

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591308

研究課題名（和文）生体におけるリン調節機構の解明と遺伝性低リン血症くる病の新たな治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of phosphate metabolism and treatment for hereditary hypophosphatemic rickets.

研究代表者

藤原 幾磨（FUJIWARA IKUMA）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10271909

研究成果の概要（和文）：

米国骨代謝学会（デンバー）において、Baylor 大学 JQ Feng 教授らと協議したところ、彼らは既に、我々が計画していた骨芽細胞特異的 DMP1 トランスジェニックマウス（DMP1-Tg）と、低リン血症くる病モデルマウス（hyp マウス）とを交配させた DMP1-Tg/hyp において、低リン血症は改善されないとの結果を得ていた。この実験内容は、我々が当初計画していたものと全く同様であり、計画通り研究を進める意義は少ないと考えた。この結果を踏まえ研究の方向性を再考したが、実質的な成果を上げることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

According to Prof JQ Feng at Baylor Univ., they have already done experiments that were exactly the same as we had planned. They crossed osteoblast-specific DMP-1 transgenic mice (DMP1-Tg) and hyp mice, model mice of hypophosphatemic rickets, though hypophosphatemia was not improved in those DMP-1/hyp mice. We decided to do another approach of the research because it was meaningless to do the same experiments that they did, but we could not get substantial achievements currently.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：低リン血症くる病、FGF23、DMP1、骨代謝、リン調節機構

1. 研究開始当初の背景
生体におけるリンの代謝調節機構について

は、近年各種遺伝性低リン血症くる病の原因
遺伝子の発見により、徐々に明らかにされて

きている。DMP1 (dentin matrix protein 1) は、骨の石灰化に関係すると考えられている SIBLINGs (small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins) という非コラーゲン骨基質蛋白群の一つであり、最近その遺伝子変異が低リン血症くる病のうち ARHR の原因であることが明らかとなり、また DMP1 ノックアウト (KO) マウスは ARHR と同様の病態を呈することが示されている。さらに、DMP1 トランスジェニック (Tg) マウスは、DMP1-KO マウスと交配することにより KO マウスの歯牙形成異常を改善させることができることから、リン代謝における DMP1 の役割が注目されている。一方、これら遺伝性低リン血症くる病の治療は、以前より行われている大量ビタミン D とリン製剤の投与という古典的な方法のみであり、しかもその治療成績は必ずしも満足できるものではない。副作用としての腎石灰化を来したり、骨変形が改善されず下肢骨の外科的治療を要することも多く、現在、遺伝性低リン血症くる病に対する有効な内科的治療法が、強く望まれているところである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DMP1 のトランスジェニックマウスにおけるリンの代謝調節機構を明らかにし、DMP1 と、リン調節因子である FGF23 (fibroblast growth factor 23) の骨芽細胞における関連性を解明することである。さらに、DMP1 トランスジェニックマウスと X 連鎖性低リン血症くる病 (XLH) のモデル動物である hyp マウスとを交配させた動物を用いて、DMP1 の代謝機構を利用した遺伝性低リン血症くる病の新たな治療法の開発の端緒となることを目指すものである。

3. 研究の方法

1) DMP1 トランスジェニック (Tg) マウスにおけるリン代謝及び骨代謝を生化学的方法、組織学的方法を用いて評価する。

① 3 週齢、6 週齢、12 週齢、24 週齢の DMP1-Tg マウス及び hyp マウスの血清リン、カルシウム、アルカリフォスファターゼを Fuji ドライケムシステムにて測定、血清 FGF23 を ELISA キットにて測定する。血清リン濃度と血清 FGF23 濃度との関連について、統計学的検討を行う。

② 上記週齢のマウスよりペントバルビタール麻酔下にて大腿骨を採取単離し、軟 X 線撮影および組織学的検討 (骨形成率、骨芽細胞数、

破骨細胞数、石灰化率など) を行う。さらにカルセイン-アリザリンレッドによるラベリングも行い、骨石灰化率を測定する。

③ DMP1-Tg マウス及び hyp マウスの長管骨より BMSC (骨髄ストローマ細胞) を採取し、細胞培養を行う。培養開始 5 日目に、培養液を b-glycerophosphate、アスコルビン酸を加えたものに変更し、骨芽細胞への分化を誘導する。骨芽細胞の分化の程度は、培養液中のアルカリフォスファターゼ活性測定、及び細胞のアリザリンレッド染色による石灰化の評価にて行う。

④ 上記③と同様に、DMP1-Tg マウス及び hyp マウス由来 BMSC の培養を行い、b-glycerophosphate、アスコルビン酸にて骨芽細胞分化を誘導する。それぞれ 2 週間培養した後、total RNA を抽出、培養骨芽細胞における FGF23 の発現を real time RT-PCR にて半定量的に評価する。

2) DMP1-Tg マウスの腎におけるビタミン D-1 α 水酸化酵素活性を測定し、ビタミン D 代謝の評価を行う。

① ペントバルビタール麻酔下にマウスより片腎を摘出後、ホモジネートを作製、基質として 25 (OH) ビタミン D を添加後、恒温槽 (37°C) にて 15 分間振盪する。反応停止液と回収率計算のための [3H]1, 25 (OH) 2D₃、抽出のためのクロロホルムなどを加えた後、脂肪相を分離する。

