Osaka University Knowledge Archive

Title	細胞外無機リン酸による Dentin Matrix Protein 1 の発現誘導機構
Author(s)	西野, 仁
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52341
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　西野　仁　　）	
論文題名	細胞外無機リン酸によるDentin Matrix Protein 1の発現誘導機構

【緒言】

リンは生命の維持に必須のミネラルであり，骨や歯牙といった硬組織形成においても必須のミネラルである。慢性的な低リン血症は、小児ではくる病，成人では骨軟化症と呼ばれる骨石灰化障害をひきおこす。近年，複数の遺伝性低リン血症性くる病責任分子が明らかとなったが，興味深いことに，これらの責任分子群のうちでDMP1，PHEX，FGF23，　FAM20Cは主たる発現部位が骨芽細胞・骨細胞であり，特に骨細胞で発現が高い。

骨芽細胞や骨細胞がリン恒常性維持に関わる複数の分子群を発現しているところから，これらの細胞は細胞外環境中のリンの過不足を感知し，応答性を示す事が推察されるが，その詳細は明らかではない。著者らは最近，マウス長管骨から単離した初代骨細胞を用いて，細胞外無機リン酸濃度の変化がリン代謝関連分子の発現に及ぼす影響を検討し，高濃度無機リン酸刺激が24時間以内に*Dmp1*の発現を強く誘導することを報告した。この観察から，細胞外無機リン酸濃度変化が直接，骨芽細胞や骨細胞に作用し，遺伝子発現や機能に影響を及ぼす事が推察される。そこで，今回，骨芽細胞／骨細胞系列の細胞において細胞外無機リン酸濃度の上昇がDmp1の発現を誘導する分子機序を解析した。また，*Dmp1*は骨細胞に高く発現し，しばしば骨細胞マーカーとして用いられる事から，中ー長期的な細胞外無機リン酸濃度の変化は骨芽細胞から骨細胞への分化にも影響を及ぼす可能性が考えられるので，この点についても検討した。

【方法と結果】

1.　<u>MC3T3-E1 単層培養への高濃度無機リン酸刺激による *Dmp1* 発現誘導と MEK/ERK 経路の関与</u>

マウス骨芽細胞系細胞株 MC3T3-E1 細胞を単層培養し，10 mM の高濃度無機リン酸を添加し，24 時間後まで経時的に RNA を回収し，real-time PCR により *Dmp1* の発現変化を検討した。その結果，*Dmp1* の発現はリン添加 24 時間で著明に増加した。また，複数の細胞種において，細胞外無機リン酸濃度の上昇が MEK/ERK 経路の活性化を介して遺伝子発現を制御することが報告されていることから, ERK1/2 のリン酸化状態の経時変化をウェスタンブロッティングにより検討した。ERK1/2 のリン酸化は 10 mM リン酸添加後 1 時間で最大となり, その後減弱を示した。そこで、MEK 阻害剤である U0126 を用いた検討を試みた。リン酸刺激により誘導される *Dmp1* の発現増強は U0126 の濃度依存的に抑制されたことから, 無機リン酸刺激による *Dmp1* の発現誘導に MEK/ERK 経路が関与していることが推察された。

また，軟骨細胞などにおいては，細胞外無機リン酸濃度の上昇により惹起されるMER/ERK経路の活性化にIII型ナトリウム／リン酸共輸送担体が関与することが示唆されている。そこで，リン酸刺激による*Dmp1*の発現誘導にもナトリウム／リン酸共輸送担体が関与しているかどうかを明らかにするため，阻害剤であるphosphonoformic acid (PFA) を用いた検討を試みた。その結果，PFAの存在下では高濃度リン酸刺激による*Dmp1*発現誘導の減弱を認め，ナトリウム／リン酸共輸送担体の関与が推察された。

