



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Immunolocalization of enzymes/membrane transporters related to bone mineralization in parathyroid hormone (PTH)-administered mice [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	前, 壮功仁
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13866号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78522
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takahito_Mae_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 前 壮功仁

主査 教授 網塚 憲生
審査担当者 副査 教授 飯村 忠浩
副査 教授 田村 正人

学 位 論 文 題 名

Immunolocalization of enzymes/membrane transporters related to bone mineralization in parathyroid hormone (PTH)-administered mice

(副甲状腺ホルモン投与マウスにおける骨基質石灰化関連酵素群・膜輸送体の免疫局在)

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。内容を以下に記す。

副甲状腺ホルモン(PTH)の間歇投与は、骨形成を促進する。骨基質石灰化は、骨形成と同時に進行するが、PTH 投与における骨基質石灰化関連リン酸供与・輸送因子の発現や局在変化は未だ不明である。本研究では、PTH 間歇投与マウスの長管骨における 1) 基質小胞性石灰化に関わる酵素・膜輸送体 (TNALP, ENPP1, PHOSPHO1), 2) 骨細胞による石灰化調節に関わる因子 (FGF23/ α klotho, SIBLING family/Phex) の発現・局在を組織化学的に解明することを目的とした。

実験動物として、生後 6 週齢雄性 C57BL/6J マウスに human PTH[1-34] (20 μ g/kg/day) を 1 日 2 回もしくは 1 日 4 回の頻度で 2 週間腹腔内投与した。麻酔下で全血採取を行った後、4%パラホルムアルデヒド溶液にて浸漬固定し、右側大腿骨・脛骨を摘出した。摘出したサンプルは、EDTA 脱灰後、パラフィン包埋を行い、TNALP, ENPP1, PHOSPHO1, FGF23, MEPE の免疫染色に供した。左側大腿骨・脛骨は、未脱灰で MMA 樹脂もしくは Epoxy 樹脂包埋を行い、骨石灰化速度の計測や von Kossa 染色を行った。また、一部の大腿骨・脛骨から total RNA を抽出し、RT-PCR 法あるいは real-time PCR 法にて、*Tnalp*, *Enpp1*, *Phospho1*, *Ank*, *Fgf23*, *Fgfr1c*, *aklotho*, *Spp1*, *Dmpl*, *Mepe*, *Phex*, *Cathepsinb* の遺伝子発現を解析した。

その結果、PTH 投与群では、投与頻度に応じて大腿骨の骨梁が増加し、骨梁表面に多数の活性型骨芽細胞や前骨芽細胞が観察された。血中カルシウム濃度は、両群で有意差が認められなかったが、血中リン濃度は PTH 投与群で有意に低下していた。しかし、PTH 投与群では石灰化速度が上昇しており、骨幹端における TNALP/ENPP1 陽性骨芽細胞系細胞の領域が広がっていた。また、PHOSPHO1 の陽性反応は骨芽細胞の細胞膜上に観察された。さらに、PTH 投与群では、*Tnalp*, *Enpp1*, *Phospho1* ならびに *Ank* 遺伝子の発現が有意に上昇していた。

コントロール群では主に骨細胞が FGF23 陽性を示したが、PTH を投与すると、骨細胞のみならず骨芽細胞や前骨芽細胞でも FGF23 陽性反応が観察された。また、PTH 投与により *Fgf23*, *FGFrl*, *akltoto* 遺伝子の発現上昇が認められた。骨基質石灰化抑制に寄与する SIBLING family である MEPE の免疫染色を行うと、コントロール群では MEPE の陽性反応がほとんど認められないのに対し、PTH 投与群では骨細胞に強陽性反応が観察された。PTH 投与群では、*Mepe* 遺伝子に加えて SIBLING family である *Spp1*, *Dmp1* 遺伝子の発現も上昇する一方、SIBLING family を分解する *Cathepsin b* 遺伝子発現は低下していた。また、*Phex* 遺伝子の発現上昇が認められた。

これより PTH を間歇投与すると、TNSALP, ENPP1, PHOSPHO1 発現が亢進し、石灰化速度の上昇に寄与すると推察された。また、SIBLING family, *Phex* の発現上昇ならびに *CathepsinB* の発現低下により、SIBLING family/*Cathepsin B* による基質石灰化抑制が、過剰に産生された *Phex* によって解除されると推測され、結果として石灰化促進に作用すると考えられた。

以上より、PTH 間歇投与は、TNSALP/ENPP1 および *Phex*/SIBLING family の発現を調整することで骨基質石灰化を亢進させると推測された。

審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。以下のその項目を記す。

- (1) 本研究における薬剤投与ならびに採材プロトコールについて
- (2) PTH 間歇投与で長管骨の骨形成が促進される機序について
- (3) ヒト臨床および動物モデルにおける PTH 投与の血中リン濃度に与える影響の違いについて
- (4) 長管骨における ALP と PHOSPHO1 の局在パターンの差異について
- (5) PTH 間歇投与により前骨芽細胞が ENPP1 を発現することの意義について
- (6) SIBLING family による石灰化調節機構について

上記の質疑応答から、申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

以上、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認めた。