

平成30年6月7日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20658

研究課題名(和文)低ホスファターゼ症モデルマウスの歯髄幹細胞由来骨芽細胞の分析

研究課題名(英文) Analysis of murine hypophosphatasia using osteoblasts derived from dental pulp stem cells

研究代表者

根本 晴子(山本晴子)(NEMOTO, Seiko)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：10633943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：低ホスファターゼ症(HPP)は、組織非特異型アルカリホスファターゼ(TNALP)の遺伝子変異を原因とする遺伝子疾患である。本研究では、HPPモデルマウス(KOマウス)骨形態計測を行い骨形成能を分析した。KOマウスにおいて骨量、骨芽細胞数の低下を認めた。また、肥大軟骨層の菲薄化、軟骨細胞数の低下を認め、このことから骨形成能が低下していると考えられた。結果からHPPの石灰化不全の原因は、PPiの蓄積による石灰化障害のみならず、骨芽細胞数の低下や、肥大軟骨の菲薄化によるものであり、これらはTNALP欠乏の影響であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypophosphatasia(HPP) is caused by mutation of the gene encoding tissue non-specific alkaline phosphatase (TNALP). Physiological function of TNALP has been investigated for years nevertheless the cellular mechanisms affecting calcification remain unclear. In this study we elucidated the bone metabolism of HPP model mice by bone morphometry to evaluate influence TNALP in the cells involving ossification.

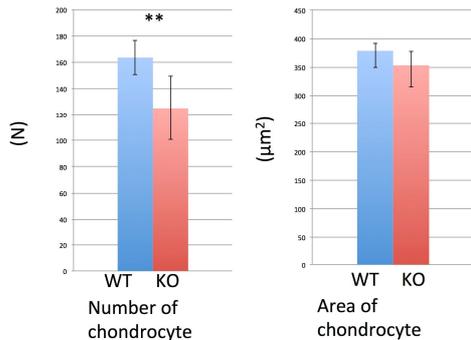
The osteoblasts decreased significantly in KO mice. In regard to the osteoclasts there were no differences. Trabecular bone width and bone volume / tissue volume of KO mice showed significant decrease in KO mice. Thinning of hypertrophic chondrocytes layer was shown in KO mice though the thick chondrocytes layer observed. These results indicate that TNALP effects the cell number of osteoblast and chondrocyte layer in KO mice. Therefore the lack of TNALP causes retarded bone mineralization in the HPP model mice.

研究分野：生化学

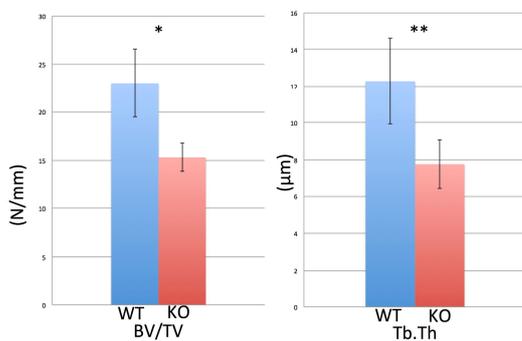
キーワード：アルカリホスファターゼ

<p>1. 研究開始当初の背景</p>	<p>発育不良であり、十分な細胞数を得ることが困難であった。</p>
<p>(1) 低ホスファターゼ症は、非組織特異型アルカリホスファターゼ（以下：TNALP）の遺伝子変異を原因とする遺伝子疾患である。TNALP は石灰化の重要な因子の一つであり、低ホスファターゼ症では、石灰化異常、骨軟化症、くる病様の症状を認める。その原因として、TNALP 欠損による TNALP の基質である無機ピロリン酸（以下：PPi）の細胞質基質における蓄積が、石灰化阻害を引き起していると考えられている。</p>	<p>このことから TNALP KO マウスの骨形成に関する細胞のより詳細な細胞の特徴を考察するため、組織学的分析を行うことを目的とする。</p>
<p>Prof. José Luis Millán (Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, CA USA) は、1977 年よりアルカリホスファターゼ（以下：ALP）について研究を行ってきた。そして Prof. Millánらは、TNALPを遺伝的欠損させた、硬組織形成不全を呈する低ホスファターゼ症モデルマウス（以下：TNALP KO マウス）を作成した。今までの研究において、TNALP 欠乏による骨形成の影響は、未だ明確にされていない。</p>	<p>(3) 以上のことを明らかにすることで、今後の低ホスファターゼ症の治療の発展に貢献することを意義する。</p>
<p>2. 研究の目的</p>	<p>3. 研究の方法</p>
<p>(1) 低ホスファターゼ症において、TNALP 欠乏による PPi の蓄積により細胞質基質における基質小胞の石灰化が障害され石灰化不全が起こるとされているが、骨形成における TNALP の機序は、未だ明らかではない。</p>	<p>本研究で用いた TNALP KO マウスは生後 6 日から 8 日でビタミン B6 依存性の痙攣発作や成長障害を示し、およそ 14 日で死亡する低ホスファターゼ症の乳児型のモデルとされている。</p>
<p>(2) 本研究では、TNALP KO マウスの歯髄由来の体性幹細胞を用いて、遺伝子発現解析を行うことを検討し、TNALP 欠乏の骨芽細胞及び軟骨細胞への影響の分析を行うことを目的としていた。しかし、歯髄細胞を使用した体性幹細胞から、細胞を分化誘導し培養を行う上で、TNALP KO マウス由来の歯髄細胞の培養細胞は野生型と比較し</p>	<p>(1) 本研究には、TNALP KO マウスとコントロールの野生型マウスを用いた。</p> <p>(2) 生後 7 日にテトラサイクリン(20 mg / kg) 腹腔内注射し骨の生体ラベルを行った。</p> <p>(3) 生後 9 日にカルセイン (20 mg / kg) を腹腔内注射し骨の生体ラベルを行った。</p> <p>(4) 生後 10 日で下肢部サンプル採取し 70 % エタノールにて固定した。</p> <p>(5) ピラヌエバ染色し、レジン包埋を行った。</p> <p>(6) レジン包埋サンプルを薄切し、顕微鏡下にて骨形態計測を行った。</p> <p>(7) 骨形態計測では、海綿骨形態計測と軟骨細胞について分析を行った。</p>
<p>4. 研究成果</p>	<p>4. 研究成果</p>
<p>(1) 結果</p>	<p>(1) 結果</p> <p>軟骨形態計測の結果、軟骨細胞層において、TNALP KO マウスは野生型マウスと比較し肥大</p>

