

研究種目：若手研究（B）

研究期間： 2008 ～ 2009

課題番号：20791556

研究課題名（和文） 骨形成に関わるポリリン酸ホスファターゼの単離同定

研究課題名（英文） Identification of inorganic polyphosphate polyphosphatase which is involved in bone formation

研究代表者

内橋 隆行 (UCHIHASHI TAKAYUKI)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70397628

研究成果の概要（和文）：

In vitro マウス内軟骨性骨化モデル ATDC5 を用い、ポリリン酸を作用させたところ、アルシアンブルー陽性軟骨基質の形成亢進や2型、10型コラーゲンの発現が対象群より早期にみられるなど、軟骨形成が促進されることを示唆する結果を得た。一方、石灰化についてはβ-グリセロリン酸添加群と比較して石灰化傾向が低かった。原因を検討したところ、培養上清中の細胞外リン酸濃度は一様に上昇するのに対し、ポリリン酸添加群ではピロリン酸の濃度が高く、石灰化抑制作用が同時に働くことが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we used mouse chondrogenic precursor cell line ATDC5 as in vitro endochondral ossification model.

Poly(P) treated ATDC5 cells showed increased calcification of the cell matrix.

Poly(P) also increased collagen type II, collagen type X, osteocalcin and tissue non-specific alkaline phosphatase (ALP) gene expressions with high level of endopolyphosphatase activity, resulting in inorganic phosphate production. ATDC5 cells differentiated into mature chondrocytes showed the reduced expression of ecto-nucleoside triphosphate pyrophosphatase.

These results suggest that Poly(P) facilitates chondrogenic differentiation and promotes mineralization by the induction of cartilage matrix proteins and polyphosphatase enzyme activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学1

キーワード：(A) 口腔外科学一般、骨形成、ポリリン酸、石灰化、リン代謝

1. 研究開始当初の背景

国内外の研究では、骨代謝において、リンはヒドロキシアパタイトの構成分子であり、カルシウムと並ぶ不可欠な調節因子である。しかしながら、リンの代謝については未だ解析が進んでおらず、未知の部分が残されている。これは、(1)リン代謝の *in vitro* 実験系が確立されていなかったこと、(2)リン代謝のターゲットとなる遺伝子が明らかにされていなかったこと、(3)リン代謝では、オルソリン酸(Pi)とピロリン酸(PPi)についての研究は進んだものの、生体に高分子リン酸として存在するポリリン酸(Poly-P)の生理作用は不明で、その評価方法が明らかでなかったことなどが挙げられる。近年 ANK 遺伝子(*ank gene*)が PPi を細胞内から細胞外に排出する排泄蛋白遺伝子であることが明らかとなった。また、Pi が細胞内に流入する Na/Pi cotransporter として NPT-1/2 遺伝子がクローニングされ、リン代謝の研究フレームが出来上がっている(Biochem J. 305(Pt1):81-5, 1995)。一方、オルソリン酸が高エネルギーリン酸結合したポリリン酸の研究では、申請者の研究グループによって、骨芽細胞の骨分化マーカー発現を誘導すること(J Dent Res. 83: 613-8,2004)、骨欠損動物モデルでは骨再生を促進し、破骨細胞の骨吸収機能を抑制することを明らかにした(J Dent Res. 86(9):893-7,2007)。この、骨形成能を証明するためには、ポリリン酸代謝で必須なポリリン酸ホスファターゼを同定する必要がある。

2. 研究の目的

骨形成や基質の石灰化におけるリン代謝機構を研究し、ポリリン酸が石灰化におけるリン酸の供給源となること、さらにポリリン酸が骨芽細胞によって加水分解されることを見出した(J Dent Res. 86(9):893-7, 2007)。しかし、哺乳動物におけるポリリン酸分解酵素

(ポリリン酸ホスファターゼ)は未だ同定されておらず、骨形成におけるリン代謝の研究にはポリリン酸ホスファターゼの同定が必要である。そこで、本研究では、ポリリン酸をピロリン酸、オルソリン酸に変化させるポリリン酸ホスファターゼの同定、クローニングを行い、その機能を解析する。