② 分離した脂肪相から、SepPak カートリッジ (Waters 社) を用いて 1, 25 (OH) 2D₃ (活性型ビタミン D) を抽出する。

③ RIA キット (DiaSorin 社) を用いて、抽出物中の 1, 25 (OH) 2D₃ を測定し、ビタミン D-1 α 水酸化酵素活性を算出する (Fujiwara I 2003)。

3) 次に、DMP1-Tg マウスと XLH のモデル動物である hyp マウスとを交配し、DMP1-Tg/hyp マウスを作製する。DMP1-Tg/hyp マウスにおけるリン代謝、ビタミン D 代謝、骨代謝を生化学的方法、組織学的方法を用いて評価する。

① 3 週齢、6 週齢、12 週齢、24 週齢の DMP1-Tg/hyp マウスの血清リン、カルシウム、アルカリフォスファターゼを Fuji ドライケムシステムにて測定、血清 FGF23 を ELISA キ

ットにて測定する。血清リン濃度と血清 FGF23 濃度との関連について、統計学的検討を行う。

②上記週齢のマウスよりペントバルビタール麻酔下に大腿骨を採取単離し、軟 X 線撮影および組織学的検討（骨形成率、骨芽細胞数、破骨細胞数、石灰化率など）を行う。さらにカルセイン-アリザリンレッドによるラベリングも行い、骨石灰化率を測定する。

③DMP1-Tg/hyp マウスの長管骨より BMSC を採取し、細胞培養を行う。培養開始 5 日目に、培養液を b-glycerophosphate、アスコルビン酸を加えたものに変更し、骨芽細胞への分化を誘導する。骨芽細胞の分化の程度は、培養液中のアルカリフォスファターゼ活性測定、及び細胞のアリザリンレッド染色による石灰化の評価にて行う。

④上記③と同様に、DMP1-Tg/hyp マウス由来 BMSC の培養を行い、b-glycerophosphate、アスコルビン酸にて骨芽細胞分化を誘導する。2 週間培養した後、total RNA を抽出、培養骨芽細胞における FGF23 の発現を real time RT-PCR にて半定量的に評価する。

4) DMP1-Tg/hyp マウスの腎におけるビタミン D-1a 水酸化酵素活性を測定し、ビタミン D 代謝の評価を行う。

①ペントバルビタール麻酔下にマウスより片腎を摘出後、ホモジネートを作製、基質として 25 (OH) ビタミン D を添加後、恒温槽 (37°C) にて 15 分間振盪する。反応停止液と回収率計算のための [3H]1, 25(OH)2D3、抽出のためのクロロホルムなどを加えた後、脂肪相を分離する。

②分離した脂肪相から、SepPak カートリッジ (Waters 社) を用いて 1, 25(OH)2D3 (活性型ビタミン D) を抽出する。

③RIA キット (DiaSorin 社) を用いて、抽出物中の 1, 25(OH)2D3 を測定し、ビタミン D-1a 水酸化酵素活性を算出する (Fujiwara I 2003)。

4. 研究成果

当初、米国からの DMP-Tg マウスの輸入手続きを進めようとしていた。

ところが、平成 21 年 9 月米国デンバーで開

催された米国骨代謝学会において、Baylor 大学 JQ Feng 教授、Wisconsin 大学 MK Drezner 教授と協議したところ、彼らは既に、我々が計画していた骨芽細胞特異的 DMP1 トランスジェニックマウス (DMP1-Tg) と、低リン血症くる病モデルマウス (hyp マウス) とを交配させた DMP1-Tg/hyp を作製していることが判明した。

さらに、この DMP1-Tg/hyp マウスでは、hyp マウスにおいて認められる低リン血症や骨病変は改善されないとの結果を得ているとのことであった (Feng 教授ら、未発表データ)。

この実験内容は、我々が当初計画していたものと全く同様であり、DMP1-Tg/hyp において、低リン血症の改善や骨の組織学的変化も見られなかったことから、計画通り研究を進める意義は少ないと考えた。

この結果を踏まえ、研究の方向性を再考することとし、DMP1-Tg マウスにおけるリン代謝および骨代謝に関する実験と、DMP1-Tg マウスの骨髄ストローマ細胞由来骨芽細胞における FGF23 の発現についての実験を進めることにしたが、DMP1-Tg の輸入が結局果たせず、実質的な成果を上げることはできなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

・第 21 回日本小児整形外科学会
(平成 22 年 11 月 26 日、徳島市)

発表者：藤原幾磨

演題：小児骨系統疾患の病態と治療

[図書] (計 2 件)

(1) 著者：藤原幾磨 (分担執筆)

書名：改訂版 骨の病気と付き合いには (pp332-334)

(メディカルレビュー社、2010 年)

(2) 著者：藤原幾磨 (分担執筆)

書名：骨系統疾患-出生前診断と周産期管理 (pp217-224)

(メジカルビュー社、2011 年)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 幾磨 (FUJIWARA IKUMA)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10271909

(2) 研究分担者

箱田 明子 (HAKODA AKIKO)
東北大学・病院・医員
研究者番号：70509398

菅野 潤子 (KANNO JUNKO)
東北大学・病院・医員
研究者番号：30509386

(3) 連携研究者

()

研究者番号：