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

学位論文

細胞外無機リン酸による
Dentin Matrix Protein 1 の発現誘導機構

大阪大学大学院　歯学研究科　統合機能口腔科学専攻
顎口腔病因病態制御学・頭蓋発生遺伝学

西野　仁

緒言

リンは生命の維持に必須のミネラルであり，細胞膜の構成，細胞内エネルギー代謝，遺伝情報の継承と維持，蛋白質の機能制御，酸塩基平衡の調節など，生体内でさまざまな機能を果たしている。健常成人の体内にはおよそ 500~700 g のリンが存在し，そのうち約 85% はハイドロキシアパタイトとして骨に貯蔵されている。経口摂取された一部は便中に排泄されるが，残りは腸管から吸収され，細胞外液リンプールに移行する。骨では骨形成によるリンの付加と骨吸収によるリンの放出が絶えず行われている。余分なリンは腎臓から排泄されることになるが，その際，近位尿細管に存在する IIa 型および IIc 型のナトリウム／リン酸共輸送担体（NaPi-IIa, NaPi-IIc）によるリン酸再吸収量の調節がリンの恒常性を維持するために中心的な役割を担う。骨芽細胞・骨細胞から産生された FGF23 は NaPi-IIa および NaPi-IIc の発現を抑制することによりリン酸排泄量を増加させる。また，FGF23 は活性型ビタミン D の産生も抑制し，腸管からのリンの吸収を低下させる。種々の遺伝性低リン血症の病態解析やモデルマウスの解析から，PHEX や DMP1，FAM20C の機能喪失が FGF23 の過剰産生を引き起こすことが示されており，このことから，PHEX，DMP1，FAM20C は FGF23 の産生を抑制的に制御すると推察されているが，まだその分子基盤については充分には理解されていない。

さらに，脊椎動物においては，リンは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ため，慢性的な低リン血症は骨石灰化の障害を来たす。骨石灰化障害は小児ではくる病，成人では骨軟化症と呼ばれる。遺伝性の低リン血症性くる病は，遺伝形式や症状から複数の病型に分類されている。X 連鎖性低リン血症性くる病（X-linked hypophosphatemic rickets; XLH）は最も頻度が高く，*PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidase on the X chromosome)* 遺伝子の機能喪失型変異により引き起こされる [1,2]。PHEX 遺伝子産物はその構造からエンドペプチダーゼであると推察されるが，機能の詳細につ

いては明らかにされていない。常染色体優性低リン血症性くる病（autosomal dominant hypophosphatemic rickets; ADHR）は *fibroblast growth factor 23 (FGF23)* 遺伝子の機能獲得型変異により引き起こされる[3]。FGF23 は骨で産生されるリン酸利尿因子で，腎臓などの遠隔臓器で作用するところから内分泌 FGF と位置づけられる。また，常染色体劣性低リン血症性くる病（autosomal recessive hypophosphatemic rickets; ARHR）は, small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein（SIBLINGs）family の骨基質蛋白質をコードする *dentin matrix protein 1*（*DMP1*）あるいはピロリン酸産生酵素をコードする *ectonucleotide pyrophophatase/phosphodiesterase 1*（*ENPP1*）遺伝子の機能喪失型変異により生じ，それぞれ ARHR1，ARHR2 と呼ばれている[4,5]。さらに最近，歯の異常を伴う低リン血症性くる病の責任遺伝子として，DMP1 などの SIBLINGs をはじめ種々の分泌蛋白質のリン酸化に関わる分泌経路特異的キナーゼである FAM20C (family with sequence similarity 20, member C) が報告された[6-8]。興味深いことに，これらの多彩な分子群のうち，PHEX，FGF23，DMP1，FAM20C は主たる発現部位が骨芽細胞・骨細胞である。

骨芽細胞は間葉系幹細胞に由来し，骨形成を担当する。一方，骨細胞は骨芽細胞の一部が最終分化に至り，骨基質に埋め込まれた細胞で[9]，成人骨に存在する全細胞の 90-95%以上を占める[10]。骨細胞は骨小腔内に存在しており，骨細管を通る多数の樹枝状の突起を介して他の骨細胞や骨表面の骨芽細胞との間にネットワークを形成し，力学的シグナルを受容して骨形成や骨吸収を制御することが知られている[11,12]。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[13]。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。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，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。さらに、*Phex* 遺伝子の欠失を有し，XLH のモデルとして用いられる *Hyp* マウスの骨芽細胞･骨細胞の異常について詳細に解析し，*Fgf23* に加えて *Dmp1* や *Fam20C*, *Sost* の発現が増加していることを報告した[13]。興味深いことに，*Hyp* マウスの骨細胞および成熟骨芽細胞においては，細胞内へのリンの取り込みに関与する III 型ナトリウム／リン酸共輸送担体 *Pit1* の発現が上昇しており，低リン血症に適応するための代償的な増加であることが推察された[13]。このことから，骨芽細胞や骨細胞は細胞外環境中のリンのアベイラビリティーを感知し，適応を示すことが推察される。

こうした背景から，本研究においては，細胞外無機リン酸濃度変化が骨芽細胞・骨細胞の遺伝子発現に及ぼす影響とその分子機序を詳細に解析することを目的とした。

材料および方法

1.　細胞培養

マウス骨芽細胞系細胞株 MC3T3-E1 細胞は, 2.0×10^5 個を 6-cm dish (Corning) に播種し, 10% 牛胎仔血清（Fetal Bovine Serum, FBS; Equitech-Bio. Inc）を含む α-MEM（WAKO）を用い，37℃，5% CO_2 存在下で 48 時間培養後、無血清培地にて 24 時間インキュベートを行い、その後、それぞれの濃度のリン酸ナトリウムバッファーを添加し，さらに培養した。高濃度無機リン酸を含む培地は，α-MEM または別途調製したリン酸を含まない培地（日研）にリン酸ナトリウムバッファーを添加することにより調製した。対照としては硫酸ナトリウムバッファーを用いた。

一部の実験においては I 型コラーゲンゲル包埋培養を行った。2.0×10^5 個の MC3T3-E1 細胞を氷中にて 50 μl の I 型コラーゲン溶液（Cellmatrix™; 新田ゼラチン）に懸濁し，24-well plate（Corning）に滴下し，37℃で 15 分間静置してコラーゲンをゲル化させた。ゲル化後，10% FBS および種々の濃度のリン酸を含む α-MEM 培地を重層し，37℃，5% CO_2 存在下で培養した。

2.　阻害剤およびリコンビナント蛋白質

MEK 阻害剤として U0126 (Sigma Aldrich)，ナトリウム／リン酸共輸送担体に対する阻害剤として phosphonoformic acid (PFA; Sigma Aldrich)，FGF 受容体（FGF receptor; FGFR）に対する阻害剤として SU5402 (Merck Millipore) を使用し，それぞれリン酸を添加する 30 分前に細胞に添加した。