3. 研究の方法

培養細胞として、マウス骨芽細胞前駆細胞の MC3T3-E1 とマウス軟骨前駆細胞の ATDC5 を用いた。ポリリン酸は、平均鎖長 60 のポリリン酸ナトリウムを終濃度 1mM で分化誘導培地に添加した。分化誘導は、MC3T3-E1 細胞では 10%FBS 添加 α -MEM 培地で維持した細胞を 6 well plate に 1.5×10^6 個ずつ播種し、24 時間後に 0.5%FBS 添加 α -MEM 培地に交換し、また ATDC5 細胞では 5%FBS 添加 α -MEM 培地に交換後、CO₂ 濃度を 3% に設定したインキュベーターで培養した。て行った。MC3T3-E1 細胞では 96 時間ごと、ATDC5 細胞では 72 時間ごとに培地交換を行い、一定期間培養後の細胞を実験に供した。軟骨基質形成の評価はアルシアンブルー染色、基質石灰化の評価はアリザリンレッド染色で行った。骨形成関連遺伝子の発現は osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), alkaline phosphatase (ALP), 軟骨分化マーカー遺伝子の発現は type II collagen, type X collagen, リン代謝関連遺伝子の発現は NaPi II, Pit1, ANK, exonucleotide-pyrophosphatase-phosphodiesterase1 (ENPP1) について、各々の遺伝子特異的プライマーを用いた RT-PCR 法で検討した。ポリリン酸分解活性は、P32 ラベルした長鎖ポリリン酸を基質とし、細胞抽出液と 37°C で 2 時間反応させた後に、薄層クロマトグラフィー

で検討した。ライブラリーを作製してクローニングを行う。

4. 研究成果

ポリリン酸を添加して培養した MC3T3-E1 細胞では、15 日、30 日培養後の培養基質にアリザリンレッド染色陽性の石灰化結節産生の亢進がみられ (Fig. 1A), ALP 活性とポリリン酸分解活性の上昇 (Fig. 2A) がみられた。また OPN, OCN mRNA の発現レベルはポリリン酸添加により上昇し (Fig. 3A), リン代謝関連分子ではピロリン酸の産生に関わる ENPP1 の発現レベル減少がみられた (Fig. 4)。一方、ポリリン酸を添加して培養した ATDC5 細胞では、アルシアンブルー染色陽性の軟骨基質産生が亢進し、さらにアリザリンレッド染色陽性基質産生の亢進がみられた (Fig. 1B)。培養 18 日目における polyphosphatase 活性はポリリン酸添加で著明に亢進した (Fig. 2B)。軟骨分化マーカー遺伝子発現の検討では、ポリリン酸添加により type II collagen の発現ピークが早期に現れ、また type X collagen 遺伝子の発現が早期に現れる傾向を示した (Fig. 5)。以上より、ポリリン酸はマウス軟骨前駆細胞および軟骨前駆細胞に作用し、分化誘導、ホスファターゼ活性亢進、細胞外リン酸・ピロリン酸濃度調節等の機構により、細胞外基質の石灰化に関与する可能性が示唆された。

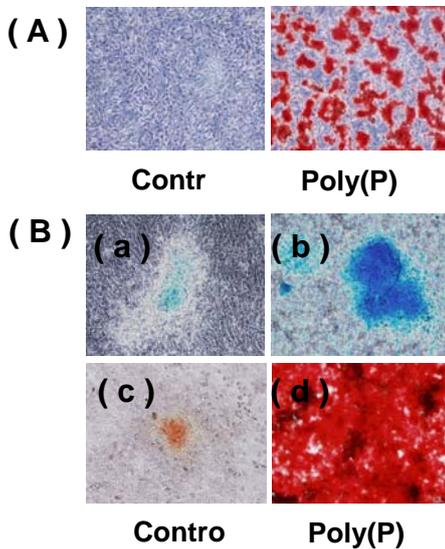


Fig. 1 細胞染色の結果.