2.　<u>MC3T3-E1 コラーゲンゲル包埋培養における中期的な無機リン酸刺激の影響</u>

中期的なリン酸刺激が骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討するのに先立ち，まず，マウス長管骨より分化度に応じて単離した骨芽細胞および骨細胞を用いて骨芽細胞の細胞成熟過程における遺伝子発現変化を検討した。*Dmp1*や*Fgf23*に加え、Wnt阻害因子である*Sost*の発現は骨細胞に富む分画で高く発現していることを確認した。興味深いことに，局所で働く古典的FGFリガンドである*Fgf2*が，成熟骨芽細胞に相当する分画で高く発現していた。

次に，中期的なリン酸刺激の影響を検討するため，MC3T3-E1細胞をI型コラーゲンゲル包埋培養に供し，1 mM ないし10 mMのリン酸存在下で11日間培養し，経時的に遺伝子発現を解析した。その結果，　10 mMのリン酸存在下では、*Dmp1*の発現がDay 1から上昇を示し、*Fgf23*の発現はDay 7で明らかな増加を示した。Dmp1のリン酸化に関わる*Fam20C*の発現も10 mMリン酸存在下で上昇を示した。*Fgf2*の発現は，10 mMのリン酸存在下ではDay 11に著明な増

加を示した。リン酸応答遺伝子であるearly growth response 1 (*Egr 1*)の発現は，10 mMのリン酸存在下ではDay 1の時点で増加し，一度減少した後にDay 11で再び上昇した。一方，1 mMのリン酸存在下では*Dmp1,Fgf23, Fam20C, Fgf2*および*Egr1*の発現は，培養期間中殆ど変化しなかった。*Sost*の発現についても検討したが，1 mM、10 mMのいずれのリン濃度においても培養期間中ほとんど変化しなかった。

3. <u>リン酸刺激による *Dmp1* の発現誘導に対する Fgf2 の関与に関する解析</u>

MC3T3-E1コラーゲンゲル包埋培養においてリン酸存在下で*Fgf2*の発現上昇を認めたこと，また，近年Fgf2の高分子アイソフォームとリン代謝の関与が示唆されていることから,単層培養を用いて短期的な高濃度無機リン酸刺激が*Fgf2*の発現に及ぼす影響についても検討した。その結果，10 mM 無機リン酸刺激は24時間で*Fgf2*の発現を誘導し，この*Fgf2*の発現増加も*Dmp1*の発現誘導と同様に， U0126やPFAにより解除された。

さらに，単層培養したMC3T3-E1細胞にリコンビナントFGF2の添加を行い，24時間後にRNAを抽出して解析したところ，*Dmp1*発現の著明な増加を認めた。そこで，細胞外無機リン酸刺激による*Dmp1*発現誘導の一部がFGF2の産生増加を介している可能性について，FGFR阻害剤であるSU5402を用いて検討したところ，リン酸刺激により誘導される*Dmp1*の発現増強はSU5402の存在下で抑制された。

【考察および結論】

これまで，軟骨細胞などいくつかの細胞種において，細胞外無機リン酸濃度の上昇がMEK/ERK経路やナトリウム／リン酸共輸送担体を介して細胞内にシグナルを惹起し，遺伝子発現や細胞の挙動を変化させることが報告されている。今回の検討から，骨芽細胞・骨細胞においても細胞外無機リン酸濃度の上昇はMEK/ERK経路やナトリウム／リン酸共輸送担体を介して細胞内にシグナルを惹起し，*Dmp1*の発現を誘導したことが示唆された。細胞外無機リン酸濃度変化に対して低リン血症の責任分子である*Dmp1*の発現が速やかに増加したことから，骨芽細胞・骨細胞が体内のリンの過不足を感知して応答性を示す可能性が考えられる。