マウス FGF2 (basic FGF) リコンビナント蛋白質は R&D より購入した。

3. マウス初代骨芽細胞・骨細胞の単離

C57BL/6J 野生型マウスを実験に使用した。通常固形飼料（CL–2; 日本クレア）の自由摂取により飼育管理を行い，すべての動物実験は大阪府立母子保健総合医療センター研究所動物実験委員会の承認のもとに施行した。マウス骨からの初代骨芽細胞・骨細胞は，著者らが以前報告した方法に従って単離した[13,14]。10 週齢の野生型マウスを麻酔下にて屠殺し，四肢の長管骨を無菌的に摘出し，10% FBS を含む α-MEM 中にて軟骨および軟部組織を除去した。さらに，ハサミを用いて骨を 0.5~1 mm 角に微細化し, 細胞分散用コラゲナーゼ（1.25 mg/ml; WAKO）を用いて 37℃でインキュベートすることにより基質の消化を行った。コラゲナーゼ処理後，ピペッティングにより細胞を骨片より遊離させ，100-μm セルストレイナー（BD Bioscience）を用いて濾過することにより 50 ml チューブに細胞を回収した。骨片は引き続きコラゲナーゼ処理に供した。同様の操作を 5 回行い，各々のステップで回収された細胞を Fraction（Fr.）1-5 とした。各ステップにおけるコラゲナーゼ処理時間を表 1 に示す。続いて，4 mM EGTA（同仁化学研究所）による脱灰処理を 15 分間行い，さらに 1.25 mg/ml コラゲナーゼ処理を 20 分間行うことにより，それぞれ，Fr. 6 および 7 を回収した。同様に EGTA 処理とコラゲナーゼ処理を反復し, Fr. 8 および 9 を回収した。各々のステップで回収された細胞は, 遠心後 5% FBS, 5%仔牛血清（calf serum, CS; Thermo Scientific）および 0.25 mM アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩（WAKO）を含む α-MEM 中に再懸濁し，解析まで 37℃の CO_2 インキュベーター内にて保存した。本法においては, マーカー遺伝子の発現から, Fr. 3-5 では骨芽細胞, EGTA による脱灰を開始した Fr. 6 以降では骨細胞に富む細胞集団が回収されることを確認している[13]。

4. ウエスタンブロッティング

細胞溶解用 RIPA バッファー［1% Triton, 1% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 7.4)，5 mM EDTA，1 mM orthovanadate，Complete™プロテアーゼ阻害剤（Roche Diagnostics)］を用いて細胞を溶解し, 不溶画分を除去したものをサンプルとして使用した。10% SDS-PAGE による電気泳動後，PVDF 膜に転写し，Blocking One P（ナカライテスク）を用いてブロッキングを行った。一次抗体として抗リン酸化 ERK1/2 抗体および 抗 ERK1/2 抗体（Cell Signaling)，二次抗体として horse radish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体（Santa Cruz)を使用し，ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いてシグナルを可視化した。

5. Real-time PCR

TRIzol Reagent（Invitrogen）を用いて total RNA を抽出したのち，RNase-free DNase set および RNeasy MinElute Cleanup kit（Qiagen）を用いて DNase 処理を行った。DNase 処理後の total RNA を鋳型として使用し，Random Primers（Promega）および Superscript II（Invitrogen）を用いて逆転写反応を行った。Real-time PCR には Taqman™ Gene Expression Master Mix および Taqman™ Gene Assays（Applied Biosystems）の *Gapdh*（Mm99999916_g1），*Fgf23*（Mm00441119_m1），*Dmp1*（Mm00803833_g1），*Sost*（Mm03024247_m1），*Fam20c*（Mm00504210_m1），*Slc20a1* (Mm00489382_g1)，*Egr1*（Mm00656724_m1），*Fgf1*（Mm00438906_m1），*Fgf2*（Mm00433287_m1），*Connexin43* (Mm01179639_s1）を用いた。各々の増幅断片をクローニングした pT7-Blue vector をスタンダードとして同時に増幅することにより検量線を作製し，サンプル中の標的分子のコピー数を算出し，同一サンプルの *Gapdh* の発現量により補正した。

6.　統計学的解析

データは one-way analysis of variance (ANOVA) にて解析し，群間の差の有意性については Tukey-Kramer test にて検定した。

結果

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

著者らはこれまで，マウス長管骨より単離した初代骨細胞において短時間の細胞外無機リン酸濃度変化が遺伝子発現に及ぼす影響を検討し，24 時間の高濃度（10 mM）無機リン酸刺激が *Dmp1* の発現を強く誘導したことを報告している[13]。すなわち，骨細胞は細胞外無機リン酸の濃度変化に応答性を示すことが推察される。そこで，骨芽細胞系細胞株である MC3T3-E1 においても同様に *Dmp1* の発現が誘導されるかどうか検討した。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 *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（図 1A)。また，これまで，軟骨細胞やヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞など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[15-17]，10 mM のリン酸添加を行った MC3T3-E1 細胞における ERK1/2 のリン酸化状態の経時変化についてもウエ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（図 1B)。

さらに，細胞外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かどうか明らかにするため，MEK 阻害剤である U0126 を用いた検討を試みた。MC3T3-E1 に 1，4，あるいは 10 mM のリン酸を添加し，24 時間後に RNA を回収して解析したところ，10 mM のリン酸存在下で *Dmp1* の著明な発現増加が認められた。一方，10 mM リン酸添加の 30 分前から培地に U0126 を添加しておいたところ，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（図 2A)。この結果より，高濃度細胞外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。

軟骨細胞や HEK293 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 MEK/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 [15-17]。そこで，MC3T3-E1 細胞における高濃度無機リン酸刺激による *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に，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* 発現誘導の減弱が認められた (図 2B)。

2. MC3T3-E1 コラーゲンゲル包埋培養における中期的な細胞外無機リン酸刺激の影響

上述したように，骨芽細胞系細胞株である MC3T3-E1 においてもマウス初代骨細胞と同様に，24 時間の短期的な高濃度無機リン酸刺激が *Dmp1* の発現を著明に誘導することが示された。*Dmp1* は骨芽細胞よりも骨細胞においてはるかに発現が高く，*Dmp1-Cre* は骨細胞特異的な遺伝子欠損マウスの作出に広く用いられている [18,19]。そこで,骨芽細胞における細胞外無機リン酸濃度の上昇は，より長期的には *Dmp1* の他にも様々な遺伝子発現を変化させ，骨芽細胞から骨細胞への分化にも影響を及ぼすのではないかと考え，解析することとした。

