

OGR1 における新規ア ゴニスト金属と破骨細 胞機能に関する研究

2016 年 1 月

阿部 理恵

OGR1 における新規ア ゴニスト金属と破骨細 胞機能に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士 (農学) 学位論文

阿部 理恵

略語

AC	adenylate cyclase、アデニル酸シクラーゼ
cAMP	cyclic adenosine monophosphate、サイクリック AMP
BSA	bovine serum albumin、ウシ血清アルブミン
BMP-4	bone morphogenetic proteins-4、骨形成タンパク質 4
CPS	counts per second、カウント毎秒
CPM	counts per minutes、カウント毎分
CTR	calcitonin receptor、カルシトニン受容体
DAB	diaminobenzidine、ジアミノベンジジン
DMEM	dulbecco's modified eagle medium、ダルベッコ変法イーグル培地、
DNA	deoxyribonucleic acid、デオキシリボ核酸
D-SPC	D-erythro sphingosylphosphorylcholine、 スフィンゴシルホスホリルコリン
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid、エチレンジアミン四酢酸
FBS	fetal bovine serum、胎仔ウシ血清
Fr.	fraction、画分
G2A	G2 accumulation

GM-CSF	granulocyte/macrophage-colony stimulating factor、 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子
GPCR	G-protein coupled receptor、G タンパク 共役型受容体
GPR4	G protein-coupled receptor 4
HBSS	Hanks' balanced salt solution、ハンクス平衡塩類溶液
He	hetero、ヘテロ
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid、ヘペス
9-HODE	9-hydroxyoctadecadienoic acid
HPLC	high performance liquid chromatography、 高速液体クロマトグラフィー
HTS	high throughput screening、ハイスループットスクリーニング
IP	inositol monophosphate、イノシトール 1 リン酸
IP3	inositol triphosphate、イノシトール 3 リン酸
KO	knock out、ノックアウト
LPC	lysophosphatidylcholine、リゾホスファチジルコリン
LPS	lipopolysaccharide、リポポリサッカライド
MEM	minimum essential media、最小必須培地
M-CSF	macrophage colony - stimulating factor、

	マクロファージコロニー刺激因子
mRNA	messenger ribonucleic acid、伝令 RNA
OGR1	ovarian cancer G-protein coupled receptor
Opn	osteopontin、オステオポンチン
PBS	phosphate buffered saline、リン酸緩衝食塩水
PLC	phospholipase C、ホスホリパーゼ C
PSY	galactosylsphingosine、psychosine、サイコシン
TBS	tris buffered saline、トリス緩衝食塩水
TDAG8	T-cell death-associated gene 8
TFA	trifluoroacetic acid、トリフルオロ酢酸
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ
PTH	parathyroid hormone、副甲状腺ホルモン
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand、 破骨細胞分化因子
RNA	ribonucleic acid、リボ核酸
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction、逆転写 PCR
WT	wild type、ワイルドタイプ

目次

第一章 序章.....	1
1 GPCR と創薬.....	1
2 リガンドスクリーニング.....	4
3 OGR1 ファミリー.....	5
4 破骨細胞及び骨芽細胞の機能.....	7
5 論文構成.....	9
第二章 OGR1 のリガンドスクリーニングにおける ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓からのアゴニスト金属の精製及び同定、作用解析.....	10
1. イントロダクション.....	10
2 OGR1 の基礎解析.....	12
2.1 イントロダクション.....	12
2.2 材料及び方法.....	12
2.2.1 シグナルマッピング（レポーターアッセイ）.....	12
2.2.2 発現解析.....	14
2.3 結果と考察.....	18
2.3.1 シグナルマッピング.....	18
2.4 要約.....	25
3 OGR1 リガンドスクリーニング及びアゴニスト金属の同定.....	26
3.1 イントロダクション.....	26
3.2 材料及び方法.....	26
3.2.1 各種安定発現細胞の取得.....	26
3.2.2 リガンドスクリーニング.....	28
3.2.3 アゴニスト活性物質の精製.....	33
3.3 結果と考察.....	37
3.3.1 リガンドスクリーニング.....	37
3.3.2 アゴニスト活性物質の精製及び同定.....	41
3.4 要約.....	46

4 OGR1 アゴニスト金属における作用解析.....	47
4.1 イントロダクション.....	47
4.2 材料及び方法.....	47
4.2.1 OGR1 アゴニスト金属を用いた解析.....	47
4.2.2 OGR1 不活性変異体の作製.....	48
4.2.3 OGR1 KO マウス破骨細胞を用いた解析.....	48
4.2.4 OGR1-EGFP を用いたインターナリゼーションアッセイ.....	50
4.2.5 アンタゴニスト HTS.....	51
4.3 結果と考察.....	52
4.3.1 OGR1 アゴニスト金属を用いた解析.....	52
4.3.2 OGR1 不活性変異体を用いた解析.....	55
4.3.3 OGR1 KO マウス破骨細胞を用いた解析.....	56
4.3.4 OGR1-EGFP を用いたインターナリゼーションアッセイ.....	58
4.3.5 アンタゴニスト HTS.....	58
4.4 要約.....	60
5 全体要約.....	61
第三章 OGR1 KO マウスを用いた破骨細胞における機能解析と骨疾患病態モデルにお ける作用解析.....	62
1 イントロダクション.....	62
2 OGR1 KO マウスを用いた破骨細胞における機能解析.....	63
2.1 イントロダクション.....	63
2.2 材料及び方法.....	63
2.2.1 破骨細胞における骨吸収活性 (Pit Formation Assay).....	63
2.2.2 破骨細胞 TRAP 染色.....	63
2.3 結果と考察.....	64
2.3.1 破骨細胞における骨吸収活性.....	64
2.3.2 破骨細胞の分化.....	68
2.3.3 破骨細胞の生存.....	77
2.4 要約.....	78

3 OGR1 KO マウスを用いた骨疾患病態モデルにおける作用解析	79
_3.1 イントロダクション	79
_3.2 材料及び方法	79
___ 3.2.1 基礎解析	79
___ 3.2.2 骨疾患病態モデル解析	80
___ 3.2.3 骨組織における発現変動解析	81
___ 3.2.4 行動解析	81
_3.3 結果と考察	83
___ 3.3.1 基礎解析	83
___ 3.3.2 骨疾患病態モデル解析	86
___ 3.3.3 骨組織における発現変動解析	89
___ 3.3.4 行動解析	91
_3.4 要約	92
4 全体要約	92
第四章 結論と予測	94
謝辞	98
引用文献	99

第一章 序章

1 GPCR と創薬

G-protein coupled receptor (GPCR) は7回膜貫通型の受容体であり、ホルモンや神経伝達物質などの受容体に結合するリガンドにより細胞外のシグナルを感知し、そのシグナルを細胞内に伝える役割を持つ。GPCRはG-proteinと呼ばれる三量体のタンパクを介してそのシグナルを伝達する。G-proteinは $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ の3つのサブユニットからなり、 $G\alpha$ にGDPが結合しているときは不活性型としてGPCRと結合している。GPCRにリガンドが結合すると $G\alpha$ にGTPが結合した活性型となり、セカンドメッセンジャーを介して細胞内にシグナルを伝達する。また、構成する $G\alpha$ の種類によって伝えるセカンドメッセンジャーが異なることが知られている。代表的なシグナルとしては $G\alpha_q$ による細胞内イノシトール3リン酸 (Inositol triphosphate、IP3) 濃度上昇及び細胞内カルシウム濃度上昇や、 $G\alpha_s$ による細胞内サイクリックAMP (cyclic adenosine monophosphate、cAMP) 濃度上昇、 $G\alpha_i$ による細胞内cAMP濃度低下、 $G\alpha_{12/13}$ による低分子量G-protein RASやRhoの活性化がある (Ritter SL et al, 2009)。また、各々のシグナルのパスウェイの下流で各種転写因子の活性化が誘導される (Figure 1)。

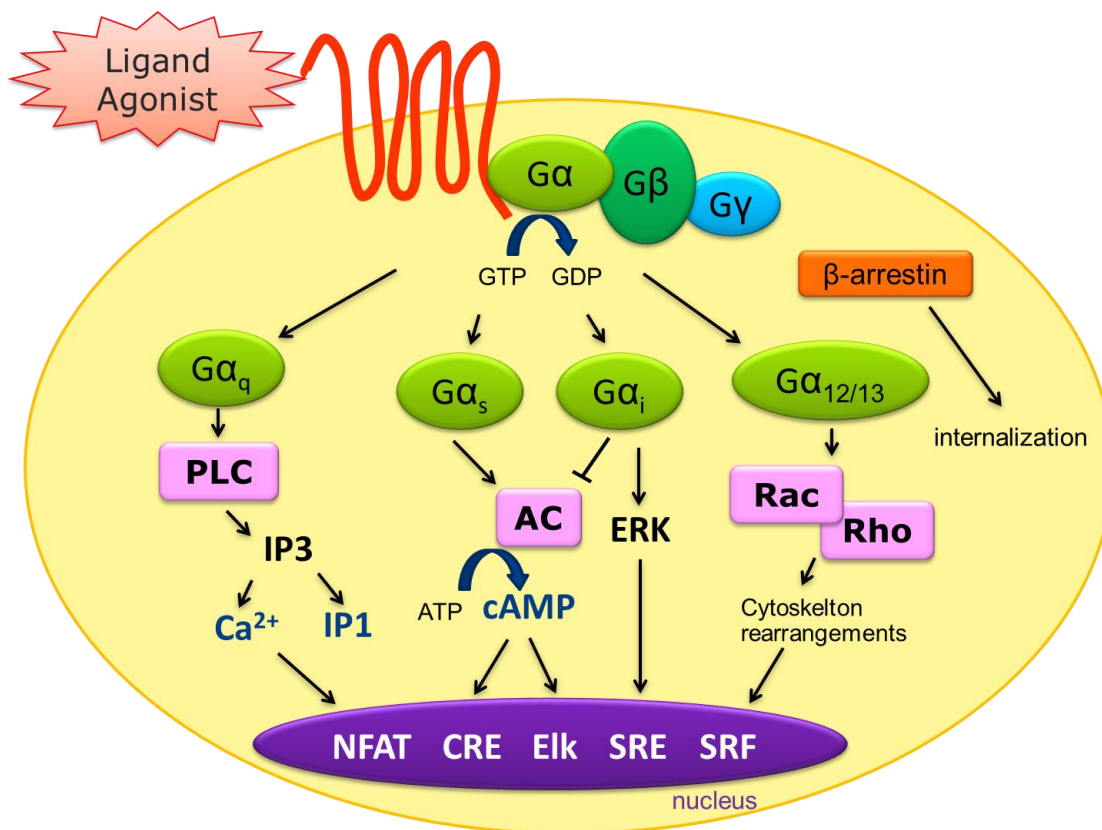


Figure 1. GPCR pathways of each Gα proteins.

Gα_q-coupled receptors activate phospholipase C (PLC) to produce inositol triphosphate (IP₃), which in turn increases intracellular calcium concentration and inositol monophosphate (IP₁, IP), resulting in NFAT nuclear import. Gα_s-coupled receptors activate adenylate cyclase (AC), resulting in an increase of cAMP, which in turn induce CRE and Elk nuclear import. Gα_i-coupled receptors inhibit AC and activate MAP/ERK kinase pathway, resulting in SRE nuclear import. Gα_{12/13}-coupled receptors activate Rac and Rho GTPase, which in turn induces cytoskeleton rearrangements and SRF nuclear import.

GPCRはその生理的役割の重要性及び疾患との関連性により、以前から創薬の標的として研究が行われてきた (Giguere PM et al, 2014)。実際、現在上市している薬剤のうち約30%がGPCRを標的としている (Brogi S et al, 2014)。ゲノムDNAやcDNAの配列解析等の*in silico*解析が進み、GPCRは1000種類近くの巨大なファミリーを形成することが示されてきた。世界中の多くのグループにより精力的なリガンドの同定が行われてきたが、未だリガンドが同定されていないもの、同定されたものの再現性やコンセンサスが得られないもの、明確な生理作用が不明なGPCRも少なくない (Levoye A et al, 2008)。そのため、GPCRを創薬標的として研究することは新規の薬剤及び治療法の開発において有用である (Stockert JA et al, 2015)。さらに、2012年のノーベル化学賞はGPCRの構造と機能を明らかにしたRobert LefkowitzとBrian Kobilkaに授与されたことから、GPCR研究が医薬品の開発に大きく貢献してきたことが伺える (Van Noorden R, 2012)。

また、近年では同じ受容体に対して異なるアゴニストが結合することにより、異なる細胞内シグナルを伝えるというバイアスドアゴニストの概念も提唱されてきている。これまで開発されてきた薬剤の中にも同じ受容体に作用しながらも異なる薬理作用を発揮している物が存在しており、これらはバイアスドアゴニストである可能性が示唆されている。このように既知の受容体に対しても新規のアゴニストを用いることで新規の薬理作用を引き出すことができる可能性があり、GPCRを創薬標的とすることで様々な薬理作用を得ることができると想定される (Khoury E et al, 2014; Wisler JW et al, 2014; Luttrell LM et al, 2015)。

2 リガンドスクリーニング

GPCR の生理的役割を知るにあたって、そのリガンドを同定することは非常に重要である。また、リガンドを同定することにより、疾患との関連性や薬剤の開発に重要な知見をもたらす (Brogi S et al, 2014)。加えて、生体内で作用するリガンドのみならず、作動薬であるアゴニストを見出すことも同様に薬剤の開発において重要である。これまでにリガンド未知のオーファン GPCR の生体内リガンド及び作動薬であるアゴニストを同定するため、リガンドスクリーニング及びリガンドフィッシングという研究手法が広く用いられてきた。リガンドスクリーニングにおいては臓器抽出物や細胞培養上清等の生体由来のサンプルやペプチド、ホルモンのライブラリー等が用いられる。アゴニストスクリーニングでは主に低分子化合物ライブラリーが用いられることが多い (Civelli O et al, 2006; Chung S et al, 2008)。また、GPCR の機能を抑制するために、リガンドもしくはアゴニストに対して作用の拮抗するアンタゴニストのスクリーニングも低分子化合物ライブラリーを用いて実施されることが一般的である (Xiao SH et al, 2008; Wang D et al, 2012; Kumari P et al, 2015) が、近年では抗体や合成ペプチド等のより高分子を用いた機能調節も行われている (Ullmer C et al, 2012; Hutchings CJ et al, 2014; Ke N et al, 2015)。

なお、結合する $G\alpha$ の種類及びセカンドメッセンジャーが不明な場合はシグナルマッピングという手法により同定を行い、そのシグナルを指標に $G\alpha$ の種類を予測し、検出が可能なシグナルを用いてリガンドスクリーニングを実施するのが一般的である (Chung S et al, 2008)。

3 OGR1 ファミリー

Ovarian cancer G-protein coupled receptor (OGR1、GPR68) は GPCR スーパーファミリーのうちクラス A に属する GPCR である (by GPCRDB <http://www.gpcr.org/7tm/>)。クラス A はロドプシン受容体ファミリーとも呼ばれ、N 末端及び C 末端にあるループが短いことが特徴である。OGR1 は GPR68 としても知られるが、1996 年にクローニングされ、当初リガンド不明のオーファン受容体であった (Xu Y et al, 1996)。その後、2000 年に Yan Xu らにより D-erythro-Sphingosylphosphorylcholine (D-SPC) がリガンドであるとの報告がなされたが、再現性が得られない (Ludwig MG et al, 2003; Tomura H et al, 2005) ことなどから論文は撤回された。そのため、現在は D-SPC がリガンドであることは疑問視されている (Seuwen K et al, 2006)。また、一方で D-SPC がアンタゴニストやモジュレーターとして機能するという報告もある (Mogi C et al, 2005)。更に 2003 年になって Marie-Gabrielle Ludwig らによりプロトンがリガンドであるとの報告 (Ludwig MG et al, 2003) がなされ、その作用は私の研究を含め複数の報告 (Wang JQ et al, 2004; Radu CG et al, 2005) において再現性が得られている。そのため、現在では OGR1 はプロトン受容体として知られるようになっている。

OGR1 の近縁のファミリーには G-protein coupled receptor 4 (GPR4)、G2 Accumulation (G2A)、T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) が知られており、何れも OGR1 と同様に当初の脂質をリガンドとする報告が疑問視されている (Seuwen K et al, 2006) 一方で、後にプロトンをリガンドとすることが報告されている (Im DS, 2005; Tomura H et al, 2005)。

GPR4は当初D-SPC及びlysophosphatidylcholine (LPC) がリガンドであるとの報告がなされたが、OGR1と同様に論文は撤回されている。GPR4は主に $G\alpha_s$ にカップルするが $G\alpha_q$ 及び $G\alpha_{12/13}$ にもカップルすることが知られている (Jin-Peng Liu et al, 2010)。また、近年血管内皮細胞での機能に關与する報告がある (Dong L et al, 2013)。

G2AはGPR132としても知られ、当初LPCがリガンドであるとの報告がなされたが、OGR1、GPR4と同様に論文は撤回されている。一方で、LPCがアンタゴニストとして作用することが報告されている (Murakami N et al, 2004)。また、9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE)、酸化リノール酸及び酸化アラキドン酸をリガンドとし、 $G\alpha_q$ 及び $G\alpha_i$ とカップルする報告がある (Obinata H et al, 2005)。さらに、マクロファージに発現し、動脈硬化の進展抑制に關与することが報告されている (Bolick DT et al, 2007; Bolick DT et al, 2009)。

TDAG8はGPR65としても知られ、当初galactosylsphingosine (psychosine, PSY) がリガンドであるとの報告がなされたが、受容体結合試験のデータが得られないことなどからこの報告も疑問視されている。一方で、PSYがプロトンによるアゴニスト活性を一部抑制する報告もある (Wang JQ et al, 2004)。また、TDAG8は $G\alpha_s$ にカップルすること、T細胞及びマクロファージに発現しており、炎症反応の抑制に關わっていることが報告されている (Mogi C et al, 2009; He XD et al, 2011; Onozawa Y et al, 2012)。

4 破骨細胞及び骨芽細胞の機能

破骨細胞及び骨芽細胞は共に骨組織を形成する上で非常に重要な細胞群である。骨は定常状態にある器官ではなく、破骨細胞による骨吸収、骨芽細胞による骨形成を繰り返しリモデリングを行うことが知られている。骨リモデリングにより血中のカルシウム濃度が保たれ、また骨の新陳代謝が行われる (Niedźwiedzki T et al, 2015) ([Figure 2](#))。

破骨細胞はマクロファージ系の前駆細胞からの分化・成熟の過程で、複数の細胞が融合し、多核の巨大細胞を形成し、成熟破骨細胞となることが知られている。破骨細胞の機能は種々のサイトカイン等によって制御されており、骨表面に接着後、酸 (HCl) を放出することにより骨のミネラルを溶解し、骨吸収を行う。骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化する細胞であり、アルカリフォスファターゼ活性を有している特徴を持ち、破骨細胞分化の支持細胞としても働く (Florencio-Silva R et al, 2015)。

副甲状腺ホルモン (Parathyroid hormone、PTH) は骨芽細胞に発現する PTH 受容体と結合し、骨芽細胞を刺激して破骨細胞分化因子 (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand、RANKL) を発現させる。単球系細胞から分化した破骨細胞前駆細胞は RANKL に対する受容体である破骨細胞分化因子受容体 (Receptor activator of nuclear factor kappa-B、RANK) を発現しており、RANKL の刺激を受けて分化・細胞融合し、破骨細胞を形成する。その結果、PTH により RANKL 及び RANK を介して破骨細胞形成が促進され、骨吸収が促進される (Lacey DL et al, 2012; Noordin S et al, 2015)。

このように破骨細胞と骨芽細胞は骨リモデリングにおいてカップリングし協調して機能するが、両者のバランスが崩れると骨疾患を引き起こす。骨粗鬆症では破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成よりも亢進することで骨量の低下が引き起こされ、骨がもろくなり骨折しやすくなる。そのため、骨粗鬆症治療薬はこの亢進した破骨細胞の作用を抑制、もしくは骨芽細胞の機能を高める作用機序を持つものがある (Gennari L et al, 2015; Makras P et al, 2015)。破骨細胞の活動を抑制する代表的な治療薬としてはビスフォスフォネート系薬剤及び抗 RANKL 抗体 (Lacey DL et al, 2012; Törring O, 2015) 等が用いられている。また、エストロゲンは骨芽細胞の活性を高める作用が知られており、閉経後の女性において血中エストロゲン量の低下がおこると併せて骨芽細胞の機能が低下するため、骨粗鬆症になりやすい。そのため、閉経後女性の骨粗鬆症には選択的エストロゲン受容体調節薬等を用いたホルモン補充療法が行われる (Xu B et al, 2015)。

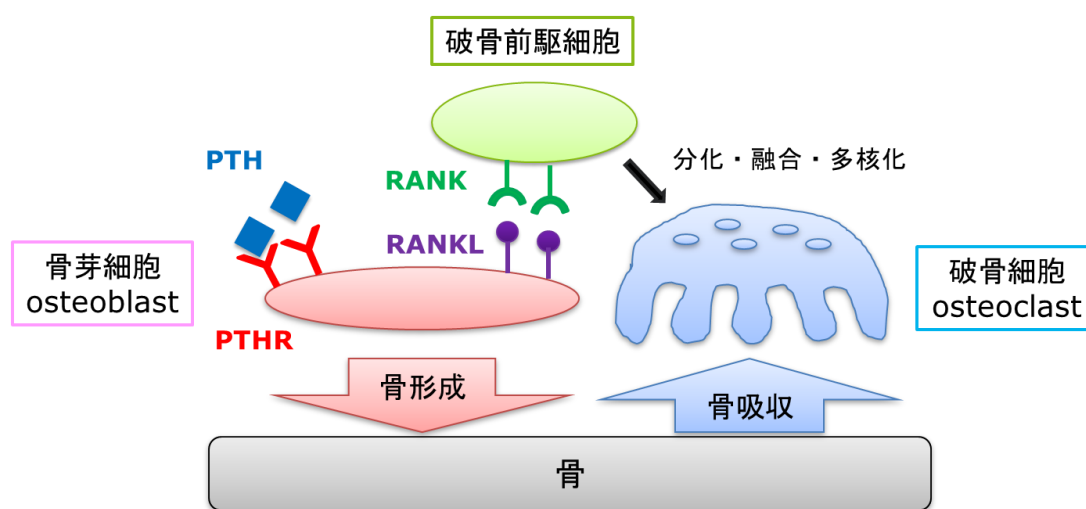


Figure 2. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling.

5 論文構成

第二章では、OGR1 の基礎解析及びリガンドスクリーニングを実施した。OGR1 の基礎解析においては OGR1 が $G\alpha_q$ カップル型の GPCR であり多様な臓器に発現すること、また破骨細胞の分化に伴い発現が上昇することを見出した。さらにリガンドスクリーニングを実施した結果、ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓抽出サンプルより、金属の Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn を OGR1 アゴニスト活性物質として同定した。また、これらアゴニスト活性を持つ金属は OGR1 の不活性変異体や OGR1 ノックアウト (knock out、KO) マウス由来破骨細胞においてはシグナルを流さないことを確認した。さらに、Ni を用いたアンタゴニスト high throughput screening (HTS) の系を構築し、アンタゴニスト化合物を取得した。なお、第二章は論文 (Abe-Ohya R et al, 2015) にて公表した研究内容を中心に構成した。

第三章では、OGR1 KO マウスを用い、破骨細胞における機能解析及び骨疾患病態モデルにおける作用解析を実施した。その結果、破骨細胞に発現する OGR1 が破骨細胞の分化及び生存に関わることを見出した。OGR1 KO マウスを用いた基礎解析では、僅かに骨組織における変化が認められたが、著明な変化は認められなかった。また、OGR1 KO マウスを用いた骨疾患病態モデルにおける作用解析においては OGR1 の有無により若干の病態の変化が観察された。さらに、各種病態モデルにおける OGR1 の発現を検討し、一部 OGR1 の発現上昇が見られる病態が存在した。

第四章では結論及び推察を記載した。

第二章 OGR1 のリガンドスクリーニングにおける ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓からのアゴニスト金属の精製及び同定、作用解析

1. イントロダクション

受容体は結合するリガンドやアゴニスト、アンタゴニストにより活性の制御を受け、細胞内に情報を伝達する分子であるが、その中でも GPCR は、上市されている薬の作用点の 30% を占めるとも言われており、創薬の標的として極めて重要な存在である。GPCR はヒトにおいて約 1000 種類存在することが知られているが、未だリガンド未知なオーファン受容体や機能未知な受容体が多く存在している。私は、このような GPCR の中に新規作用機序を有する創薬の標的が存在すると想定し、リバースジェネティクス的手法を用いて OGR1 の創薬標的としての可能性を検討した。

OGR1 は当初 D-SPC がリガンドであるという報告及び D-SPC がアトピー性皮膚炎に関与するという学会報告があったため、アトピー性皮膚炎の創薬標的として研究を開始した。しかし、OGR1 に対する D-SPC の特異的なリガンド応答性の再現性が得られなかったこともあり、リガンド未知のオーファン GPCR として取り扱いリガンドスクリーニングを含めた解析を行うこととした。その後 2003 年にプロトンリガンドとし、低 pH により活性化するとの報告がなされた (Ludwig MG et al, 2003)。低 pH による OGR1 の活性化は、私の検討においても再現性が得られたが、これは他のリガンド及びアゴニストの存在を否

定するものではないと考えた。また、より生理的な中性領域の pH において OGR1 に作用するリガンド及びアゴニストが存在する可能性も想定し、リガンドスクリーニングを実施した。実際、以降で示すように酸性を示さないサンプル (ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓サンプル) においてもアゴニスト活性を見出したことから、より生理的な中性領域の pH で作用するアゴニスト活性物質が存在すると考えられた。

第二章では OGR1 のシグナルマッピング及び発現解析を用いた基礎解析を実施した。また、OGR1 のリガンドスクリーニングを実施し、ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓抽出サンプルでのアゴニスト活性を見出した。さらに、これらのサンプルからのアゴニスト金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) の精製及び同定を実施した。同定した OGR1 アゴニスト金属を用いて、OGR1 不活性変異体及び OGR1 KO マウス破骨細胞における解析を実施した。また、アンタゴニスト HTS を実施し、アンタゴニスト化合物を取得した。

2 OGR1 の基礎解析

2.1 イントロダクション

GPCR の研究を行うにあたって、カップルする $G\alpha$ の種類やセカンドメッセンジャーを調べることは必要不可欠である。カップルする $G\alpha$ の種類が不明な場合にもレポーターアッセイを用いたシグナルマッピングという手法により $G\alpha$ の種類を予測することが可能である。OGR1 は既知の報告 (Ludwig MG et al, 2003) から $G\alpha_q$ カップル型であることが予想されていたが、本研究においても更なる確認を行うためシグナルマッピングを実施した。

また、GPCR の機能する部位を予想するために詳細な発現部位を解析することが有用である。本研究では、ヒト臓器由来 mRNA における網羅的な解析を実施した。また、発現の報告があった骨関連細胞において、より詳細な解析を実施した。また、ヒト組織における免疫染色によるタンパク質レベルでの発現の解析も試みた。

2.2 材料及び方法

2.2.1 シグナルマッピング (レポーターアッセイ)

HEK293 細胞株にインテグリン $\alpha v\beta 3$ を安定発現させた HEK293 $\alpha v\beta 3$ 株を用いた。レポータープラスミドとして Stratagene の PathDetect cis-reporting System 使用し、pNFAT-Luc、pCRE-Luc、pSRE-Luc、pSRF-Luc 及び pFR-Luc + pFA2-ELK

の5種を用いた。また、補正用に renilla ルシフェラーゼ発現プラスミドである pRT-TK (Promega) を用いた。さらに導入遺伝子の発現量増強のためには、SV40 large T antigen の発現プラスミド pRSV-Tag を用いた。

