

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07866

研究課題名(和文) 骨芽細胞の分化と石灰化における III型ナトリウム リン酸共輸送担体の役割

研究課題名(英文) Role of type III sodium/phosphate co-transporters in osteoblast differentiation and mineralization

研究代表者

山崎 美和(若林美和)(Yamazaki, Miwa)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・骨発育疾患研究部門(旧環境影響部門)  
・流動研究員

研究者番号：50455549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨格においてリンは多様な作用を発揮するが、少なくともその一部は細胞形質膜や基質小胞の膜上に存在するIII型ナトリウム/リン酸共輸送担体であるPit1およびPit2を介することが推察される。本研究においては、骨芽細胞の機能制御におけるPit1およびPit2の役割を明確にするため、骨芽細胞系細胞株にCRISPR/Cas9を適用することにより樹立したPit1欠損細胞、Pit2欠損細胞を用いた解析を行った。骨芽細胞におけるPit1やPit2は細胞外リン酸の上昇を介して石灰化の亢進とアルカリホスファターゼの低下をもたらし、ピロリン酸やATPの代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、血管や脳などの異所性の石灰化におけるPit1やPit2の関与が報告され、注目を浴びている。しかしながら、小児の成長に関わる骨芽細胞の分化や石灰化におけるPit1およびPit2の生理的な機能については十分な検討がなされておらず、本研究の学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In skeletons, extracellular phosphate (Pi) exerts various actions. Although these multiple actions of extracellular Pi on the skeletal cells are likely to be partly mediated by type III sodium/phosphate co-transporters Pit1 and Pit2, the details still remain unclear. In the current study, we generated osteoblastic cells lacking Pit1 or Pit2 by applying CRISPR/Cas9 genome editing. Our results demonstrated that ablation of Pit1 or Pit2 in the osteoblastic cell line led to accelerated mineralization, suppressed tissue-nonspecific alkaline phosphatase and altered the levels of extracellular and intracellular pyrophosphate and adenosine triphosphate, and we speculate that these changes might be partly mediated by changes in the availability of extracellular Pi.

研究分野：骨ミネラル代謝学

キーワード：リン Pit1 Pit2

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児の特性である成長において、骨格の形成および石灰化は必須のプロセスである。骨基質の石灰化は、骨芽細胞から出芽的に分泌される基質小胞を介して開始される。骨芽細胞の形質膜および基質小胞の膜上には III 型ナトリウム-リン酸 (Na/Pi) 共輸送担体である Pit1 および Pit2 が存在する。我々はこれまで、骨芽細胞や軟骨細胞等を用いて、細胞外無機リン酸濃度の変化が Pit1 を介してシグナルを惹起し、遺伝子発現変化をもたらすことを明らかにしてきた。とくに、骨芽細胞株においては、Pit1 を介するリン酸惹起シグナルは、骨細胞のマーカーである dentin matrix protein 1 (Dmp1) 遺伝子の発現を速やかに上昇させた (Nishino, Yamazaki, et al. J Cell Biochem, 2017; Yamazaki, et al. J Cell Biochem, 2010; Kimata, et al. Bone, 2010)。このことから、Na/Pi 共輸送担体は骨の石灰化のみならず、骨芽細胞分化にも関わる可能性が示唆されるが、骨芽細胞の分化や石灰化の制御における Pit1 と Pit2 の機能の異同は不明である。また、Pit1 や Pit2 は異所性の石灰化にも関与することが推察されているが、Pit2 の機能喪失変異による細胞内への Pi 取り込みの低下が、脳内の石灰化を示す家族性基底核石灰化症を引き起こすことが報告されており (Wang, et al. Nature Genetics, 2012)、石灰化における Pit1、Pit2 の機能の詳細についても不明な点が残されている。

近年、ゲノム上の任意の位置に遺伝子改変を誘導するゲノム編集技術が開発されており、中でも CRISPR/Cas システムは最新的手法である (Cong, et al. Science, 2013; Mali, et al. Science, 2013)。本研究においては、CRISPR/Cas を用いてこれらの Na/Pi 共輸送担体の欠損細胞を作製し、骨芽細胞の分化と基質小胞を起点とする石灰化の分子機構における Pit1 と Pit2 の役割を解明する。本研究は成長過程にある小児において重要な骨の形成と石灰化の分子機構の解明をめざすものであり、得られる成果は小児の健全な骨発育に資すると期待される。