それに先立ち，まず骨芽細胞／骨細胞に発現している遺伝子群の細胞成熟過程における発現変化を検討するため，著者らが確立した方法 [13] を用いてマウス長管骨より単離した骨芽細胞および骨細胞の各分画の新鮮な細胞から RNA を抽出し，real-time PCR により解析を行った。以前に報告した結果 [13] と同様に，成熟骨細胞のマーカーで sclerostin をコードする *Sost* や *Dmp1*，*FGF23* の発現が後半の分画で増加しており，骨芽細胞・骨細胞系列の細胞が分化度に応じて単離・回収されていることが確認された。さらに今回，リン酸刺激で誘導される転写因子 *early growth response 1* (*Egr1*)[16] や gap junction の形成に関わる *Connexin 43 (Cx43)*，局所で働く古典的 FGF リガンドである *Fgf1* および *Fgf2* の発現プロファイルについても解析を

行った。その結果，興味深いことに，*Fgf2* の発現は成熟した骨芽細胞に相当する Fr. 5 をピークとする変化を示した。一方，*Egr1*，*Cx43*，*Fgf1* の発現については分画間で明らかな差を認めなかった（図 3)。

次に，MC3T3-E1 に対する中期的なリン酸刺激の影響を検討するため，I 型コラーゲンゲル包埋培養を行った。Matthews らは最近，ラット初代骨芽細胞と MC3T3-E1 細胞を I 型コラーゲンゲル包埋培養（三次元培養）と単層培養（二次元培養）に供して石灰化能や遺伝子発現変化を比較し, 包埋培養を行った細胞の方が骨芽細胞分化の促進を示したことを報告している [20]。そこで今回，MC3T3-E1 細胞を I 型コラーゲンゲル包埋培養に供して 1 ないし 10 mM のリン酸存在下で 11 日間培養し，経時的に RNA を抽出して遺伝子発現を解析した（図 4)。その結果，*Dmp1* の発現は，1 mM のリン酸存在下では培養期間中殆ど変化しなかったが，10 mM のリン酸存在下では Day 1 から明らかな上昇を示した。Dmp1 のリン酸化に関わる Fam20C の遺伝子発現も 10 mM のリン酸存在下で発現の上昇を示した。*Fgf23* の発現は，1 mM のリン酸存在下では培養期間中殆ど変化しなかったが，10 mM のリン酸存在下では Day 7 で明らかな増加を示した。Egr1 は MEK/ERK 経路の下流で誘導される転写因子であるが，ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞においては細胞外無機リン酸濃度の上昇によっても急速に発現が誘導されることが報告されており，リン酸応答遺伝子の一つである [16]。今回の MC3T3-E1 コラーゲンゲル包埋培養系においても，*Egr 1* の発現は，1 mM のリン酸存在下では培養期間中に明確な変化を示さなかったが，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。*Fgf1* および *Fgf2* の発現は，10 mM のリン酸存在下で，それぞれ Day 7 以降あるいは Day 11 の時点で発現の著明な増加を示した。一方 *Cx43* の発現は, 1 mM リン酸存在下ではほぼ横ばいであったが，10 mM リン酸存在下ではいったん減少した後に増加する傾向を示した（図 4)。

3. MC3T3-E1 単層培養への高濃度細胞外無機リン酸刺激による *Fgf2* 発現誘導

前述したように，今回，マウス長管骨より分化段階に応じて単離した骨芽細胞・骨細胞を用いて種々の遺伝子の発現プロファイルを検討した結果，*Fgf2* の発現が成熟した骨芽細胞に相当する Fr. 5 で最も高く，興味深い変動を示した（図 3)。また，MC3T3-E1 コラーゲンゲル包埋培養において，*Fgf2* の発現も高濃度リン酸存在下で強く誘導されたことから，図 2 で示した実験と同様に MC3T3-E1 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を検討した。その結果，高濃度無機リン酸刺激は 24 時間で *Fgf2* の発現を誘導した。また，この短期的なリン酸刺激による *Fgf2* の発現増加も *Dmp1* の発現誘導と同様に，MEK 阻害剤である U0126 やナトリウム／リン酸共輸送担体阻害剤である PFA により解除された（図 5)。

4. MC3T3-E1 単層培養へのリコンビナント FGF2 添加による *Dmp1* 発現誘導

前述したように，MC3T3-E1 単層培養において，24 時間の短期的な高濃度無機リン酸刺激は *Dmp1* に加えて *Fgf2* の発現も強く誘導し，この発現誘導は MEK/ERK 経路を介していた（図 2, 5)。一方，マウス骨から単離した初代骨芽細胞・骨細胞における遺伝子発現プロファイルにおいては，*Dmp1* の発現が骨細胞に富む Fr. 6 以降の分画で高かったのに対して，*Fgf2* の発現は成熟した骨芽細胞に富む Fr. 5 でピークに達した（図 3)。FGF2 も細胞外無機リン酸濃度の上昇により惹起されるシグナルと同様に MEK/ERK 経路を活性化することから，リン酸刺激による *Dmp1* 発現誘導の一部は FGF2 の産生増加を介しているのではないかと考え，FGF2 が *Dmp1* 発現を誘導しうるか検討した。単層培養した MC3T3-E1 細胞にリコンビナント FGF2 (10 ng/ml) 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（図 6A)。

5. 高濃度無機リン酸刺激による *Dmp1* 発現誘導に対する FGF 受容体阻害剤の作用

さらに，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 を用いて解析を進めた。MC3T3-E1 細胞に 10 mM リン酸を添加する 30 分前から培地に SU5402 を添加しておいたところ，リン酸刺激により誘導される *Dmp1* の発現増強が抑制された（図 6B)。

考察

リンの恒常性を維持するためには，生体はリンの過不足を感知する必要がある。多細胞生物である哺乳類においては，細胞レベルと個体レベルの両者でリンの過不足を感知する必要がある[17]。このリン感知機構の分子機序についてはまだ明らかになっていないが，これまで，いくつかの細胞種において，細胞外液中のリン酸濃度の上昇が細胞内にシグナルとして伝達され，遺伝子発現を変化させることが報告されている。著者が所属する研究室においても，これまで軟骨細胞やヒト胎児由来腎臓細胞 HEK293 細胞を用いて細胞外無機リン酸濃度変化により惹起されるシグナルの受容機構について解析を行い，*Pit1* や Raf/MEK/ERK 経路，FGFR の関与について報告してきた[15,16]。マウス長管骨より単離した初代骨細胞において 24 時間の高濃度リン酸刺激が *Dmp1* の発現を誘導したことから[13]，今回，骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いてその分子機序について解析を行ったところ，MEK 阻害剤である U0126 やナトリウム／リン酸共輸送担体に対する阻害剤 PFA の添加により高濃度無機リン酸刺激で誘導される *Dmp1* の発現増加が解除された（図 2）。このことから，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推察される。

