



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Sodium-dependent vitamin C transporter 2 を介する骨芽細胞分化の調節                                                                                          |
| Author(s)    | 呉, 希美                                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 2004, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/44802">https://hdl.handle.net/11094/44802</a>                                                             |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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

氏 名 吳 希 美

博士の専攻分野の名称 博士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 18645 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 1 項該当

薬学研究科応用医療薬科学専攻

学 位 論 文 名 Sodium-dependent vitamin C transporter 2 を介する骨芽細胞分化の調節

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 田 中 慶一

(副査)

教 授 土 井 健 史 教 授 西 原 力 教 授 宮 本 和 久

## 論 文 内 容 の 要 旨

最近還元型アスコルビン酸 (AA) を特異的に輸送するトランスポーターsodium-dependent vitamin C transporter (SVCT) 1 および 2 がラットでクローニングされ、また申請者の研究室ではマウス SVCT1 及び 2 を同定・クローニングしている。AA 膜輸送の主要な部分は SVCT を介すると考えられている。骨芽細胞は AA 存在下で長期間培養することにより、細胞増殖が盛んな期間を過ぎた後、様々な形質を発現し前骨芽細胞から骨芽細胞、さらには骨細胞へと分化する。MC3T3-E1 骨芽細胞における AA 輸送は SVCT1 ではなく、SVCT2 によって行われる。そこで MC3T3-E1 骨芽細胞の細胞内への AA 輸送制御を考察する好材料と考え、骨芽細胞における AA 輸送制御の重要性など SVCT2 の関与を明らかにすることを目指した。一方、骨形成の調節には、全身性ホルモン、サイトカイン、骨吸収過程で骨基質へ放出される局所のイオンおよび微量元素なども重要な役割を担っていると考えられるが、これらの因子の骨代謝調節作用における SVCT2 および AA の役割は全く明らかにされていない。本研究では骨の最も基本的な成分である  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{PO}_4^{3-}$  イオン、および体内含量の多くが骨に分布する微量元素である亜鉛に注目した検討を行い、SVCT2 発現と AA 取り込みに対する影響を見出した。さらに、骨芽細胞分化における SVCT2 および AA の意義についても興味ある知見を得た。

$\text{Ca}^{2+}$  あるいは  $\text{PO}_4^{3-}$  除去培地での培養に対するこれらイオンの添加は、SVCT2 および骨芽細胞分化マーカーである osteopontin (OPN) mRNA 発現、OPN プロモーター活性を促進した。また、L タイプ Ca チャネルブロッカー nifedipine あるいはタイプ III リン酸イオントランスポーターブロッカー foscarnet は、 $\text{Ca}^{2+}$  あるいは  $\text{PO}_4^{3-}$  イオンによる SVCT2 および OPN mRNA 発現、OPN プロモーター活性誘導を抑制した。 $\text{Ca}^{2+}$  あるいは  $\text{PO}_4^{3-}$  を添加した培養で細胞の AA 取り込み能が顕著に上昇し、nifedipine あるいは foscarnet はそれぞれのイオンによる AA 取り込み能上昇を抑制した。膜分画 SVCT2 タンパク質はこれらイオンの処理により発現が誘導された。以上の知見よりこれら両イオンは SVCT2 および OPN mRNA レベルを上昇させるとともに、AA 取り込み能を高めることが示された。また、このような  $\text{Ca}^{2+}$  の作用は細胞膜 Ca 感受性受容体を介するものではなく、L タイプ Ca チャネルを介すると考えられ、一方、 $\text{PO}_4^{3-}$  イオンの作用はタイプ III リン酸イオントランスポーターを介して発現すると考えられた。

AA 存在下の培養で亜鉛は濃度依存的に SVCT2 mRNA 発現を誘導し、また、AA 非存在下の培養でも亜鉛の作用は発現した。輸送反応のパラメータを AA 存在下における亜鉛処理の有無、および AA 非存在下における亜鉛処理の

有無で比較すると、いずれの場合も亜鉛処理の対照群と比較して  $K_m$  値の変化は認められなかった。一方、 $V_{max}$  は細胞の亜鉛処理で上昇し、AA の有無と無関係であった。膜分画 SVCT2 タンパク質の発現は亜鉛処理で誘導され、この作用は AA の存在に依存しなかった。亜鉛の SVCT2 誘導は AA の骨芽細胞内への取り込みを介して骨芽細胞分化を促進するものと考えられる。そこで、AA 存在下および非存在下の亜鉛処理で、分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼ (ALP)、 $\alpha_1$  (I) procollagen (COL)、OPN およびオステオカルシン (OCN) mRNA の発現を解析した。ALP、COL mRNA 発現は亜鉛で誘導され、AA 存在下で亜鉛の作用が強く現れた。OPN および OCN mRNA 発現は AA 依存的に亜鉛で誘導された。従って、亜鉛による ALP、COL、OPN および OCN 誘導の大部分は SVCT2 誘導と AA を介すると考えられた。

