

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592349

研究課題名（和文）FGF23 がくる病マウスの硬組織形成細胞における
リン輸送体の発現異常に及ぼす影響研究課題名（英文）Effects of FGF23 on NaPi expression in the hard tissue forming cells
of Hyp mice.

研究代表者

大西 智之（ONISHI TOMOYUKI）

大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員

研究者番号：30303978

研究成果の概要：X 連鎖性低リン血症くる病（XLH）の疾患モデル動物である Hyp マウスの歯における *FGF23* の分布を検討した結果、エナメル芽細胞および象牙芽細胞に発現していることがわかった。さらに、Hyp マウスの歯では、野生型マウスと比較して FGF23 mRNA の発現量が有意に多かった。XLH の原因遺伝子である PHEX は、主に骨芽細胞や象牙芽細胞に発現し、FGF 23 の発現を負に制御すると考えられている。今回の結果から FGF 23 は骨ばかりでなく歯にも発現しており、さらに、Hyp マウスにおいて過剰に発現することは上記の仮説を裏付けている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：Hyp マウス，象牙質石灰化異常，NaPT2，分子生物学，FGF23

1. 研究開始当初の背景

X 連鎖性低リン血症性くる病（XLH）は、発育遅延、低リン血症および骨石灰化不全等の全身的特徴を有し、遺伝性くる病の中で最も出現頻度が高い疾患で、X 染色体性優性遺伝を示す。歯科的には、う蝕や外傷の既往のない健全な歯に頻繁に歯肉膿瘍が出現することで知られている。XLH 患者の歯の病理組織学的検索によると、象牙質には多数の球間象牙質が認められ、加えて象牙前質の拡大や象牙細管の不規則な走行などの特徴的な所見が示されている。一方、分子生物学的研究

から、XLH 患者の X 染色体上に存在する PHEX (Phosphate regulating gene homologies to endopeptidase on X chromosome) 遺伝子に様々な変異の認められることが報告されている。

XLH の疾患モデル動物である Hyp マウスでは、発育遅延、低リン血症および骨石灰化不全といったヒト患者と同様の病的所見が認められる。また、Hyp マウスの *Phex* 遺伝子のエクソン 16 以降が欠失していることが明らかにされている。さらに Hyp マウスでは、腎近位尿細管の腎上皮細胞において、無機リンの細胞内への輸送に重要な役割を担って

いる2型ナトリウム-リン酸共輸送体 (Npt2) の3種のアイソフォームのうち、Npt2a および2cの発現が障害されることから、尿から血液へのリンの再吸収が抑制され、血清リン濃度が低下することが知られている。我々はこれまでに、Hyp マウスのエナメル芽細胞や象牙芽細胞においてNpt2b mRNAの発現量が減少している事を明らかにし、さらに、in vitroの実験を用いて、この発現量の減少がホルモン様の因子によってのみ制御されているのではないことを示唆した。

線維芽細胞増殖因子 (FGF) 23は、常染色体性低リン血症性くる病 (ADHR) の責任遺伝子として、また、腫瘍性骨軟化症の責任腫瘍が過剰に産生する因子として同定された。さらに、XLH患者やHypマウスの血中FGF23濃度が高いことが知られている。最近の報告では、FGF23が骨において発現していること、また、FGF23が腎におけるNpt2aの発現やリンの再吸収を直接的に制御していること、さらに、FGF23ノックアウトマウスでは腎におけるNpt2aの発現量が少ないことが示唆されている。以上のことから、これらの疾患の病態、とりわけ、硬組織の石灰化異常やリンの代謝異常にFGF23が重要な役割を有していると考えられるが、その詳細に関しては未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、FGF23がリンの代謝異常を有するHypマウスの硬組織石灰化異常にどのように関連しているのかを検索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

すべての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験指針に基づいて実施した。

ヘテロ型のC57 BL/6J Hypマウス雌(X/Hyp, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)と野生型C57 BL/6Jマウス雄(X/Y, 日本クレア、東京)を交配させ、生まれたHypマウス雄(Hyp/Y)とヘテロ型Hypマウス雌を交配させ、ホモ型Hypマウス雌(Hyp/Hyp)を作製した。このホモ型Hypマウス雌とHypマウス雄を継代交配させて実験に供した(以下、ホモ型Hypマウス雌およびHypマウス雄を総称してHypマウスとして記載する)。