骨基質中には血中よりも高濃度のリン酸が存在する。高濃度細胞外無機リン酸刺激により発現が著明に誘導される*Dmp1*は特に骨細胞に高く発現する分子であるところから，今回，骨芽細胞における細胞外無機リン酸濃度の上昇は中ー長期的には骨芽細胞から骨細胞への分化を促進するのではないかと考え，検討を行った。その際，骨内微小環境に近づけるためコラーゲンゲル包埋培養を用いた。その結果，*Sost*の発現は細胞外無機リン酸濃度変化による発現増加を認めなかったが，*Dmp1*のほか*Fam20c*や*Fgf23*などリン代謝に関わる複数の遺伝子の発現が高濃度リン酸存在下で増加した。このことから，骨芽細胞分化過程におけるリン代謝制御機能の獲得に細胞外無機リン酸濃度の上昇が関与している可能性が推察される。

また，今回，単層培養を用いた短期的なリン刺激の影響についての検討ではFGF2もDmp1の発現増加に関与している可能性を示唆する結果が得られたが，コラーゲンゲル包埋培養では*Dmp1*の発現増加が*Fgf2*の発現増加に先行しており，両者の関係については今後さらなる検討が必要である。

以上のように，骨芽細胞・骨細胞系列において細胞外無機リン酸濃度の上昇はMEK/ERK経路を介してシグナルとして細胞内に伝達され，*Dmp1*の発現を誘導することが示され，その一部は*Fgf2*の発現誘導を介している可能性が推察された。また，骨芽細胞分化過程においては，細胞外基質中のリン酸濃度の上昇が，リン代謝に関わる複数の遺伝子発現を誘導することにより，リン代謝制御機能の獲得に関与することが示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　　西　野　仁　　）		
	（職）	氏　　名
論文審査担当者	主 査　教　授　道　上　敏　美 副 査　教　授　西　村　理　行 副 査　准教授　河　合　伸　治 副 査　講　師　墨　　哲　郎	

論文審査の結果の要旨

骨芽細胞や骨細胞は *dentin matrix protein 1* (*Dmp1*) をはじめ、*fibroblast growth factor 23* (*Fgf23*)、*Fam20c* などリン恒常性維持に関わる複数の分子群を発現している。このことから、これらの細胞が細胞外環境中のリンの過不足を感知し，リン代謝に関わる分子群の発現を変化させる事が推察されるが，その詳細は明らかではない。マウス骨から単離された初代骨細胞において 24 時間の高濃度リン酸刺激は *Dmp1* の発現を誘導することから、骨細胞や骨芽細胞が細胞外無機リン酸濃度変化に対して応答性を示すことが示唆される。こうした背景から、今回、西野　仁氏は、主としてマウス骨芽細胞系細胞株である MC3T3-E1 細胞を用いて、細胞外無機リン酸濃度上昇による
分子機序を明らかにすることを目的として研究を行った。

西野　仁氏はまず、MC3T3-E1 単層培養に高濃度 (10 mM) の無機リン酸を添加し、24 時間以内に *Dmp1* の発現が強く誘導される事を明らかにした。さらに、MEK 阻害剤 U0126 やナトリウム／リン酸共輸送担体に対する阻害剤 phosphonoformic acid (PFA) を用いた検討により、リン酸刺激による *Dmp1* の発現誘導に MEK/ERK 経路やナトリウム／リン酸共輸送担体が関与することを示した。また、高濃度無機リン酸刺激が古典的な FGF リガンドである *Fgf2* の発現をも増加させたことから、FGF 受容体阻害剤 SU5402 を用いた検討を行い、リン酸刺激による *Dmp1* 発現誘導のすくなくとも一部は *Fgf2* の発現増加を介していることを示した。さらに、Dmp1 が骨細胞に比較的特異的に発現する分子であるところから、細胞外無機リン酸濃度の上昇が骨芽細胞から骨細胞への分化を促進するのではないかと考え、I 型コラーゲンゲル包埋培養を用いて高濃度無機リン酸刺激の中期的な作用について検討を進めた。その結果、高濃度リン酸存在下では *Dmp1* に加えて *Fgf23*、*Fam20c* などリン代謝に関わる複数の遺伝子発現が増加し、骨芽細胞分化過程においては細胞外リン酸濃度の上昇がリン代謝制御機能の獲得に関与する可能性が推察された。

これらの研究成果は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。