The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨形成に対するリンおよびリン代謝調節因子関連ペプチドの影響
Author(s)	林原, 哲之
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44750
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【57】

氏　　名	林（はやし）　原（ばら）　哲（てつ）　之（ゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　１８８７５　号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	**骨形成に対するリンおよびリン代謝調節因子関連ペプチドの影響**
論文審査委員	（主査） 教　授　米田　俊之 （副査） 教　授　大嶋　　隆　　助教授　原田　英光　　講　師　豊澤　　悟

論　文　内　容　の　要　旨

リンは、骨の主たる構成成分の一つであり、骨の代謝にはリン代謝が重要な役割を果たすことが推察されている。これを支持する所見として、低リン血症などのリン代謝異常を示す疾患においては、骨の石灰化不全や骨格異常が認められる。またこれらの疾患においてはホルモン様低リン血症誘発因子の存在が推測されており、この因子と骨形成との関係も注目されている。近年このような低リン血症誘発因子の有力な候補分子の一つとして matrix extracellular phosphoglycoprotein（MEPE）が骨軟化症を惹起する腫瘍から同定された。

そこで本研究では骨代謝調節におけるリンの役割を明らかにすることを目的として、まずヒト XLH の病態モデルである Hyp マウスを用い、リン代謝異常と骨格異常の関連について検討を行った。さらに、リン代謝および骨代謝において重要な分子と考えられる MEPE の断片ペプチドが、どのような作用を有するかを検討するために、ヒト MEPE の配列より合成した断片ペプチド（AC-100）の骨形成及び骨吸収に対する作用についても検討を加えた。

＜実験方法＞

1．Hyp マウスの組織学的検索

4 週齢の野生型および Hyp マウス脛骨を HE 染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色により、組織学的検索およびコンタクトマイクロラジオグラフィー（CMR）を用いて石灰化度の検討を行った。

2．Hyp マウス骨髄細胞の破骨細胞様細胞への分化

Hyp マウスより採取した骨髄細胞の破骨細胞様細胞への分化を TRAP 陽性多核細胞形成を指標として検討した。誘導した破骨細胞様細胞の骨吸収能は薄切象牙片上に形成された吸収窩の面積を測定することにより評価した。骨髄細胞における RANKL（receptor activator of NF-kB ligand）および OPG（osteoprotegerin）の発現を RT-PCR 法により評価した。

3．高リン食での飼育による骨格異常の改善

生後 2 日齢より 4 週齢まで Hyp マウスを高リン食（リン 3％含有）と通常食（リン 0.81％含有）により飼育し、血清中リン濃度の測定、脛骨の組織学的および CMR による検索を行った。

4．AC-100 の骨形成作用の検討

新生仔マウスより採取した頭蓋骨の器官培養系に、AC-100 を添加して培養後、骨芽細胞数および新生骨量について組織形態計測学的検索を行った。また、AC-100 をマウス頭部皮下に連続投与し、カルセイン二重標識法

により新生骨量を評価した。

5．AC-100の骨芽細胞の増殖・分化に対する作用

ヒト初代培養骨芽細胞（HPO 細胞）を用い、細胞増殖は比色定量法により、分化はアルカリフォスファターゼ（ALP）活性により評価した。

6．AC-100による細胞内シグナルの検討

AC-100 をコートした培養皿に HPO 細胞を播種し、focal adhesion kinase（FAK）と extracellular signal-regulated protein kinase（ERK）のリン酸化をウエスタンブロッティング法により評価した。

＜結果＞

組織学的検索により Hyp マウスの脛骨では野生型マウスと比較して海綿骨量の有意な増加を認めた。また、CMR により Hyp マウスの海綿骨では石灰化の低下を認めた。さらに、Hyp マウスでは、破骨細胞数の有意な減少を認めた。この破骨細胞数の減少は海綿骨の石灰化の低下と相関していた。一方、in vitro において骨髄細胞から誘導される破骨細胞形成数および骨吸収窩面積は野生型マウスと Hyp マウスの間で差は認められなかった。培養液中のリン濃度を下げた場合、いずれのマウスの骨髄細胞においても RANKL mRNA の発現は減少し、破骨細胞形成は抑制された。また、Hyp マウスを４週間高リン食で飼育した場合、血清中リン濃度および骨石灰化度は改善され、破骨細胞の数も増加した。

マウス頭蓋骨器官培養および頭部皮下への局所投与による検討の結果、AC-100 が骨形成を促進することが示された。また、その骨形成促進効果にはインテグリン結合配列（RGD）とグリコサミノグリカン結合配列（SGDG）が共に必要であった。さらに、AC-100 はヒト初代培養骨芽細胞の増殖および分化を促進した。また、AC-100 は骨芽細胞の FAK および ERK のリン酸化を亢進した。さらに、AC-100 の添加により破骨細胞様細胞形成数は濃度依存的に増加したが、MEPE は逆に濃度依存的に破骨細胞様細胞形成数を減少させた。

＜考察と結論＞

本研究の結果より、ヒトの XLH 病態動物モデルである Hyp マウスの骨格異常は、これまでに報告されている骨芽細胞による骨形成の低下のみならず、破骨細胞による骨吸収の低下も原因の一つであることが示された。この骨吸収の低下は、破骨細胞系細胞自身の本質的障害ではなく、骨の石灰化不全、低リン血症などの環境的要因により破骨細胞の形成が抑制され、骨リモデリングが低下した結果であることが示唆された。また、リン代謝異常と骨形成不全を呈する疾患において発現が増加している MEPE およびその断片ペプチドが異なる様式で骨形成と骨吸収の両方に作用することが示唆された。本研究の結果よりリンは骨吸収と骨形成の制御に密接に関与することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨代謝調節におけるリンの役割を検討する目的で、低リン血症と骨形成不全を呈する Hyp マウスを用いて組織学的および細胞生物学的検討を行ったものである。その結果、血中リンの低下による破骨細胞の形成異常、ならびに機能障害が Hyp マウスにおける骨格異常に密接に関与することが明らかとなった。さらに、リン代謝を調節するホルモン様因子 MEPE の断片ペプチドが骨形成を促進し、破骨細胞形成を増強することが示された。

以上の結果は、骨代謝制御におけるリン代謝の役割を理解する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。