高リン食投与によるリンの負荷はリン酸利尿因子である FGF23 の産生増加をもたらすことが動物実験などでも確認されているが[21]，ヒトの血中リンの急速な上昇は FGF23 値を変化させないことが報告されており[22]，骨芽細胞・骨細胞においても細胞外液中のリン酸濃度の上昇が直接 FGF23 の発現増加をもたらすかどうかは明確になっていない。著者らがマウス骨から単離した初代骨細胞を用いて短期的な細胞外無機リン酸刺激の影響を検討したところ，24 時間の 10 mM リン酸刺激は *Dmp1* の発現を著明に増加させたが，*Fgf23* の発現については変化させなかった[13]。今回，MC3T3-E1 を用いてリン酸刺激が *Fgf23* の発現に及ぼす影響についても

検討を行ったところ，単層培養に対する 24 時間の 10 mM リン酸刺激は，Dmp1 の発現は著明に誘導した（図 2)。また，コラーゲンゲル包埋培養を用いてより慢性的なリン酸刺激の影響を検討したところ，*Fgf23* の発現は *Dmp1* よりも遅れて上昇することが示された（図 4)。この結果は前述の *vivo* での観察と矛盾せず，リンによる *Fgf23* の発現誘導には時間を要する事が推察される。

今回，マウス骨より単離した骨芽細胞・骨細胞における遺伝子発現プロファイルの解析において，*Dmp1* は骨細胞に富む Fr. 6 以降で発現が上昇したのに対し，*Fgf2* は成熟骨芽細胞に相当する Fr. 5 において発現のピークを認めた（図 3)。近年，FGFR1 の機能獲得型変異により引き起こされる骨空洞性異形成症が FGF23 の産生過剰による低リン血症を呈する事が報告されている [23]。また，前述したように，著者らは *Hyp* マウスの骨細胞において *Fgf23* や *Dmp1* の発現が増加していたことを報告しているが，これらの細胞においては *Fgf1*，*Fgf2*，*Fgfr1-3*，*Egr1* の発現も野生型マウスの骨細胞と比較して著明に増加しており，FGF シグナルの活性化が推察された [13]。FGF2 は骨芽細胞分化や骨形成を亢進することが知られており [24]，最近報告された FGF2 高分子アイソフォーム欠損マウスは骨形成亢進による骨量増加を示すが，同時に *Fgf23* の発現低下も呈する [25]。一方，FGF2 高分子アイソフォームを過剰発現するトランスジェニックマウスは FGF23 の過剰産生により低リン血症を呈することが報告されている [26]。このように，FGF2 がリン代謝関連分子の発現制御および骨芽細胞・骨細胞の分化や機能に関与している可能性が示唆されていることから，今回 FGF2 に注目し，MC3T3-E1 を用いて細胞外無機リン酸による *Fgf2* の遺伝子発現に対する直接作用を検討した。その結果，高濃度無機リン酸存在下では *Dmp1* と同様に *Fgf2* の発現が増加し，この発現誘導は U0126 あるいは PFA を添加することで解除された（図 5)。さらにリコンビナント FGF2 の添加により *Dmp1* の発現が増加し（図 6A)，また，細胞外無機リン酸刺激による *Dmp1* の発現誘導は FGFR 阻害剤で

ある SU5402 により抑制された（図 6B)。これらの結果より，高濃度無機リン酸刺激による *Dmp1* 発現誘導の少なくとも一部は FGF2 を介している可能性が推察される。しかし，コラーゲンゲル包埋培養を用いた検討では，リン酸による *Fgf2* の発現の上昇は *Dmp1* の発現上昇よりも遅延していたことから，リン酸刺激による *Dmp1* 発現誘導には FGF2 を介さない経路も存在することが推察され，今後の検討が必要である。

通常，成人の血中には約 1.2 mM の無機リン酸が存在するが，軟骨が成熟する過程では細胞外基質中のリン酸が次第に増加し，石灰化軟骨では 10 mM を超える事が示唆されている [27]。骨芽細胞が骨細胞へと最終分化し，骨基質に埋没する過程においても，基質中のリン酸濃度は極めて高いと推察される。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長期的には *Dmp1* 以外の遺伝子発現にも影響を及ぼし,骨細胞への分化を促進するのではないかと考え，コラーゲンゲル包埋培養を用いた検討を行った。骨細胞においてリン代謝制御は最も重要な作用の１つであると考えられる。今回の MC3T3-E1 の I 型コラーゲンゲル包埋培養による検討において，リン代謝制御にかかわる *Dmp1* や *Fgf23*, *Fam20C* の発現は 1 mM の無機リン酸存在下では変動しなかったが，10 mM の高濃度無機リン酸存在下で誘導された（図 4)。すなわち，細胞外無機リン酸の濃度の上昇が骨細胞におけるこれらの遺伝子の発現上昇に必要であることが示唆された。しかしながら，*Sost, Cx43* 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ことから，骨細胞が成熟過程でリン代謝調節以外の機能を獲得するためには細胞外無機リン酸刺激のみでは不十分であり，他のシグナルを必要とすることが推察された。

今回用いたコラーゲンゲル包埋培養では，10 mM の高濃度無機リン酸刺激は *Egr-1* 発現の二相性の変化をもたらした（図 4)。*Egr-1* の発現は上流に存在する MEK./ERK 経路により制

御されていると考えられ，今回は検討を行っていないが，最初に *Egr-1* 発現が誘導された後，フォスファターゼの誘導により *Egr-1* 発現がいったん減少し，その後に再び増加したと考えられる。高濃度リン酸刺激により発現が誘導された遺伝子群の発現ピークが一致していないのは，リン酸で誘導されるシグナルが振動を有することと関連しているのかも知れない。

以上のように，今回の研究結果から，骨芽細胞・骨細胞系列においても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，またその一部は *Fgf2* の発現誘導を介している可能性が示唆された。また，骨芽細胞分化過程における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促進し，骨細胞の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。

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えてくださり終始変わらぬ御指導・御鞭撻を賜った大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔病因病態制御学（口腔外科学第一教室）古郷幹彦教授ならびに同研究科連携講座 頭蓋発生遺伝学（大阪府立母子保健総合医療センター研究所環境影響部門）道上敏美招聘教授に深謝致します。また，本研究に際し貴重な御指導・御助言を賜った大阪大学大学院医学系研究科　小児科学　大薗惠一教授に心より感謝の意を表します。また，適切な御助言と実験に関する御指導を頂いた大阪府立母子保健総合医療センター研究所　環境影響部門の川井正信先生，立川加奈子氏，木下さおり氏，越水隆雄氏，大阪大学大学院歯学研究科　宮川和晃先生，大阪大学大学院医学系研究科　大幡泰久先生に感謝致します。最後に，暖かい御協力と御助言を賜りました大阪府立母子保健総合医療センター西尾順太郎先生，和田芳直研究所所長に深く御礼申し上げます。