(2) 歯におけるFGF23の発現

① トータルRNAの抽出

生後6日齢の野生型マウスより、下顎第一臼歯歯胚、歯槽骨および小腸を摘出し、Acid-guanin-phenol-chloroform (AGPC)法に基づいて、RNAagents Kit (Promega, Madison, WI, USA)を用いて、トータルRNAを抽出した。歯胚の一部はエナメル器と歯乳頭に分け

てRNA抽出を行った。

② RT-PCR法

トータルRNAから、SuperScript III reverse transcriptase (GibcoBRL, Gaithersburg, MD, USA)を用いて逆転写(RT)反応を行うことにより、first-strand cDNAを合成した。RT反応は、65℃、5分間のプレヒート、50℃、60分の伸張反応、および70℃、15分間インキュベーションによる反応停止の条件で行った。

合成されたcDNAを鋳型として、FGF23遺伝子、デンチンシアロフォスフォプロテイン(DSPP)遺伝子、アメロゲニン(AMEL)遺伝子、オステオポンチン(OPN)遺伝子、およびコントロールとしてβ-アクチン(β-actin)遺伝子の一部を特異的に増幅するプライマー (FGF23 : 5'-AACAGGAGCCATGACTCGAAG-3' , 5'-GTGGGGAACAGTGTAGAA-3', DSPP : 5'-AACTGCCTGGGCCATCCG-3' , 5'-CTGTTGATAGATAACTCATTCTGTG-3' AMEL : 5'-CCACCACTCCATGACTCCAAC-3' , 5'-CACTTCGGTCTCTCATTCTCTGA-3' , OPN : 5'-GTGATTGCTTTTGCCTGTTTG-3', 5'-GGATCTGGGTGCAGGCTGTA-3', β-actin : 5'-ACCCTGTGCTGCTCACC-3' , 5'-TGGATGGCTACGTACATGGCT-3')を用いて、Polymerase Chain Reaction (PCR)法を行った。PCR反応はプレヒート(95℃, 9分)を行った後、熱変性(94℃, 30秒)、アニーリング(60℃, 30秒)および伸長反応(72℃, 30秒)を40サイクルで行い、さらに伸長反応(72℃, 9分)を追加する条件で行った。

(3) 歯におけるNpt2bおよびFGF23の分布

① プローブの作製

生後6日齢の野生型マウスの歯より得られたcDNAを鋳型として、Npt2bおよびFGF23遺伝子の一部を特異的に増幅するプライマー (Npt2b : 5'-GACCTGCCTGAACTCCAGGAC-3' , 5'-AGTCAGCCAAGCAAAGGGAA-3' , FGF23 : 5'-ACTTGTCGCAGAAGCATC-3', 5'-GCAGGTGACTCTCAGGCC-3')を用いてPCR法を行った。増幅産物をTOPO TA PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いてpCR-II-TOPOにライゲーションした。通法通り精製したプラスミドを自動DNAシーケンサー(373 DNA sequencer, Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定し、遺伝子の挿入方向を確認した後、DIG labeling kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)を用いてdigoxigenin (DIG)標識センスおよびアンチセンスRNAプローブを作製した。

②抗体の作成

NPT2b の合成ペプチド (CRDQGEDEEEK) をウサギ背部に筋注し、免疫を行った。49 日後に耳介静脈より採決し、得られた血清をペプチドカラムで精製したものを抗 NPT2b 抗体とした。

③組織切片の作製

様々な日齢の野生型および Hyp マウスを 4% 抱水クロラルによる腹腔内注射で全身麻酔を施した後、4% パラホルムアルデヒド含有 DEPC 処理水で灌流固定を行った。その後、頭部を摘出し、24 時間同様の固定液で後固定を行った。続いて、試料を 7.5% EDTA にて 4-7 日間 4 °C で脱灰後、通法通りパラフィンに包埋した。この試料から 6 μm の矢状断薄切片を作製し、シランコートスライドガラス (松浪硝子、大阪) に貼布した。

④ 免疫組織化学染色

切片を抗 Npt2b 抗体 (1:1000) で室温にて一晚作用させた後、PBS で洗浄し、ビオチン標識抗ウサギ IgG (Vector, Burlingame, CA) を作用させた。この抗血清処理した切片を ABC コンプレックス (Vector) で 90 分間室温にて反応させ、0.04% 3,3 ジアミノベンジン (DAB) および 0.003% H₂O₂ 含有 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中でホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (以下 HRP と略す) 活性を発色させた。その際、HRP 反応は 0.08% 硫酸ニッケルアンモニウムで増強した。免疫染色後、それぞれの切片をメチルグリーンで対比染色し、オイキットで封入した。ネガティブコントロール群として、一次抗体の代わりに抗体希釈液を作用させたものを用い、さらに、免疫染色に用いた切片の隣接切片に対し、通法通りに H-E 染色を施した。