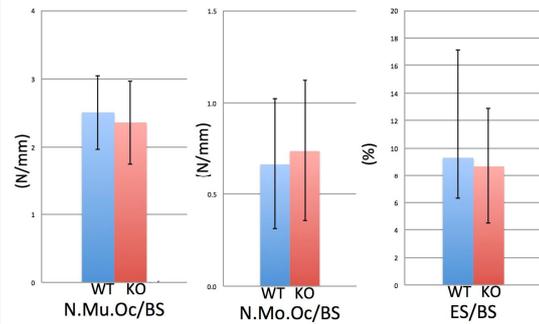
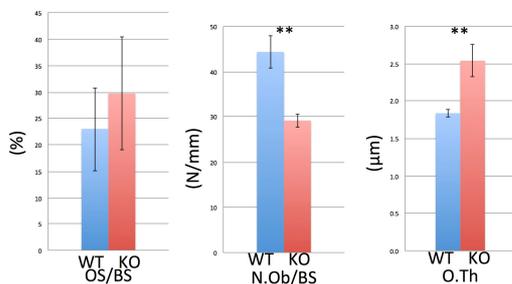
軟骨層が薄く、さらに軟骨細胞数が有意に少なかった。



一次海綿骨骨形態計測の結果、一次海綿骨骨梁幅および骨量 / 組織量において TNALP KO マウスは野生型と比較し有意に低値であった。



TNALP KO マウスにおいて骨芽細胞数が野生型と比較し有意に少なく、破骨細胞数においては有意な差は認められなかった。



(2) 考察

day10 の TNALP KO マウス及び、野生型マウスの骨形態計測を行い比較した結果、TNALP KO マウスの軟骨細胞層の菲薄、軟骨細胞の減少は骨形成能の低下を示していると考えられる。故に、海綿骨における骨梁幅の低下、骨量の低下を認めたと考える。また、TNALP KO マウスでは、骨芽細胞数が有意に減少していたが、破骨細胞数においては有意差を認めなかった。骨芽細胞数が減少することにより骨形成が低下し骨の吸収を行う破骨細胞数は減少していないことで低ホスファターゼ症の骨形成が低下していることが考えられた。

(3) 結論

以上の結果から TNALP KO マウスの肥大軟骨の菲薄化及び骨芽細胞数の低下は骨形成能の低下を示しており、その原因は TNALP 欠乏の影響であると考えられる。低ホスファターゼ症において、TNALP 欠乏による PPI の蓄積により細胞質基質における基質小胞の石灰化障害が主な原因とされていたが、本研究から TNALP 欠乏が PPI の代謝のみならず骨芽細胞、軟骨細胞に関与していることが示唆された。

< 引用文献 >

研究者番号：10633943

José Luis Millán, Mammalian Alkaline Phosphatases From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology, 2006, ISBN: 3-527-31079-7

Sonoko Narisawa, Nils Fröhlander, José Luis Millán. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia, Developmental Dynamics, Volume 208, Issue 3, 1997, pages 432-446

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計2件)

根本(山本)晴子、低ホスファターゼ症モデルマウスの骨形態計測による骨形成能評価、分子生物学会第40回年会 (ConBio2017)、H29年12月6日、神戸

Seiko Yamamoto-Nemoto,
Histomorphometrical analysis in murine hypophosphatasia. ASBMR Annual meeting 2017, 9.8-11.2017 Denver

[図書] (計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本 晴子 (NEMOTO, Seiko)

日本大学・松戸歯学部・助教