細胞を96穴プレートに 1×10^4 個/well 播種して一晩培養後、培地を抗生物質及び血清不含の Opti-Minimum Essential Media I (Opti-MEM I, GIBCO) 培地 (50 μ l/well) に交換した。1 well あたり 76 ng の pcDNA3.1 (-)/hOGR またはコントロールベクター、G-protein ($G\alpha_{16}$ 、 $G\alpha_{q15}$ 、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i1$)、1 ng の pRSV-TK、1 ng の pRLTK、22 ng のレポータープラスミド (pNFAT-Luc、pCRE-Luc、pSRE-Luc、pSRF-Luc、もしくは pFRLuc+ pFA2-ELK 2 ng) 及び Plus-reagent (Invitrogen) 1 μ l を Opti-MEM I 10 μ l に加えた後、室温で15分静置した。その後 Lipofectamine reagent (Invitrogen) 0.5 μ l の入った Opti-MEM I 10 μ l と混合し、室温で15分静置後、細胞に添加してトランスフェクションを行った。3時間後、150 μ l/well の10%血清入りの Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) を添加して、さらに一晩培養した。

翌日培地を捨て、細胞を200 μ l/well の Phosphate Buffered Saline (PBS) で一度洗浄した後、20 μ l/well の lysis buffer (Promega) にて細胞を溶解させ、白色96穴プレート (OptiPlate-96, Perkin Elmer) に移した。これを、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて、発光を ARVO SX にて各試料のルシフェラーゼ活性 (レポーター由来) と renilla ルシフェラーゼ活性 (補正用) を測定した。

結果は、まず各試料のルシフェラーゼ活性カウント (counts per second、CPS) を各々の renilla ルシフェラーゼ活性カウントで割った値を算出し、次に OGR1 トランスフェクション群の算出値を対照であるベクタートランスフェクション群の算出値を割り算して、OGR1 発現によりベクター対照の何倍に変化したかを示す相対値を fold として表した。

2.2.2 発現解析

(1) 解析に用いた細胞の培養

マウス骨髄由来細胞株 Raw264.7 の培養は継代用培地 (DMEM、10% Fetal Bovine Serum (FBS)、100 units/ml Penicillin-Streptomycin、GIBCO) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で行った。継代時は培地を一部捨て、スクレイパーにて細胞を剥がした後、15 ml tube 中で 18 G の針及び 5 ml のシリンジを用いて 5、6 回のストロークを行い細胞を懸濁後、播種した。分化誘導時には、直径 6 cm シャーレに 3×10⁵ 個の細胞を播種し、分化用培地 (α-MEM、GIBCO、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) に sRANKL (PEPROTECH INC) を終濃度が 40 ng/ml になるよう添加した培地中で、37°C、5% CO₂ 条件下で 3 日間の培養を実施した。3 日後に半量の分化用培地を交換し、さらに 1 日間、37°C、5% CO₂ 条件下で培養し分化誘導を行った。

マウス初代培養破骨細胞は、マウス大腿骨より回収した骨髄細胞を継代用培地 (RPMI1640、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を実施した。翌日細胞を播種し直し、分化用培地 (α-MEM、

10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) に mGranulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF、R&D systems) を終濃度 20 ng/ml になるよう添加した培地中で 2 日間培養した。その後、さらに sRANKL を終濃度が 30 ng/ml になるよう添加した分化用培地に交換して 3 日間の分化誘導を行った。

マウス初代培養骨芽細胞は生後 1 日目のマウス頭蓋骨より回収した細胞を分化用培地 (α -MEM、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。翌日、上記培地に Bone Morphogenetic Proteins-4 (hBMP-4、R&D systems) を終濃度 10 ng/ml になるよう添加し 14 日間の分化誘導を行った。なお、培地交換は 3 日毎に実施した。

(2) RT-PCR によるヒト OGR1 mRNA の発現解析

購入ヒト各種臓器 mRNA をテンプレートとして Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を実施した。RT-PCR の条件は、アニーリング温度 60°C、サイクル数 35 回及び 40 回で行なった。

(3) 定量的 PCR (TaqMan) による OGR1 mRNA の発現変動解析

mRNA の抽出は細胞からは RNeasy (QIAGEN) を用いて添付のプロトコールに従い行った。逆転写反応は TaKaRa RNA PCR Kit (タカラバイオ) を用いて行った。作製した cDNA をテンプレートとして、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用い、ABI PRISM 7700 (もしくは 7900) sequence

detection system (Applied Biosystems) にて定量的 PCR を行なった。なお、プローブとして 5'-FAM-CATCCTCCTCTATGAGAAC-MGB-3' を、センスプライマーとして 5'-ACTGGTCCCATGGTGACCTATC-3' を、アンチセンスプライマーとして 5'-GATGGAGATGCAGCAGAGGAA-3' を用いた。

(4) 免疫組織染色によるヒト OGR1 の発現解析

抗体の作成

ポリクローナル抗体の作成は (株) 免疫生物研究所に委託した。抗原ペプチドは、第 2 の細胞外領域と想定されるペプチド A (VLQHDNWSHGDLSC 14 mer)、第 3 の細胞外領域と想定されるペプチド B (CFEHYPIQAWQRAI 14 mer)、第 3 の細胞内領域と想定されるペプチド C (CSHGTQKSRKDQIQRL 16 mer)、C 末端側の細胞内領域と想定されるペプチド D (CAFQTPNSPGSGGFPTGRLA 20 mer) の 4 種を選択し、ペプチド A 及びペプチド B、ペプチド C 及びペプチド D をそれぞれ混合免疫で 3 羽ずつ、計 6 羽のウサギに対して免疫した。その後、最終的に発現細胞を用いたウエスタン法及び免疫染色法で良好な反応を示す個体を選択し、その全採血より抗体を精製した。

免疫細胞染色

単層培養細胞における染色の検討では、4 穴 Lab-TekII Chamber Slide (Nalge Nunc) で 70% コンフルエントに培養した HEK293/ α v β 3 細胞に、LipofectAMINE2000 を用いて添付のマニュアルに従い 500 ng の pcDNA-OGR1 も

しくは pcDNA3.1 (+) を形質導入した。翌日、PBS で細胞を洗浄後、100%エタノールで細胞を固定し、1%BSA/Tris Buffered Saline (TBS、DAKO) でブロッキングを実施後、1% BSA/TBS にて 500 倍に希釈した抗 OGR1 抗血清もしくはポリクローナル抗体で一次抗体反応を行った。500 倍に希釈した Biotin 標識抗ウサギ IgG 抗体 (DAKO) にて二次抗体反応を行い、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ) で三次抗体反応を行った。Diaminobenzidine (DAB、DAKO) で発色させ、顕微鏡で観察した。

セルブロックでの染色検討を行うことで、より免疫組織染色での精度を高めることが知られている。セルブロックサンプルの作製では、上記と同様に pcDNA-OGR1 を発現させた HEK293/ α v β 3 細胞を 15 ml のファルコンチューブに集め、1500 rpm で 5 - 10 分間の遠心後、上清を捨てペレットに 20%中性緩衝ホルマリン液を 3 ml 加え室温で 30 分以上静置して固定した。その後、一般的なパラフィン固定組織切片の作製と同様にセルブロックにおける切片サンプルを作製した。また、染色は上記と同様に実施した。

免疫組織染色

上記で得られたヒト OGR1 ポリクローナル抗体を用いたヒト各組織での免疫組織染色を群馬心臓血管センターに依頼した。染色に用いた臓器は心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胆嚢、膵臓、肺、胸腺、胃、食道、小腸、大腸、膀胱、骨格筋、舌、胸部大動脈、腹部大動脈、睾丸、精巣、大脳、小脳、脊髄、後根神経節、及び軟骨細胞であった。

2.3 結果と考察

2.3.1 シグナルマッピング

OGR1 に共役する G タンパク質を推定するため、シグナルマッピングをレポーターアッセイ法により行なった。その結果、NFAT においてやや強いシグナルを検知したことより、OGR1 は $G\alpha_q$ カップル型と想定された (Figure 3)。また、若干の CRE 及び Elk の活性化も見られた。他の文献報告 (Ludwig MG et al, 2003) などからは OGR1 の細胞内シグナルはイノシトールリン酸及びカルシウム濃度上昇を伴うことが知られており、 $G\alpha_q$ カップル型の GPCR としての特徴を持っている。そこで、本研究においては $G\alpha_q$ カップル型のシグナルを中心に以後の解析を進めることにした。

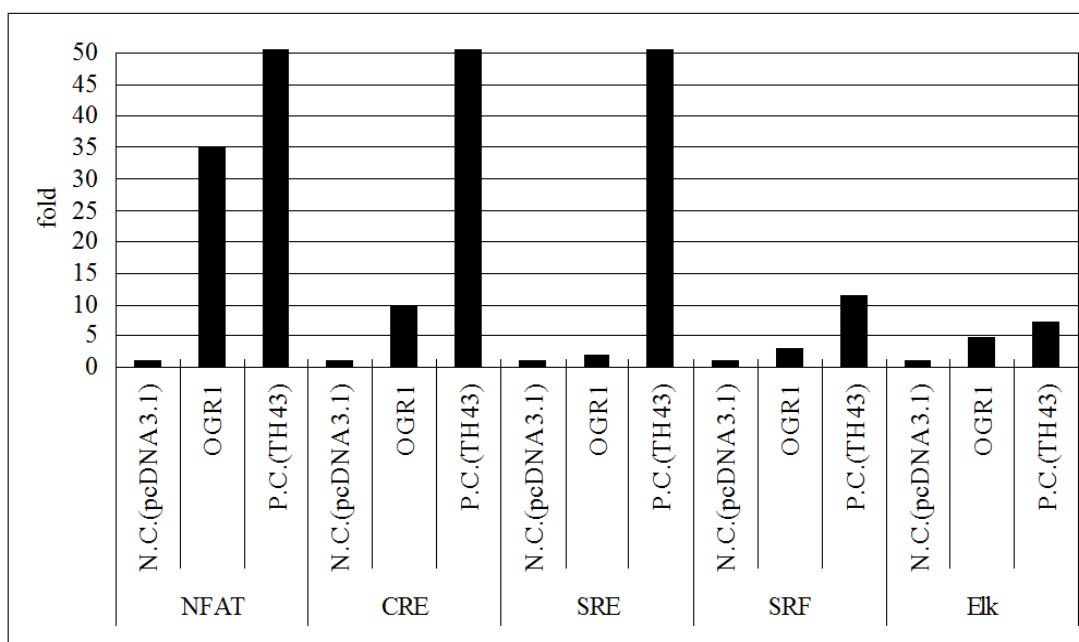


Figure 3. Luciferase activity in hOGR1 transfected cells.

NFAT signals were enhanced in hOGR1 transfected cells. Data are means divided by controls. $N=3$

2.3.2 発現解析

RT-PCR を用いたヒト各種臓器における mRNA レベルでの発現解析では、ほぼ全ての臓器で OGR1 の発現を認めたが、その中で大腸、小腸、肺、胎盤、肝臓、脾臓、前立腺、胸腺、脳、脊髄、精巣、胃、気管、胎児脳でやや発現が高かった (Figure 4)。

LifeSpan 社データベースの免疫組織染色によるタンパク質レベルでの発現解析では、広範な組織に OGR1 が分布していたが、特に脳各組織、乳房、大腸、肝臓、卵巣、膵臓、前立腺、筋肉、皮膚、小腸、脾臓、胸腺、子宮等での発現が高く、ガン化すると発現が上昇する組織が多数存在していた。

一方、OGR1 が骨細胞及び骨芽細胞などの骨関連の細胞において発現しているとの報告 (Ludwig MG et al, 2003) があったことから詳細な解析を行った結果、分化後の骨芽細胞及び破骨細胞で共に mRNA レベルで発現を認めた。さらに、raw264.7 から分化を誘導した破骨細胞及びマウス初代培養破骨細胞では分化に伴い顕著な発現の亢進を認めた (Figure 5a)。これは他の研究グループでの破骨細胞での検討と類似した結果であった (Komarova SV et al, 2005; Yang M et al, 2006)。一方で ST-2 から分化を誘導した骨芽細胞及びマウス初代骨芽細胞では分化に伴う発現変化は見られなかった (Figure 5b)。なお、破骨細胞の分化マーカーとしてカルシトニン受容体 (Calcitonin receptor, CTR) を、骨芽細胞の分化マーカーとしてオステオポンチン (Osteopontin, Opn) を用いた。この結果から、OGR1 は骨芽細胞及び破骨細胞の両細胞で機能している可能性があるが、破骨細胞の分化段階で何らかの役割を担っている可能性が推察された。

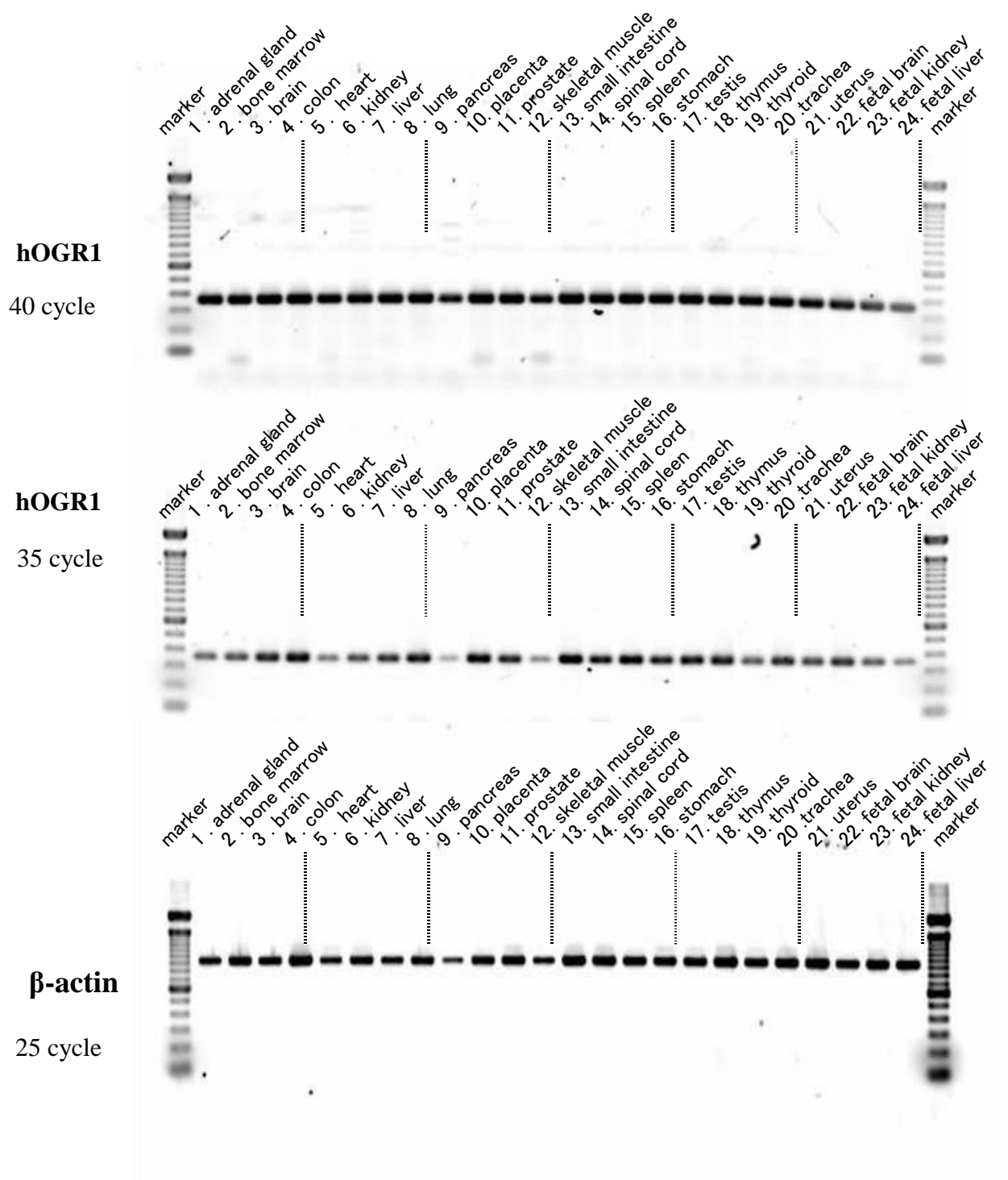
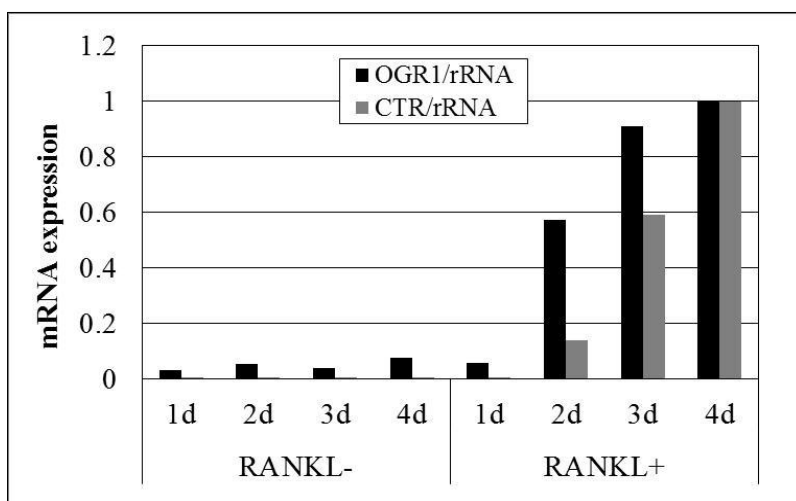


Figure 4. RT-PCR analysis of OGR1 mRNA expression in human tissues

hOGR1 was ubiquitously expressed in human tissues.

a)



b)

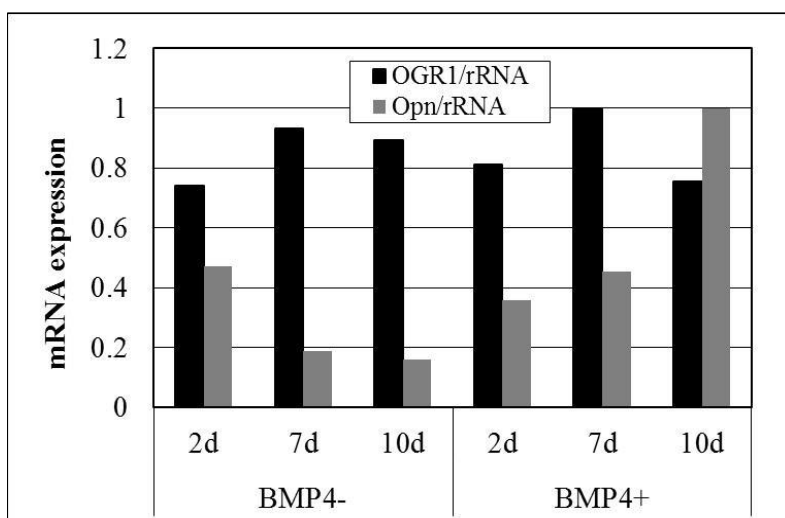


Figure 5. OGR1 expression increased with osteoclast differentiation.

a) OGR1 expression was increased in mouse primary osteoclast differentiation induced by RANKL. Calcitonin receptor (CTR) expression was also increased and used as a positive marker of osteoclast differentiation.

b) OGR1 expression was not increased in mouse primary osteoblast differentiation induced by BMP-4. Osteopontin (Opn) expression increased and was used as a positive marker of osteoblast differentiation. Data are expressed as the relative expression compared to the maximum expression of each target genes.

免疫組織染色によるヒト OGR1 の発現解析では、まず最初にヒト OGR1 特異的な抗体の作製を試みた。ペプチド C 及びペプチド D を混合免疫して得られた抗血清において固定細胞染色で明瞭な OGR1 特異的な染色を確認した (Figure 6)。この抗血清にペプチド D を添加した際に競合阻害が見られたことからペプチド D に対して抗血清の精製を実施した。さらに、精製して得られた抗体を用いセルブロックでの染色を確認した (Figure 7)。なお、一般的にセルブロックでの染色を確認することにより、ホルマリン固定後パラフィン包埋切片での染色条件を確かめることが可能である。

本抗体を用い、ヒト各組織での免疫組織染色を群馬心臓血管センターに依頼した。しかし、群馬心臓血管センターでは検討した何れの組織においても明瞭な染色像は得られなかった (data not shown)。その理由として組織における OGR1 のタンパク質レベルでの発現量が抗体で検出できるほどは高くなかったこと、抗体とサンプルの組み合わせが適していなかったこと等が考えられる。また、同時に実施した群馬心臓血管センターにおけるヒト各組織由来サンプルでの Gene chip 解析では、軟骨細胞由来 mRNA において OGR1 の発現が認められた (data not shown)。なお、同じサンプルを用いた際の Gene chip 解析と免疫染色との結果の違いの理由としては、Gene chip を用いた mRNA レベルの解析のほうが抗体を用いたタンパク質レベルの解析に比べてより検出感度が高かったことが考えられる。このため、免疫組織染色法を用いたヒト組織における詳細なタンパク質レベルでの解析は実施することが出来なかった。

KO マウスを作製した Deltagen 社の報告 (<http://www.deltagen.com/>) では、OGR1 は RT-PCR では調べた全組織でその発現が見られたことから、Figure 4 で示したデータと同様にユビキタスに発現していると考えられた。一方、LacZ 染色では脳、脊髄、眼、胸腺、脳下垂体、前立腺で染色が見られたが、特に脳及び脊髄で強い染色が見られた (Figure 8)。

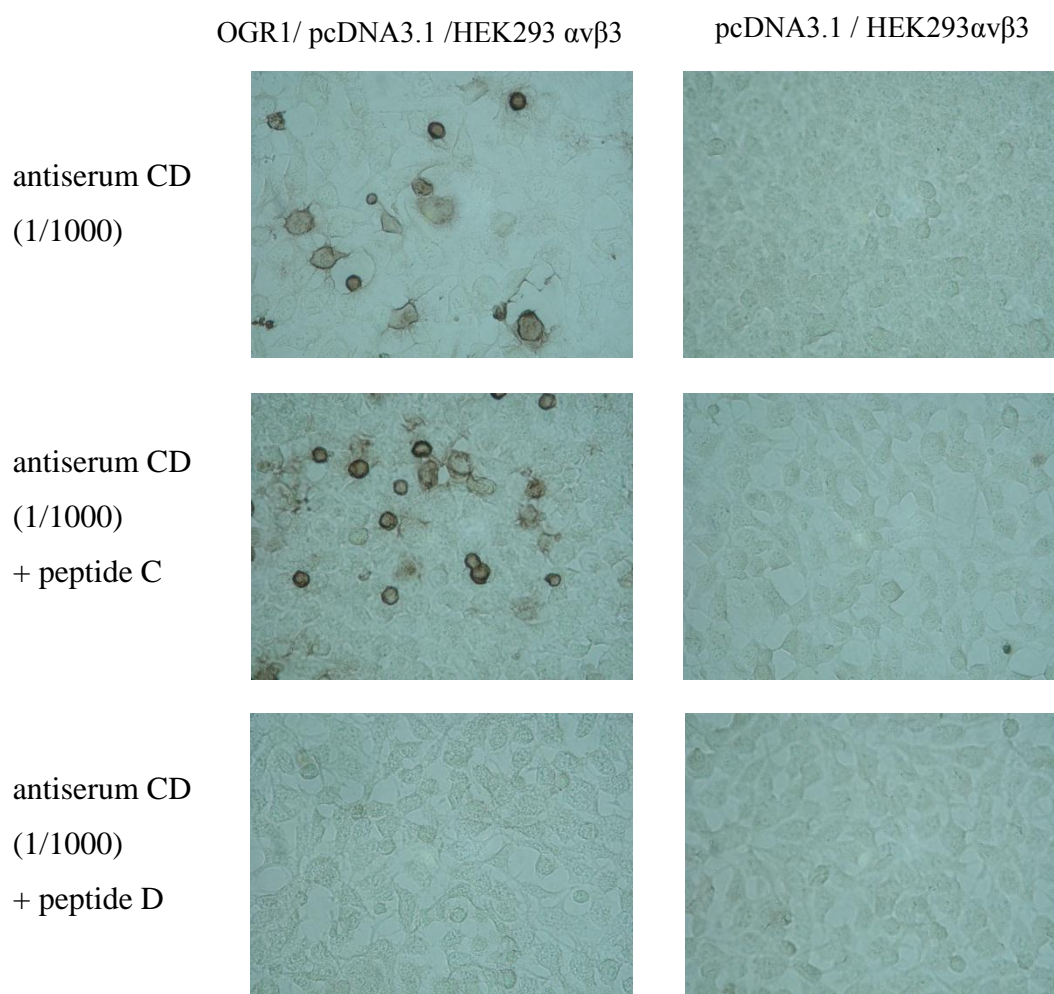


Figure 6. Immunocytochemistry of OGR1 antiserum with peptide C and D in fixed monolayer cells.

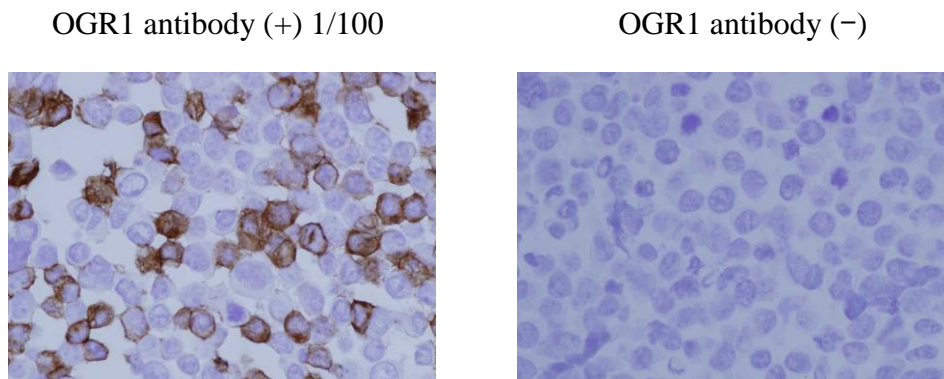


Figure 7. Immunocytochemistry of OGR1 antibody in cell block.

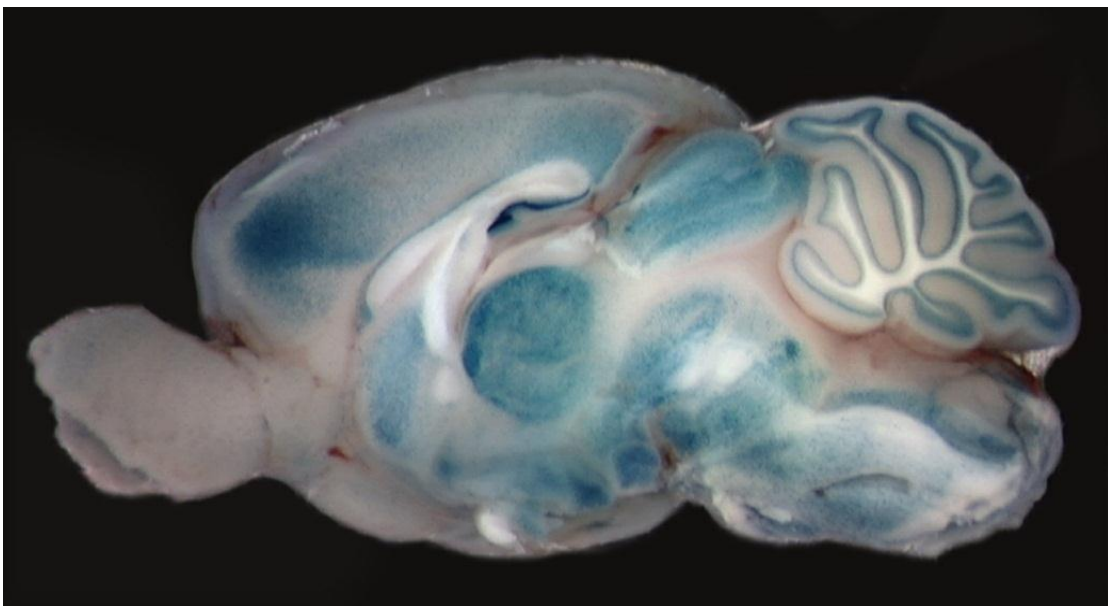


Figure 8. LacZ staining in OGR1 KO mouse brain.
Most striking signals are seen in brain and spinal cord.