### 2. 研究の目的

CRISPR/Cas システムを用いて Pit1 および Pit2 遺伝子を欠損する骨芽細胞株を作成することにより、骨芽細胞の分化と基質小胞を介した石灰化における Pit1 と Pit2 の役割について検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) Pit1 欠損細胞 (Pit1-KO) および Pit2 欠損細胞 (Pit2-KO) の樹立: マウス骨芽系細胞株 (MC3T3-E1 subclone 4) に CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を適用して Pit1-KO および Pit2-KO を樹立した (GeneArt CRISPR Nuclease Vector with CD4 Enrichment Kit; Thermo Fisher Scientific)。コントロール細胞としては、ノックアウト細胞作製の手順を経て、Pit1、Pit2 遺伝子に変異が導入されなかったクローンを使用した。

(2) 樹立したノックアウト細胞の解析

① Pi 取り込みアッセイ: P32-orthophosphate を使用し、Pit1-KO および Pit2-KO の Pi 取り込み能を検討した。

② 骨芽細胞分化誘導および評価: 3 mM Pi とアスコルビン酸存在下で長期培養することにより行った。In vitro の石灰化をアリザリンレッド染色 (Sigma-Aldrich) およびハイドロキシアパタイトに特異的に結合する蛍光色素を用いた OsteoImage Mineralization Assay (Lonza) により評価した。

③ Real-time PCR: total RNA を抽出し SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を使用し cDNA を合成した。Real-time PCR は Taqman Gene Expression Assay および StepOnePlus Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を使用し行った。

④ Pi、ピロリン酸 (PPi)、アデノシン三リン酸 (ATP) および組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNSALP) 活性の測定: ホスファ C-テストワコー (富士フイルム和光純薬)、PPi assay kit (Biovision)、CellTiter-Glo 2.0 Assay (Promega) および基質として p-nitrophenylphosphate (富士フイルム和光純薬) を使用した。

(3) レンチウイルスによるノックアウト細胞への Pit1 および Pit2 遺伝子導入: Pit1、Pit2 をコードする Slc20a1 および Slc20a2 cDNA は DNAFORM より購入し CSII-EF-RfA-IRES-Puro にクローニングした。レンチウイルスは RIKEN BRC により提供されている方法に従って調整した。

#### 4. 研究成果

Pit1-KO 細胞、Pit2-KO 細胞においては、Pit1、Pit2 をコードする Slc20a1 および Slc20a2 遺伝子の変異導入部位近傍のシーケンスにより、それぞれフレームシフトと premature な stop codon が生じていることを確認した。

Pit1-KO および Pit2-KO においては Pi 取り込みが著明に減少し、細胞外の Pi レベルが上昇していた。3mM Pi 存在下長期培養における分化誘導を行い、骨芽細胞や骨細胞のマーカー遺伝子の発現を real-time PCR にて検討した。骨芽細胞分化の重要な転写因子である Runx2 の発現は、コントロール細胞においては Day14 にピークがありその後減少した。一方、Pit1-KO における Runx2 の発現ピークは、コントロールと比較し遅く発現量も低下していた。Pit2-KO においては Runx2 の発現は長期培養期間中一定して低かった。骨芽細胞分化のマーカーである Osteopontin、成熟骨芽細胞と骨細胞が産生する Dmp1 と Fgf23、骨細胞のマーカー遺伝子 Sost の発現を検討したところ、コントロール細胞においては、3mM Pi 存在下で長期間培養することによりこれらの遺伝子の発現が強く誘導されたが、Pit1-KO、Pit2-KO においては著明に抑制されていた。

石灰化能をアリザリンレッド染色とハイドロキシアパタイトに特異的に結合する OsteoImage 蛍光染色により評価したところ、Pit1-KO 細胞、Pit2-KO 細胞においては、リン酸取り込み能が減弱していたにも関わらず、石灰化がコントロール細胞に比べて著明に亢進していた。これらのことから、次に、石灰化阻害作用を有する PPi の代謝を検討した。

