

Title	Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone
Author(s)	南平, 昭豪
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45452
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	南 平 昭 豪
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19327 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone (ヒト骨組織における MEPE の発現)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹 (副査) 教授 大藪 恵一 教授 内山 安男

論文内容の要旨

[目的]

これまで骨代謝の多くの研究は骨芽細胞と破骨細胞に関して行なわれてきている。一方、骨基質 1 mm³ あたり約 25000 個の割合で埋没して存在する骨細胞は、その細胞突起を介して骨芽細胞や lining cell と接触している形態的な特徴から、骨表層の細胞の機能に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられながらその機能はほとんど明らかにされていない。MEPE は腫瘍性骨軟化症患者の腫瘍に高発現している蛋白として 2000 年にクローニングされ、低リン血症性骨軟化症を引き起こす原因物質 phosphatonin の候補のひとつとして報告されるとともに、げっ歯類の骨細胞に存在し、石灰化条件下での培養骨芽細胞に発現が明らかとなってきた物質である。本研究では、ヒト骨組織における MEPE の局在を明らかとし、また石灰化障害を有する骨軟化症と石灰化障害のない骨粗鬆症患者の骨組織を用いて、骨基質石灰化との関連を明らかにすることを目的とした。

[方法ならびに成績]

鼻中隔に発生した腫瘍性骨軟化症患者の腫瘍から cDNA ライブラリーを作成し、リコンビナントヒト MEPE タンパクの精製とこれを用いたウサギ抗ヒト MEPE ポリクローナル抗体作成を行なった。ポリクローナル抗体は、大腸菌、CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞に発現させたリコンビナント MEPE 蛋白を認識することをウエスタンブロットティングにより確認した。

この抗体を用いて、ヒト骨組織における MEPE タンパクの局在を免疫染色法で検討した。まず、手術時に採取した正常ヒト骨サンプルおよび、骨軟化症サンプルの脱灰パラフィン切片での HE 染色、抗 MEPE 抗体での免疫染色を行った。正常骨組織において、MEPE は骨小胞、樹状突起を含めた骨細胞に均一に強く発現しており、骨芽細胞、lining cell、軟骨細胞には発現していなかった。一方、骨軟化症患者の骨組織においては、MEPE の骨細胞における発現は海綿骨梁の辺縁には認めず、石灰化骨が存在すると考えられる骨皮質および、海面骨の深層に局限していた。

次に、骨軟化症患者 4 例および骨粗鬆症患者 4 例の腸骨サンプルの非脱灰メチルメタクリレート包埋切片を作成し、類骨染色 (Villanueva 染色) と免疫染色を組み合わせることにより、石灰化骨と非石灰化骨での MEPE の発現、MEPE

陽性骨細胞の割合を比較検討した。骨軟化症サンプルでは、Villanueva 染色陽性の類骨領域には MEPE 陽性骨細胞はほとんど認めず、MEPE の発現は Villanueva 染色陰性の石灰化領域の骨細胞に限局していた。MEPE 陽性骨細胞の割合を石灰化領域と非石灰化領域とで比較したところ、それぞれ $87.5 \pm 8.6\%$ 、 $7.8 \pm 6.4\%$ と有意に石灰化領域の骨細胞での MEPE の発現が高かった。腫瘍性、Fanconi 症候群、ビタミン D 欠乏症のいずれの骨軟化症でも同様の結果であった。また、骨粗鬆症患者の骨組織においても MEPE 陽性骨細胞の割合は石灰化領域 $95.3 \pm 0.5\%$ 、非石灰化領域 $4.9 \pm 5.7\%$ と有意差を認め、疾病の石灰化障害の有無に関係なく、MEPE の発現は石灰化領域中の骨細胞に認められた。

[総括]

骨細胞特異的に発現される物質として MEPE の他に DMP-1、Phex タンパクがあるが、石灰化領域と非石灰化領域での存在の差が明らかにされた物質は MEPE が初めてである。げっ歯類培養骨芽細胞の分化最終段階で基質が石灰化する時期に MEPE の発現が高まるという過去の報告とあわせて、MEPE が骨基質の石灰化に関与することが予想できる。しかし腫瘍性骨軟化症とその他の骨軟化症との間、骨軟化症と骨粗鬆症との間でその分布様式に明らかな差を認めず、腫瘍性骨軟化症の病態への関与や石灰化障害への関与を示す結果ではなかった。この研究は骨芽細胞から骨細胞への分化過程において、骨基質の石灰化が生じる分化の最終段階に MEPE が発現されることをヒト骨組織で示し、その発現の特異性から石灰化領域のヒト骨細胞のマーカーとなりえることを明らかとした。この事実は今後の骨細胞の機能解析の研究の一助となると考える。

論文審査の結果の要旨

MEPE は骨代謝に深く関わる可能性のある新しいタンパクとして世界的に注目されている分子のひとつである。もともとは腫瘍性骨軟化症の架空の原因物質 phosphatonin のひとつとして報告され解析されてきたが、ノックアウトマウスのデータなどにより、骨形成とくに石灰化に関わることが示唆されている。著者らは、ヒトリコンビナント MEPE タンパクに対するポリクローナル抗体を作成し、ヒト骨組織における MEPE の発現の分布および、MEPE と骨基質石灰化との関与を免疫組織化学の手法を用いて検討した。正常骨組織において、MEPE は骨細胞に強く発現しており、軟骨細胞、骨芽細胞、lining cell には発現が見られなかった。また、骨粗鬆症と骨軟化症の患者骨組織の検討により、MEPE の発現は、周囲の骨基質が石灰化している部位にほぼ限局して発現していることが明らかとなった。ヒトの骨組織での MEPE の発現を組織学的に観察、明らかにしたことは世界的にも新しい知見であり、その分布が石灰化前と後の骨基質中の骨細胞で異なるという発見は、今後の MEPE と石灰化に関わる機序の解明に役立つと考えられ、本論文は学位に値するものと認める。