2.4 要約

OGR1 は NFAT 活性化を伴う $G\alpha_q$ カップル型の GPCR であり、細胞内シグナルとして IP 及びカルシウムの上昇を引き起こすことが示された。また、OGR1 は広範な組織に発現が見られ、骨芽細胞と破骨細胞にも発現するが、特に破骨細胞においては分化に伴い発現が顕著に上昇することが示された。さらに、脳神経系においても比較的発現が高いことが示された。

3 OGR1 リガンドスクリーニング及びアゴニスト金属の同定

3.1 イントロダクション

GPCR の生理的役割を解析し創薬標的として検討する上で、そのリガンドを同定することは重要な知見をもたらす。OGR1 は当初報告された D-SPC による作用は認められなかったものの、後にプロトンがリガンドである報告 (Ludwig MG et al, 2003) がなされ、私の検討においても再現性が得られた。より生理的な中性領域の pH において OGR1 に作用するリガンド及びアゴニストが存在する可能性を想定してリガンドスクリーニングを実施した。実際、本章で示すように酸性を示さないサンプル (ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓抽出サンプル) においてアゴニスト活性を見出した。また、[Figure 5](#) で示したように OGR1 は破骨細胞の分化に伴い発現が上昇することから、ST-2 等の骨芽細胞の放出する何らかの因子が OGR1 を介して破骨細胞に作用している可能性が示唆された。なお、細胞内シグナル解析の方法として IP アッセイ及びカルシウム Flux アッセイの系を用いてリガンドスクリーニングを行った。さらに、上記サンプルからアゴニスト活性物質をカラム等を用いて精製し、原子吸光分析法を用いて、OGR1 アゴニスト活性を持つ金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) を同定した。

3.2 材料及び方法

3.2.1 各種安定発現細胞の取得

(1) ヒト及びマウス OGR1 cDNA のクローニング

ヒト OGR1 cDNA のクローニングは、以下のように実施した。すなわち、human spleen cDNA ライブラリーをテンプレートとして、センスプライマーとして 5'-TGTCCTCTACTTCGGCTACCT-3' を、アンチセンスプライマーとして 5'-TCTGGTCCTTGCGGCTCTTCT-3' を用いて PCR により行なった。その後、pcDNA3.1 (-) の Xho I、BamH I サイトに本 cDNA を組み込んだ発現プラスミド pcDNA3.1 (-)/hOGR を常法により作製した。

(2) OGR1 安定発現細胞株

本研究では、各アッセイに適した安定発現株、すなわち FLIPR での測定用には CHO-K1/hOGR1 を、IP アッセイ用には HEK293/hOGR1 を以下の方法により作製した。CHO-K1 細胞株の培養は、CHO 継代用培地 (F-12 Nutrient mixture、GIBCO、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で行った。HEK293 細胞株の培養は HEK 継代用培地 (DMEM、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で行った。継代時は培地を捨て PBS で洗浄後、0.05% もしくは 0.25% Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid (Trypsin-EDTA、GIBCO) を添加して 37°C にて細胞を剥離し継代用培地を添加した後、900 r.p.m. で 3 分間の遠心分離を行った。上清除去後、継代用培地を添加して細胞懸濁液を調製した。

トランスフェクションは、当日 70% 程度の密度になるように、トランスフェクション前日に回収した CHO-K1 細胞懸濁液は CHO トランスフェクション用培地 (F-12 Nutrient Mixture、10% FBS) で、HEK293 細胞懸濁液は HEK トラン

スフェクション用培地 (DMEM、10% FBS) で 75 cm² フラスコに播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。翌日、pcDNA3.1 (-)/hOGR1 を以下に示す方法で CHO-K1 及び HEK293 細胞株に導入した。すなわち、滅菌済みエッペンチューブに Opti-MEM I を 500 µl 分注後、pcDNA3.1 (-)/hOGR 8 µg、Plus-reagent 80 µl を加えた後、軽くピペッティングを行い、室温で 15 分間静置した。その後、Lipofectamine reagent 20 µl の入った Opti-MEM I 500 µl と混合し、室温で 15 分間静置後、全量を Opti-MEM I 4 ml で 1 回洗浄した後、Opti-MEM I 4 ml に置換した CHO-K1 細胞に添加した。37°C、5% CO₂ 条件下で、4 時間の培養後に培地をトランスフェクション用培地 15 ml に交換した。トランスフェクションの翌日から、CHO 選択培地 (F-12 Nutrient Mixture、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin、400 µg/ml G418、Invitrogen)、もしくは HEK 選択培地 (DMEM、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin、400 µg/ml G418) で培養し、1 - 2 週間後、生育してくる細胞、すなわちヒト OGR1 遺伝子を安定に発現していると予想される形質転換体のヘテロサスペンションを、0.2 個/well、1 個/well、5 個/well の濃度で 96 穴プレートに播種した。10 - 14 日後、1 個/well で生育している株について 24 穴プレート、12 穴プレート、6 穴プレート、細胞培養用 25 cm² フラスコ、細胞培養用 75 cm² フラスコと、培養スケールを徐々に拡大して継代培養を実施した。

3.2.2 リガンドスクリーニング

(1) 骨関連細胞の培養及び培養上清の回収

マウス間質細胞由来骨芽細胞株 (ST-2) の培養は、継代用培地 (RPMI 1640、GIBCO、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で行った。マウス頭骨冠由来細胞株 (MC3T3-E1)、及びヒト骨肉腫由来細胞 (MG63) の培養は、継代用培地 (α -MEM、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で行った。継代時は培地を捨て PBS で洗浄後、0.05% もしくは 0.25% Trypsin-EDTA を添加して、37°C にて細胞を剥離し継代用培地を添加した後、900 r.p.m. で 3 分間の遠心分離を行った。上清除去後、継代用培地を添加して細胞懸濁液を調製し播種した。ST-2 及び MG63 の分化誘導時にはコンフルエントまで細胞を培養した後、分化用培地 (α -MEM、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) に hBMP-4 (R&D systems) を終濃度が 10 ng/ml になるよう添加した培地に交換し、37°C、5% CO₂ 条件下で 3 日間の分化誘導を行った。各々の細胞について、フェノールレッドフリーの α -MEM に培地交換を行い、上清を 24 時間後に回収し、無血清培養上清 (フェノールレッドフリー) としてサンプル調製に供した。初代培養細胞であるラット骨髓細胞、ラット頭蓋骨由来骨芽細胞、及びブタ軟骨細胞はホクドーより購入した。各々の細胞に添付されたフェノールレッドフリーの培養用培地を回収し、血清培養上清 (フェノールレッドフリー) として同様にサンプル調製に供した。また、精製時に用いた ST-2 細胞培養上清を得るための大量培養は北山ラベス (株) に依頼した。

(2) 動物細胞培養上清を用いたサンプル調製

無血清培養上清を用いたサンプル調製

ST-2、MC3T3-E1、及びMG63の無血清培養上清（フェノールレッドフリー）500 ml に TFA (5 ml) を添加し、0.22 μ m PVDF フィルター（Millipore）でろ過後、得られたろ液をサンプル調製に使用した。ここまでの操作は氷水中で行った。ろ液はタンパク質精製用 HPLC (BioCad 700E、Applied Biosystems、流速 10 ml/分、UV 214 and 280 nm 検出) を用いて Oasis HLB カラム (Waters、10 mm I.D.×100 mm) にチャージし、10% CH₃CN-0.1% TFA (約 118 ml) でカラム洗浄後、80%CH₃CN - 0.1% TFA (約 79 ml) で溶出した。溶出液はフラクションコレクター (SF-2120、ADVANTEC) を用いて、5 ml ずつ分画した。UV クロマトグラムでピークが見られたフラクション 2、3 を混合 (10 ml) し、4°C で透析 (透析膜: RC 透析チューブポア 7、分画分子量 1,000、4.6 ml/cm、スペクトラム社) を行った。透析液には 40% CH₃CN - 0.1% TFA (1 L) を用い、1 日の透析後、新しい透析液に交換し、さらに 2 日間の透析を行った。回収したサンプルは、遠心エバポレータで濃縮乾固した。サンプルは 5% CH₃CN - 0.1% TFA (10 ml) に再溶解後、1.5 ml シリコナイズドチューブ (アシスト) 20 本に分注し、遠心エバポレータにて濃縮乾固後、アッセイ用サンプルとした。

血清培養上清を用いたサンプル調製

ラット骨髄細胞、ラット頭蓋骨由来骨芽細胞、及びブタ軟骨細胞の血清培養上清（フェノールレッドフリー）についても、無血清培養上清と同様にろ過、Oasis HLB カラム精製、透析、濃縮乾固を行い、続いて以下のように除タンパク質処理を行った。サンプルを 40% CH₃CN - 0.1% TFA (5 ml) に再溶解後、セントリプラス YM-50 (Millipore) に移し、遠心操作 (3,000×g、1 - 1.5 時間、4°C) を実

施した。通過液を回収し、1.5 ml シリコナイズドチューブ 20 本に分注し、遠心エバポレータにて濃縮乾固後、アッセイ用サンプルとした。

(3) IP アッセイ

アッセイ前日、96 穴プレート poly-D-Lysine cellware 96-well plate (No.356461, BECTON DICKINSON) に HEK293/hOGR1 細胞、あるいは HEK293 細胞を 5×10^4 個/well で播種し、数時間の培養により細胞を接着させた。イノシトールフリーの DMEM 培地 (DMEM Inositol free、細胞化学研究所) に透析済み FBS (JHR Biosciences) を 10%、及び L-Glutamine (GIBCO) を終濃度 2 mM になるように添加した培地を調製した。さらに myo- ^3H -inositol (TRK883、Amersham) を終濃度 1 nCi/ml となるように添加した培地を、細胞を接着させた 96 穴プレートの培地と入れ替え、37°C で一晩培養を継続した。被検化合物は予め血清を含まない 20 mM LiCl 含有の上記培地に溶解し、その培地を培養後の細胞の培地と入れ替えることで、37°C で 2 時間細胞と暴露した。その後、被検化合物溶液を除去し、20 mM ギ酸を 38 μl /well ずつ添加して 4°C で 1 時間以上放置し、細胞を破壊した。予め超純水で 4 倍希釈した RNA binding Ysi (RPNQ0013V beads、Amersham) を 10 μl ずつ分注した白色 96 穴プレートに、上記の細胞溶解液 35 μl ずつを添加して、攪拌後、遮光して室温で一晩静置した。翌日、トップカウンタにて放射活性を測定した。

結果は、各 well のカウント (Counts per minutes、CPM) の平均値、もしくはその値を化合物を含まない well (すなわち未刺激群であり、以降は none と

表記する) の平均値でさらに割った値を算出し、none の何倍に変化したかを示す値を fold increase として表した。

(4) カルシウム Flux アッセイ

発光タンパク質であるエクオリンを細胞に発現させ、細胞内カルシウム濃度変動を測定した。エクオリンとその基質であるセレンテラジンが複合体を形成し、カルシウムイオンと反応することでカルシウム濃度の測定が可能である。

トランスフェクション前日に回収した CHO-K1 細胞懸濁液をトランスフェクション用培地で 4×10^5 /ml に希釈し、直径 15 cm シャーレに 20 ml の細胞懸濁液を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。翌日、pcDNA3.1 (-)/hOGR を以下に示す方法で CHO-K1 細胞株に導入した。滅菌済みエッペンチューブに Opti-MEM I 500 μ l を分注後、Lipofectamine 2000 reagent 60 μ l を加えて軽くピペッティングを行い、室温で 5 分静置した。その後、mt-AEQ 10 μ g、pcDNA3.1 (-)/hOGR 10 μ g、もしくは pcDNA3.1 (-) の入った Opti-MEM I 500 μ l と混合し、室温で 20 分間静置後、CHO-K1 細胞に添加して、37°C、5% CO₂ 条件下で一晩培養した。

その後、細胞を PBS 15 ml で洗浄後、0.05% Trypsin-EDTA 2 ml にて細胞を剥離し、エクオリンアッセイバッファー (200 mM Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS、14065-056、GIBCO)、25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic

acid (HEPES、pH 7.4、Dojindo)、0.1% bovine serum albumin (BSA、SIGMA)) を 8 ml 添加後、遠心して細胞を回収した。アッセイバッファー 2 ml に懸濁した細胞に、終濃度 2.5 μM となるようにセレンテラジン h (C-6780、Molecular Probe) を加え、アルミホイルで包んで遮光し、室温で 2 時間攪拌しながらセレンテラジン h をロードした。その後、さらにアッセイバッファーを 8 ml 加え、セルストレイナーを通して細胞塊を取り除いた。反応は、白色 96 穴プレート上にて、1 well あたり 100 μl で行なった。被検化合物は、アッセイバッファーに溶解してプレート 1 well あたり 50 μl ずつ分注し、ルミノメーター (Miro Lumat Plus LB96V、Berthold Technologies) にセットした。細胞は、ルミノメーター付属のインジェクターにて 50 μl ずつインジェクトし、30 秒間にわたって発光をスキャン測定した。

3.2.3 アゴニスト活性物質の精製

(1) ST-2 無血清細胞培養上清からの活性画分の精製

未分化の ST-2 無血清培養上清 (フェノールレッドフリー) 1L に 10 ml TFA (Trifluoroacetic Acid) を添加し、0.22 μm PVDF フィルターでろ過後、得られたろ液を精製に使用した。ここまでの操作は氷水中で行った。MeOH (10 ml) でコンディショニング、超純水 (10 ml) で平衡化した Oasis HLB cartridge (Waters, 1g/20cc LP) 10 本に、ろ液を 100 ml ずつチャージした。10% CH_3CN - 0.1% TFA (10 ml \times 2) で洗浄後、80% CH_3CN - 0.1% TFA (10 ml \times 2) で溶出し、それぞれの溶出液を混合した。その溶出液 (200 ml) を 4 $^{\circ}\text{C}$ で透析 (透析膜: RC 透析チューブポア 7、分画分子量 1,000、4.6 ml/cm) を行った。溶出液 200 ml を 50 ml \times 4

つに分け、透析液には 40% CH₃CN - 0.1% TFA (5 L×4) を用い、1 日透析後、新しい透析液に交換し、さらに 2 日間の透析を行った。回収したサンプルを混合し、遠心エバポレータにて濃縮乾固することにより、活性画分 3 (active fraction 3、active fr. 3) を得た (Figure 9)。

この active fr. 3 について、逆相 High performance liquid chromatography (HPLC) による分画を行った。HPLC 装置には HP1100 (Agilent Technologies) を用い、カラムには TSKgel ODS-80Ts (東ソー、4.6 mm I.D.×150 mm、with pre-column) を使用した。サンプルを 5% CH₃CN - 0.1% TFA (6 ml) に溶解後、HPLC カラムに 1.3 ml×4 回注入し、2 ml ずつ分画した。同じ保持時間の画分をそれぞれ 1 つにまとめて 8 ml とし、fr. 1 - 23 を 1.5 ml シリコナイズドチューブ 1 ml×2 本に分注し、遠心エバポレータにて濃縮乾固後、IP アッセイに供した (Figure 12 b)。IP アッセイにて活性が見られた fr. 2 - 3 (保持時間 2 - 6 分) の溶出画分を active fr. 4 とし、fr. 11 - 12 (保持時間 20 - 24 分) の溶出画分を active fr. 5 とした (Figure 14)。Active fr. 4 及び 5 (各々 12 ml) を遠心エバポレータにて濃縮乾固後、原子吸光分析サンプルとした (Table 1)。

(2) ブタ膵臓からの活性画分の精製

ブタ膵臓 1 kg 相当を細断し、ビーカー 10 本にそれぞれ 200 ml の超純水を加え、10 分間沸騰水中で加熱した。氷冷後、ミキサーで破碎した後、最終濃度が 1 M となるように酢酸を添加し、遠心 (15,000×g、30 分、4°C) 後、上清を取得した。その上清に最終濃度 0.1% となるよう TFA を添加し、遠心 (15,000×g、

30分、4°C) 後、上清を取得した。MeOH (50 ml) でコンディショニング、超純水 (50 ml) で平衡化した Oasis HLB cartridge (6g/35 cc LP、Waters) 10 本に、その上清を 100 ml ずつチャージした。10% CH₃CN - 0.1% TFA (40 ml) で洗浄後、80% CH₃CN - 0.1% TFA (30 ml×2) で溶出し、各々の溶出液を混合した。溶出液は遠心エバポレータ (SAVANT SPEEDVAC Plus SC210A、サーモエレクトロン) にて濃縮乾固し、得られたサンプルは逆相 HPLC による分画を行った。HPLC 装置には HP1100 (Agilent Technologies) を用い、カラムには TSKgel ODS-80Ts (東ソー、4.6 mm I.D.×150 mm) を使用した。サンプルを 5% CH₃CN - 0.1% TFA(30 ml) に溶解後、遠心 (3,000 rpm、5分、4°C) し、上清を 0.45 μm Millex-HV filter (Milipore) に通した後、得られた上清を HPLC カラムに 1.5 ml×7 回注入し、5 ml ずつ分画した。同じ保持時間の画分を各々1つにまとめて 35 ml とし、fr. 4-6 を遠心エバポレータにて濃縮乾固した (Figure 9)。

得られたサンプルを 30% CH₃CN - 0.1% TFA (5 ml) に溶解後、遠心 (5,000 rpm、2分、4°C) し、上清を 0.45μm Millex-HV filter に通した後、ゲルろ過を行った。ゲルろ過にはタンパク質分離精製装置 (AKTAPurifier, Amersham Biosciences、溶出液 30% CH₃CN - 0.1% TFA、流速 1 ml/分、UV 215 and 280nm 検出) を用い、ゲルろ過カラムには Superdex Peptide HR 10/30A (Amersham Biosciences、10 mm I.D.×300 mm) を使用した。ろ液をゲルろ過カラムに 0.2 ml×10 回注入し、フラクションコレクターで 1 ml ずつ分画した。同じ保持時間の画分を各々1つにまとめて 10 ml とし、このうち fr. 11-16 を 1.5 ml シリコナイズドチューブに 1 ml ずつ分注し、遠心エバポレータにて濃縮乾固後、IP アッセイに供した (Figure 11)。

IP アッセイにて活性が見られた fr.13 (溶出液量 17 - 18 ml) を active fr. 1 とした (Figure 12 a)。Active fr. 1 (残りの 9 ml) を遠心エバポレータにて濃縮乾固し、90% CH₃CN (0.5 ml) に溶解後、フラクションコレクター (SF-2120、ADVANTEC) を接続した HPLC (HP1100、Agilent Technologies、溶出液 CH₃CN/H₂O - 20 mM HCOONH₄ - HCOOH (pH 3.0)、gradient (90% - 10分 - 90% - 50分 - 50% CH₃CN)、流速 1 ml/分、UV 254 nm) にて、1 ml ずつ分画した。カラムには Atlantis HILIC Silica (Waters、4.6 mm I.D.×150 mm) を使用した。Fr. 27 - 37 を 1.5 ml シリコナイズドチューブに 0.25 ml 分注し、遠心エバポレータで濃縮乾固後、IP アッセイに供した。IP アッセイで活性が見られた fr. 33 (保持時間 33 - 34 分) を active fr. 2 とした (Figure 13)。Active fr. 2 (残りの 0.75 ml) を遠心エバポレータにて濃縮乾固し、原子吸光分析サンプルとした (Table 1)。

(3) 原子吸光分析

原子吸光分析は東レリサーチセンターに依頼した。分析装置には黒鉛炉加熱原子吸光分析 (日立、Z5700) を使用した。分析は以下のように行った。サンプルチューブに純水 100 µl を封入し、ハンドシェイクで攪拌した後、超音波槽に 5 分間浸した。この試料溶液から 80 µl を取り、1% 硝酸 (v/v) で 400 µl に希釈した。この試料溶液を黒鉛炉加熱吸光分析法により、金属元素 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) の分析を行った (Table 1)。

3.3 結果と考察

3.3.1 リガンドスクリーニング

リガンドスクリーニングにおける精製のフローを [Figure 9](#) に記載する。OGR1 は [Figure 3](#) で示したように Gαq カップル型と想定されたことより、細胞内シグナル解析の方法として IP アッセイ及びカルシウム Flux アッセイの系を用いてリガンドスクリーニングを行った。細胞培養上清サンプル及びブタ臓器抽出サンプルについてアッセイを行った結果、ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓抽出サンプルに活性が認められた。各々の活性サンプルより、フローに記載した精製を実施し、OGR1 アゴニスト活性を持つ金属を同定した。

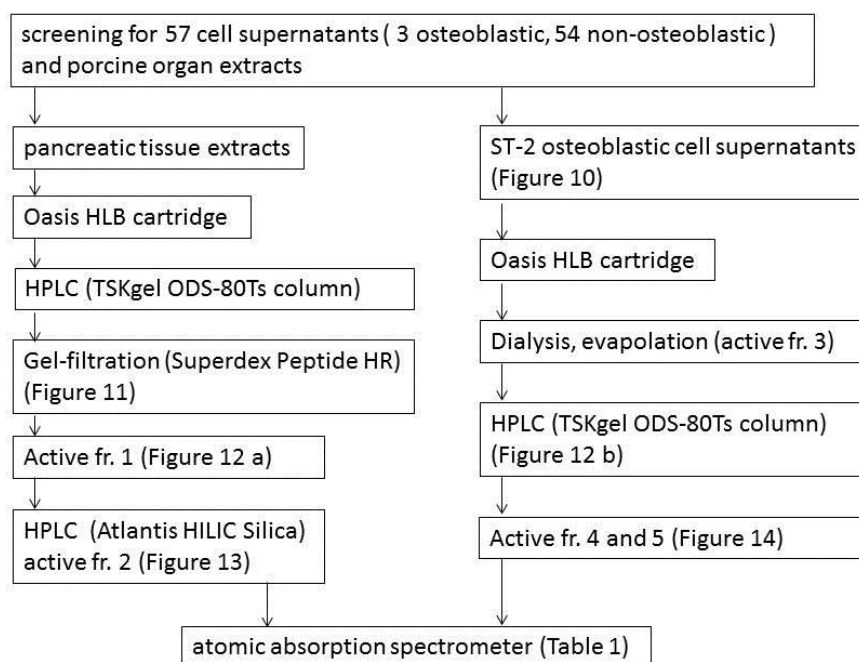


Figure 9. A schematic way of agonist screening and purification of OGR1 agonistic metals from ST-2 osteoblastic cell supernatants and pancreatic tissue extracts.

上記細胞培養上清サンプル及びブタ臓器抽出サンプルを用いたリガンドスクリーニングに加えて生理活性物質ライブラリーでのスクリーニングを実施し、約 500 化合物中 70 のヒット化合物 (活性化 30%以上) を得た。その内、内在性に発現する受容体のアゴニスト及び非特異的に IP 蓄積を誘導すると思われる化合物を除いた 11 化合物について再現性を求めたところ、4 化合物が最終ヒットとして残った。この内、比較的活性の強い 2 化合物 (TyrphostinA9、Emodin) について検討を行った。しかしながら、両化合物とも添加可能な最高濃度でも活性が頭打ちにならずに EC₅₀ を算出するためのシグモイド曲線が確認できなかった。さらに、両化合物とも酸性の性質を有しており低 pH による影響と化合物の活性とが分離できなかったため、これ以上の検討は中止とした。

細胞培養上清サンプル

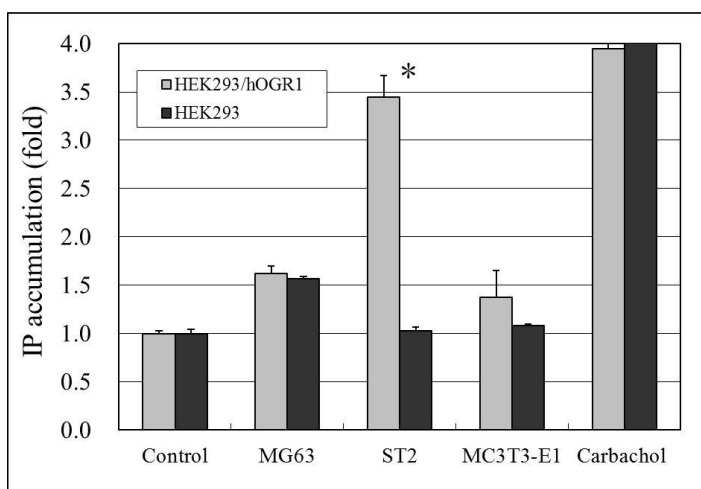
細胞培養上清サンプルでは、サンプル 54 種について IP アッセイを行ったところ、再現性のあるヒットが 4 種存在したが、明確な特異性を認めることは出来なかった。一方、骨関連細胞株の培養上清サンプルでは、ST-2 骨芽細胞において活性を認めたが、MG63 及び MC3T3-E1 ではアゴニスト活性は見られなかった (Figure 10 a)。また、ST-2 骨芽細胞に加えて初代骨関連培養細胞 (ラット骨髄、ブタ軟骨、ラット頭蓋骨由来骨芽細胞) 培養上清サンプルにおいても活性を認め、再現性、特異性、及び濃度依存性を確認した (Figure 10 b)。さらに、カルシウム Flux アッセイにおいても同様に ST-2 骨芽細胞及び初代骨関連培養細

胞の培養上清サンプルによるアゴニスト活性を確認した。これらの活性は ST-2 の培養上清で最も強かったため、ST-2 培養上清についてアゴニスト活性物質の精製を実施することとした。

ブタ臓器抽出サンプル

ブタ臓器抽出サンプルは、各種臓器 (脳、心臓、腎臓、膵臓、脾臓、肝臓、肺、胃、小腸、精巣、卵巣、胸腺、血液、血清) について、「熱及びアセトン処理あり」、「熱処理あり」、「熱処理なし」のサンプルを作製した。これらサンプルについて IP アッセイを行ったところ、複数の臓器 (心臓、腎臓、膵臓、脾臓、肝臓、肺、胃、精巣、血液) 由来サンプルで OGR1 アゴニスト活性を認めた。そのうち、「熱及びアセトン処理あり」サンプルにおいても比較的活性の高かった膵臓サンプルについて [3.2.3\(2\)](#) で記載した方法で精製を実施した。その結果、ゲルろ過精製において分画した fr. 11 - 16 のうち、fr. 13 に強い活性を認めた ([Figure 11](#))。

a)



b)

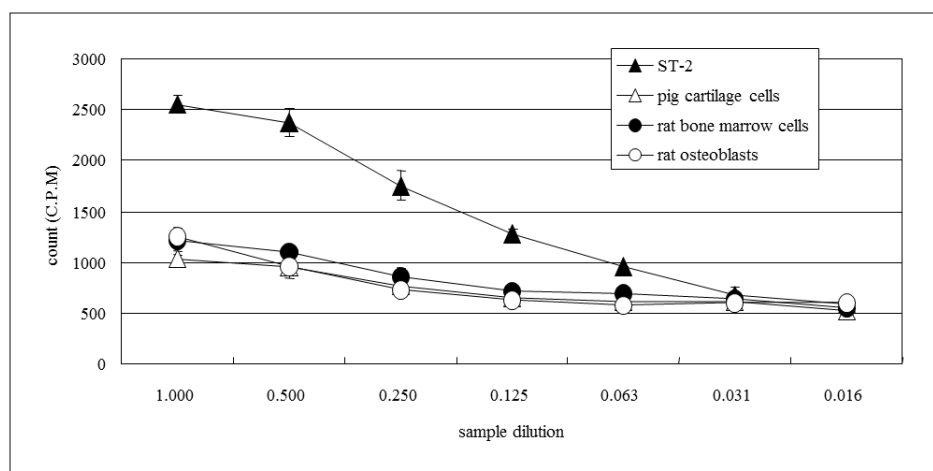


Figure 10. OGR1 agonistic activity of osteoblastic cell line and primary culture supernatants.

a) IP accumulation was enhanced in an hOGR1 expressed cell line when ST-2 supernatants were added. MG63 is a human osteosarcoma cell line. ST2 is a mouse bone marrow stroma cell line. MC3T3-E1 is a mouse calvaria preosteoblast cell line. Calbacol was added in 1 mM and used as a positive control of IP accumulation. Data are means divided by each control. \pm SE, $N=4$, $*p<0.0001$.

b) IP accumulation was enhanced in hOGR1 expressed with ST-2, pig cartilage cells, rat bone marrow cells and rat osteoblasts supernatants in a dose-dependent manner. \pm SD $N=2$ Data are means divided by each control.

