OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation
Author(s)	森本, 彬人
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85282
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	森本　彬人
論文題名 Title	SLPI is a critical mediator that controls PTH-induced bone formation （SLPIはPTH誘導性骨形成に重要なタンパク質である）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

成体の骨組織は、骨吸収と骨形成による骨の再構築（リモデリング）を生涯にわたって繰り返すことで、恒常性を維持する。近年、破骨細胞と骨芽細胞の時空間的位置関係が細胞間相互作用に寄与し、骨吸収と骨形成のバランスを制御するという知見が集積しつつある。骨代謝に関わる主要なホルモンである副甲状腺ホルモン（PTH）は、生体骨組織内で破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用を促進し、骨吸収と骨形成の両方を制御することが知られている。本研究では、PTHが骨形成と骨吸収をどのように協調的に制御するのか、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

骨芽細胞をECFPで標識したトランスジェニックマウス(Col2.3-ECFP)に、PTH製剤を1日1回週5日皮下投与した。3週後、マウスより骨を採取し、骨髄腔を開放した上でコラゲナーゼ処理を行い、細胞懸濁液から$Lin^{-}CD45^{-}ECFP^{+}$細胞集団を単離した。この細胞集団はOsteocalcinやOsterixの遺伝子発現レベルが高く、骨芽細胞に特異的な集団であることを確認した。次に、次世代シーケンサー（RNA-Seq）を用いて、これらの細胞集団の網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、PTH投与群と非投与群の間で1288遺伝子に有意な発現変動が認められた。これらの中には、創傷治癒やタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)に関わる多くの遺伝子が含まれており、その中でもセリンプロテアーゼ阻害作用をもつ低分子タンパク質SLPIの発現が最も顕著に増加していることが明らかになった。

次に、SLPIノックアウトマウスを使用して、SLPIがPTHの骨量増加作用に与える影響を検討した。大腿骨遠位端海綿骨量をマイクロCTで計測した結果、SLPI欠損マウスでは野生型マウスと比較してPTHの骨量増加作用が有意に減少することが分かった。一方で、PTH非投与時の海綿骨量はSLPI欠損マウスと野生型マウスの間で差が認められなかった。PTHの投与下で、SLPIノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、血清骨形成マーカーP1NPの値が有意に低い一方で、骨吸収マーカーCTXの値は有意に高かった。以上の結果より、PTHは骨芽細胞のSLPI遺伝子発現上昇を介して、骨形成と骨吸収の両方に影響を与え、骨量を増加させることが示唆された。

骨芽細胞におけるSLPIの役割を明らかにするために、レトロウイルスベクターを用いてSLPIを過剰発現するMC3T3-E1骨芽細胞株を作成した。これらの細胞株は、分化誘導時に骨芽細胞分化に重要な転写因子(Runx2、Sp7)や分化マーカー(ALP、Col1a1、Bglap)の遺伝子発現が高かった。さらに、アリザリンレッド染色にて高い石灰化能を有しており、SLPIは骨芽細胞が発現する骨形成促進因子であることが分かった。一方で、リコンビナントSLPIタンパク質は、in vitroで破骨細胞の分化および骨吸収活性に影響を与えず、骨吸収に対する直接的な影響については否定的であった。

SLPIが破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用に与える影響を検討するために、SLPIを過剰発現した骨芽細胞株と破骨細胞の共培養を行った。その結果、SLPIを過剰発現した骨芽細胞では、コントロールの骨芽細胞株と比較して、有意に破骨細胞との細胞接着時間が大きいことが明らかとなった。

最後に、SLPIが生体内で骨芽細胞と破骨細胞の細胞間相互作用に与える影響を検討するために、二光子励起顕微鏡を用いてSLPIノックアウトマウスの生体骨組織内における骨芽細胞と破骨細胞の動態を観察した。その結果、PTH投与下でSLPIノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して、破骨細胞と骨芽細胞の混ざり合いの程度や、細胞間接触の頻度が有意に低いことが明らかとなった。

〔総　括(Conclusion)〕

本研究により、創傷治癒や抗炎症作用、癌の転移促進作用を持つ分子として知られていたSLPI が、PTHの骨同化作用にも関わることが明らかとなり、PTHの骨形成促進作用の新たな分子メカニズムが同定された。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　森本　彬人

論文審査担当者	（職）		氏　名	
	主　査	大阪大学教授	石井　優	署名
	副　査	大阪大学教授	竹田　潔	署名
	副　査	大阪大学教授	大薗　恵一	署名

論文審査の結果の要旨

申請者は、副甲状腺ホルモン(PTH)が骨代謝を制御する分子メカニズムを探索する研究を行った。まず、PTHを間欠的に投与した成体マウスの骨芽細胞では、セリンプロテアーゼインヒビターSLPIの発現が増加していることを見出した。次に、SLPI欠損マウスを解析し、PTHの薬効(骨同化作用)が有意に小さく、血清骨形成マーカーP1NPの値が低く、骨吸収マーカーCTXの値が高いことを示した。また、骨芽細胞にSLPIを過剰発現させると、骨形成能が活性化することが分かった。一方で、SLPIはin vitroで破骨細胞の機能に影響を与えなかったが、SLPIを過剰発現した骨芽細胞は破骨細胞との細胞接着が亢進していた。最後に、SLPI欠損マウスの骨組織を顕微鏡下に観察し、PTH投与後に、破骨・骨芽細胞間の細胞間コミュニケーションが低下していることを明らかにした。以上の結果は、PTHがSLPIを介して骨形成と骨吸収の両方を制御し、骨量を増加させることを示しており、博士（医学）の学位授与に値する。