分化誘導前の細胞を使用し、1 mM Pi 存在下での細胞外 PPi レベルは Pit1-KO、Pit2-KO においては、コントロールより上昇していた。このことから、Pit1-KO 細胞や Pit2-KO 細胞における石灰化の亢進は、細胞外ピロリン酸の低下によるものではないことが明らかになり、むしろ石灰化亢進に対する代償機構としてピロリン酸が上昇していることが推察された。細胞内ピロリン酸レベルは Pit1-KO、Pit2-KO において著明に減少していた。Pit1 や Pit2 の欠損によって細胞内外の PPi レベルに変化を認めたことから、次に細胞外 ATP から PPi を産生する Enpp1 ならびに PPi を細胞内から細胞外へと輸送する Ank の発現を検討した。その結果、Pit1-KO ではコントロールと比較し Enpp1 の発現が上昇していたが、Ank の発現は減少していた。Pit2-KO ではこれらの遺伝子の発現はコントロールと比較し差を認めなかった。

骨において PPi は TNSALP の主要な基質であるため、次に Alpl 遺伝子発現と TNSALP 活性を検討した。Pit1-KO、Pit2-KO においては、コントロール細胞に比べて Alpl 遺伝子発現と TNSALP 活性が著明に減弱しており、このことが細胞外 PPi の上昇の原因となっていることが推察された。

細胞外の ATP は細胞外シグナル分子として、ATP 受容体を介して作用を発揮し、細胞機能を制御する。また骨においては PPi の産生に関与する。これらの細胞の ATP レベルについて検討した結果、細胞外 ATP レベルは PPi と同様に、Pit1-KO、Pit2-KO においてコントロールより著明に上昇しており、細胞外 ATP が TNSALP の基質となることが明らかとなった。細胞内 ATP レベルについても検討した結果、細胞外と比べて細胞内の ATP はおよそ 1000 倍のレベルであり、細胞間に明らかな差は見られなかった。ATP 受容体のうち、骨芽細胞に強く発現している P2Y2 と P2X7 の発現を検討した。Pit1-KO、Pit2-KO において、P2Y2 の発現は抑制されていた一方、P2X7 の発現は著明に上昇していた。

次に、石灰化が進行した細胞における PPi 代謝や ATP 代謝について検討するため、3 mM Pi を含む分化誘導培地で 21 日間培養した後の細胞を用いて、同様の解析を行った。Alpl 遺伝子発現は Pit1-KO、Pit2-KO において低下していたが、TNSALP 活性は Pit2-KO 細胞においてコントロールより増加しており石灰化前の細胞を用いた場合と異なった結果であった。細胞外 PPi は、Pit1-KO で増加、Pit2-KO で減少し、細胞内 PPi は、Pit1-KO、Pit2-KO でともに増加していた。Day21 での細胞外 ATP については細胞間で差が認められなかった一方、細胞内 ATP レベルについては、Pit1-KO 細胞、Pit2-KO 細胞で増加していた。

レンチウイルスベクターを用いて Pit1、Pit2 をそれぞれの欠損細胞に発現させたところ、Pi 取り込み能は有意に回復していた。Pit1-KO 細胞や Pit2-KO 細胞で認められた石灰化の亢進、Alpl 遺伝子発現および TNSALP 活性の低下、細胞外 PPi および ATP の上昇はいずれも解除され、これらの変化が Pit1 や Pit2 の欠損によるものであることが確認された。