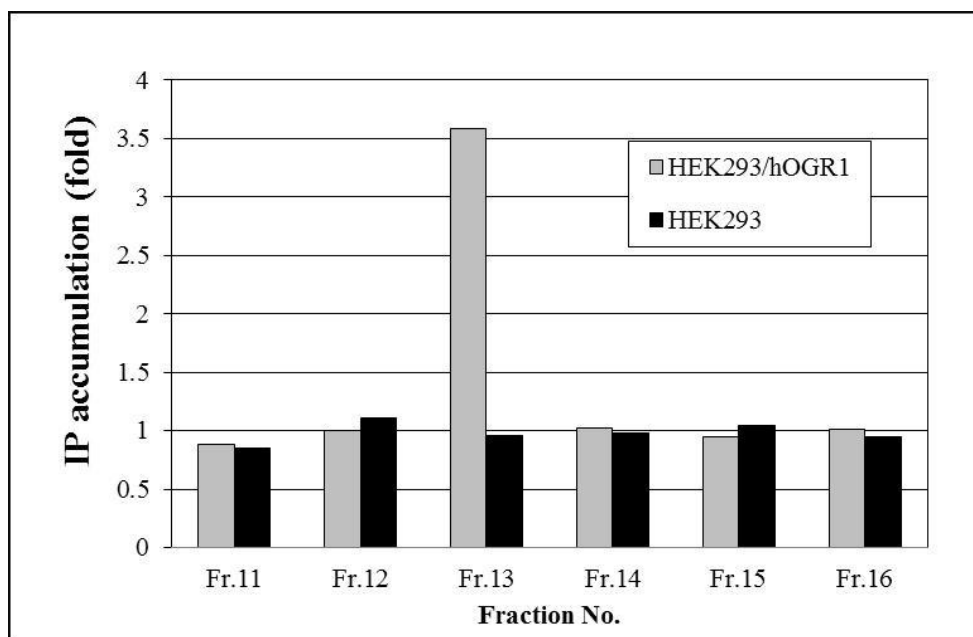


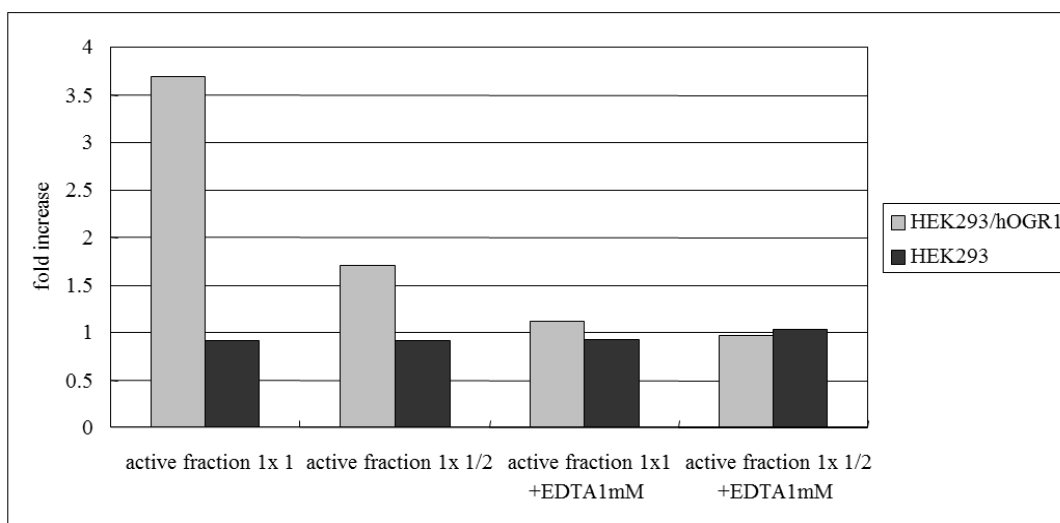
Figure 11. OGR1 agonistic activity of gel-filtered porcine pancreas fractions.

IP accumulation was enhanced in the hOGR1 expressed cell line by Fr. 13 in a gel-filtered porcine pancreas extract sample. This fraction was prepared from a boiled and homogenized porcine pancreas sample. Homogenized supernatants were purified using an Oasis HLB cartridge and a TSKgel column and fractionated Superdex gel filtration column. Data are means divided by each control. $N=2$.

3.3.2 アゴニスト活性物質の精製及び同定

アゴニスト活性物質を同定するため、ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓抽出サンプルにおいて各々精製を実施した。その過程においてゲルろ過処理時でのみ活性が認められる物質の分子量が小さいこと、及び 1 mM EDTA の添加で活性が消失するという特徴的な物性により、活性画分に含まれる物質は金属性である可能性が示された (Figure 12)。

a)



b)

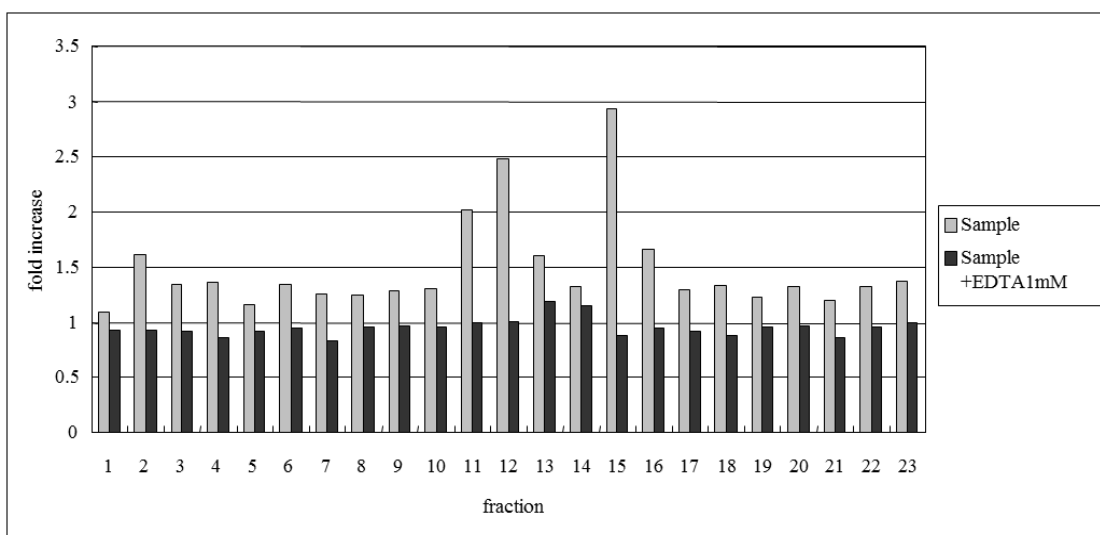


Figure 12. Inhibitory effects of EDTA on OGR1 agonistic samples.

a) Inhibitory effects of EDTA on gel-filtered porcine active fraction.

b) Inhibitory effects of EDTA on ST-2 cell serum-free medium fractions.

Data are means divided by each control. $N=2$.

一方、ブタ膵臓抽出サンプルと ST-2 骨芽細胞培養上清のアゴニスト活性画分の精製を進めたところ、前者からは active fr. 2 (Figure 13)、後者からは active fr. 4 及び 5 (Figure 14) をより精製度がより進んだサンプルとして得た。最終的に、各々の活性画分に含まれる金属を原子吸光分析にて解析した。その結果、OGR1 アゴニスト活性物質として金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) 及びその濃度を同定した (Table 1)。

本研究において、ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓抽出サンプルから新規に OGR1 アゴニスト活性物質として金属を同定した。ST-2 骨芽細胞培養上清サンプル作製時の培地等の材料にはフリーの金属イオンが含まれていないことから、同定されたアゴニスト金属はタンパクやコファクター等と複合体を形成していた金属が由来である可能性が考えられる。また、OGR1 が破骨細胞分化に伴って発現が上昇すること (Figure 5a)、骨芽細胞培養上清中に金属が含まれていたことと考え合わせると、これら金属が破骨細胞、骨芽細胞のカップリングにおいて何らかの機能を持つ可能性が考えられる。骨芽細胞由来の RANKL が破骨前駆細胞上の RANK に作用して分化を誘導する機構から推察して、骨芽細胞が何らかの形でアゴニスト金属を放出し、破骨細胞に発現する OGR1 を介して破骨細胞の機能に作用する可能性も考えられる。また、Figure 4 に示したように OGR1 は膵臓にも発現していることから、膵臓内でアゴニスト金属による OGR1 を介したシグナルが何らかの役割を果たしている可能性も推察される。実際に OGR1 が膵 β 細胞におけるインスリン分泌に関わるとの報告もある (Nakakura T et al, 2012; Mogi C et al, 2014)。

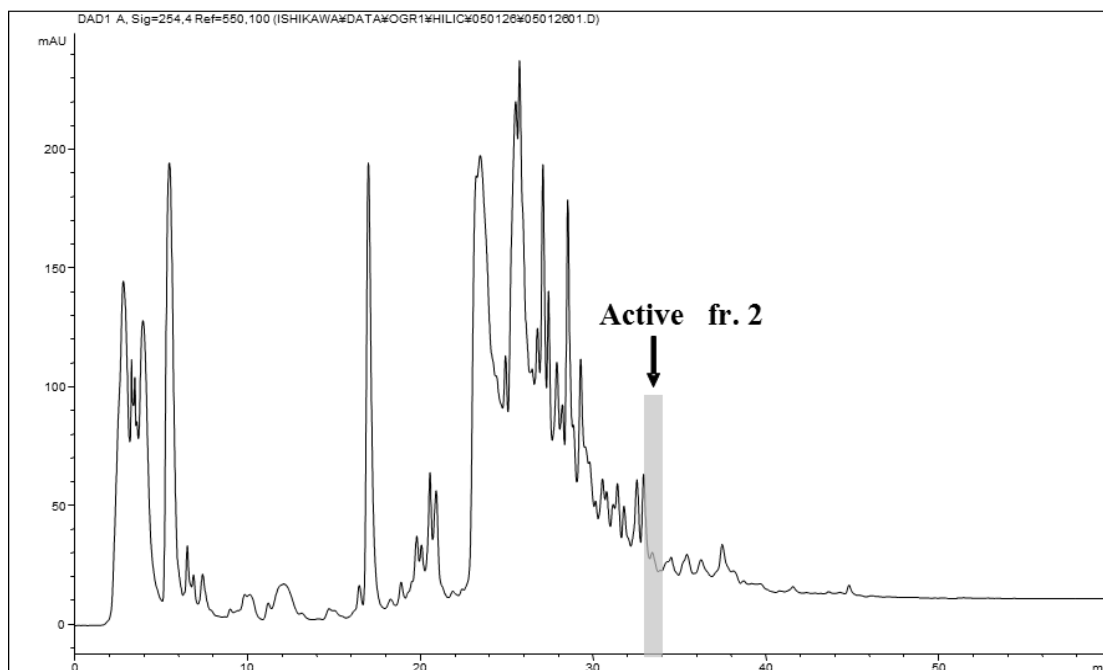


Figure 13. HPLC profile of the gel-filtered porcine pancreas active fraction 2 monitored at 254 nm.

Active fraction 2 (fr. 2) was purified from active fraction 1 under the following conditions. Column: Atlantis HILIC Silica (Waters) 4.6 mm × 150 mm; flow rate: 1 ml/min, eluent: CH₃CN / H₂O - 20 mM HCOONH₄ - HCOOH (pH 3.0) gradient (90% - 10 min - 90% - 50 min - 50% CH₃CN)

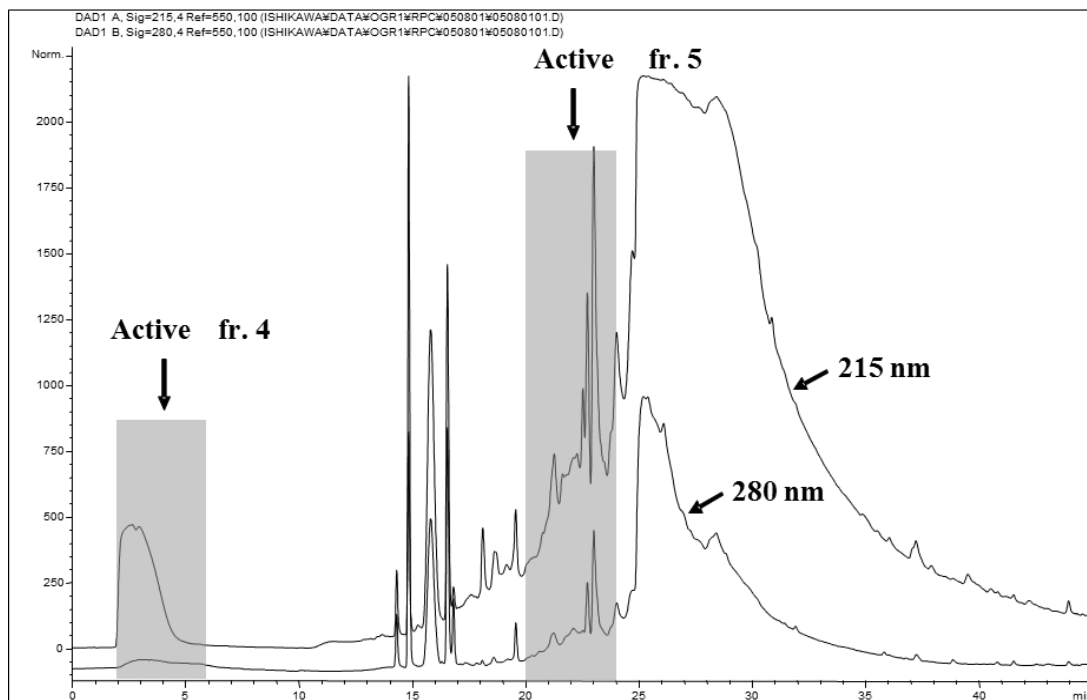


Figure 14. HPLC profile of the ST-2 cell supernatants active fraction 4 and 5 monitored at 215 nm and 280 nm.

Active fraction 4 and 5 (fr. 4 and 5) were purified from active fraction 3 under the following conditions. Column: TSKgel ODS-80Ts (TOSOH) 4.6 mm ×150 mm; flow rate: 1 ml/min, eluent: CH₃CN / H₂O - 0.1% TFA gradient (5% - 5 min - 5% - 40 min - 95% CH₃CN)

Table 1. OGR1 agonistic metal, Fe, Zn, Co, Ni and Mn concentrations (μM) in the active fractions (4, 5 and 2) determined by atomic absorption spectrometry.

Fr.	Fe	Zn	Co	Ni	Mn
4 (ST-2)	40.3	24.2	0.065	2.28	0.72
5 (ST-2)	11.9	0.019	0.048	0.022	0.0075
2 (pancreas)	n.d.	30.6	0.017	44.3	0.51

ST-2 active fractions 4 and 5 were prepared from serum-free supernatants using an Oasis HLB cartridge and a fractionated TSKgel column. The active fractions of the four trials were combined and applied to an atomic absorption spectrometer to analyze metal ion contents. Pancreas active fraction 2 was prepared using an Oasis HLB cartridge and a TSKgel column and Superdex gel filtration column. The active fractions were combined with 10 trials and applied to an HILIC Silica column. The active fraction was dried and applied to an atomic absorption spectrometer to analyze metal ion contents. n.d., not detected.

3.4 要約

OGR1 のリガンドスクリーニングを実施し、ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓抽出サンプルにおいてアゴニスト活性を見出した。これらサンプルからアゴニスト活性物質の精製を行い、OGR1 アゴニスト金属として、Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn を同定した。

4 OGR1 アゴニスト金属における作用解析

4.1 イントロダクション

[Table 1](#) で同定した OGR1 アゴニスト活性を持つ金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) に関して、より詳細な解析を実施した。各種金属の活性の比較及び濃度依存性を評価した。また、OGR1 不活性変異体及び OGR1 KO マウス由来破骨細胞におけるシグナルを解析した。インターナリゼーションによる解析も試みた。さらに、活性が強く特異性の高い Ni を用いてアンタゴニスト HTS を実施し、アンタゴニスト化合物を取得した。

4.2 材料及び方法

4.2.1 OGR1 アゴニスト金属を用いた解析

(1) 金属サンプル調製

[Table 1](#) で同定した金属を含む以下の金属について括弧内の塩を用いアゴニスト活性を評価するためのサンプルを調製した。Fe (FeCl₂、FeCl₃、FeSO₄)、Zn (ZnCl₂)、Co (CoCl₂)、Mn (MnCl₂)、Ni (NiSO₄)、Cu (CuSO₄)、V (VCl₃)、Cr (CrCl₃)、Mo (MoCl₅)、Sn (SnCl₂)、Se (SeCl₂)、Sr (SrCl₂)、Al (AlCl₃)、Ca (CaCl₂)、K (KCl)、Mg (MgSO₄) の金属についてアッセイバッファーに溶解した。

(2) FLIPR を用いたアゴニスト活性評価

FLIPR 384 (Molecular Devices 社製) での測定には、384 穴プレート (CORNING、No.3712) に CHO-K1/hOGR1 を 3,750 個/well となるように播種し 2 日間培養した。タオルペーパー上でプレートをはたいて培地をよく除き、0.2 mM Calucium3 Express (Molecular Devices) 及び 2% Pluronic acid (Molecular probes) を FLIPR アッセイバッファー (200 mM HBSS、0.1 M HEPES、Sigma、H-3375、12 mM Probenecid、Sigma) に希釈したカルシウム 3 溶液を 25 µl/well 添加し、37°C で 1 時間のインキュベーションを実施することで蛍光色素をロードした。アッセイバッファーにて希釈した被検化合物を FLIPR 384 上で 25 µl 添加することで蛍光強度変化による細胞内カルシウム変動を測定した。

4.2.2 OGR1 不活性変異体の作製

ヒト OGR1 不活性変異体は、論文 (Ludwig MG et al, 2003) を参考に実施した。[第二章 3.2.1](#) で作製したヒト OGR1 の 245 番目のアミノ酸 His を Phe に、あるいは 17、20、84、169、269 番目のアミノ酸 His を Phe に置換した変異体 (hOGR1 変異体 1 及び hOGR1 変異体 2) を設計し、PCR 法を用いて定法にて変異を導入した。

4.2.3 OGR1 KO マウス破骨細胞を用いた解析

(1) OGR1 KO マウス

OGR1 KO マウスは Deltagen 社からヘテロマウス (Hetero、He) として購入し (C57BL/6J 背景、系統名: T184)、日本チャールスリバー (株) にて委託繁殖したものを用いた。なお、2 度の戻し交配と同時に受精卵を作製し、凍結保存用とした。

(2) 破骨及び骨芽細胞の培養

マウス初代培養破骨細胞は、マウス大腿骨及び脛骨より骨髓細胞を回収し、継代用培地 (α -MEM、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を実施した。翌日、浮遊細胞画分を回収し、96 穴プレートに $2 - 4 \times 10^6$ cells/well の密度で細胞を播種し、分化用培地 (α -MEM、10% FBS、100 units/ml Penicillin-Streptomycin、40 ng/ml macrophage colony - stimulating factor (M-CSF、R&Dsystems) で 2 日間の培養を実施した。その後、さらに sRANKL (PEPROTECH INC) を終濃度が 50 ng/ml になるよう添加した分化用培地に交換して、3 日間の分化誘導を行った。

マウス初代培養骨芽細胞は、生後 1 日目のマウス頭蓋骨より回収した細胞を分化用培地 (α -MEM、10% FBS、100units/ml Penicillin-Streptomycin) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を実施した。翌日、上記培地に hBMP-4 (R&D systems) を終濃度 10 ng/ml になるよう添加し、14 日間の分化誘導を行った。なお、培地交換は 3 日毎に実施した。

(3) 破骨及び骨芽細胞を用いた IP アッセイ

破骨細胞を用いた IP アッセイでは、マウス大腿骨より回収した骨髓細胞を 96 穴プレートに播種し、上記と同様に破骨細胞の分化を誘導した。骨芽細胞を用いた IP アッセイでは、マウス頭蓋骨より回収した細胞を 96 穴プレートに播種し、上記と同様に骨芽細胞の分化を誘導した。以降のアッセイ方法は[第二章 3.2.2](#) の内容に従った。

4.2.4 OGR1-EGFP を用いたインターナリゼーションアッセイ

(1) OGR1-EGFP 融合タンパク質発現細胞株

pEGFPN1 (CLONTECH laboratories) の BamHI サイトに OGR1 cDNA を組み込んだ pEGFPN1/hOGR1 プラスミドを作製した。pcDNA3.1 (-) /hOGR をテンプレートとし、以下に示すプライマーを用いて PCR を実施し、その結果取得した hOGR1cDNA 断片を pEGFPN1 の BamHI サイトに組み込んだ。

センスプライマー:

5'-pCGCGGATCCCGCCACCATGGGGAACATCACTGCAGACAACTCCTCGATG
-3'

アンチセンスプライマー:

5'-pCGCGGATCCGCGTTGGACGGGCACCCCTTGGGCGGGCTGGGACC-3'

次に、このプラスミドを、HEK293 細胞に Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) により導入した。クローニングは G418 による数週間のセレクション後に 96 穴プレートに播種し、1 個/well で生育している株について拡大して継

代培養を実施した。その後、強い蛍光を発し、かつ細胞増殖の良い細胞を選択して HEK293/hOGR1-EGFP とした。

(2) インターナリゼーションアッセイ

96 穴プレート poly-D-Lysine coated Black Clear-bottom plate (No.356640、BD Falcon) に先述の方法で作製した HEK293/hOGR1-EGFP をコンフルエントのおよそ 70 - 90%程度までに生育させたプレートを用意し、無血清培地 50 μ l/well に置換した。6 時間 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した後、2 倍の濃度で調製したリガンドサンプルを 50 μ l/well 添加し、さらに 45 分間、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。次に、各 well に 100 μ l の 10 μ g/ml Hoechst 33342/マイルドホルム 20 N を添加し、室温 10 分間静置して細胞を固定し、PBS にて 1 回洗浄後、各 well に 100 μ l の PBS を添加後、透明フィルムシールを貼り、測定まで遮光下 4°C で保存した。測定及び解析は InCell Analyzer 1000 (Amersham Biosciences) にてマニュアルに従い行なった。

4.2.5 アンタゴニスト HTS

FLIPR 384 での測定は、[第二章 4.2.1](#) で先述した方法に従った。アンタゴニスト活性の評価には、予め被験物質を well に添加しておき、その後アゴニスト物質 (ここでは NiSO₄ 5 μ M) を添加した際のコントロール、すなわち被験物質非添加 well に対する蛍光強度の低下を指標に行なった。被験物質としては購入化合物ライブラリー 1 mg/ml を終濃度 1/480 で添加した。

4.3 結果と考察

4.3.1 OGR1 アゴニスト金属を用いた解析

Table1 で同定された各種金属元素における活性について IP アッセイを用いて活性の検討を行った結果、全ての金属、すなわち Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn が中性 pH 条件下において OGR1 特異的なアゴニスト活性を有することを確認した (Figure 15)。また、Mn、Ni 及び Co による最大活性は低 pH 刺激による最大活性とほぼ同等であった。

弱い低 pH 刺激条件下においてはこれらの OGR1 アゴニスト金属をさらに添加することで、プロトンとの相加効果を確認した。また、これらアゴニスト金属の活性は 1mM EDTA 添加により抑制された。一方で、同定された OGR1 アゴニスト金属以外の複数の金属での活性も評価したところ、調べた Cu、Al、V、Cr、Mo、Sn、Se、Sr、Ca、K、Mg についてはアゴニスト活性は見出されなかった (data not shown)。

また、OGR1 アンタゴニスト活性の報告されている Cu 及び Zn については、Cu は低 pH 刺激に対して弱いアンタゴニスト活性を示したものの、Zn はアンタゴニスト活性は示さずアゴニスト活性のみを示した (data not shown)。

本研究において、複数の金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) が OGR1 アゴニストとして作用することを見出した。これら OGR1 アゴニスト金属は単独でアゴニストとして作用することから、別の GPCR で報告されたりガンド存在時にのみ作用する Na、Ca、Mg 等のアロステリックモジュレーターとは異なる

(Ananthanarayanan VS et al, 2006)。また、Zn は GPR39 (Holst B et al, 2007) 及び GPR83 (Müller A et al, 2013) に対してもアゴニスト活性を持つことが報告されていることから、Zn を代表とした金属が単独でアゴニストとして生体内で機能を持つ可能性が考えられた。

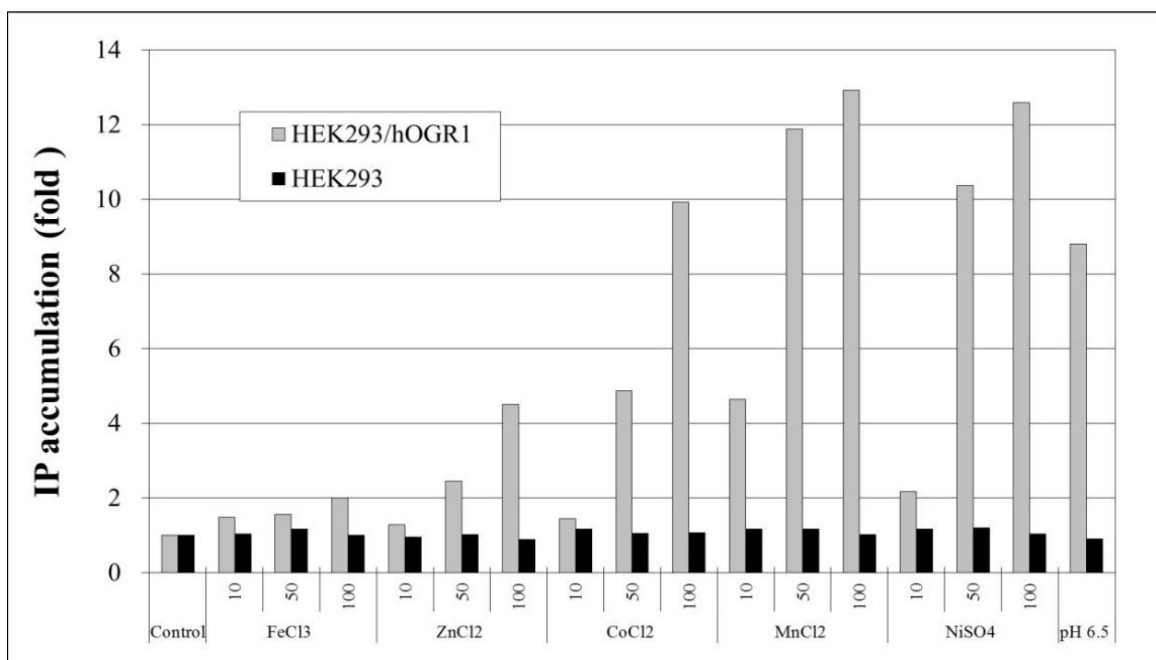


Figure 15. OGR1 specific and dose-dependent activation by metals.