$Ca^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$  あるいは亜鉛で処理した際に骨芽細胞の分化マーカー発現が誘導され、この現象は SVCT2 発現誘導および AA 取り込み上昇を介すると推定された。そこで、SVCT2 を過剰安定発現する (前) 骨芽細胞を作成し、骨芽細胞分化形質の発現変化を解析した。SVCT2 過剰発現細胞は、SVCT2 mRNA 発現と AA 取り込み能が対照細胞と比較して亢進しており、 $V_{max}$  は約 2.2 倍であった。この上昇率は上述のイオンや亜鉛による骨芽細胞分化誘導時の AA 取り込み上昇に相当する変化であり、SVCT2 誘導とそれに伴う AA 取り込み促進を介した骨芽細胞分化を検討するのに適した細胞であると考えられた。SVCT2 安定発現細胞における骨芽細胞分化マーカー発現を対照と比較すると、AA 存在下の培養で SVCT2 過剰発現による ALP、COL および OPN mRNA 発現が上昇したが、AA 非存在下の培養では OPN 以外の分化マーカーの発現上昇は認められなかった。また、AA 非存在下の培養と比較して、AA 存在下の方が OPN mRNA 発現は高値であった。以上の結果より、SVCT2 安定過剰発現により骨芽細胞初期分化マーカー (ALP、COL)、および後期分化マーカー (OPN) 発現が亢進し、その作用は主として SVCT2 で輸送される AA を介していることが明らかとなった。骨芽細胞分化過程の最終段階では骨芽細胞による骨基質の石灰化が起こり、骨形成が完成する。そこで、SVCT2 安定過剰発現による石灰化能の変化を解析した。SVCT2 過剰発現細胞がコンフルエントの 7 日目に石灰化 nodule を形成し始めるのに対して、同時点で対照細胞の石灰化は全く観察されなかった。対照細胞の石灰化は SVCT2 過剰発現細胞より少なくとも 3 日間遅れて開始され、同時点では SVCT2 過剰発現細胞は顕著な石灰化を生じていた。von Kossa 像と Ca 含量を評価したところ、コンフルエント 9 日目に SVCT2 安定発現細胞と対照細胞の石灰化 nodule 形成および Ca 沈着量に最大の差を認めた。これらの検討から SVCT2 過剰発現により石灰化が顕著に加速されることが明らかとなった。

本研究では  $Ca^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$  イオンおよび亜鉛と、骨芽細胞の SVCT2 に注目した検討を行い、以下の結論を得た。 $Ca^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$  および亜鉛は骨芽細胞の SVCT2 発現を誘導し、AA 取り込み能を亢進した。亜鉛は複数の骨芽細胞分化マーカーの発現を誘導し、その主要な部分は亜鉛で誘導された SVCT2 と本タンパク質によって輸送される AA を介して発現した。また、SVCT2 安定過剰発現により骨芽細胞の分化および石灰化は顕著に促進され、この現象は主として AA 取り込み上昇を介して発現した。

## 論文審査の結果の要旨

アスコルビン酸 (AA) は骨形成に重要な役割を果たすと考えられており、骨芽細胞は AA 存在下で長期間培養することにより、細胞増殖が盛んな期間を過ぎた後、様々な形質を発現し前骨芽細胞から骨芽細胞、さらには骨細胞へと分化することが可能である。骨細胞への AA の輸送や機能との関係についてはほとんど知られていなかったが、最近 AA を輸送するトランスポーター sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT) 1 および 2 が明らかにされ、それらの解析が可能になった。

本研究では SVCT2 が発現している MC3T3-E1 骨芽細胞を用い骨芽細胞における AA 輸送の制御と骨形成の関係について検討したところ、1) 骨の主要な構成成分であるカルシウムおよび磷酸イオンは SVCT2 のタンパク質および mRNA レベルを上昇させると共に AA 輸送反応の  $V_{max}$  を上昇させることにより AA の取込を促進した。また、これら両イオンは SVCT2 発現上昇とともに骨芽細胞分化マーカーである osteopontin (OPN) mRNA の発現を促進したが、これらの作用はいずれも Ca チャネルブロッカーあるいはリン酸イオントランスポーターブロッカーにより阻

害された。2) 骨組織の主要な微量元素である亜鉛イオンも AA の存在に関係なく SVCT2 のタンパク質および mRNA 発現を誘導するとともに Vmax 上昇に基づく AA の取込を促進した。また分化マーカーである alkaline phosphatase (ALP)、 $\alpha$  (I) procollagen (COL)、OPN および osteocalcin (OCN) の mRNA の発現をも誘導し、これらの作用は AA 存在下で強く現れた。3) SVCT2 の骨芽細胞分化における意義を明らかにするために SVCT2 を過剰発現する骨芽細胞を作成して骨芽細胞分化形質の発現変化を解析したところ、過剰発現細胞では SVCT2 mRNA 発現と AA 取込能が亢進していると共に AA 存在下で ALP、COL および OPN mRNA 発現が上昇したが、非存在下では OPN mRNA 以外の発現上昇は見られなかった。さらに過剰発現細胞では石灰化が顕著に促進される事をも明らかにした。

以上の結果は骨芽細胞の分化や石灰化が細胞外微小環境における骨塩由来イオンや微量元素によって誘導され、その多くの部分が SVCT2 とこれによって輸送される AA を介して発現することを示唆するものであり、これらの研究成果は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。