

Title	リン代謝における骨細胞の機能
Author(s)	宮川, 和晃
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59277">https://hdl.handle.net/11094/59277</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

## 【4】

氏名	宮 川 和 晃 <small>みや がわ かず あき</small>
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 25012 号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	リン代謝における骨細胞の機能
論文審査委員	(主査) 教授 道上 敏美 (副査) 教授 古郷 幹彦 准教授 西村 理行 講師 佐藤 淳

## 論文内容の要旨

## 【研究背景・目的】

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あり、成人骨に存在する全細胞の90-95%を占める。従来、骨細胞の機能に関する知見は力学的ストレスの受容細胞としての機能にとどまっていたが、近年、リン酸利尿因子であるFibroblast growth factor 23 (FGF23)をはじめ、遺伝性低リン血症の責任分子であるPhosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X Chromosome (PHEX) 及び Dentin matrix protein 1 (DMP1) が骨細胞に比較的特異的に発現していることが明らかとなり、リン恒常性維持において骨細胞が重要な機能を担っている事が示唆されている。しかし、これらを含む多彩なリン代謝関連分子群の骨細胞における機能的関連の詳細については、適切なモデル細胞の欠如などの理由から充分な解析がなされていない。こうした背景から、本研究においては、マウス骨からの初代骨細胞の単離・培養技術を確認し、さらに、*PHEX*遺伝子の機能喪失型変異にもとづくX連鎖性低リン血症性くる病 (XLH) のマウスホモログである

*Hyp*マウスを用いて、骨細胞におけるリン代謝関連分子群の機能的連関のメカニズムに関する解析を試みた。

## 【材料および方法】

### ① マウス初代骨細胞単離法の確立

20週齢の野生型 (C57BL/6J) マウスから摘出した長管骨を微細化し、コラゲナーゼによる基質の分解を5回繰り返し (Fr. 1-5)、続いて基質の分解とEGTAによる脱灰処理を2回反復する事により (Fr. 6-9)、細胞を段階的に分画として単離、回収した。各分画からtotal RNAを抽出し、骨芽細胞および骨細胞マーカー遺伝子の発現をreal-time PCR法によって解析した。

### ② *Hyp*マウス骨におけるリン代謝関連分子の遺伝子発現解析

20週齢の*Hyp*マウスの長管骨から上述の方法で骨芽細胞および骨細胞を単離し、real-time PCR法により遺伝子発現を野生型細胞と比較検討した。また、18.5日齢の*Hyp*/野生型胎仔および4週齢個体より摘出した長管骨より単離したRNAを用いて、リン代謝関連分子の発現変化の出現時期についても検討を行った。

### ③ 免疫染色によるリン代謝関連分子の蛋白質発現解析

20週齢の*Hyp*および野生型の脛骨を摘出し、4% パラホルムアルデヒドによる固定と0.5 M EDTAによる脱灰の後にパラフィン切片を作製した。抗FGF23および抗Dmp1抗体を用いた酵素抗体反応により、*Hyp*/野生型脛骨におけるFgf23およびDmp1蛋白質の発現量及び発現部位を解析した。

### ④ 活性型ビタミンDおよび細胞外無機リン酸刺激に対する初代骨細胞の応答性

活性型ビタミンDに対する応答性を検討するため、10-14週齢の*Hyp*および野生型マウスより単離した骨細胞 (Fr. 6-9) をI型コラーゲン・ゲルに包埋し、薬理量(1x10<sup>-8</sup> M)の活性型ビタミンD<sub>3</sub>または溶媒のみを添加した培地を重層し、48時間培養した後にRNAを回収し、real-time PCR法により遺伝子発現を解析した。また、細胞外無機リン酸に対する応答性についても検討を行うため、単離した骨細胞を高濃度(4 mM)あるいは通常濃度(1 mM)の無機リン酸を含むゲルに包埋し、同濃度のリン酸を含む培地を重層して48時間培養し、遺伝子発現を解析した。