OGR1 agonistic metals enhanced IP accumulation in an OGR1-dependent manner. Metals were added in a μM range. Data are means divided by each controls. $N=2$

さらに、[Figure 15](#) で活性の確認されたアゴニスト金属の中でも特に活性の高かった Mn、Ni、Co について FLIPR を用いたアッセイにおいてシグモイド曲線をプロットした ([Figure 16](#))。各々の金属の 100 μM 添加時の活性を 100% とした際の EC_{50} 値は Mn 約 2 μM 、Ni 約 1 μM 、Co 約 0.5 μM であった。

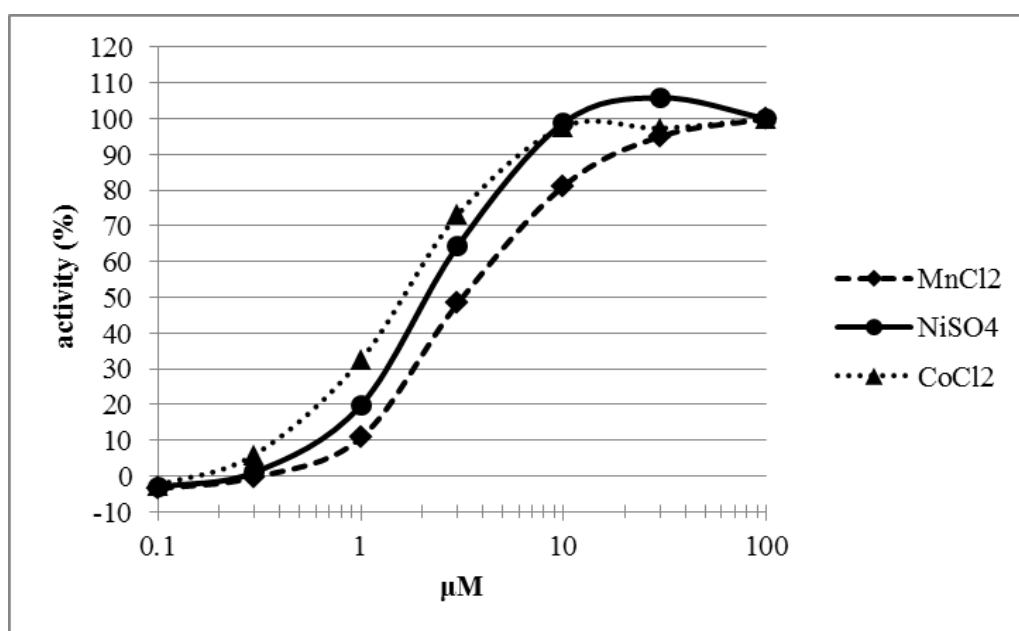


Figure 16. OGR1 agonistic metals sigmoid curve.

Mn, Ni and Co dose-dependently enhanced IP accumulation in an OGR1-dependent manner. Metals were added in a μM range. Data are means divided by each controls. $N=2$

4.3.2 OGR1 不活性変異体を用いた解析

OGR1 に特徴的な His 配列に変異を導入した変異体 (hOGR1 変異体 1 及び変異体 2) において同定した金属による活性を検討した。なお、本変異体ではプロトンによる刺激に対する活性が減弱することが知られている。その結果、本研究で新規に見出した OGR1 アゴニスト活性を有する金属においても低 pH による刺激と同様に両変異体において活性の低下が見られた (Figure 17)。

この結果より、OGR1 アゴニスト金属による活性もプロトンによる活性と同様に OGR1 上の特徴的な His 残基を介していることが示唆された。そのため、生体内においてもプロトンと OGR1 アゴニスト金属が互いに競合して機能している可能性が考えられる。一般的に His 残基は金属イオンの親和性が高いことが知られている (Bornhorst JA et al, 2000; Laganowsky A et al, 2011)。His 残基におけるイミダゾール官能基により Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 及び Co^{2+} 等の金属イオンが配位することが可能となる。OGR1 は中性 pH においては、His 残基間の水素結合により不活性化型の構造をとっており、OGR1 アゴニスト金属が存在すると His 残基間の水素結合に作用して活性化型の構造に変化すると考えられる。また、やや低い pH 領域においてはいくつかの水素結合が残っており、OGR1 アゴニスト金属により、プロトンへの相加的な活性化が起こると考えられる (Zhou L et al, 2013)。なお、本章 4.3.1 に記載したように Cu はアゴニスト活性ではなく、低 pH 条件下において弱いアンタゴニスト活性を示したが、これは His 残基との結合様式や構造変換に対する作用が他のアゴニスト金属と異なるためであると予測される。

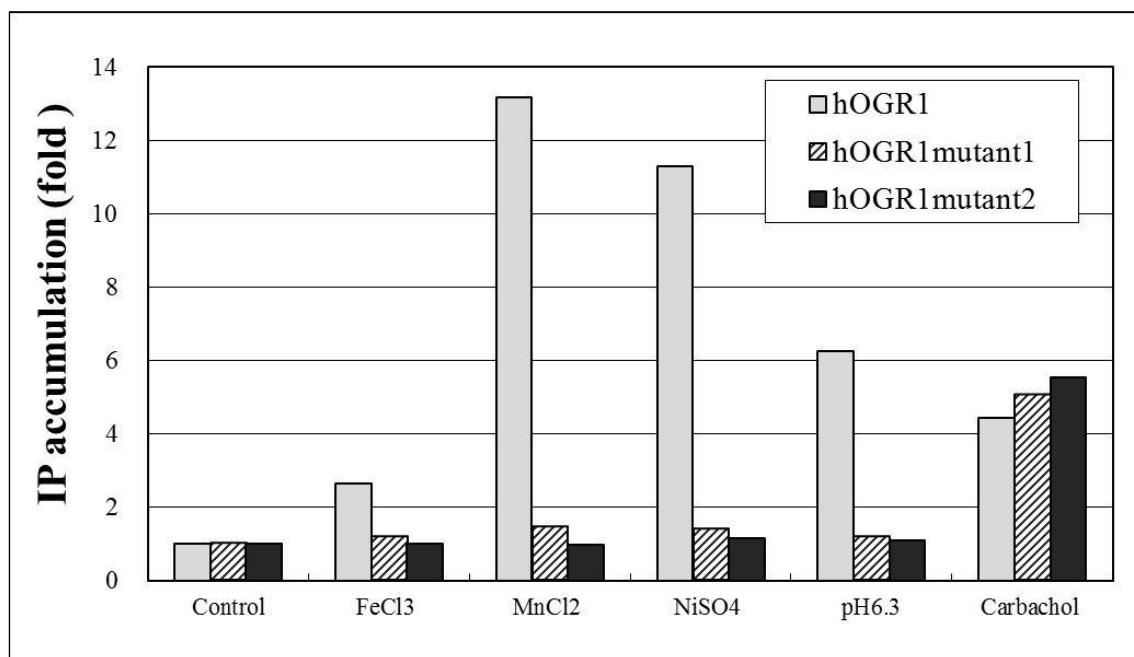


Figure 17. IP accumulation activities were reduced in OGR1 mutants expressed cells.

IP accumulations by metals and protons decreased significantly in cells which express OGR1 mutants (hOGR1 mutant 1 and 2) in comparison to wild type hOGR1. FeCl₃, MnCl₂ and NiSO₄ were added in 100 μM. Calbachol was added in 1 mM. Data are means divided by each control. *N*=2.

4.3.3 OGR1 KO マウス破骨細胞を用いた解析

内在性に発現する OGR1 における各種アゴニスト金属の作用を検討するため、OGR1 KO マウス由来破骨細胞にて活性を評価した。IP アッセイにおいて、OGR1 アゴニスト活性を有する金属 (Mn、Ni 及び Co) 及び低 pH による刺激 (HCl 添加) により、ワイルドタイプ (wild type、WT) では濃度依存的な細胞内 IP の蓄積、すなわちシグナルの増強が見られたが、KO ではそのシグナルは抑制されていた (Figure 18)。OGR1 は破骨細胞分化に伴い発現上昇することからも、

アゴニスト活性を有する金属 (Mn、Ni 及び Co) 及び低 pH により、破骨細胞上に内在的に発現する OGR1 を介して細胞内シグナルが伝達され、何らかの機能を持つことが示唆された。

一方で、OGR1 KO マウス由来骨芽細胞を用いて同様に評価を行ったところ、WT と KO でシグナルに違いが見られなかった (data not shown)。このことから骨芽細胞においては OGR1 を介したシグナルが伝達されていないか、それほど強くないことが予測された。

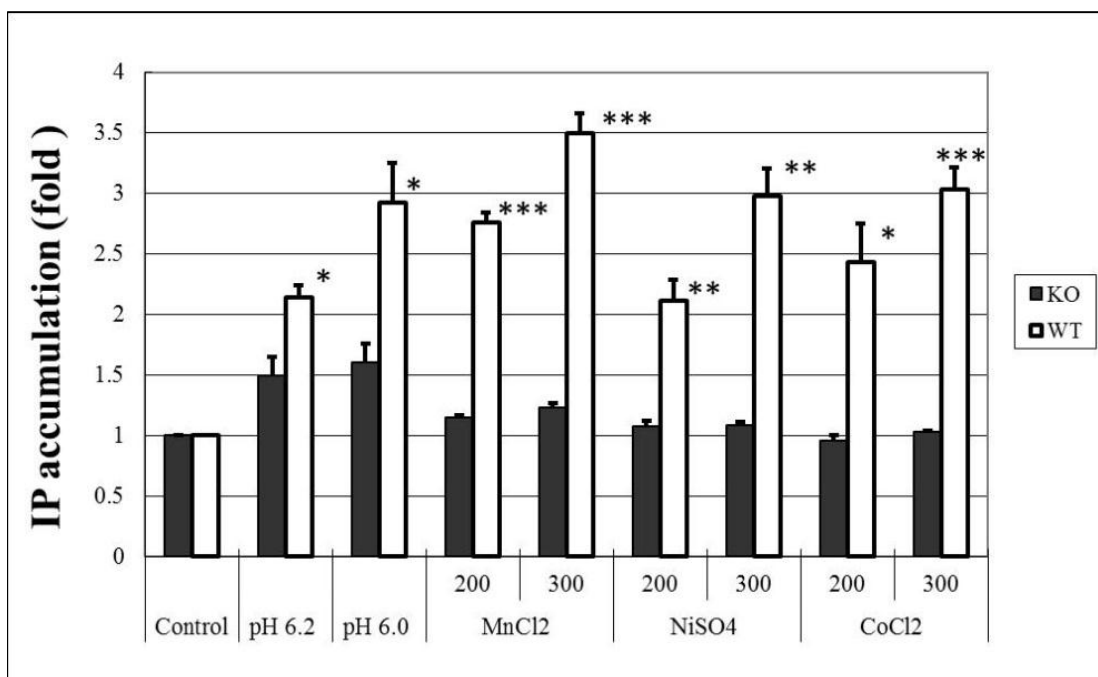


Figure 18. IP accumulation in primary mice osteoclasts.

OGR1 agonistic metals and proton-induced IP accumulation in an OGR1-dependent manner. Agonistic metals show dose-dependent activity (200, 300 μ M) only on WT osteoclasts. Data are means divided by each controls. +SE, $N=3$, *** $p<0.0005$, ** $p<0.005$, * $p<0.05$ (KO, knockout, WT, wild type).

4.3.4 OGR1-EGFP を用いたインターナリゼーションアッセイ

同定した OGR1 アゴニスト金属、及び低 pH により OGR1 のインターナリゼーションが誘導されるか検討したが、インターナリゼーション活性は検出されなかった (data not shown)。また、現在までに OGR1 のインターナリゼーションを誘導する報告は無い。そのため、OGR1 アゴニスト金属及び低 pH によるインターナリゼーションを介したシグナル調節や生理的作用については現時点では不明である。

4.3.5 アンタゴニスト HTS

OGR1 の機能を阻害するためのアンタゴニスト化合物のスクリーニングを HTS で実施できるように、FLIPR を用いて以下の系を構築した。アゴニストとして、本研究において新規に同定した Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn を用いて検討を行った結果、[Figure 16](#) で示したように Ni、Mn 及び Co を用いた際に高カウンターの安定したシグナルを得ることができた。また、Ni、Mn 及び Co は低 pH による刺激を脱感作した。さらに検討したところ、これらの金属のうち、Ni のみ ATP 刺激に対しての阻害作用は見られなかった (data not shown)。すなわち、Ni は ATP 刺激による P2YR 等の ATP 受容体活性化に影響を与えないことから、Mn や Co と比較して、より OGR1 特異的なシグナルを評価することが可能であると考えられた。そのため、Ni を用いることで、活性が安定でかつ特異性の高いスクリーニングを行うことが可能であると予想された。

次に FLIPR にて Ni (NiSO_4 5 μM) をアゴニストとして用いて、購入化合物ライブラリー約 20 万検体のアンタゴニスト活性の評価を行った。その結果、ヒット (50%以上の抑制) 74 検体のうち、54 検体で再現性を認め、その内、低 pH 刺激 (pH6.3) に対しても 43 検体で活性 (50%以上の抑制) を認めた。

さらに IP アッセイでの絞込みを行った結果、12 検体で NiSO_4 30 μM に対する阻害 (10%以上の抑制) を認め、その内、8 検体で再現性を得た。また、低 pH 刺激 (pH7.2) では 14 検体で阻害 (10%以上の抑制) を認め、その内、9 検体で再現性を得た。両刺激で共に阻害を認めた化合物は 9 検体 (化合物 1 - 9) であった ([Figure 19](#))。これらの化合物に関しては今後より詳細な解析が必要であるが、現時点で OGR1 アンタゴニストのヒット化合物であると考えている。

以上、Ni をアゴニストとして利用した本 OGR1 アンタゴニスト HTS 系は新規かつ独自のスクリーニング系として有用であると考えられた。

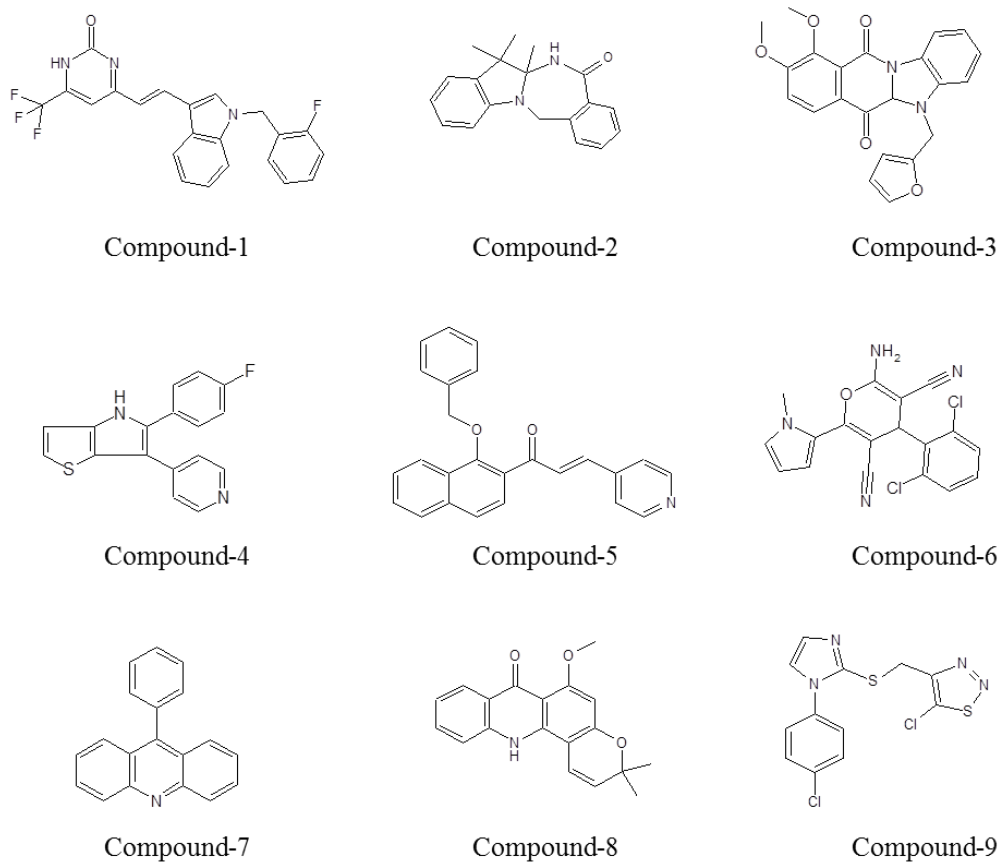


Figure 19. OGR1 antagonistic compounds.

4.4 要約

同定した OGR1 アゴニスト活性を持つ金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) に関して、各種金属の活性の比較及び濃度依存性を確認した。これら各種金属の活性の比較及び濃度依存性を確認した。また、OGR1 不活性変異体において低 pH 刺激と同様にアゴニスト金属によるシグナルも抑制されていたことから、これら OGR1 アゴニスト金属による活性はプロトンと同じ His 残基を介している

ことが示唆された。また、OGR1 KO マウス由来破骨細胞において、低 pH 刺激と同様にアゴニスト金属によるシグナルも抑制されていたことから、内在的に発現する OGR1 を介しアゴニスト金属及びプロトンによるシグナルが伝達されることが示唆された。OGR1 アンタゴニスト HTS を実施し、アンタゴニスト化合物を取得した。

5 全体要約

シグナルマッピングを実施し、OGR1 は細胞内シグナルとして IP 及びカルシウムの上昇を引き起こす Gαq カップル型であることを示唆するデータを得た。発現解析により、OGR1 は広範な組織に発現が見られるが、破骨細胞の分化に伴い発現が顕著に上昇することを見出した。OGR1 のリガンドスクリーニングを実施し、ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓抽出サンプルにおいてアゴニスト活性を見出した。その結果、OGR1 アゴニスト活性物質として複数の金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) を同定した。これら各種金属の活性の比較及び濃度依存性を確認した。また、低 pH 刺激による活性を持たない OGR1 不活性変異体においてアゴニスト金属によるシグナルも抑制されていたことから、アゴニスト金属による活性はプロトンと同じ His 残基を介していることが示唆された。また、OGR1 KO マウス由来破骨細胞においてはアゴニスト金属による活性が抑制されたことから、内在的な OGR1 を介しシグナルが伝達されることが示された。さらに、Ni を用いて独自のアンタゴニスト HTS を実施し、アンタゴニスト化合物を取得した。

第三章 OGR1 KO マウスを用いた破骨細胞における機能解析と骨疾患病態モデルにおける作用解析

1 イントロダクション

第二章で報告したように、OGR1 は破骨細胞の分化と共に顕著に発現が亢進することから、破骨細胞の機能への関与が示唆された。そこで、本研究では OGR1 の破骨細胞での機能、及び骨疾患形成における関与の可能性を調べる目的で更なる解析を行った。先に示したようにマウス破骨細胞において、低 pH 刺激及び OGR1 アゴニスト金属が OGR1 特異的な細胞内シグナルを誘導することから、これらアゴニストの破骨細胞機能への影響を解析した。さらに、OGR1 KO マウスの骨組織における基礎解析、及び各種骨疾患モデル (OVX 骨粗鬆症モデル、不動化骨粗鬆症モデル、関節炎モデル) における検討を行った。なお、正常な骨組織では骨は常に新しい組織へと置き換わっているが、破骨、骨芽両細胞の働きのバランスが保たれており、全体の骨の量は変化しない。しかし、何らかの原因でこのバランスが崩れて破骨細胞の過剰な機能亢進が起これば、必要以上に骨が吸収されて骨組織が脆くなり、最終的に骨粗鬆症等の骨疾患へと至る。また、本研究では骨組織に僅かにでも変化があった場合、運動機能等にも影響が出る可能性を考慮し、行動解析についても併せて実施した。

2 OGR1 KO マウスを用いた破骨細胞における機能解析

2.1 イントロダクション

OGR1 は破骨細胞の分化と共に顕著に発現が亢進することから、破骨細胞の機能への関与が示唆された。低 pH 刺激及び OGR1 アゴニスト金属が OGR1 特異的な細胞内シグナルを誘導することから、これらアゴニストの OGR1 を介した破骨細胞機能、すなわち破骨細胞骨吸収活性、破骨細胞分化、及び破骨細胞生存への影響を解析した。

2.2 材料及び方法

2.2.1 破骨細胞における骨吸収活性 (Pit Formation Assay)

[第二章 4.2.3](#) の方法に従い、骨芽細胞と骨髄細胞を回収し、両細胞の共存培養系において成熟破骨細胞を形成させた。細胞を回収し、象牙切片を入れたプレートに再度播種し、各種刺激を添加し 2 日間 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。その後、象牙切片を回収し、1 M アンモニア水中で超音波処理し細胞を破壊した。処理後の切片をアンモニア水から取り出し、ヘマトキシリン液で 1 分間染色し、水洗、乾燥させた。破骨細胞によって形成された吸収窩 (pit) の数を顕微鏡下にて計数して評価した。

2.2.2 破骨細胞 TRAP 染色

破骨細胞分化及び破骨細胞生存は破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase、TRAP) の染色により評価した。96 穴プレートに播種した破骨細胞に 100 μ l/well の 10%ホルマリン-PBS を加え、15 - 20 分間細胞を固定後、さらにエタノール/アセトン (1 : 1) を加え、1 - 2 分間細胞を再固定し、軽く風乾を行った。100 μ l/well の TRAP 基質溶液 (TRAP buffer 13.33 ml : 50 mM 酒石酸 Na を溶解した 100 mM 酢酸 buffer、pH 5.0 に p-Nitrophenyl phosphate tablet を溶解したもの) を添加し、20 - 30 分間室温で反応を行った。100 μ l の反応液を回収し、予め 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を 50 μ l 入れた 96 穴プレートに加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーにより波長 405 nm における吸光度を測定した。なお、破骨細胞分化の評価の際には、[第二章 4.2.3](#) で先述の分化用培地にて 2 日間培養して破骨細胞前駆細胞を増やした後、M-CSF + sRANKL \pm 各種サンプルで 3 日間の培養後 TRAP 染色を実施した。

2.3 結果と考察

2.3.1 破骨細胞における骨吸収活性

成熟破骨細胞における骨吸収活性に対する各種 OGR1 アゴニスト金属及び低 pH 刺激による作用を評価した。なお、比較として OGR1 アゴニスト活性を持たない金属についても同時に評価した。

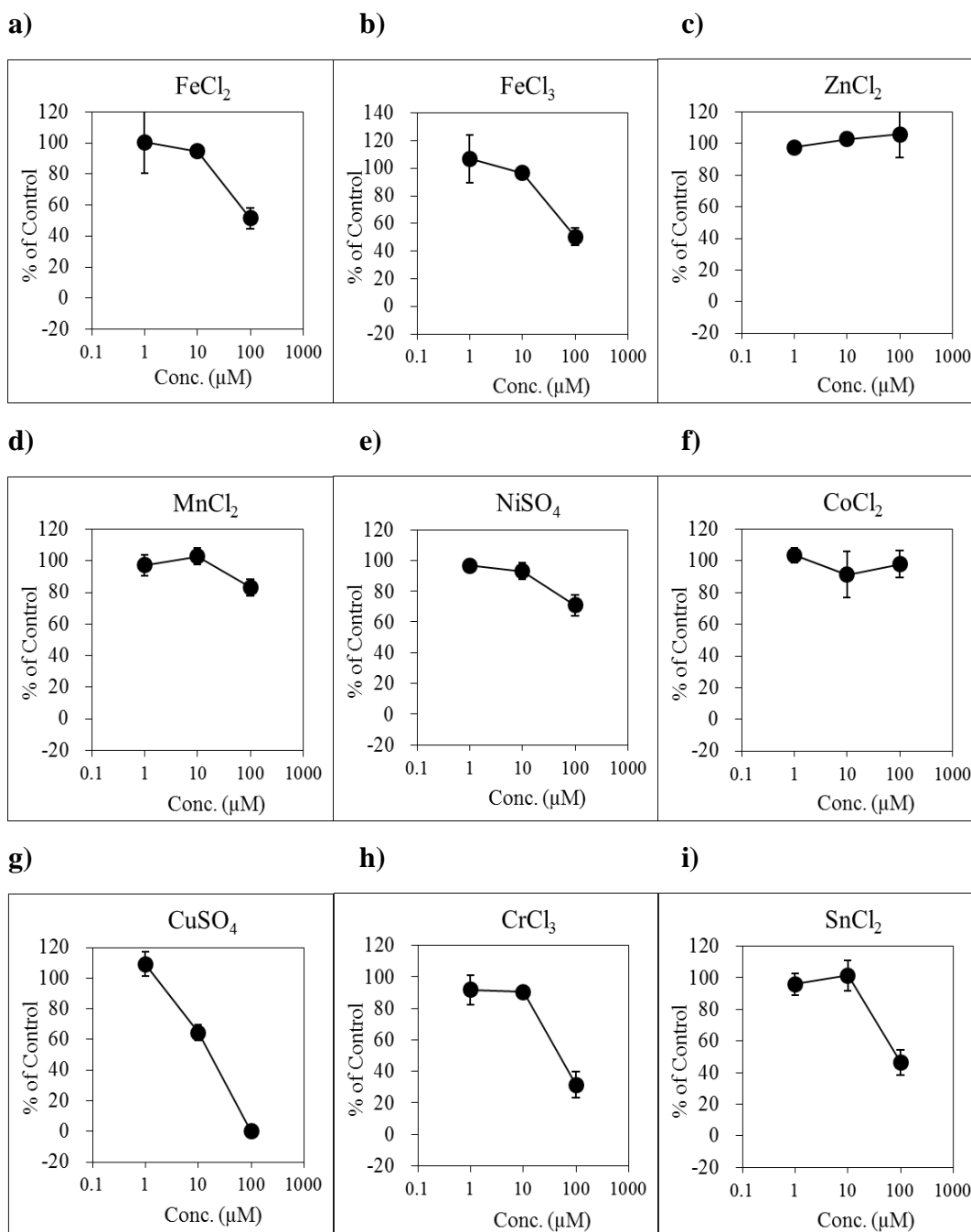
骨芽細胞と骨髄細胞との共存培養系にて成熟破骨細胞を形成させ、各種刺激を添加し2日間培養中の象牙切片上における骨吸収窩 (pit) の数により骨吸収活性の評価を行った (Figure 20)。なお、本系ではすでに強い骨吸収活性をもった破骨細胞を用いているため、主に骨吸収抑制作用が評価しやすく、更なる骨吸収活性化作用は評価しにくい系となっている。

本系で評価した結果、OGR1 アнтаゴニスト活性を持つ Cu (CuSO₄) において骨吸収抑制作用が 10 μM から観察された。なお、この時細胞毒性は観察されなかった。また、以降 2.3.2 で示すように Cu は分化抑制作用も持つことから破骨細胞の機能と深く関わっていることが推察された。

一方、100 μM の高濃度においては、OGR1 アゴニスト金属である Fe (FeCl₂、FeCl₃)、Mn (MnCl₂)、Ni (NiSO₄) 及び OGR1 アнтаゴニスト活性を持つ Cu (CuSO₄) において骨吸収抑制作用が見られたが、本濃度では成熟破骨細胞だけでなく、骨芽細胞も含めた細胞において顕著な細胞毒性が観察されたため、非特異的な毒性であると考えられた。また、OGR1 アゴニスト活性を持たない金属である Cr (CrCl₃)、Sn (SnCl₂)、V (VCl₃) 及び I (ICl₃) においても 100 μM の高濃度において、上記同様の非特異的な毒性が観察された。

OGR1 アゴニスト活性を持つプロトンの活性、すなわち HCl 添加 (1 - 2%) による低 pH 刺激では骨吸収活性化作用に変化は見られなかった。なお、HCl 4% の濃度では骨吸収抑制作用が見られたが、本濃度では顕著な細胞毒性が

認められたため、上記各種金属高濃度 (100 μM) 添加と同様に非特異的な毒性による作用であると考えられた。



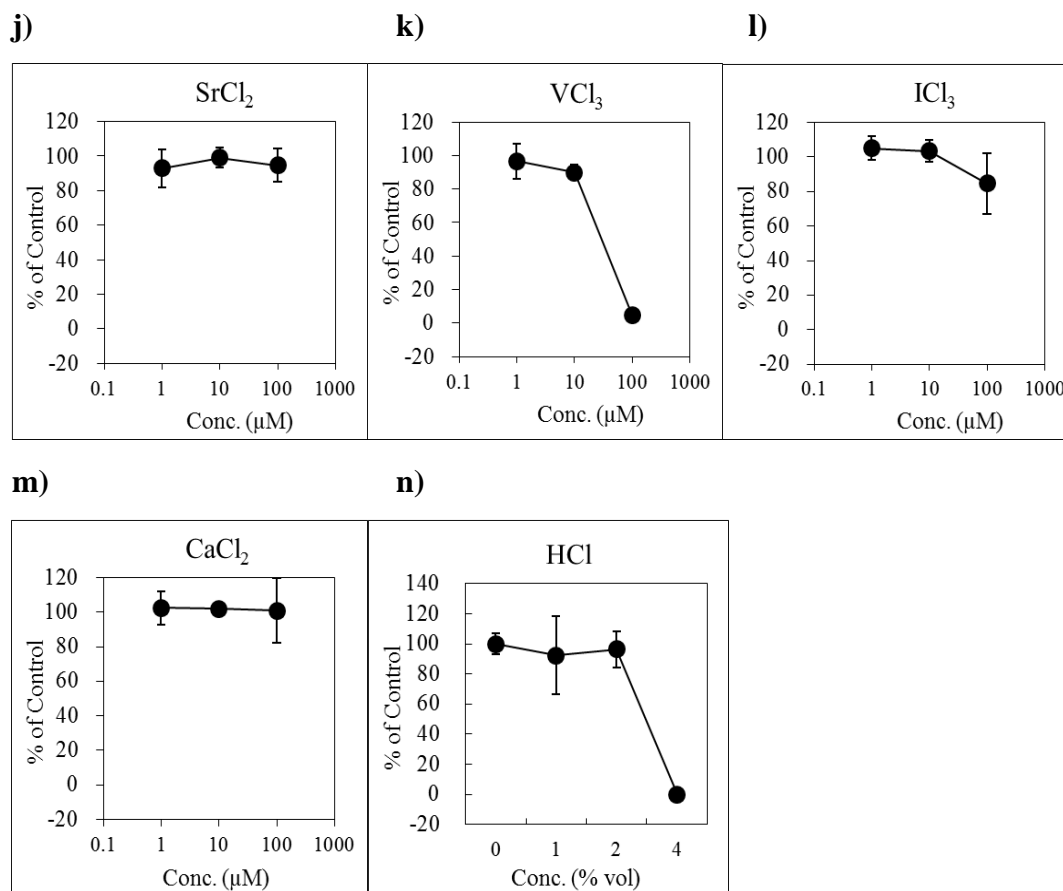


Figure 20. Osteoclasts bone resorption effects by OGR1 agonistic metals and proton.

a)-f) OGR1 agonistic metals (Fe, Zn, Mn, Ni, and Co) effects on osteoclasts bone resorption.

g) OGR1 antagonistic metal Cu inhibited osteoclasts bone resorption.

h)-m) OGR1 non agonistic metals (Cr, Sn, Sr, V, I and Ca) effects on osteoclasts bone resorption.

n) Proton did not change osteoclasts osteoclasts bone resorption activity.