骨芽細胞における Pit1 や Pit2 は細胞外 Pi の上昇を介して石灰化の亢進と TNSALP の低下をもたらす、PPi や ATP の代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Yamazaki M, Kawai M, Kinoshita S, Tachikawa K, Nakanishi T, Ozono K, Michigami T.  | 4. 巻<br>-               |
| 2. 論文標題<br>Clonal osteoblastic cell lines with CRISPR/Cas9-mediated ablation of Pit1 or Pit2 show enhanced mineralization despite reduced osteogenic gene expression.                                      | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Bone   | 6. 最初と最後の頁<br>-         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bone.2021.116036.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Michigami T, Tachikawa K, Yamazaki M, Kawai M, Kubota T, Ozono K.  | 4. 巻<br>106             |
| 2. 論文標題<br>Hypophosphatasia in Japan: ALPL Mutation Analysis in 98 Unrelated Patients.   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Calcif Tissue Int.   | 6. 最初と最後の頁<br>221-231   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s00223-019-00626-w  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Kawai M, Kinoshita S, Yamazaki M, Yamamoto K, Rosen CJ, Shimba S, Ozono K, Michigami T.  | 4. 巻<br>4               |
| 2. 論文標題<br>Intestinal clock system regulates skeletal homeostasis.   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>JCI Insight  | 6. 最初と最後の頁<br>-         |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1172/jci.insight.121798.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Yamamoto K, Kawai M, Yamazaki M, Tachikawa K, Kubota T, Ozono K, Michigami T.  | 4. 巻<br>28              |
| 2. 論文標題<br>CREB activation in hypertrophic chondrocytes is involved in the skeletal overgrowth in epiphyseal chondrodysplasia Miura type caused by activating mutations of natriuretic peptide receptor B. | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Hum Mol Genet.   | 6. 最初と最後の頁<br>1183-1198 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1093/hmg/ddy428.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Michigami T, Kawai M, Yamazaki M, Ozono K.                    | 4. 巻<br>98              |
| 2. 論文標題<br>Phosphate as a Signaling Molecule and Its Sensing Mechanism. | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Physiol Rev.  | 6. 最初と最後の頁<br>2317-2348 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1152/physrev.00022.2017.                 | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                                  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yamazaki M, Kawai M, Kinoshita S, Tachikawa K, Nakanishi T, Ozono K, Michigami T  |
| 2. 発表標題<br>CRISPR/Cas9-Mediated Ablation of Type III Sodium/Phosphate Co-transporters in Osteoblastic Cells Caused Accelerated Mineralization and Suppressed Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase |
| 3. 学会等名<br>ASBMR 2021 Annual Meeting (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山崎美和、川井正信、木下さおり、立川加奈子、中西達郎、大園恵一、道上敏美                                  |
| 2. 発表標題<br>骨芽細胞におけるIII型ナトリウム/リン酸共輸送担体の欠損は細胞外リン酸の上昇を介して石灰化の亢進とアルカリホスファターゼの低下をもたらす |
| 3. 学会等名<br>第39回日本骨代謝学会学術集会   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山崎美和、川井正信、木下さおり、大園恵一、道上敏美                  |
| 2. 発表標題<br>III型ナトリウム/リン酸共輸送担体は骨石灰化およびピロリン酸・ATP代謝を制御する |
| 3. 学会等名<br>第38回日本骨代謝学会学術集会                            |
| 4. 発表年<br>2020年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山崎美和、川井正信、大園恵一、道上敏美              |
| 2. 発表標題<br>骨芽細胞機能制御における Ⅲ型ナトリウム/リン酸共輸送担体の役割 |
| 3. 学会等名<br>第93回日本内分泌学会学術集会                  |
| 4. 発表年<br>2020年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>山崎美和、川井正信、大園恵一、道上敏美。         |
| 2. 発表標題<br>Ⅲ型ナトリウム/リン酸共輸送担体を介する骨芽細胞機能制御 |
| 3. 学会等名<br>第37回日本骨代謝学会学術集会              |
| 4. 発表年<br>2019年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yamazaki M, Kawai M, Ozono T, Michigami.                                       |
| 2. 発表標題<br>Functional Control of Osteoblasts by Type III Sodium/Phosphate Cotransporters. |
| 3. 学会等名<br>ASBMR 2019 Annual Meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山崎美和、川井正信、大園恵一、道上敏美                       |
| 2. 発表標題<br>基質小胞性石灰化および骨芽細胞機能における Ⅲ型ナトリウム/リン酸共輸送担体の役割 |
| 3. 学会等名<br>第36回日本骨代謝学会学術集会                           |
| 4. 発表年<br>2018年                                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究内容 骨発育疾患研究部門（旧 環境影響部門） 大阪母子医療センター【研究所】  
<https://www.wch.opho.jp/research/bone/content.html>

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|