Sugiyama T, Kitamura T, Harada A, Okajima F.

Deficiency of proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 attenuates glucose-stimulated insulin secretion.

Endocrinology. 153(9):4171-80. (2012) 査読有

〔学会発表〕(計2件)

茂木千尋、戸村秀明、岡島史和
pH受容体 OGR1 ファミリーの骨リモデリングにおける役割

第12回生命科学研究会、平成25年6月28日~29日、浅虫観光ホテル(青森市)

中倉敬、茂木千尋、戸村秀明、岡島史和
膵細胞におけるプロトン感知性 OGR1 を介したインスリン分泌シグナルの解析

第85回日本生化学会、平成24年12月14日~16日、福岡国際会議場(福岡市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://signal-transduction.imcr.gunma-u.ac.jp/>

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: 0375528