Data are means \pm SD, $N=2$

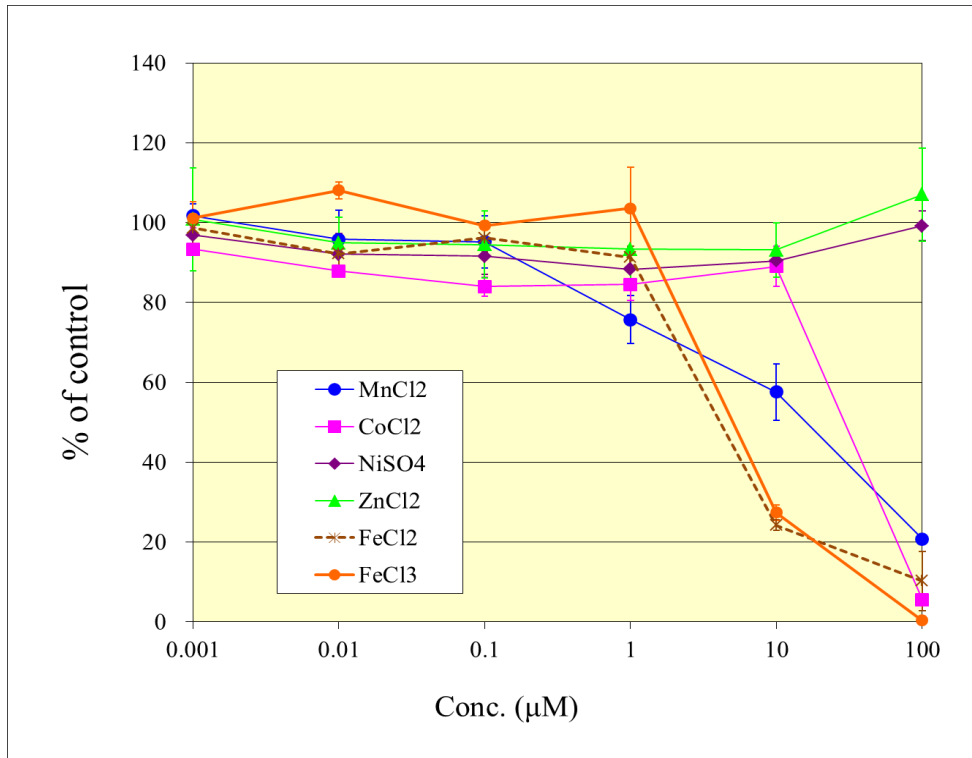
2.3.2 破骨細胞の分化

M-CSFとRANKLによって骨髄細胞から破骨細胞へ分化する過程での各種 OGR1 アゴニスト金属及び低 pH 刺激による作用を評価した。なお、比較として OGR1 アゴニスト活性を持たない金属についても同時に評価した。

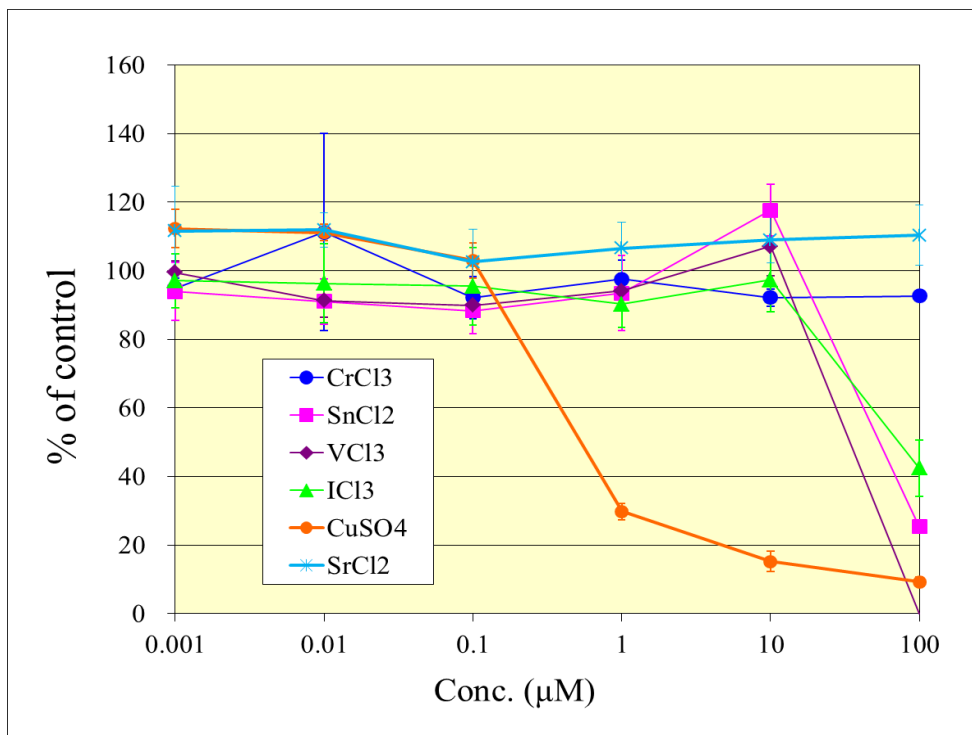
その結果、OGR1 アゴニスト活性を持つ Fe (FeCl_2 、 FeCl_3) 及び Mn (MnCl_2) 添加により 1 - 10 μM の濃度で破骨細胞分化抑制活性が見られた。一方で、OGR1 アゴニスト活性を持つ Zn (ZnCl_2)、Ni (NiSO_4) 及び Co (CoCl_2) 添加では顕著な作用は見られず、比較的高濃度の 100 μM において Zn 及び Ni で若干の分化促進作用が、Co で分化抑制作用が観察された (Figure 21a)。この比較的高濃度 (100 μM) での分化抑制作用は OGR1 アゴニスト活性を持たない V (VCl_3)、I (ICl_3)、Sn (SnCl_2) においても見られたことから OGR1 アゴニスト活性の有無と相関しない可能性が考えられた (Figure 21b)。また、OGR1 アンタゴニスト活性を持つ Cu (CuSO_4) においては破骨細胞分化抑制活性が見られ、比較的低濃度の 1 μM から活性がみられた (Figure 21b)。

さらに、低 pH 刺激として、HCl (0.125 - 1% vol/vol) を添加した際に破骨細胞の分化が促進された。顕微鏡下での観察において、HCl 処理群では破骨細胞数も多く、多核化も進んでいた。なお、HCl (2 - 4% vol/vol) においては破骨細胞数が顕著に低下していたが、これは強い酸性により破骨細胞へのダメージが起っていたためと考えられた (Figure 21c)。

a)



b)



c)

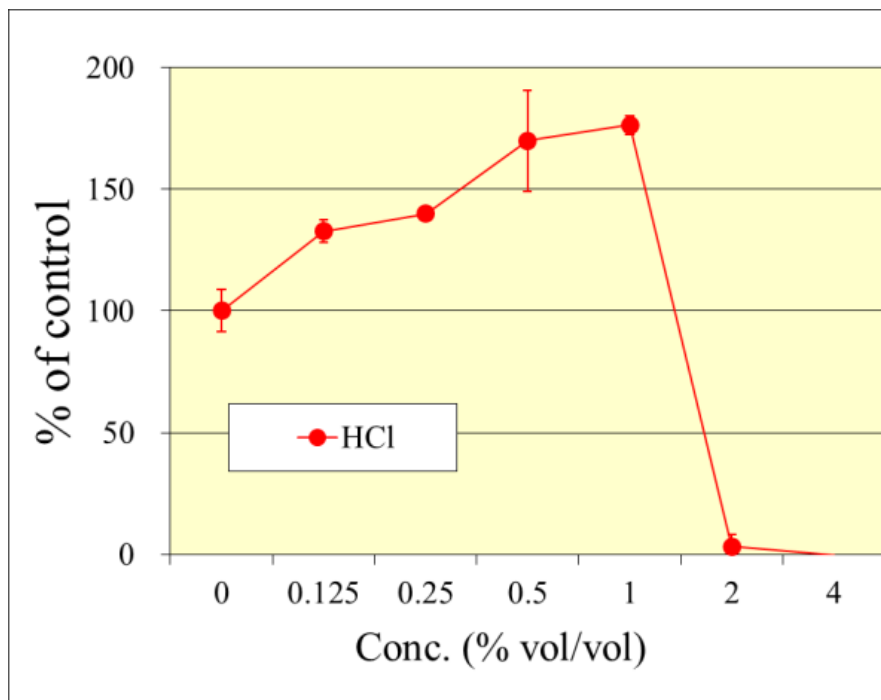


Figure 21. Osteoclasts differentiation effects by OGR1 agonistic metals and proton.

- a) Some of OGR1 agonistic metals inhibited osteoclasts differentiation.
- b) Some of non OGR1 agonistic metals inhibited osteoclasts differentiation.
- c) Proton induced osteoclasts differentiation.

Data are means \pm SD, $N=3$

さらに、これら各種 OGR1 アゴニスト金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) による作用が OGR1 を介したものか否かを検討するため、OGR1 KO マウス由来破骨細胞を用いて同様の評価を実施した。

その結果、Fe (FeCl₂、FeCl₃) 添加 (10 µM) で見られた破骨細胞分化抑制活性は WT、He、KO 何れのジェノタイプでも見られたことから OGR1 に非特異的な作用であると考えられた (Figure 22 a、b)。また、100 µM Zn (ZnCl₂)、Ni (NiSO₄) 添加における分化促進作用 (Figure 22 c、e)、及び 100 µM Co (CoCl₂) 添加における分化抑制作用 (Figure 22 f) においてもジェノタイプ間で差が見られなかったことから OGR1 に非特異的な作用であると考えられた。なお、Mn (MnCl₂) での分化抑制作用は再現性が得られなかった (Figure 22 d)。また、OGR1 アゴニスト活性を持たない各種金属 (Cr、Sn、V、I 及び Sr) における作用もジェノタイプ間で差が見られなかった (data not shown)。以上の結果から、各種 OGR1 アゴニスト金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) による破骨細胞分化における作用は OGR1 に非特異的な作用であると考えられた。

なお、骨関連細胞における OGR1 アゴニスト金属の作用を調べた研究では Fe (Jia P et al, 2012) 及び Co (Patntirapong S et al, 2009) が破骨細胞の分化を促進し、骨吸収を誘導するという報告がある一方で、Fe 及び Co が骨吸収を抑制する報告がある (Nichols KG et al, 1997; Rousselle AV et al, 2002)。また、Zn は骨芽細胞形成を促進し、破骨細胞形成を抑制するという報告がある (Yamaguchi M, 2010; Yamaguchi M et al, 2011)。なお、現時点では Ni 及び Mn の破骨細胞における作用の報告は見出すことが出来なかった。そのため、Figure 22 で示した結果

と併せて、現時点における OGR1 アゴニスト金属の破骨細胞に対する直接作用は明確ではないことが推察された。

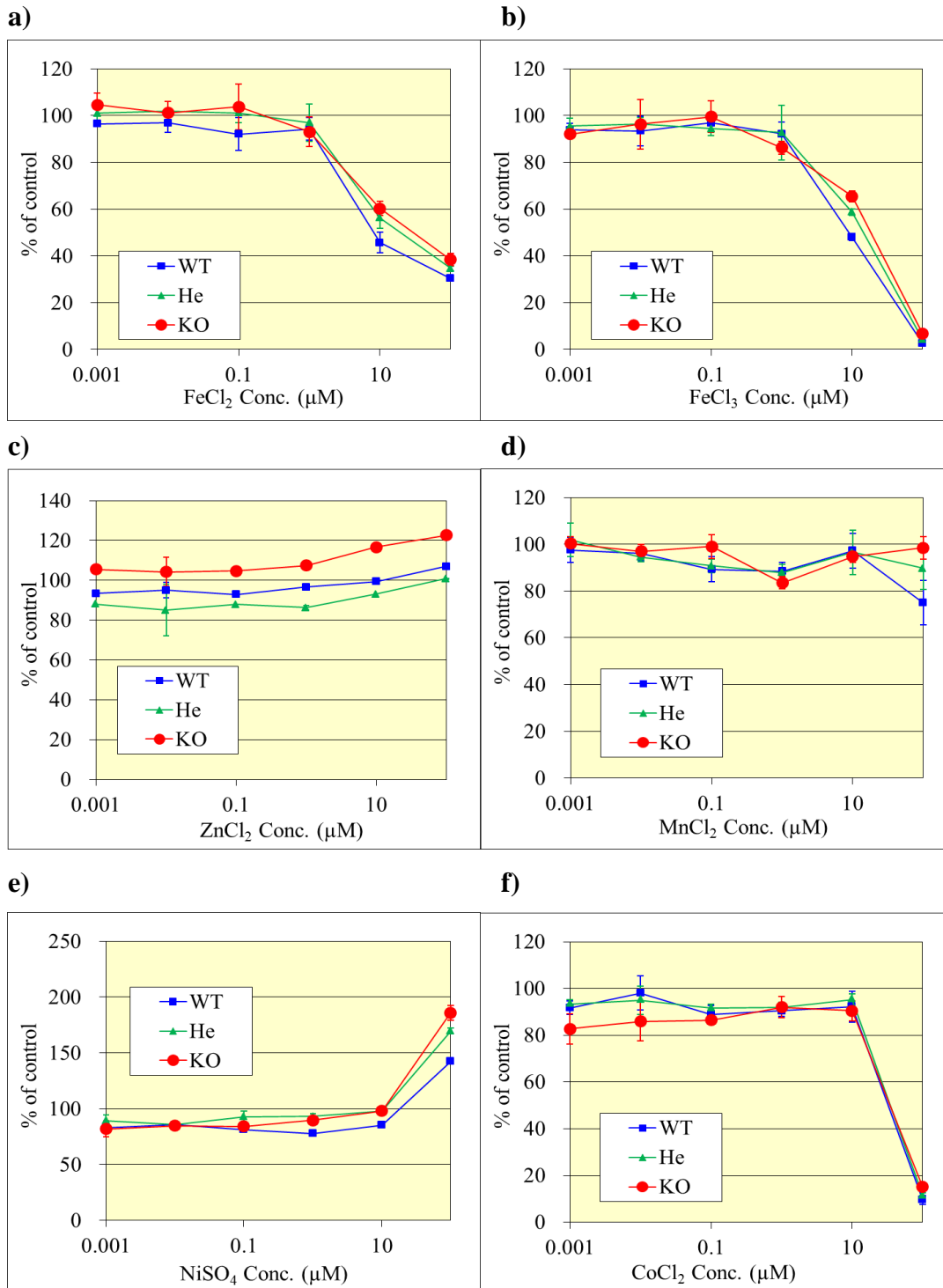


Figure 22. Osteoclasts differentiation effects in OGR1 KO mice by OGR1 agonistic metals.

- a) FeCl₂ inhibited osteoclasts differentiation OGR1 independent manner.
- b) FeCl₃ inhibited osteoclasts differentiation OGR1 independent manner.
- c) ZnCl₂ enhanced osteoclasts differentiation OGR1 independent manner.
- d) MnCl₂ inhibited osteoclasts differentiation OGR1 independent manner.
- e) NiSO₄ inhibited osteoclasts differentiation OGR1 independent manner.
- f) CoCl₂ inhibited osteoclasts differentiation OGR1 independent manner.

Data are means \pm SD, *N*=3

さらに、[Figure 21 c](#) で見られた低 pH 刺激による作用について、OGR1 KO マウス由来破骨細胞を用いて詳細な解析を実施した。破骨細胞分化時に添加する sRANKL の濃度を 6.25、12.5、25、50 ng/ml とし、低 pH 刺激による分化促進を検討した。その結果、低濃度 6.25 ng/ml の sRANKL 添加培養時に OGR1 に依存的な低 pH による分化促進作用が観察された ([Figure 23](#))。

以上の結果から、本研究で同定された各種 OGR1 アゴニスト金属による破骨細胞分化における作用は OGR1 に非特異的なものであったこと、一方で低 pH 刺激による分化促進作用は OGR1 に依存的な作用であったことから、以降の破骨細胞の評価では本研究で新規に見出した OGR1 アゴニスト金属を用いることは断念し、低 pH 刺激による条件を中心に実施した。

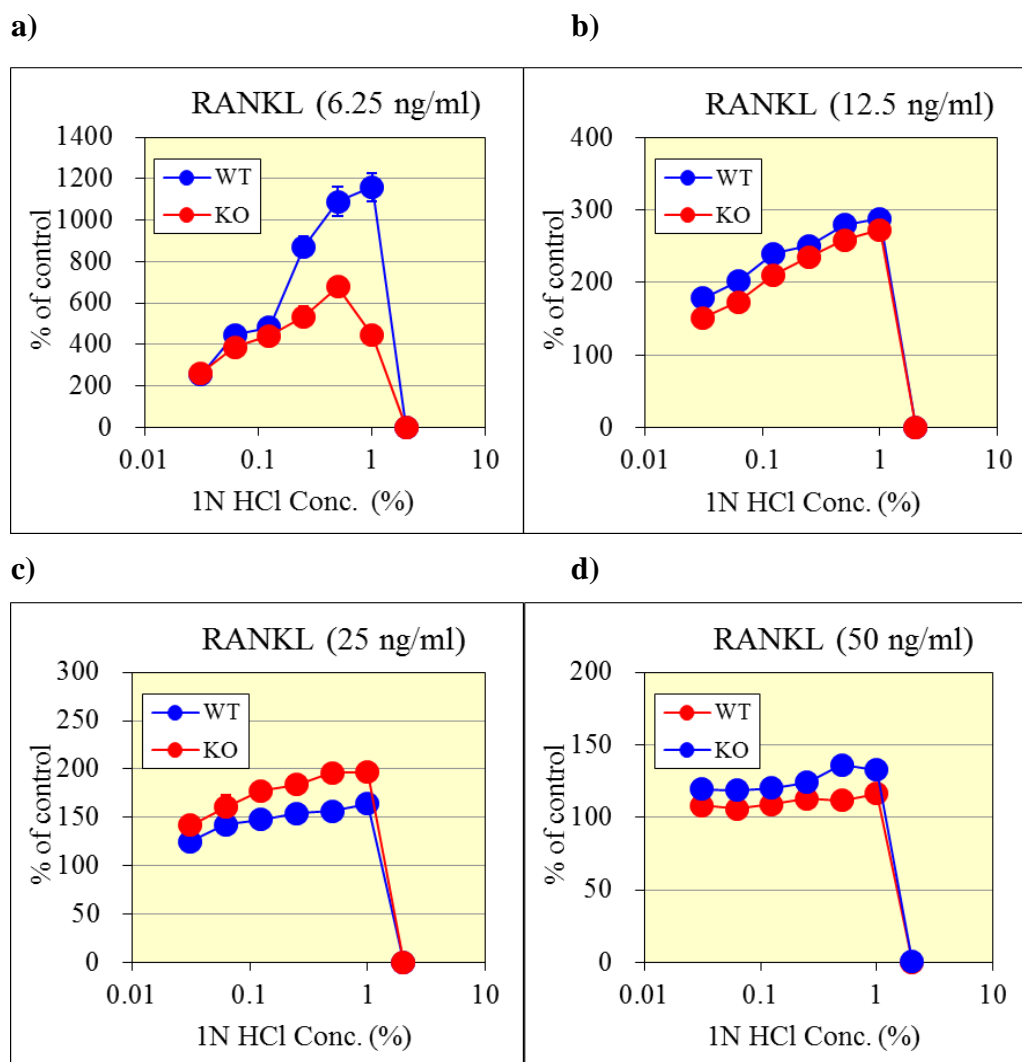


Figure 23. Osteoclasts differentiation enhanced by proton with different RANKL dose.

Proton induced OGR1-dependent osteoclasts differentiation with low dose (6.25 ng/ml) sRANKL.

Data are means \pm SD, $N=3$. (KO : knock out, WT : wild type)

次に、低 pH 刺激による破骨細胞の骨芽細胞との共存培養系における破骨細胞分化作用への検討を実施した。通常、RANKL を添加しない条件下において、破骨細胞は骨芽細胞と共存培養をすることで分化が誘導される。OGR1 KO マウスより破骨細胞前駆細胞 (BM) 及び骨芽細胞 (OB) を調製し、共存培養系における破骨細胞分化を TRAP 染色にて評価した。

その結果、OGR1 KO マウス由来の破骨細胞前駆細胞を用いた際には WT で見られた低 pH による分化促進作用が見られなかった。一方で、骨芽細胞においてはジェノタイプ間で差が見られなかった (Figure 24)。以上の結果から、破骨細胞の骨芽細胞との共存培養下において低 pH での分化促進に破骨細胞または破骨細胞前駆細胞に発現する OGR1 が関与していることが示唆された。

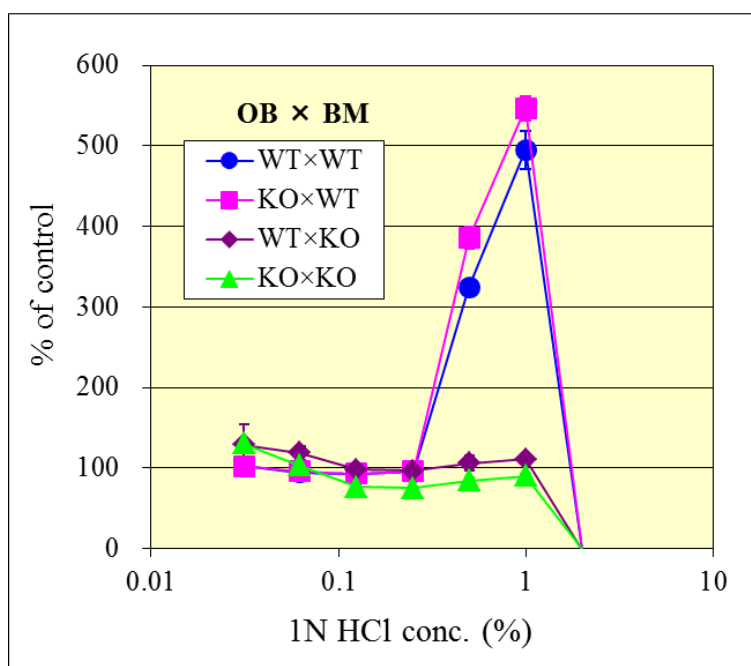


Figure 24. Osteoclasts differentiation enhanced by proton in osteoblast and osteoclast coculture.

Osteoclasts (BM) differentiated by proton in an OGR1-dependent manner when cocultured with osteoblasts (OB).

Data are mean \pm SD, $N=3$. (KO : knock out, WT : wild type)

2.3.3 破骨細胞の生存

破骨細胞の分化後、RANKL 無添加で培養した際の 24 時間後の生存率は、WT では低 pH で顕著に増加した。一方、KO ではごく僅かにのみ増加した。このことより、分化後の破骨細胞の生存は低 pH で促進し、その作用の一部に OGR1 が関与することが示唆された (Figure 25)。

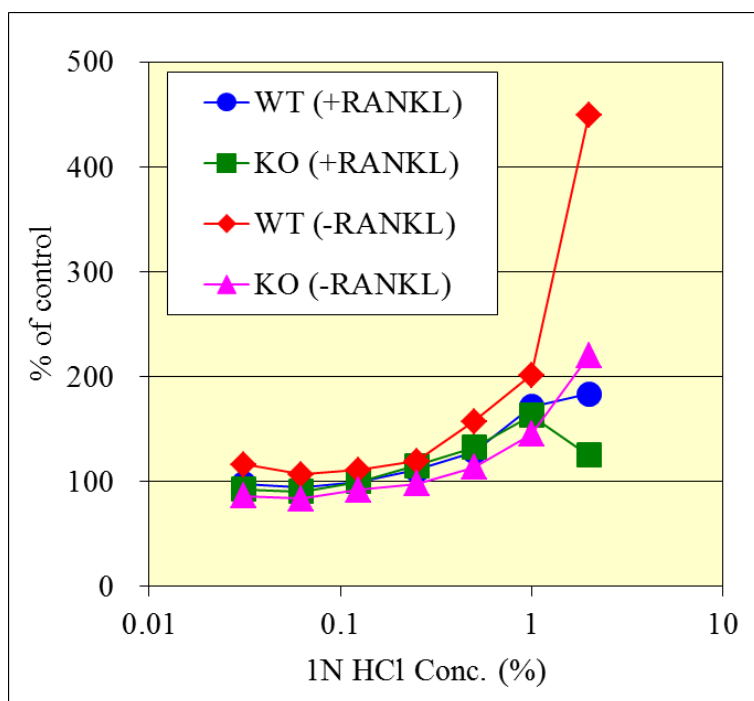


Figure 25. Osteoclasts survival enhanced by proton.