引用文献

1. Francis, F., Hennig, S., Korn, B. *et al.* A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. Nat Genet 11, 130-136 (1995)

2. Sabbagh, Y., Jones, A.O., Tenenhouse, H.S. PHEX db, a locus-specific database for mutations causing X-linked hypophosphatemia. Hum Mutat 16, 1-6 (2000)

3. ADHR Consortium. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. Nat Genet 26, 345-348 (2000)

4. Feng, J.Q., Ward, L.M., Liu, S. *et al.* Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. Nat Genet 38, 1310-1315 (2006)

5. Levy-Litan, V., Hershkovitz, E., Avizov, L. *et al.* Autosomal-recessive hypophosphatemic rickets is associated wit h an inactivation mutation in the ENPP1 gene. Am J Hum Genet 86, 273-278 (2010)

6. Tagliabracci, V.S., Engel, J.L., Wen, J. *et al.* Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. Science 336, 1150-1153 (2012)

7. Rafaelsen, S.H., Raeder, H., Fagerheim, A.K. *et al.* Exome sequencing reveals FAM20c mutations associated with fibroblast growth factor 23-related hypophosphatemia, dental anomalies, and ectopic calcification. J Bone Miner Res 28, 1378-1385 (2013)

8. Takeyari, S., Yamamoto, T., Kinoshita, Y. *et al.* Hypophosphatemic osteomalacia and bone sclerosis caused by a novel homozygous mutation of the FAM20C gene in an elderly man with a mild variant of Raine syndrome. Bone 67, 56-62 (2014)

9. Bonewald, L.F. Mechanosensation and Transducion in Ostecytes. Bonekey osteovision 3, 7-15 (2006)

10. Parfitt, A.M. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. Clin Orthop Relat Res 127, 236-247 (1977)

11. Zhao, W., Byrne, M.H., Wang, Y. *et al.* Osteocyte and osteoblast apoptosis and excessive bone resorption accompany failure of collagenase cleavage of collagen. J Clin Invest 106, 941-949 (2000)

12. Sugawara, Y., Kamioka, H., Honjo, T. *et al.* Three-dimensional reconstruction of chick calvarial osteocytes ad their cell processes using confocal microscopy. Bone 36, 877-883 (2005)

13. Miyagawa, K., Yamazaki, M., Kawai, M. *et al*, Dysregulated Gene Expression in the Primary Osteoblasts and Osteocytes Isolated from Hypophosphatemic *Hyp* Mice. PloS One 9, e93840 (2014)

14. Yamazaki, M., Kawai, M., Miyagawa, K. *et al.* Interleukin-1-induced acute bone resorption facilitates the secretion of fibroblast growth factor 23 into the circulation. J Bone Miner Metab, Epub ahead of print (2014)

15. Kimata, M., Michigami, T., Tachikawa, K. *et al.* Signaling of extracellular inorganic phosphate up-regulates cyclin D1 expression in proliferating chondrocytes via the Na+/Pi cotransporter Pit-1 and Raf/MEK/ERK pathway. Bone 47, 938-47 (2010)

16. Yamazaki, M., Ozono, K., Okada, T. *et al*, Both FGF23 and extracellular phosphate activate Raf/MEK/ERK pathway via FGF receptors in HEK293 cells. J Cell Biochem 111, 1210-21 (2010)

17. Michigami, T. Extracellular phosphate as a signaling molecule. Contrib Nephrol 180, 14-24 (2013)

18. Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T. *et al.* Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nat Med 17, 1231-1234 (2011)

19. Xiao, Z., Huang, J., Cao, L. *et al.* Osteocyte-specific deletion of Fgfr1 suppresses FGF23. PLoS One 9, e104154 (2014)

20. Matthews, B.G., Naot, D., Callon, K. *et al.* Enhanced osteoblastogenesis in three-dimensional collagen gels. BoneKey Rep 3, 560 (2014)

21. Perwad, F., Azam, N., Zhang, M.Y. *et al.* Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. Endocrinology 146, 5358-5364 (2005)

22. Ito, N., Fukumoto, S., Takeuchi, Y. *et al.* Effect of acute changes of serum phosphate on fibroblast growth factor (FGF)23 levels in humans. J Bone Miner Metab 25, 419-22

(2007)

23. White, K.E., Cabral, J.M., Davis, S.I. *et al.* Mutations that cause osteoglophonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation. Am J Hum Genet 76, 361-367 (2005)

24. Fei, Y., Xiao, L., Doetschman, T. *et al.* Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway. J Biol Chem 286, 40575-40583 (2011)

25. Homer-Bouthiette, C., Doetschman, T., Xiao, L. *et al.* Knockout of Nuclear High Molecular Weight FGF2 Isoforms in Mice Modulates Bone and Phosphate Homeostasis. J Biol Chem 289, 36303-36314 (2014)

26. Xiao, L., Naganawa, T., Lorenzo, J. *et al.* Nuclear isoforms of fibroblast growth factor 2 are novel inducers of hypophosphatemia via modulation of FGF23 and KLOTHO. J Biol Chem 285, 2834-46 (2010)

27. Mwale, F., Tchetina, E., Wu, C.W. *et al.* The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. J Bone Miner Res 17, 275-83 (2002)

表１．マウス長管骨からの初代骨芽細胞および骨細胞単離条件

Fraction(Fr.)	反応液	反応時間（分）
1	コラゲナーゼ（1.25 mg/ml）	15
2	コラゲナーゼ（1.25 mg/ml）	15
3	コラゲナーゼ（1.25 mg/ml）	20
4	コラゲナーゼ（1.25 mg/ml）	20
5	コラゲナーゼ（1.25 mg/ml）	20
6	EGTA（4 mM）	15
7	コラゲナーゼ（1.25 mg/ml）	20
8	EGTA（4 mM）	15
9	コラゲナーゼ（1.25 mg/ml）	20

