HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Immunolocalization of enzymes/membrane transporters related to bone mineralization in parathyroid hormone (PTH)-administered mice [an abstract of entire text]
Author(s)	前, 壮功仁
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/78525
Type	doctoral thesis
File Information	Takahito_Mae_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

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）

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　前　壮功仁

骨基質石灰化は骨芽細胞が類骨層に分泌する基質小胞から開始され、様々な酵素・膜輸送体によりリン・カルシウムイオンが基質小胞へと供給されている。基質小胞性石灰化に関与する酵素・膜輸送体としては、組織非特異型アルカリホスファターゼ(tissue non-specific alkaline phosphatase: TNALP), ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1), PHOSPHO1, Ank や Pit-1 などをあげることができる。また、骨細胞・骨芽細胞から産生される FGF23 は、腎臓の近位尿細管に存在する FGFR1c/klotho 受容体に結合し血中リン濃度を低下させるが、骨細胞・骨芽細胞は FGFR1c/klotho を発現しオートクライン作用的に石灰化を調節する可能性も示唆されている。さらに、DMP1, MEPE, osteopontin などの SIBLING family 蛋白は cathepsin B によりリン酸化を受けて石灰化結晶を抑制することが報告されているが、その一方で、骨細胞・骨芽細胞から分泌される Phex は SIBLING family 蛋白に結合し、cathepsin B による石灰化結晶抑制を解除するという。このように、骨基質、特に類骨層における基質小胞性石灰化は TNALP, ENPP1, PHOSPHO1 など様々な酵素・膜輸送体によって調節される一方､骨基質内部の石灰化は SIBLING family 基質蛋白のリン酸化や分解、あるいは、Phex の制御を受けると推察される。

副甲状腺ホルモン(PTH)の間歇投与により骨芽細胞の骨形成や石灰化を促進することが報告されているが､骨基質石灰化を調節する酵素や膜輸送体に対して PTH がどのように作用して骨基質石灰化を亢進させているのか未だに明らかにされていない。そこで、本研究では、PTH の間歇投与マウスの長管骨における TNALP, ENPP1, PHOSPHO1, Phex, MEPE などの骨基質石灰化に関与する酵素・膜輸送体の局在を組織化学的に検索した。

本研究では human PTH[1-34](20μg/kg/day)を 1 日 2 回もしくは 1 日 4 回の頻度で 2 週間にわたって腹腔内投与した生後 6 週齢雄性 C57BL/6J マウスを用いた｡血中カルシウムおよびリン濃度の測定のため、これらマウスを麻酔下で全血採取を行ったのち、パラホルムアルデヒド固定を行った。その後、右側大腿骨・脛骨を摘出し、EDTA 溶液で脱灰後にパラフィン包埋を行い、TNALP, ENPP1, PHOSPHO1, MEPE, Phex, FGF23, osteopontin などの免疫組織化学を施行した。一方、左側大腿骨・脛骨は、脱灰せずに MMA 樹脂もしくは Epoxy 樹脂包埋を行い、MMA 樹脂切片ではカルセイン標識観察および骨石灰化速度の計測を、Epoxy 樹脂切片では 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, osteopontin, dmp1, mepe, phex, cathepsin B* 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は多数の活性型骨芽細胞・前骨芽細胞が観察された。また、PTH 投与群の骨表面に厚い類骨層が認められ、石灰化速度も有意に上昇していた。血中リン濃度は、コントロール群と比較して PTH 投与群で有意に低下していたが、血中カルシウム濃度は両群において有意差を示さなかった。PTH 投与マウスの骨幹端における TNALP 陽性骨芽細胞・前骨芽細胞、ならびに、ENPP1 陽性領域や PHOSPHO1 陽性骨芽細胞が広範囲にわたって観察された。また、*tnalp, enpp1, phospho1* 遺伝子の発現は、コントロール群に比較して、PTH 投与群で有意に上昇していた。

一方、FGF23 は、コントロール群では主に骨細胞に陽性反応が認められたが、PTH 投与群では骨細胞のほか骨芽細胞・前骨芽細胞にも陽性反応が観察され、*fgf23* 遺伝子の発現も有意に上昇していた。SIBLING family 蛋白の局在を検討したところ、MEPE の陽性反応は、コントロール群ではほと

んど認められなかったが、PTH 投与群では骨細胞に強い陽性反応が観察された。また PTH 投与群において、セメントラインに一致した osteopontin 強陽性反応が認められた。これら遺伝子発現を解析したところ、SIBLING family である *mepe, osteopontin, dmp1* 遺伝子と *phex* 遺伝子の発現は、PTH 投与群で有意に増加したものの、*cathepsin B* 発現は有意に低下していた。

これらの結果から、PTH を間歇投与すると TNSALP, ENPP1, PHOSPHO1 の発現および蛋白局在が増加し、石灰化速度が上昇するものと推察された。また、*phex* 遺伝子および SIBLING family の *mepe, dmp1, osteopontin* 遺伝子の発現が上昇する一方、SLBLING family 蛋白を分解する *cathepsin B* の遺伝子発現が低下したことから、SIBLING family による基質石灰化抑制が Phex により解除されて、石灰化を促進するものと推測される。

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