Osteoclasts survival rates were increased by proton in an OGR1-dependent manner .
Data are means \pm SD, $N=3$. (KO : knock out, WT : wild type)

2.4 要約

OGR1 KO マウス由来破骨細胞を用いた解析の結果、OGR1 を介した低 pH 刺激により破骨細胞の分化が促進されること、また破骨細胞の生存が促進されることが示された。以上より、OGR1 は破骨細胞の機能においても重要な役割を示すことが示唆された。

3 OGR1 KO マウスを用いた骨疾患病態モデルにおける作用解析

3.1 イントロダクション

OGR1 KO マウス破骨細胞を用いた解析において、OGR1 が破骨細胞の分化及び生存などの機能面でも重要な役割を持つことが示されたことから、本章ではさらに OGR1 KO マウスを用いた *in vivo* での解析を実施した。すなわち、骨組織における基礎解析、及び各種骨疾患モデル (OVX 骨粗鬆症モデル、不動化骨粗鬆症モデル及び関節炎モデル) における検討を行った。さらに、骨組織に変化があった場合、運動機能にも影響が出る可能性を考慮し、行動解析についても併せて実施した。

3.2 材料及び方法

3.2.1 基礎解析

OGR1 KO マウス (WT、He、KO) ♂、♀、7 週齢、各 20 匹について、体重測定、 μ フォーカス X 線写真による骨格の評価を行った。また、右大腿骨を摘出して骨密度の測定を行った。さらに、体重、骨密度が平均的な個体、WT、KO、♂、♀、各 10 匹を選抜し、新潟骨の科学研究所への委託にて脛骨、大腿骨、腰椎について骨形態計測を行った。なお、全ての個体は予め腹腔内投与によるカルセイン二重染色により骨標識を行い、骨標本は BS 染色により作製した。また、(WT、He、KO) ♂、♀、8 週齢、各 5 匹の血液化学検査は日本チャールスリバーで実施した。

3.2.2 骨疾患病態モデル解析

(1) 骨粗鬆症モデル

OVX モデル

OGR1 KO マウス (WT、He、KO) ♀、6-7 週齢について卵巣摘出 (ovariectomy、OVX) 手術もしくは sham 手術を行った。術後 8 週間後に解剖し、右大腿骨及び脛骨を摘出し、骨密度測定を行った。なお、全ての動物実験に関して社内の倫理規定に従い実施した。

不動化神経切除モデル

OGR1 KO マウス (WT、He、KO) ♂、7 週齢について右大腿骨神経切除もしくは sham 手術を行った。術後 1、2、3 週間後に解剖し、左右の大腿骨及び脛骨を摘出し、骨密度測定を行った。

(2) 抗体誘導関節炎モデル

OGR1 KO マウス (WT、He、KO) ♂、6 週齢に関節炎用カクテル(免疫生物研究所 No.62200)で関節炎を誘導した。マウス 1 匹あたり 0.3 ml の抗 CII 抗体カクテル (10 mg/ml) を尾静脈内に投与し、抗体投与 3 日後に 1 匹あたり 0.1 ml (500 µg/ml) の Lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内に投与した。関節炎の評価は、抗体投与後 3、5、7、10、12、14 日目に行い、四肢の腫脹スコアを測定した。

なお、腫脹スコアの定義は、0点: 変化なし、1点: 指1本の腫脹、2点: 指2本の腫脹はあるが足全体には及んでいない、3点: 足全体の腫脹とし、計12点満点とした。また、14日目の腫脹スコアの測定後に採血致死を行い、両肢足根部の採材を行った。ホルマリン浸漬した左足の組織評価をハムリー (株) で実施した。足根関節及び指節間関節各々における骨膜炎スコアと骨破壊スコアを各10点 (計40点満点) で評価し、総合判定は足首から先の部分を、X線写真像にて全体的に評価した (10点満点)。さらに病理組織の詳細な評価もハムリー (株) で実施した。

3.2.3 骨組織における発現変動解析

骨組織からの RNA の抽出は、摘出した骨組織を液体窒素中にて凍結しクライオプレス (マイクロテック・ニチオン) にて破碎後、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて添付のプロトコールに従い実施した。さらに、RNeasy を用いて二次精製を行った。逆転写反応は TaKaRa RNAPCR Kit を用いて行った。作製した cDNA をテンプレートとして、TaqMan UniversalPCR Master Mix を用い ABI PRISM 7700 (もしくは 7900) sequence detection system で定量的 PCR を行なった。なお、プローブとして 5'-FAMCATCCTCCTCTATGAGAAC-MGB-3'を、センスプライマーとして 5'-AHR-151-0803ACTGGTCCCATGGTGACCTATC-3'を、アンチセンスプライマーとして 5'-GATGGAGATGCAGCAGAGGAA-3'を用いた。

3.2.4 行動解析

以下の行動解析は OGR1 KO マウス (WT、KO) ♂ 20 週齢以降各 5 匹を用いて行った。

Rotarod test は ROTAROD TREADMILL FOR RATS & MICE (Muromachi) を用いて行った。回転は 40 rpm、50 rpm、60 rpm のいずれかの等速回転で行い、回転軸径の直径は 30 mm もしくは 90 mm を用いて開始から落下までの持久時間 (Latency to fall) を記録した。

Tail flick test は Tail-Flick Unit I.R.intensity (Ugo Basile) を用いて行った。I.R.intensity を 20 及び 50 に設定した際の latency (sec) を記録し、3 回の試行の各個体の平均値を算出した。

Grip strength test は GRIP STRENGTHMETER FOR MICE (Muromachi) を用いて行った。尾部を引っ張った際の最大値 (N: ニュートン) を記録し、3 回の試行の各個体の平均値を算出した。マウス自発運動量の測定は SCANET MV-20 (メルクエスト) を用いて行った。12 mm 以上の動きを評価する MOVE1 の取り込みを 1 回/分で行い、30 分間もしくは 60 分間の合計値を算出した。

3.3 結果と考察

3.3.1 基礎解析

Deltagen 社の報告 (<http://www.deltagen.com/>) では、ホモ欠損マウスの外見的形態、及び発育繁殖は、WT との差異を認めていない。一方、私の解析では、KO で大腿骨近位端の骨密度の上昇が雄でのみ観察された。さらに詳細な骨形態計測の結果は、以下の通りであった ([Figure 26](#))。

雄では腰椎海綿骨における骨量(BV/TV (%))、WT:23.07、KO:17.44、 $P<0.05$) ([Figure 26 a](#)) 及び骨梁数 (Tb.N (N/mm)、WT:5.638、KO:4.651、 $p<0.001$) ([Figure 26 b](#)) が低下した。脛骨海綿骨量には明らかな変化はなく ([Figure 26 c](#))、骨吸収の指標である骨吸収面の低下 (ES/BS (%))、WT:40.35、KO:33.09、 $P<0.05$)、及び骨形成の指標である類骨幅の亢進 (O.Th (μm))、WT:2.400、KO:2.878、 $P<0.05$)が見られた。また、大腿骨皮質骨幅は低値 (Ct.Wi (μm))、WT:185.7、KO:171.3、 $P<0.05$)を示した。

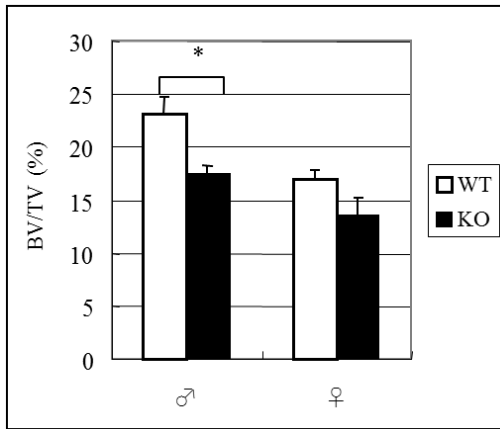
雌では腰椎海綿骨量に明らかな変化はなく ([Figure 26 a](#))、骨梁数 (Tb.N (N/mm)、WT:4.914、KO:4.064、 $p<0.05$) ([Figure 26 b](#)) は低下した。脛骨海綿骨量 (BV/TV(%))、WT:11.56、KO:8.34、 $P<0.05$) ([Figure 26 c](#)) 及び骨梁数 (Tb.N (N/mm))、WT:3.915、KO:3.140、 $p<0.01$) ([Figure 26 d](#)) は低値であった。脛骨海綿骨では骨吸収の指標である骨吸収面 (ES/BS (%))、WT:48.12、KO:40.27、 $P<0.001$)、及び破骨細胞面 (Oc.S/BS (%))、WT:22.69、KO:18.68、 $P<0.05$) と骨形成の指標である類骨幅 (O.Th (μm))、WT:3.505、O:2.887、 $P<0.05$) は共に低下し、雄と異なる所見であった。雌の大腿骨皮質骨幅に明らかな変化はなかったが、骨外膜性の骨

形成が遅延 (WT:5/9、KO:1/9) していることが示唆された。また、脛骨成長板軟骨においては、雄雌共に一次海綿骨幅が有意に低下していた ([Figure 26 e](#))。

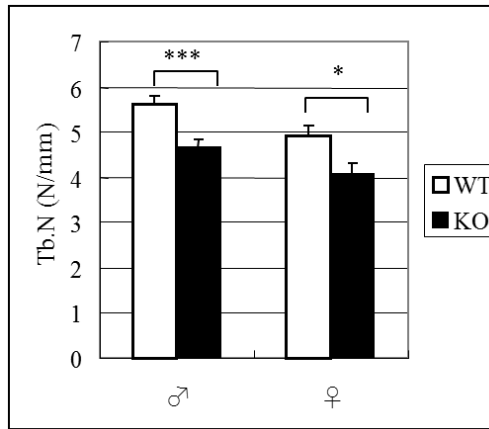
さらに、雄では成長板軟骨の面積 (G.P.V (μcm^2) WT:75665、KO:67505、 $p<0.001$) 及び幅 (G.P.Wi (μcm), WT:70.63、KO:62.95、 $p<0.001$) の低下が見られ、雌では長軸成長速度の低下 (L.G.R ($\mu\text{cm}/\text{day}$), WT:68.28、KO:47.03、 $p<0.001$) が見られた。

以上の結果より、雄、雌何れも成長に変化が現れていることが示唆されたが、雌雄により様態は異なっていた。また、血清分析も併せて実施したが、ジェノタイプによる有意な所見は見出されなかった。

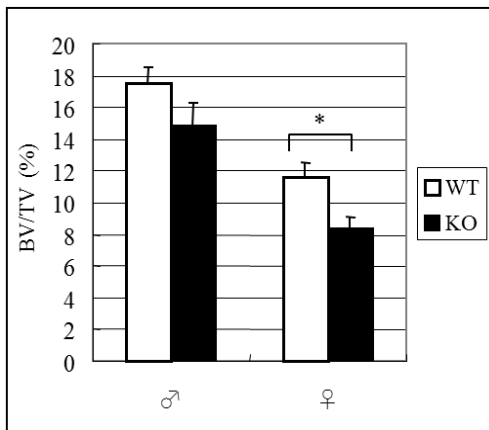
a)



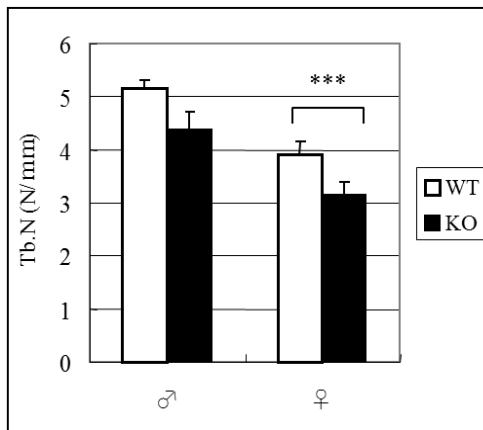
b)



c)



d)



e)

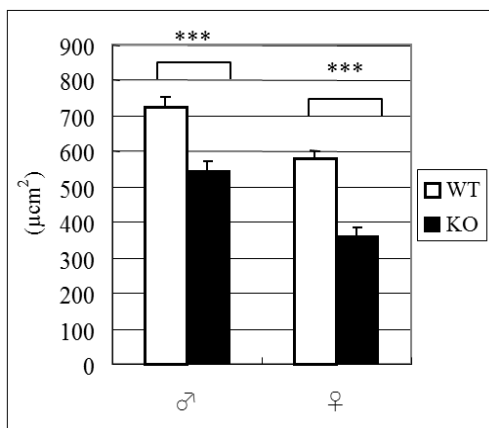


Figure 26. Morphometry of bone structure in OGR1 KO mice.

- a) Lumbar spongy bone mass of KO was significantly lower than WT in male.
- b) Lumbar spongy bone trabecular number of KO was significantly lower than WT in male and female.
- c) Tibial spongy bone mass of KO was significantly lower than WT in female.
- d) Tibial spongy bone trabecular number of KO was significantly lower than WT in female.
- e) Tibial growth plate primary spongy bone width of KO was significantly lower than WT in male and female.

Data are means +SE, N=10, *:P<0.05, **:P<0.01, ***:P<0.001. (KO : knock out, WT : wild type)

3.3.2 骨疾患病態モデル解析

OVXによる骨粗鬆症モデルでは、1回目の解析では、ホモ欠損マウスの大腿骨遠位端においてワイルドタイプに比較して有意な骨密度減少の抑制を認めた。しかし、2回目の解析では、同様の傾向は見られず再現性は得られなかった ([Figure 27](#))。

なお、不動化による骨粗鬆症モデルでは、ジェノタイプにより左右大腿骨の骨密度減少率に差は見られなかった (data not shown)。

また、抗体誘導関節炎モデルでは、評価期間を通して KO では WT と比較して抗体による関節炎の腫脹が弱い傾向であり、He ではその中間程度であった ([Figure 28 a](#))。また、後肢足根部の X 線写真による評価では、骨破壊と総合

判定で WT、He、KO の順にスコアが低下していた (Figure 28 b)。しかし、詳細な病理組織評価において、関節炎惹起により有意な差が見られる項目について検討したところ、KO と WT の関節炎に明らかな差は認められなかった (data not shown)。

以上の結果より、骨粗鬆症モデル、関節炎モデルにおいて OGR1 の関与が示唆されたが、顕著な作用では無い可能性が推察された。

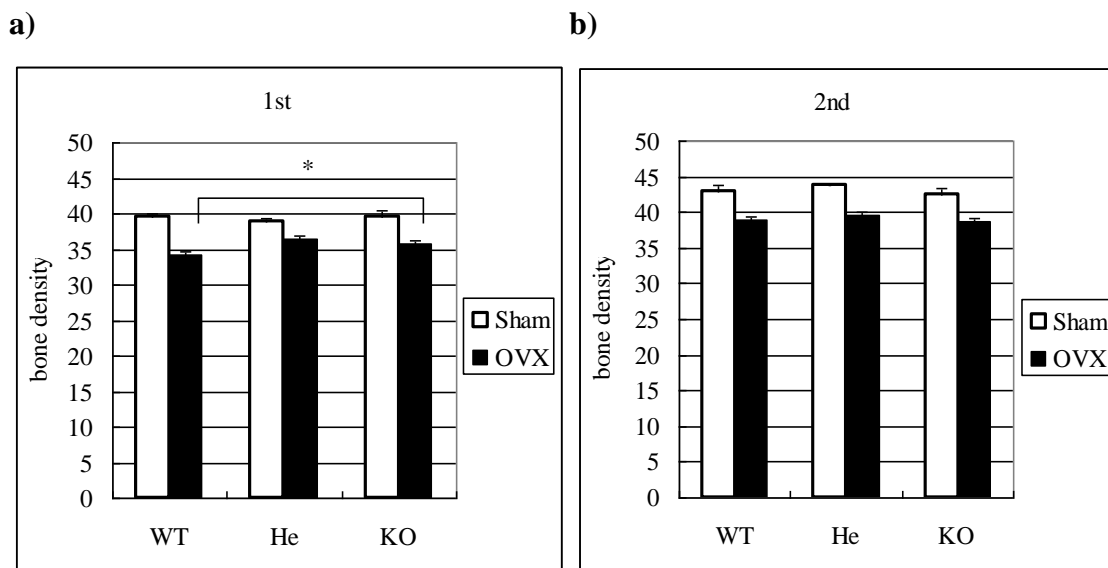


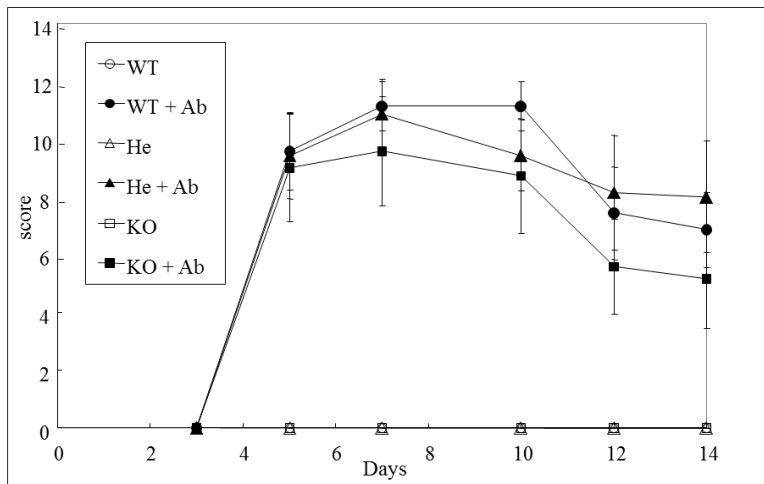
Figure 27. Bone mineral density loss in distal femur of OVX mice.

a) Bone mineral density loss was relieved in OGR1 KO mice.

b) Poor reproducibility of bone mineral density loss relief in OGR1 KO mice.

Data are means +SE, $N=8-10$, *: $P<0.05$. (WT : wild type, He : hetero, KO : knock out)

a)



b)

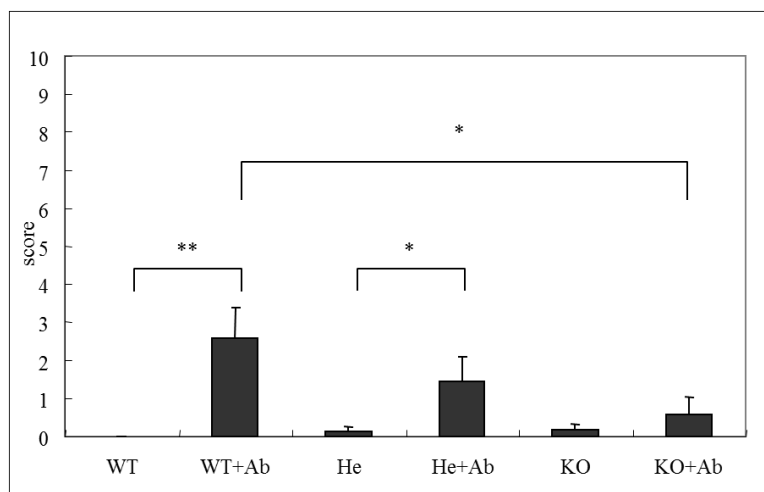


Figure 28. Swelling and bone destruction in collagen-induced arthritis mice.

a) Swelling scores were continuously lower in OGR1 KO mice than WT. (Scores are determined on a scale of 1 to 12.)

b) Bone destruction score were significantly lower in OGR1 KO mice than WT. (Scores are determined on a scale of 1 to 10.)

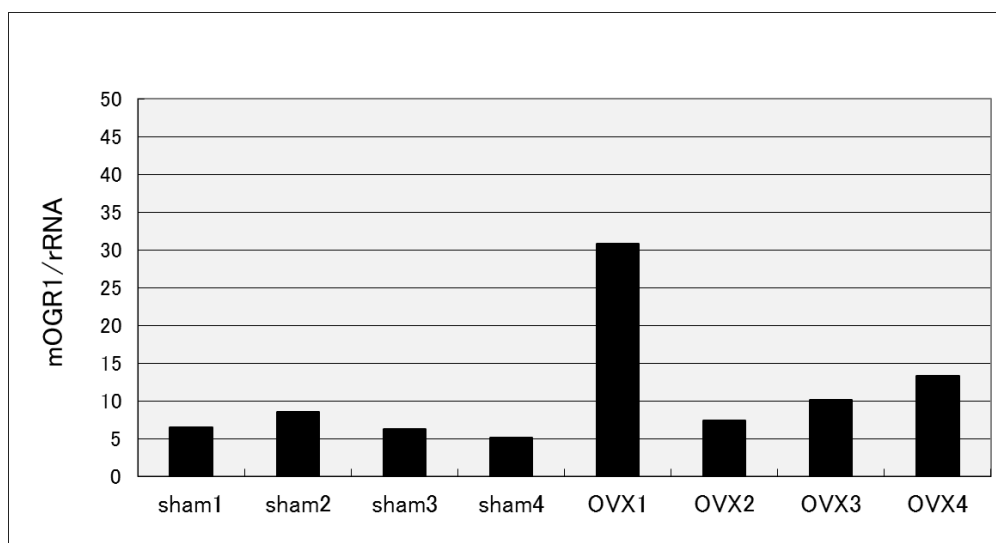
Data are means +SE, $N=8-10$, * : $P<0.05$ * : $P<0.05$, * * : $P<0.01$. (WT : wild type, He :hetero, KO : knock out, Ab : CII antibody cocktail)

3.3.3 骨組織における発現変動解析

OVX 及び不動化による骨粗鬆症モデルマウスの骨組織より抽出した mRNA において OGR1 の発現変動を解析した。その結果、OVX 手術群では、術後 7 日目において sham 群と比較して若干の発現上昇を示した (Figure 29)。また、この発現上昇は破骨細胞のマーカーである CTR と発現パターンが類似していた。一方、不動化群では sham 群と比較して OGR1 の発現変動は見られなかった (data not shown)。さらに、抗体誘導関節炎モデルの関節組織より抽出した mRNA における OGR1 の発現変動を解析した結果、炎症誘導 6 週後のサンプルにおいて、関節炎誘導群で OGR1 の発現が高い個体が散見された。一方で、8 週後のサンプルでは炎症誘導の有無による OGR1 の発現変化は見られなかった (data not shown)。

さらに骨代謝に関連するシグナルでの変化を捉えるため、Gene chip を用いて KO マウス由来の破骨細胞について網羅的な発現解析を実施した。その結果、ATPase Cu²⁺ transporting alpha polypeptide (ATP7a) が WT と比較して KO で上昇傾向であり、galactosylceramidase (Galc) が低下傾向であった。さらに TaqMan で解析を実施したところ、ATP7a は Gene chip 解析データと同様に KO マウスで上昇傾向であったが、Galc は Gene chip 解析データと相反して KO マウスで上昇していた (data not shown)。

a)



b)

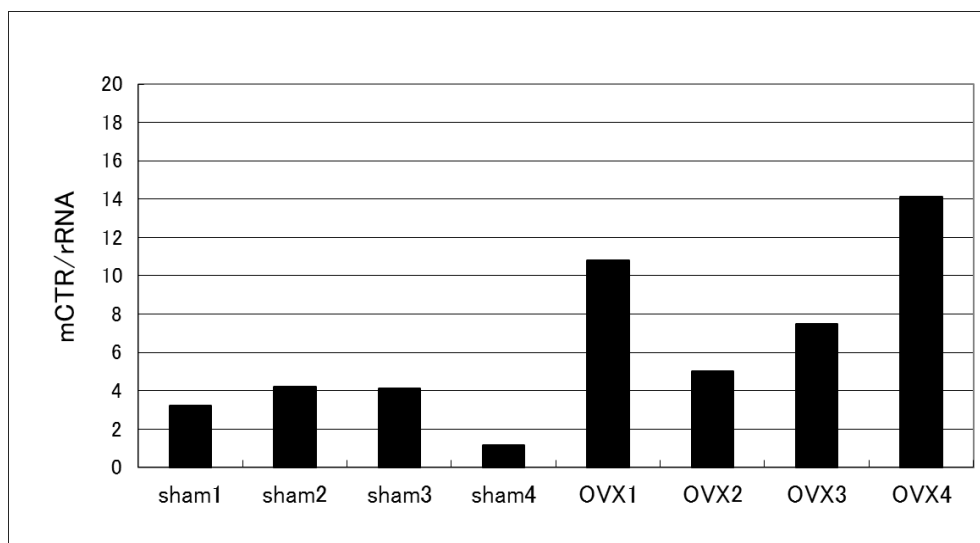


Figure 29. Gene expression analysis in OVX mice bone.

a) OGR1 mRNA expression in OVX mice day7.

b) CTR mRNA expression in OVX mice day7.

3.3.4 行動解析

Deltagen 社の報告 (<http://www.deltagen.com/>) では、Open field test における運動機能低下、Rotarod test における運動機能低下、驚愕反応における応答低下及びプレパルス抑制の増加を認めている。私が行った行動解析では Rotarod test、Grip strength test において KO マウスで僅かに抑制の傾向が見られた (Figure 30)。一方で、Tail flick test 及び自発運動には WT と KO マウスで差は見られなかった。

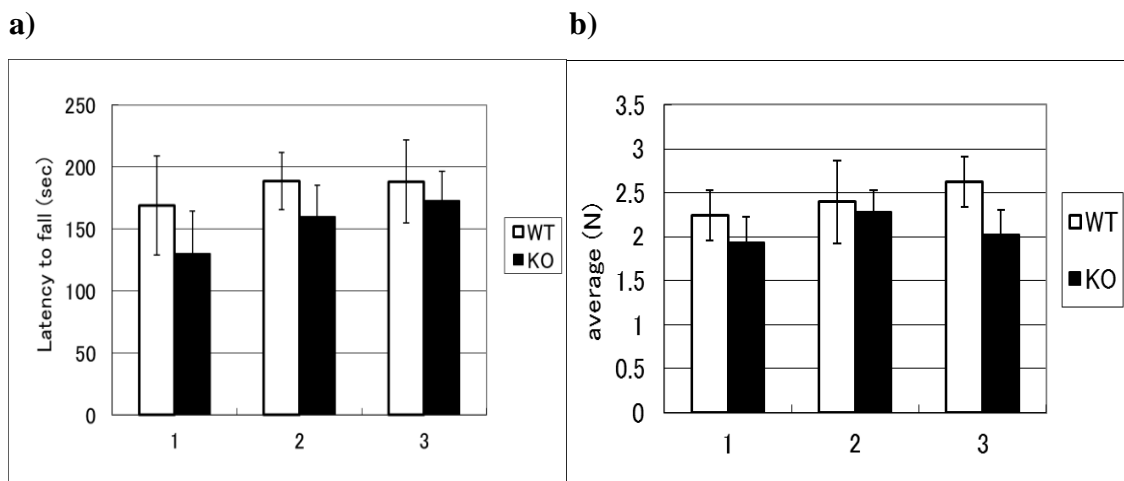


Figure 30. Behavior analysis in OGR1 KO mice.

- a) Rotarod performance test repeated 3 times at $\Phi 30$, 50 rpm/300 sec.
- b) Grip strength test repeated 3 times.