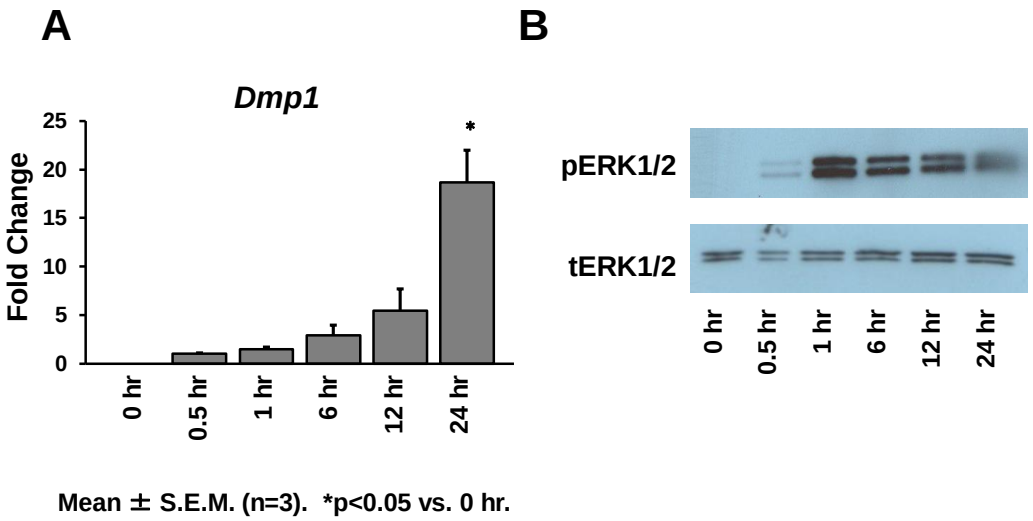

図１　MC3T3-E1における高濃度細胞外無機リン酸に対する応答性

MC3T3-E1細胞に血清非存在下で10 mMのリン酸ナトリウムバッファーを添加し，経時的にRNAと蛋白質を回収した。(A)*Dmp1* の遺伝子発現量をreal-time PCRによる解析を行った。遺伝子発現量は同一試料の*Gapdh*の発現量により補正した値の平均±標準誤差として表記した（n=3）。0 hrでの発現量を1とするfold changeで示す。高濃度無機リン酸の添加により*Dmp1*の遺伝子発現増加を認めた。(B) ERK1/2のリン酸化状態の経時変化について抗リン酸化ERK1/2 抗体，抗ERK1/2 抗体およびHRP標識抗ウサギIgG抗体を用いてウエスタンブロットに供した。高濃度無機リン酸の添加によりリン添加後1時間頃をピークとするERK1/2のリン酸化の増強を認めた。

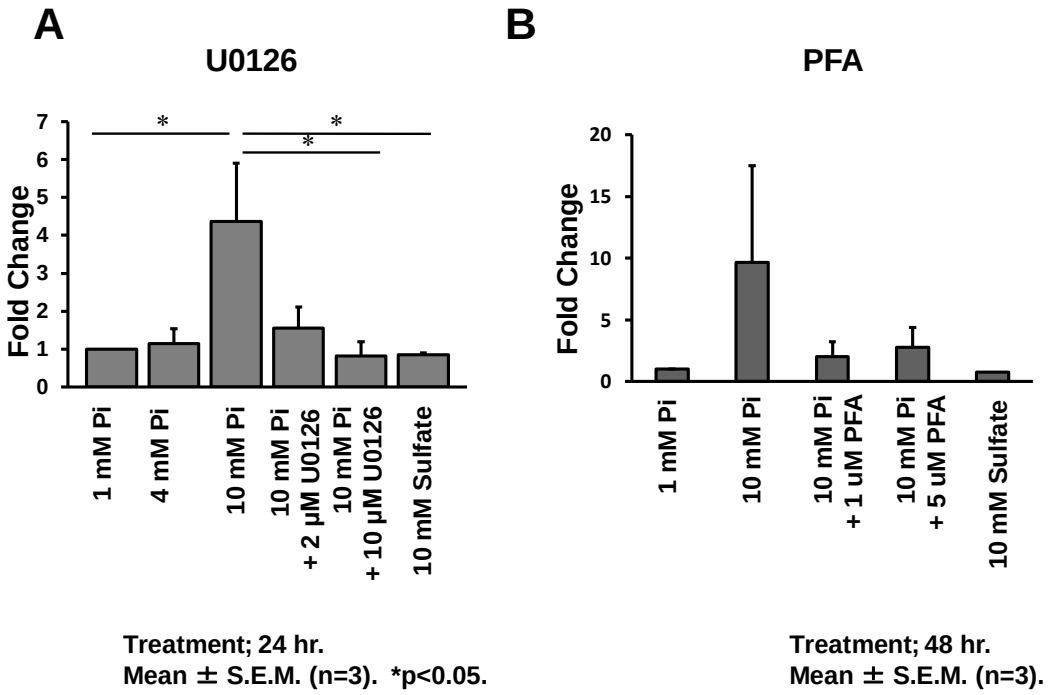

図２　細胞外無機リン酸濃度上昇による*Dmp 1*の遺伝子発現増加に対するU0126,PFAの効果

(A)MC3T3-E1細胞に 血清非存在下でMEK阻害剤U0126（2, 10 μM）もしくは溶媒のみを添加し，30分後に1, 4, 10 mMのリン酸ナトリウムバッファーまたは陰性対照として硫酸ナトリウムバッファーを添加した。リン酸添加24時間後にtotal RNAを抽出し，*Dmp1* の発現量をreal-time PCR法により解析した。(B) MC3T3-E1細胞に血清非存在下でナトリウム／リン酸共輸送担体阻害剤PFA（1, 5 μM）もしくは溶媒のみを添加し，30分後に1, 10 mMリン酸ナトリウムバッファーまたは陰性対照として硫酸ナトリウムバッファーを添加した。リン酸添加48時間後にtotal RNAを抽出し，*Dmp1* の発現量をreal-time PCRによる解析を行った。遺伝子の発現量は同一試料の*Gapdh*の発現量により補正した値の平均±標準誤差として表記した(n=3)。1 mM Piでの発現量を1としたfold changeで示す。*p<0.05.細胞外無機リン酸濃度上昇による*Dmp1* の発現増加は，U0126，PFAによる解除が示唆された。