(A)MC3T3-E1 (B)ATDC5

a, b:Alcian Blue c, d:Alizarin Red

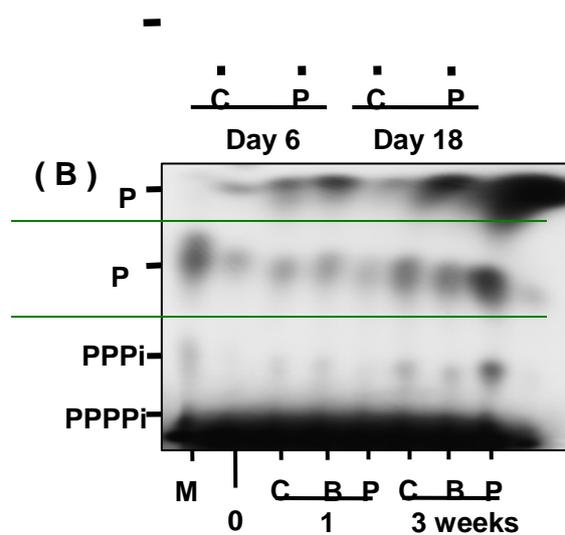
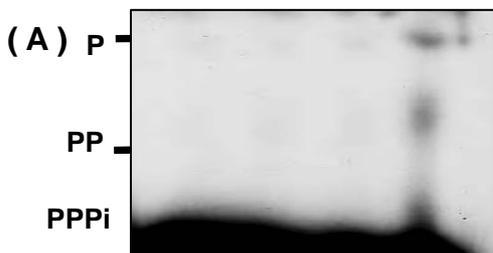


Fig. 2 Polyphosphatase 活性によるポリリン酸分解反応.

—(A)MC3T3-E1 (B)ATDC5

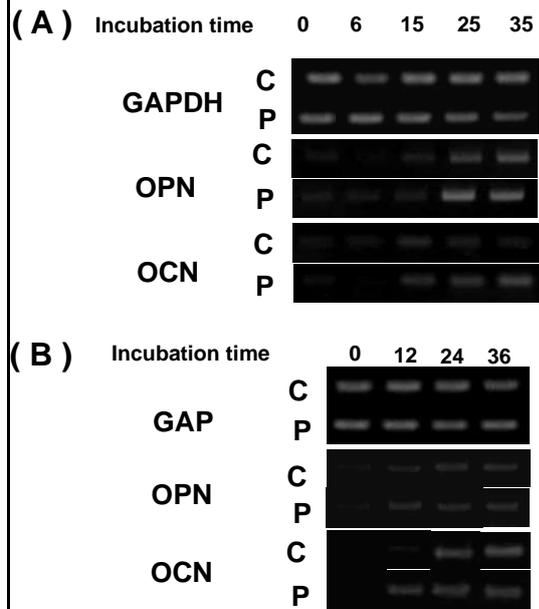


Fig. 3 骨形成マーカー遺伝子の発現.

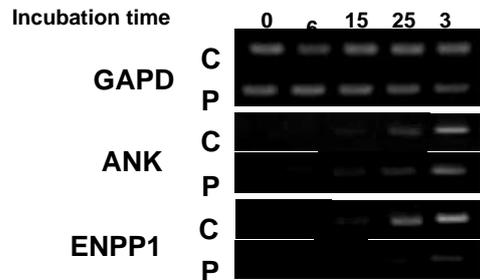


Fig. 4 MC3T3-E1 細胞のリン代謝関連遺伝子の

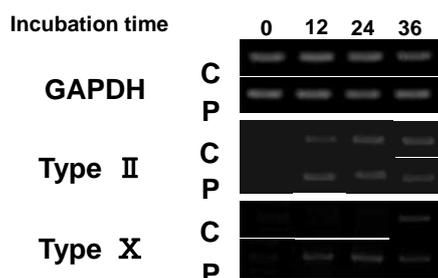


Fig.5 軟骨分化マーカー遺伝子の発現
C:control P:Poly(P)60

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①内橋 隆行, 上松 隆司, 高田 匡基, 山岡 稔, 古澤 清文

In vitro 内軟骨性骨化モデルにおけるポリリン酸の石灰化促進作用

日本口腔組織培養学会雑誌 18(2)29-36

[学会発表] (計 2 件)

①内橋隆行, 上松隆司, 高田匡基, 山岡 稔, 古澤清文

ポリリン酸は骨芽細胞前駆細胞と軟骨前駆細胞の分化を誘導し石灰化を促進する

第 45 回日本口腔組織培養学会

②高田 匡基, 上松 隆司, 内橋 隆行, 秋田 大輔, 古澤 清文

ポリリン酸は軟骨前駆細胞の分化を促進する

第 63 回日本口腔科学会学術集会

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内橋隆行 (UCHIHASHI TAKAYUKI)

研究者番号 : 70397628