## 【結果】

野生型マウス骨より単離した各分画の細胞におけるマーカー遺伝子の発現を解析したところ、骨芽細胞マーカー遺伝子である*kerat*はFr. 3-5で、骨細胞マーカー遺伝子である*Dmp1*や*Sost*はFr. 6-9で高く発現しており、骨芽細胞に富む細胞集団 (Fr. 3-5) と骨細胞に富む細胞集団 (Fr. 6-9) が別々に回収されることを確認した。

*Hyp*マウス及び野生型マウスのいずれにおいてもFr. 6-9で骨細胞が回収されることを確認した。血中FGF23値から推察された通り、*Hyp*細胞においては*Fgf23*の発現が上昇していた。また、興味深い事に、*Hyp*細胞においては*Dmp1*の発現についても著明に増加しており、骨芽細胞に相当する分画でも高い発現を認めた。免疫染色においても、*Hyp*骨の骨細胞及び周囲の基質にFgf23とDmp1の高い蛋白質発現を認めた。*Hyp*骨における*Fgf23*及び*Dmp1*の発現増加は胎生18.5日齢の時点で既に認められたが、この時点の*Hyp*胎仔の血中リン値は野生型胎仔とほぼ同等であった。

骨芽細胞や骨細胞におけるリン酸の取り込みに関与するIII型Na<sup>+</sup>/Pi共輸送体*Pit1*の発現を検討したところ、低リン血症を呈する20週齢の*Hyp*より単離した細胞では、いずれの分画においても*Pit1*の発現が野生型細胞よりも増加していた。一方、*Hyp*胎仔の骨においては*Pit1*の発現は野生型胎仔とほぼ

同等であった。4週齢の時点では*Hyp*骨で増加傾向を示した。以上より、*Phex*によるこれらのリン代謝関連遺伝子の発現制御の少なくとも一部は血中リン値に依存しないことが推察された。

XLHに対してはリン酸塩と活性型ビタミンD製剤の経口投与による治療が行われているが、治療に伴い血中FGF23濃度が上昇することが報告されている。そこで、*Hyp*および野生型由来骨細胞に対する活性型ビタミンD<sub>3</sub>及び細胞外無機リン酸刺激の直接作用を検討した。活性型ビタミンD<sub>3</sub>は、*Hyp*/野生型骨細胞のいずれにおいても代表的な標的遺伝子である*Rank1*の遺伝子発現を上昇させた。一方、*Dmp1*および*Phex*の発現を抑制した。また、高濃度の無機リン酸刺激は、*Hyp*及び野生型骨細胞のいずれにおいても*Early growth response 1 (Egr1)* 遺伝子の発現を誘導し、これらの細胞がリン酸刺激に対して応答性を示す事が確認された。*Dmp1*の発現は、リン酸刺激により増強を認めた。

## 【結論】

骨細胞は活性型ビタミンDや細胞外無機リン酸濃度などの細胞外からの情報を直接受容し、FGF23-PHEX-DMP1を中心とする複数の分子の機能的連関及び発現制御を介してリン代謝調節において重要な役割を担うことが示された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス骨からの骨細胞単離法及び培養法を確立し、X連鎖性低リン血症性くる病 (XLH) のモデルで *Phex* の機能喪失型変異を有する *Hyp* マウスを用いて、リン代謝における骨細胞の機能に関する分子細胞生物学的解析を行ったものである。その結果、*Hyp* 細胞においては Fgf23 に加えて Dmp1 の発現が著明に増加していることを初めて見いだした。また、コラーゲンゲル包埋培養法にて、*Hyp* 骨細胞および野生型細胞が共に活性型ビタミン D<sub>3</sub> 及び細胞外リン酸刺激に対して応答性を示すことを明らかにした。本論文は、骨細胞におけるリン代謝関連分子群の発現制御及び機能的連関に関する重要な知見を提供するものであり、また、種々の骨疾患における骨細胞を標的とする新規治療の開発に応用できると期待される。よって、博士 (歯学) の学位論文として価値のあるものと認める。