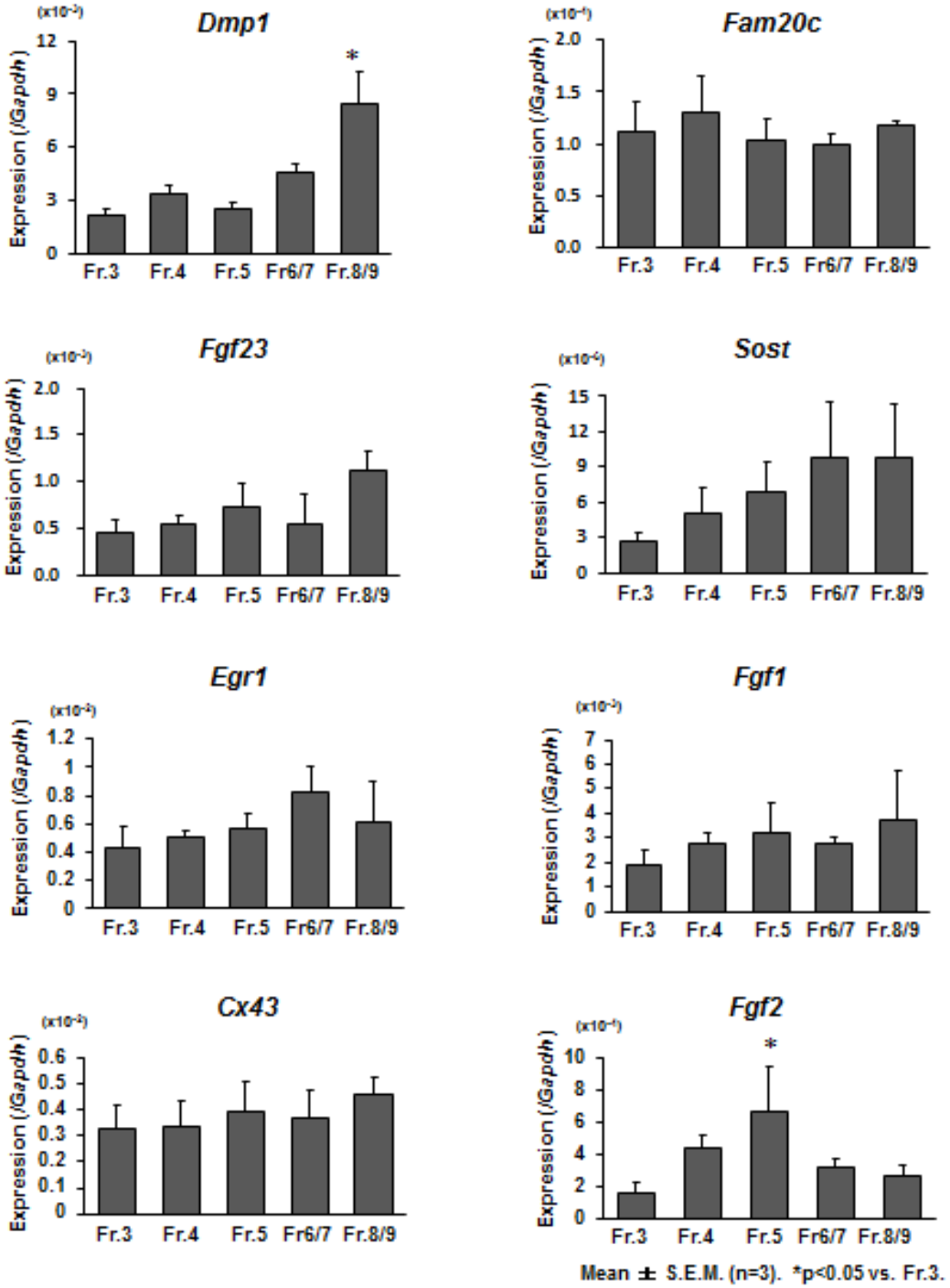

図３　野生型マウス長管骨より単離した各細胞分画における遺伝子発現プロファイル

10週齢の雄性C57BL/6J野生型マウス4匹より単離したFraction（Fr.）3以降の分画についてtotal RNAを抽出し，real-time PCR法により解析した。各遺伝子の発現量は同一試料の*Gapdh*の発現量により補正した値の平均±標準誤差として表記した（n=3）*p<0.05.

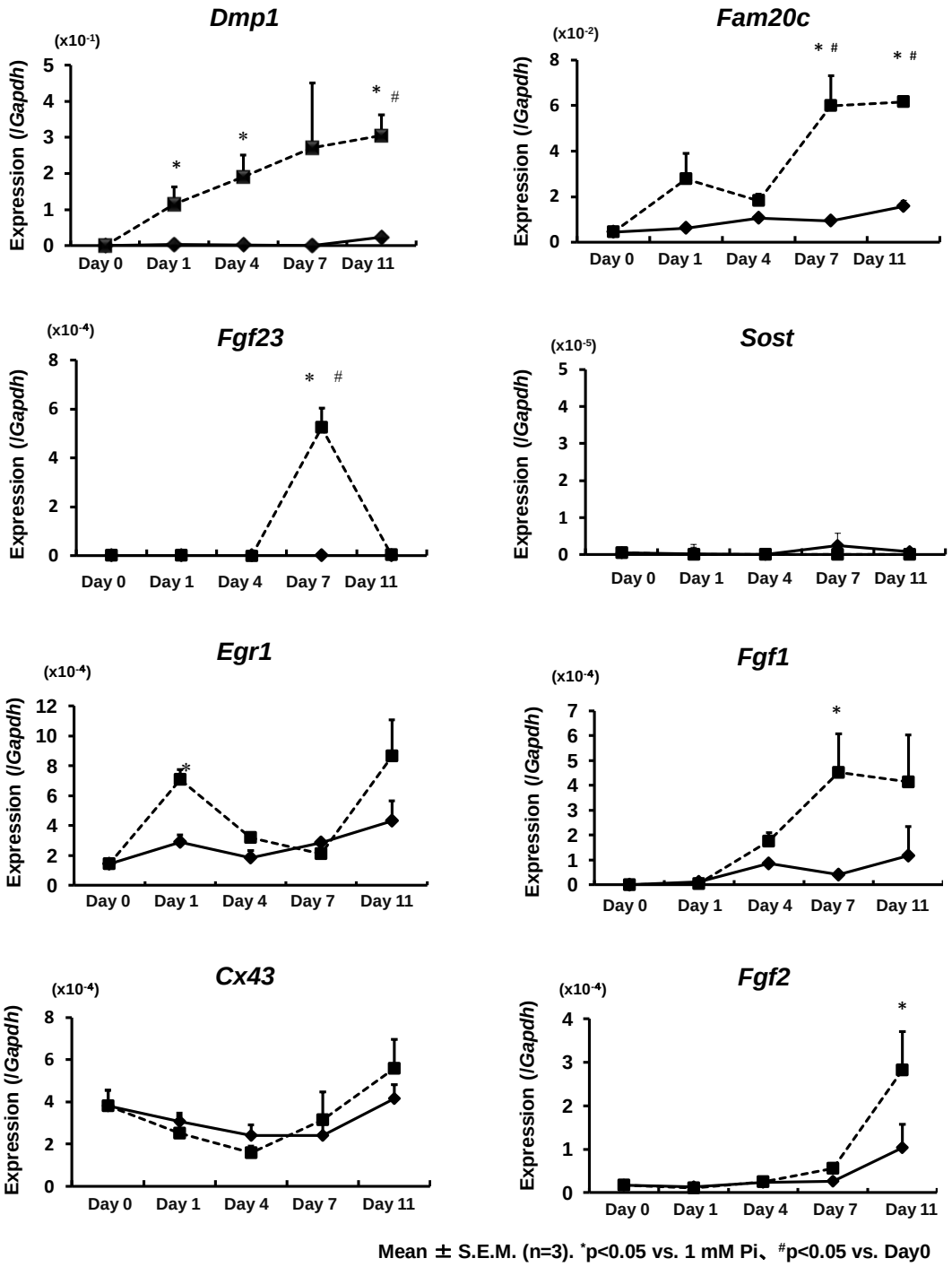

図４　MC3T3-E1コラーゲンゲル包埋培養における細胞外無機リン酸濃度変化の遺伝子発現変化への影響

MC3T3-E1細胞をＩ型コラーゲンゲルに包埋し，15分後に1 mM（◆），10 mM（■）の無機リン酸を添加した。リン酸添加時およびリン酸添加1，4，7，11日後にtotal RNAを抽出し，各遺伝子の発現量をreal-time PCR法により解析した。各遺伝子の発現量は同一試料の*Gapdh*の発現量により補正を行った。*,#：$p<0.05$