3.4 要約

骨形態計測の結果では OGR1 KO マウスにおいて骨の成長が変化している可能性が示された。各種骨疾患モデルにおける検討では OVX 骨粗鬆症モデル及び関節炎モデルにおいて OGR1 の関与が示唆されたが、その作用は比較的弱いものであった。また、OVX 骨粗鬆症モデルにおける発現解析では、破骨細胞のマーカーである CTR と発現パターンが類似して OGR1 の若干の発現上昇を示した。さらに、行動解析では Rotarod test、Grip strength test において KO マウスで僅かに抑制の傾向が見られた。以上より、OGR1 は *in vivo* における骨の成長及び骨疾患にも関与し、運動面にも影響を持つ可能性が示された。

4 全体要約

OGR1 KO マウス由来破骨細胞を用いた解析の結果、OGR1 を介した低 pH 刺激により、破骨細胞の分化が促進されること、また破骨細胞の生存が促進されることが示された。このことより、OGR1 は破骨細胞の機能においても重要な役割を示すことが示唆された。

OGR1 KO マウスを用いた基礎解析において、骨形態計測の結果では骨の成長が変化している可能性が示された。また、各種骨疾患モデルにおける検討では OVX 骨粗鬆症モデル及び関節炎モデルにおいて OGR1 の関与が示唆され

たが、その作用は比較的弱いものであった。さらに、行動解析では Rotarod test、Grip strength test において KO マウスで僅かに抑制の傾向が見られた。

以上より、OGR1 は破骨細胞に発現し、破骨細胞の形成及び生存に関与すること、また骨の成長や骨疾患にも関与することが示唆されたが、寄与はそれほど顕著ではないため骨疾患の創薬標的とするには不十分であると考えられた。

第四章 結論と予測

第一章では、創薬研究における GPCR 研究の重要性、また GPCR 研究におけるリガンドスクリーニングの有用性について論じた。さらに、本研究の中心となる OGR1 及びそのファミリーGPCR についての情報を記載した。また、OGR1 が骨疾患に関与する可能性が示されたことから、骨疾患において中心になる破骨細胞及び骨芽細胞の機能について論じた。最後に論文構成を記載した。

第二章では、OGR1 のリガンドスクリーニングにおける ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓からのアゴニスト金属の精製を中心に論じた。最初にシグナルマッピングを実施し、OGR1 は細胞内シグナルとして細胞内 IP 及びカルシウムの上昇を引き起こす Gαq カップル型であることを示唆するデータを得た。また、発現解析により、OGR1 は広範な組織に低い発現が見られるが、特に破骨細胞における発現が高く、破骨細胞の分化に伴い発現が顕著に上昇することを見出した。OGR1 のリガンドスクリーニングを実施し、ST-2 骨芽細胞培養上清及びブタ膵臓抽出サンプルにおいてアゴニスト活性を見出した。その結果、OGR1 アゴニスト活性物質として数種の金属 (Fe、Zn、Co、Ni 及び Mn) を同定した。これら各種金属の活性の比較及び濃度依存性を確認した。また、OGR1 不活性変異体及び OGR1 KO マウス由来破骨細胞においては低 pH 刺激と同様にアゴニスト金属によるシグナルも抑制されていたことから、アゴニスト金属による活性はプロトンと同じく OGR1 上の特徴的な His 残基を介していることが示唆された。

このように OGR1 が破骨細胞分化に伴って発現が上昇すること、及び骨芽細胞培養上清からアゴニスト金属が同定されたことから、破骨細胞、骨芽細胞のカップリングにおいて、骨芽細胞が何らかの生理的条件下でアゴニスト金属を放出し、OGR1 を介して破骨細胞に作用する可能性が考えられる。実際、Fe の血中濃度 200 μM 前後 (Behrangi E et al, 2015)、Zn は 10 μM 前後 (Fallah R et al, 2015)であり、OGR1 へのアゴニスト活性を十分に持つ濃度である。また、OGR1 は膵臓にも発現しており、膵臓抽出サンプルにおいて活性が見られたことは、膵臓の臓器内で OGR1 を介したシグナルが何らかの役割を果たしている可能性を示している。

さらに、Ni を用いて独自のアンタゴニスト HTS を実施し、アンタゴニスト化合物を取得した。これらのアンタゴニスト化合物を用いて破骨細胞上の OGR1 の機能を阻害することで骨粗鬆症の治療薬への応用が期待される。また、OGR1 が関与する別の疾患においても OGR1 の機能を調節することで治療薬へ応用できる可能性がある。

第三章では OGR1 KO マウスを用いて、*in vitro* における破骨細胞での機能を解析した。OGR1 を介した低 pH 刺激により、破骨細胞の分化が促進されること、また破骨細胞の生存が促進されることから OGR1 が破骨細胞の機能において重要な役割を果たすことが示された。また、*in vivo* では骨形態計測の結果において OGR1 が骨の形態に作用を示し、骨の成長を変化させている可能性が示された。また、各種骨疾患モデルにおける解析では OVX 骨粗鬆症モデル及び関節炎モデルにおいて OGR1 の関与が示唆されたが、その作用は比較的弱いも

のであった。さらに、行動解析では Rotarod test、Grip strength test において KO マウスで僅かに抑制の傾向が見られた。これらの結果から、OGR1 は破骨細胞に発現して破骨細胞機能に関与し、骨の成長や骨疾患及び運動機能にも関与することが示唆されたが、寄与はそれほど顕著ではないため骨疾患の創薬標的とするには不十分であると考えられた。

本研究においては、破骨細胞に着目して研究を実施したが、OGR1 は破骨細胞 (Iwai K et al, 2007; Pereverzev A et al, 2008; Li H et al, 2009; Kato K et al, 2013) のみならず骨芽細胞 (Tomura H et al, 2008; Frick KK et al, 2009; Frick KK et al, 2010)、軟骨細胞 (Yuan FL et al, 2014)、気道平滑筋細胞 (Ichimonji I et al, 2010; Liu JP et al, 2010; Matsuzaki S et al, 2011; Saxena H et al, 2012)、気道上皮細胞 (Liu C et al, 2013)、樹状細胞 (Aoki H et al, 2013; Horiguchi K et al, 2014)、膵 β 細胞 (Nakakura T et al, 2012; Mogi C et al, 2014)、腎近位尿細管 (Mohebbi N et al, 2012)、神経細胞株 (Kotake M et al, 2014)、後根神経節 C 繊維 (Ru F et al, 2015)、及び消化管上皮細胞株 (Thongon N et al, 2014; de Valliere C et al, 2015) 等多種の細胞に発現し機能しているとの報告がある。そのため、本研究で新規に見出した OGR1 アゴニスト金属、及び新規スクリーニング系から見出した低分子アンタゴニストを用いて、これらの細胞の機能を調節できる可能性がある。

また、細胞外の酸性化により組織の腫瘍性形質転換が増加することや腫瘍の悪性化が進展することが知られている (De Milito A et al, 2005; Gillies RJ et al, 2007)。このため、OGR1 を含むプロトン感受性 GPCR の腫瘍化に関する研究が行われている (Huang WC et al, 2008; Justus CR et al, 2013; Damaghi M et al,

2013)。OGR1 KO マウスではメラノーマ細胞の腫瘍化が抑制されている報告 (Li H et al, 2009)、及び OGR1 の発癌性に関与する報告 (Yan L et al, 2014) がある。一方で、卵巣癌細胞 (Ren J et al, 2011)、前立腺癌細胞 (Singh LS et al, 2007)、及び乳癌細胞 (Li J et al, 2013) における OGR1 の癌転移抑制作用の報告もある。このように、現時点では OGR1 が癌の進展及び抑制のどちらに機能するかは明確ではないため今後の研究が待たれるが、癌研究の分野においても本研究で新規に見出した OGR1 アゴニスト金属及びアンタゴニスト HTS 系を活用できる可能性がある。

謝辞

本研究を遂行し、学位論文を執筆するにあたり、ご指導、ご支援及び激励を賜りました全ての方に心より感謝いたします。

多大なご支援とご指導を賜りました指導教官の筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻の深水昭吉教授に深く感謝いたします。

本研究は第一三共株式会社及びその前身である三共株式会社において実施されました。本研究を実施する機会及び論文を執筆する機会を与えて下さりました磯野藤男博士 (アスピオファーマ株式会社)、高橋正明博士及び奥山亮博士 (第一三共株式会社) に深く感謝いたします。特に、本研究の開始から論文執筆までの長きにわたり、多大なご支援、ご指導及び激励を賜りました奈良太博士 (第一三共株式会社) に心より感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、多くのご協力及びディスカッションを賜りました塩澤秀幸博士、望月伸一博士 (第一三共株式会社)、石川富雄研究員 (第一三共 RD ノバーレ株式会社) 及び須田幸治博士 (アスピオファーマ株式会社) に深く感謝いたします。また、データの取得及び論文執筆にご協力を賜りました多くの第一三共株式会社の関係者の皆様にこの場を借りて深く感謝いたします。

最後に、博士後期過程社会人特別選抜への進学及び学位論文の執筆を応援し見守ってくれた家族に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

引用文献

- 1) Abe-Ohya R, Ishikawa T, Shiozawa H, Suda K, Nara F, 2015. Identification of metals from osteoblastic ST-2 cell supernatants as novel OGR1 agonists. *J Recept Signal Transduct* 35:485-92.
- 2) Ananthanarayanan VS, Kerman A, 2006. Role of metal ions in ligand-receptor interaction: insights from structural studies. *Mol Cell Endocrinol* 246:53-59.
- 3) Aoki H, Mogi C, 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, 2013. 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:e79985.
- 4) Behrangi E, Baniasadi F, Esmaeeli S, Hedayat K, Goodarzi A, Azizian Z, 2015. Serum iron level, ferritin and total iron binding capacity level among nonpregnant women with and without melasma. *J Res Med Sci* 20:281-283.
- 5) Bolick DT, Whetzel AM, Skaflen M, Deem TL, Lee J, Hedrick CC, 2007. Absence of the G protein-coupled receptor G2A in mice promotes monocyte/endothelial interactions in aorta. *Circ Res* 100:572-580.
- 6) Bolick DT, Skaflen MD, Johnson LE, Kwon SC, Howatt D, Daugherty A, Ravichandran KS, Hedrick CC, 2009. G2A deficiency in mice promotes macrophage activation and atherosclerosis. *Circ Res* 104:318-327.
- 7) Bornhorst JA, Falke JJ, 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol* 326:245-254.
- 8) Brogi S, Tafi A, Desaubry L, Nebigil CG, 2014. Discovery of GPCR ligands for probing signal transduction pathways. *Front Pharmacol* 5:255.
- 9) Chung S, Funakoshi T, Civelli O, 2008. Orphan GPCR research. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S339-46.
- 10) Civelli O, Saito Y, Wang Z, Nothacker HP, Reinscheid RK, 2006. Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol Ther* 110:525-532.

- 11) Damaghi M, Wojtkowiak JW, Gillies RJ, 2013. pH sensing and regulation in cancer. *Front Physiol* 4:370.
- 12) De Milito A, Fais S, 2005. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncol* 1:779-786.
- 13) de Vallière C, Vidal S, Clay I, Jurisic G, Tcymbarevich I, Lang S, Ludwig MG, Okoniewski M, Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA, Wagner CA, Rogler G, Seuwen K, 2015. The pH-sensing receptor OGR1 improves barrier function of epithelial cells and inhibits migration in an acidic environment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 309:G475-90.
- 14) Dong L, Li Z, Leffler NR, Asch AS, Chi JT, Yang LV, 2013. Acidosis activation of the proton-sensing GPR4 receptor stimulates vascular endothelial cell inflammatory responses revealed by transcriptome analysis. *PLoS One* 8:e61991.
- 15) Fallah R, Sabbaghzadegan S, Karbasi SA, Binesh F, 2015. Efficacy of zinc sulfate supplement on febrile seizure recurrence prevention in children with normal serum zinc level: A randomised clinical trial. *Nutrition* 31:1358-1361.
- 16) Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS, 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015:421746.
- 17) Frick KK, Krieger NS, Nehrke K, Bushinsky DA, 2009. Metabolic acidosis increases intracellular calcium in bone cells through activation of the proton receptor OGR1. *J Bone Miner Res* 24:305-313.
- 18) Frick KK, Bushinsky DA, 2010. Effect of metabolic and respiratory acidosis on intracellular calcium in osteoblasts. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F418-25.
- 19) Gennari L, Rotatori S, Bianciardi S, Gonnelli S, Nuti R, Merlotti D, 2015. Appropriate models for novel osteoporosis drug discovery and future perspectives. *Expert Opin Drug Discov* 1-16.
- 20) Giguere PM, Kroeze WK, Roth BL, 2014. Tuning up the right signal: chemical and genetic approaches to study GPCR functions. *Curr Opin Cell Biol* 27:51-55.
- 21) Gillies RJ, Gatenby RA, 2007. Hypoxia and adaptive landscapes in the evolution of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 26:311-317.

- 22) He XD, Tobo M, Mogi C, Nakakura T, Komachi M, Murata N, Takano M, Tomura H, Sato K, Okajima F, 2011. Involvement of proton-sensing receptor TDAG8 in the anti-inflammatory actions of dexamethasone in peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 415:627-631.
- 23) Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, Storjohann L, Stidsen CE, Jones R, Beck-Sickinger AG, Schwartz TW, 2007. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 148:13-20.
- 24) Horiguchi K, Higuchi M, Yoshida S, Nakakura T, Tateno K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Kato T, Kato Y, 2014. Proton receptor GPR68 expression in dendritic-cell-like S100beta-positive cells of rat anterior pituitary gland: GPR68 induces interleukin-6 gene expression in extracellular acidification. *Cell Tissue Res* 358:515-525.
- 25) Huang WC, Swietach P, Vaughan-Jones RD, Ansorge O, Glitsch MD, 2008. Extracellular acidification elicits spatially and temporally distinct Ca²⁺ signals. *Curr Biol* 18:781-785.
- 26) Hutchings CJ, Cseke G, Osborne G, Woolard J, Zhukov A, Koglin M, Jazayeri A, Pandya-Pathak J, Langmead CJ, Hill SJ, Weir M, Marshall FH, 2014. Monoclonal anti-beta1-adrenergic receptor antibodies activate G protein signaling in the absence of beta-arrestin recruitment. *MAbs* 6:246-261.
- 27) Ichimonji I, Tomura H, Mogi C, Sato K, Aoki H, Hisada T, Dobashi K, Ishizuka T, Mori M, Okajima F, 2010. Extracellular acidification stimulates IL-6 production and Ca²⁺ mobilization through proton-sensing OGR1 receptors in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299:L567-77.
- 28) Im DS, 2005. Two ligands for a GPCR, proton vs lysolipid. *Acta Pharmacol Sin* 26:1435-1441.
- 29) Iwai K, Koike M, Ohshima S, Miyatake K, Uchiyama Y, Saeki Y, Ishii M, 2007. RGS18 acts as a negative regulator of osteoclastogenesis by modulating the acid-sensing OGR1/NFAT signaling pathway. *J Bone Miner Res* 22:1612-1620.

- 30) Jia P, Xu YJ, Zhang ZL, Li K, Li B, Zhang W, Yang H, 2012. Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species. *J Orthop Res* 30:1843-1852.
- 31) Jin-Peng Liu, Takashi Nakakura, Hideaki Tomura, Masayuki Tobo, Chihiro Mogi, 2010. 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. *Pharmacological Research*.
- 32) Justus CR, Dong L, Yang LV, 2013. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. *Front Physiol* 4:354.
- 33) Kato K, Morita I, 2013. Promotion of osteoclast differentiation and activation in spite of impeded osteoblast-lineage differentiation under acidosis: effects of acidosis on bone metabolism. *Biosci Trends* 7:33-41.
- 34) Ke N, Nguyen K, Irelan J, Abassi YA, 2015. Multidimensional GPCR profiling and screening using impedance-based label-free and real-time assay. *Methods Mol Biol* 1272:215-226.
- 35) Khoury E, Clément S, Laporte SA, 2014. Allosteric and biased G protein-coupled receptor signaling regulation: potentials for new therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:68.
- 36) Komarova SV, Pereverzev A, Shum JW, Sims SM, Dixon SJ, 2005. Convergent signaling by acidosis and receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) on the calcium/calcineurin/NFAT pathway in osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2643-2648.
- 37) Kotake M, Sato K, Mogi C, Tobo M, Aoki H, Ishizuka T, Sunaga N, Imai H, Kaira K, Hisada T, Yamada M, Okajima F, 2014. Acidic pH increases cGMP accumulation through the OGR1/phospholipase C/Ca(2+)/neuronal NOS pathway in N1E-115 neuronal cells. *Cell Signal* 26:2326-2332.
- 38) Kumari P, Ghosh E, Shukla AK, 2015. Emerging Approaches to GPCR Ligand Screening for Drug Discovery. *Trends Mol Med* .
- 39) Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, Kostenuik PJ, Dougall WC, Sullivan JK, San Martin J, Dansey R, 2012. Bench to bedside: elucidation of the

- OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov* 11:401-419.
- 40) Laganowsky A, Zhao M, Soriaga AB, Sawaya MR, Cascio D, Yeates TO, 2011. An approach to crystallizing proteins by metal-mediated synthetic symmetrization. *Protein Sci* 20:1876-1890.
- 41) Levoye A, Jockers R, 2008. Alternative drug discovery approaches for orphan GPCRs. *Drug Discov Today* 13:52-58.
- 42) Li H, Wang D, Singh LS, Berk M, Tan H, Zhao Z, Steinmetz R, Kirmani K, Wei G, Xu Y, 2009. Abnormalities in osteoclastogenesis and decreased tumorigenesis in mice deficient for ovarian cancer G protein-coupled receptor 1. *PLoS One* 4:e5705.
- 43) Li J, Guo B, Wang J, Cheng X, Xu Y, Sang J, 2013. Ovarian cancer G protein coupled receptor 1 suppresses cell migration of MCF7 breast cancer cells via a Galpha12/13-Rho-Rac1 pathway. *J Mol Signal* 8:6.
- 44) Liu C, Li Q, Zhou X, Kolosov VP, Perelman JM, 2013. Regulator of G-protein signaling 2 inhibits acid-induced mucin5AC hypersecretion in human airway epithelial cells. *Respir Physiol Neurobiol* 185:265-271.
- 45) Liu JP, Komachi M, Tomura H, Mogi C, Damirin A, Tobo M, Takano M, Nochi H, Tamoto K, Sato K, Okajima F, 2010. 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* 299:H731-42.
- 46) Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K, 2003. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature* 425:93-98.
- 47) Luttrell LM, Maudsley S, Bohn LM, 2015. Fulfilling the Promise of "Biased" G Protein-Coupled Receptor Agonism. *Mol Pharmacol* 88:579-588.
- 48) Makras P, Delaroudis S, Anastasilakis AD, 2015. Novel therapies for osteoporosis. *Metabolism* 64:1199-1214.
- 49) 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, 2011. Extracellular acidification induces connective tissue growth factor production through proton-sensing receptor OGR1 in human airway smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 413:499-503.
- 50) Mogi C, Tomura H, Tobo M, Wang JQ, Damirin A, Kon J, Komachi M, Hashimoto K, Sato K, Okajima F, 2005. Sphingosylphosphorylcholine antagonizes proton-sensing ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1)-mediated inositol phosphate production and cAMP accumulation. *J Pharmacol Sci* 99:160-167.
- 51) Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T, Sato T, Kihara Y, Ishii S, Harada A, Okajima F, 2009. Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J Immunol* 182:3243-3251.
- 52) Mogi C, Nakakura T, Okajima F, 2014. Role of extracellular proton-sensing OGR1 in regulation of insulin secretion and pancreatic beta-cell functions. *Endocr J* 61:101-110.
- 53) Mohebbi N, Benabbas C, Vidal S, Daryadel A, Bourgeois S, Velic A, Ludwig MG, Seuwen K, Wagner CA, 2012. The proton-activated G protein coupled receptor OGR1 acutely regulates the activity of epithelial proton transport proteins. *Cell Physiol Biochem* 29:313-324.
- 54) Müller A, Kleinau G, Piechowski CL, Müller TD, Finan B, Pratzka J, Grüters A, Krude H, Tschöp M, Biebermann H, 2013. G-protein coupled receptor 83 (GPR83) signaling determined by constitutive and zinc(II)-induced activity. *PLoS One* 8:e53347.
- 55) Murakami N, Yokomizo T, Okuno T, Shimizu T, 2004. G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem* 279:42484-42491.
- 56) Nakakura T, Mogi C, Tobo M, Tomura H, Sato K, Kobayashi M, Ohnishi H, Tanaka S, Wayama M, Sugiyama T, Kitamura T, Harada A, Okajima F, 2012. Deficiency of proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Endocrinology* 153:4171-4180.

- 57) Nichols KG, Puleo DA, 1997. Effect of metal ions on the formation and function of osteoclastic cells *in vitro*. J Biomed Mater Res 35:265-271.
- 58) Niedźwiedzki T, Filipowska J, 2015. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. J Mol Endocrinol 55:R23-36.
- 59) Noordin S, Glowacki J, 2015. Parathyroid hormone and its receptor gene polymorphisms: implications in osteoporosis and in fracture healing. Rheumatol Int .
- 60) Obinata H, Hattori T, Nakane S, Tatei K, Izumi T, 2005. Identification of 9-hydroxyoctadecadienoic acid and other oxidized free fatty acids as ligands of the G protein-coupled receptor G2A. J Biol Chem 280:40676-40683.
- 61) Onozawa Y, Fujita Y, Kuwabara H, Nagasaki M, Komai T, Oda T, 2012. Activation of T cell death-associated gene 8 regulates the cytokine production of T cells and macrophages *in vitro*. Eur J Pharmacol 683:325-331.
- 62) Patntirapong S, Habibovic P, Hauschka PV, 2009. Effects of soluble cobalt and cobalt incorporated into calcium phosphate layers on osteoclast differentiation and activation. Biomaterials 30:548-555.
- 63) Pereverzev A, Komarova SV, Korčok J, Armstrong S, Tremblay GB, Dixon SJ, Sims SM, 2008. Extracellular acidification enhances osteoclast survival through an NFAT-independent, protein kinase C-dependent pathway. Bone 42:150-161.
- 64) Radu CG, Nijagal A, McLaughlin J, Wang L, Witte ON, 2005. Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. Proc Natl Acad Sci U S A 102:1632-1637.
- 65) Ren J, Zhang L, 2011. Effects of ovarian cancer G protein coupled receptor 1 on the proliferation, migration, and adhesion of human ovarian cancer cells. Chin Med J (Engl) 124:1327-1332.
- 66) Ritter SL, Hall RA, 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. Nat Rev Mol Cell Biol 10:819-830.

- 67) Rousselle AV, Heymann D, Demais V, Charrier C, Passuti N, Baslé MF, 2002. Influence of metal ion solutions on rabbit osteoclast activities *in vitro*. *Histol Histopathol* 17:1025-1032.
- 68) Ru F, Banovcin P Jr, Kollarik M, 2015. Acid sensitivity of the spinal dorsal root ganglia C-fiber nociceptors innervating the guinea pig esophagus. *Neurogastroenterol Motil* 27:865-874.
- 69) Saxena H, Deshpande DA, Tiegs BC, Yan H, Battafarano RJ, Burrows WM, Damera G, Panettieri RA, Dubose TD Jr, An SS, Penn RB, 2012. The GPCR OGR1 (GPR68) mediates diverse signalling and contraction of airway smooth muscle in response to small reductions in extracellular pH. *Br J Pharmacol* 166:981-990.
- 70) Seuwen K, Ludwig MG, Wolf RM, 2006. Receptors for protons or lipid messengers or both? *J Recept Signal Transduct Res* 26:599-610.
- 71) Singh LS, Berk M, Oates R, Zhao Z, Tan H, Jiang Y, Zhou A, Kirmani K, Steinmetz R, Lindner D, Xu Y, 2007. Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1, a new metastasis suppressor gene in prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 99:1313-1327.
- 72) Stockert JA, Devi LA, 2015. Advancements in therapeutically targeting orphan GPCRs. *Front Pharmacol* 6:100.
- 73) Thongon N, Ketkeaw P, Nuekchob C, 2014. The roles of acid-sensing ion channel 1a and ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on passive Mg²⁺ transport across intestinal epithelium-like Caco-2 monolayers. *J Physiol Sci* 64:129-139.
- 74) Tomura H, Wang JQ, Komachi M, Damirin A, Mogi C, Tobo M, Kon J, Misawa N, Sato K, Okajima F, 2005. Prostaglandin I(2) production and cAMP accumulation in response to acidic extracellular pH through OGR1 in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 280:34458-34464.
- 75) Tomura H, Mogi C, Sato K, Okajima F, 2005. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cell Signal* 17:1466-1476.
- 76) Tomura H, Wang JQ, Liu JP, Komachi M, Damirin A, Mogi C, Tobo M, Nochi H, Tamoto K, Im DS, Sato K, Okajima F, 2008. Cyclooxygenase-2 expression and

- prostaglandin E2 production in response to acidic pH through OGR1 in a human osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 23:1129-1139.
- 77) Törring O, 2015. Effects of denosumab on bone density, mass and strength in women with postmenopausal osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 7:88-102.
- 78) Ullmer C, Zoffmann S, Bohrmann B, Matile H, Lindemann L, Flor P, Malherbe P, 2012. Functional monoclonal antibody acts as a biased agonist by inducing internalization of metabotropic glutamate receptor 7. *Br J Pharmacol* 167:1448-1466.
- 79) Van Noorden R, 2012. Nobel work boosts drug development. *Nature* 490:320.
- 80) Wang D, Li Y, Zhang Y, Liu Y, Shi G, 2012. High throughput screening (HTS) in identification new ligands and drugable targets of G protein-coupled receptors (GPCRs). *Comb Chem High Throughput Screen* 15:232-241.
- 81) Wang JQ, Kon J, Mogi C, Tobo M, Damirin A, Sato K, Komachi M, Malchinkhuu E, Murata N, Kimura T, Kuwabara A, Wakamatsu K, Koizumi H, Uede T, Tsujimoto G, Kurose H, Sato T, Harada A, Misawa N, Tomura H, Okajima F, 2004. TDAG8 is a proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 279:45626-45633.
- 82) Wisler JW, Xiao K, Thomsen AR, Lefkowitz RJ, 2014. Recent developments in biased agonism. *Curr Opin Cell Biol* 27:18-24.
- 83) Xiao SH, Reagan JD, Lee PH, Fu A, Schwandner R, Zhao X, Knop J, Beckmann H, Young SW, 2008. High throughput screening for orphan and liganded GPCRs. *Comb Chem High Throughput Screen* 11:195-215.
- 84) Xu B, Lovre D, Mauvais-Jarvis F, 2015. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis. *Biochimie* .
- 85) Xu Y, Casey G, 1996. Identification of human OGR1, a novel G protein-coupled receptor that maps to chromosome 14. *Genomics* 35:397-402.
- 86) Yamaguchi M, 2010. Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Mol Cell Biochem* 338:241-254.

- 87) Yamaguchi M, Weitzmann MN, 2011. Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF-kappaB activation. *Mol Cell Biochem* 355:179-186.
- 88) Yan L, Singh LS, Zhang L, Xu Y, 2014. Role of OGR1 in myeloid-derived cells in prostate cancer. *Oncogene* 33:157-164.
- 89) Yang M, Mailhot G, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Odgren PR, 2006. Expression of and role for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) during osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 281:23598-23605.
- 90) Yuan FL, Wang HR, Zhao MD, Yuan W, Cao L, Duan PG, Jiang YQ, Li XL, Dong J, 2014. Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 is involved in acid-induced apoptosis of endplate chondrocytes in intervertebral discs. *J Bone Miner Res* 29:67-77.
- 91) Zhou L, Li S, Su Y, Yi X, Zheng A, Deng F, 2013. Interaction between histidine and Zn(II) metal ions over a wide pH as revealed by solid-state NMR spectroscopy and DFT calculations. *J Phys Chem B* 117:8954-8965.