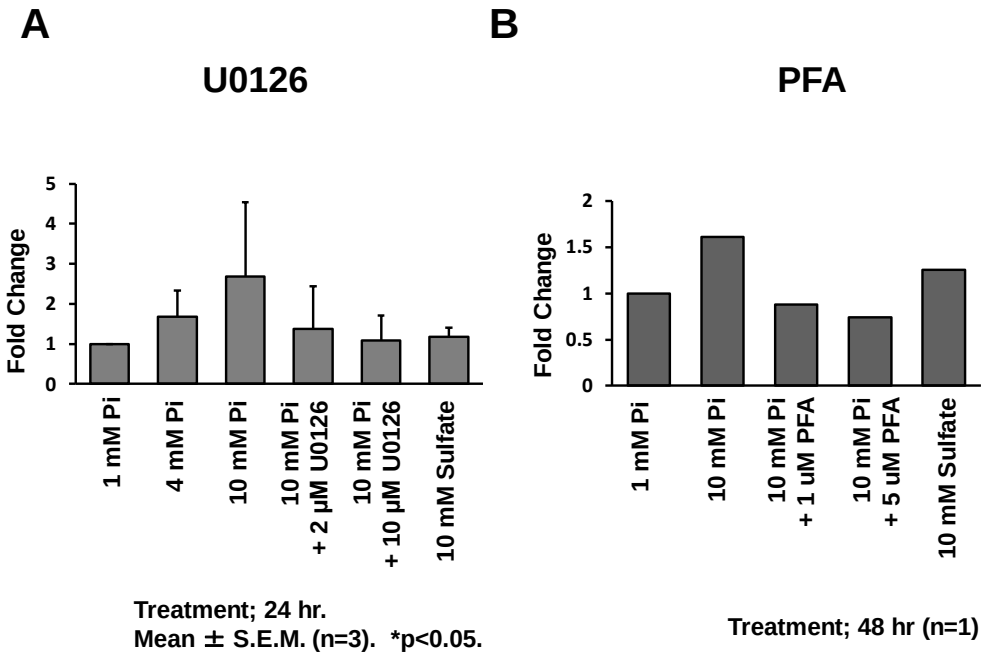

図５　細胞外無機リン酸濃度上昇による*Fgf2*の遺伝子発現増加に対するU0126,PFAの効果

(A)MC3T3-E1細胞に血清非存在下でMEK阻害剤U0126（2, 10 μM）もしくは溶媒のみを添加し，30分後に1，4，10 mMリン酸ナトリウムバッファーまたは陰性対照として硫酸ナトリウムバッファーを添加した。リン酸添加24時間後にtotal RNAを抽出し，*Fgf2* の発現量をreal-time PCR法により解析した。遺伝子の発現量は同一試料の*Gapdh*の発現量により補正した値の平均±標準誤差として表記した（n=3）1 mM Piでの発現量を１としたfold changeで示す。細胞外無機リン酸濃度上昇による*Fgf2* の発現増加は，U0126により解除された。(B) MC3T3-E1細胞に血清非存在下でナトリウム／リン酸共輸送担体阻害剤PFA（1, 5 μM）もしくは溶媒のみを添加し，30分後に1，10 mMリン酸ナトリウムバッファーまたは陰性対照として硫酸ナトリウムバッファーを添加した。リン酸添加48時間後にtotal RNAを抽出し，*Fgf2* の発現量をreal-time PCR法により解析した。遺伝子の発現量は同一試料の*Gapdh* の発現量により補正した。1 mM Piでの発現量を1としたfold changeで示す。細胞外無機リン酸濃度上昇による*Fgf2* の発現増加は，PFAにより減少傾向を示した。

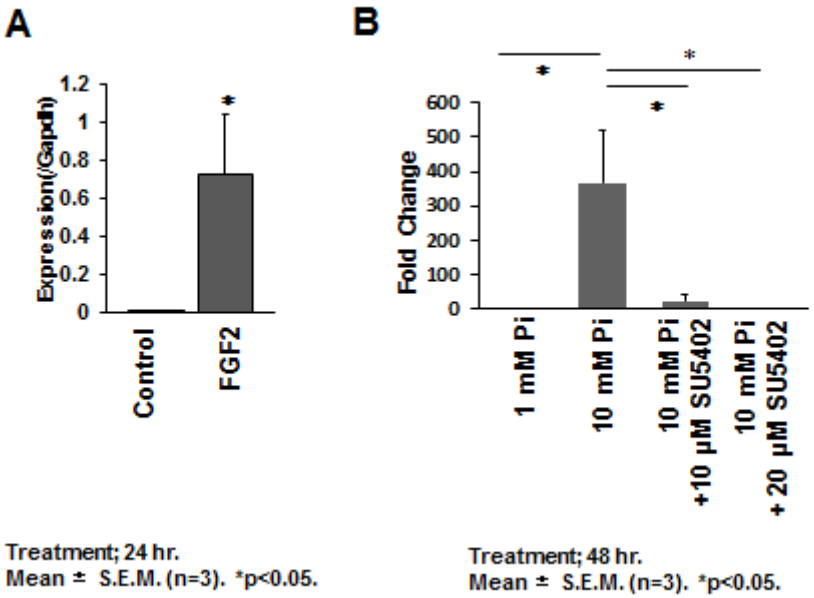

図６　リコンビナントFGF2，FGFR阻害剤SU5402に対する*Dmp1*の遺伝子発現変化

(A)MC3T3-E1細胞にリコンビナントFGF2（10　ng/ml）もしくは溶媒のみを添加した。リコンビナントFGF2添加24時間後にtotal RNAを抽出し，*Dmp1* の発現量をreal-time PCR法により解析した。遺伝子の発現量は同一試料の*Gapdh*の発現量により補正した値の平均±標準誤差として表記した（n=3）。リコンビナントFGF2の添加により*Dmp1* の遺伝子発現増加を認めた。(B)MC3T3-E1細胞に10% 牛胎仔血清存在下でFGFR阻害剤SU5402（10，20　μM）もしくは溶媒のみを添加し，30分後に1，10　mM無機リン酸を添加した。リン酸添加48時間後にtotal RNAを抽出し，*Dmp1* の発現量をreal-time PCR法により解析した。細胞外無機リン酸濃度上昇による*Dmp1* の発現増加は，SU5402により解除されると示唆された。