⑤ in situ Hybridization 法

in situ Hybridization 法は In situ Hybridization Reagents (日本ジーン) を用いて行った。まず、薄切した切片をキシレンで脱パラフィン後、切片を PBS で洗浄し、5 μg/ml のプロテアーゼ K を室温で 10 分反応させた。次に、0.25% 無水酢酸含有 0.1 M トリエタノールアミン溶液で 10 分間アセチル化処理を行った後、4 倍濃縮 SSC で洗浄し、2 倍濃縮 SSC を含む 50% ホルムアミド溶液で 42 °C で 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション反応は hybridization buffer で 1 ng/ml に希釈した RNA プローブを 42 °C で 16 時間反応させて行った。シグナルの検出は DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals) を使用して行った。

(4) Hyp マウスにおける FGF23 遺伝子の発

現異常

①歯胚培養

胎生 17 日齢の野生型および Hyp マウスを抱水クロラルで全身麻酔後、腹部切開により胎児を取り出し、実体顕微鏡下で胎児マウスの下顎第一臼歯歯胚を摘出した。摘出した歯胚を Trowell 変法で 37 °C、5% CO₂ 気相下で、100 単位/ml の Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) および 100 μg/ml のアスコルビン酸 (和光純薬) を添加した 10% ウシ胎児血清 (FBS) (ニチレイバイオサイエンス、東京) 含有 BGJb 培地 (Invitrogen) 中で 14 日間培養を行った。

②cDNA の合成

生後 2 および 6 日齢野生型および Hyp マウスの下顎第一臼歯から前述の方法でトータル RNA を抽出後、Superscript III を用いた RT 反応により cDNA を合成した。また、上記のように培養した歯胚より同様に cDNA を合成した。

③スタンダードサンプルの作製

FGF23 遺伝子とインターナルコントロールとして用いた β-actin 遺伝子の一部を特異的に増幅するプライマー (FGF23: 5'-ACTTGTCGCAGAAGCATC-3' , 5'-GTGGGGGAACAGTGTAGAA-3', β-actin: 5'-ACCCTGTGCTGCTCACC-3' , 5'-TGGATGGCTACGTACATGGCT-3') を作製し、生後 6 日齢野生型マウスの下顎第一臼歯より得られた cDNA を鋳型として PCR 法を行った。得られた FGF23 遺伝子及び β-actin 遺伝子の増幅産物を pCR-II-TOPO にサブクローニングし、得られたプラスミドをスタンダードサンプルとして用いた。

④定量的 PCR 法

合成した cDNA をテンプレートとして定量的 PCR 法を行った。定量的 PCR 法は、リアルタイムモニタリング装置 5700 ABI PRISM Sequence Detector System (Applied Biosystems) および Takara Ex Taq™ R-PCR Version 2.1 (タカラバイオ、大津) を使用し、プライマーはスタンダードサンプル作製に使用したものをを用いた。PCR 反応は 95 °C、30 秒のプレヒートの後、95 °C、5 秒ついで 60 °C、20 秒の 2 ステップを 40 サイクル行い、続いて dissociation protocol として 60 °C から 95 °C までを 20 分間行った。また、スタンダードには上記で構築したプラスミドを段階希釈したものをを用いた。

4. 研究成果

(1) 歯における FGF23 遺伝子の発現と分布

RT-PCR 法において、生後 0, 2, 4 および 6

日齢野生型マウスの歯および頭蓋骨に FGF23 mRNA に対する特異的なバンドを認めた (図 1a)。しかし、生後 0 および 6 日齢マウスの歯胚におけるバンドは非常に薄かった (図 1a)。さらに生後 4 日齢マウスの歯胚をエナメル器と歯乳頭に分け、それぞれから合成した cDNA をテンプレートとした PCR 法の結果、ともに FGF23 mRNA のバンドを認めた (図 1b)。DSPP, AMEL, OPN はそれぞれ象牙芽細胞, エナメル芽細胞, 骨芽細胞のマーカーとして用いた。

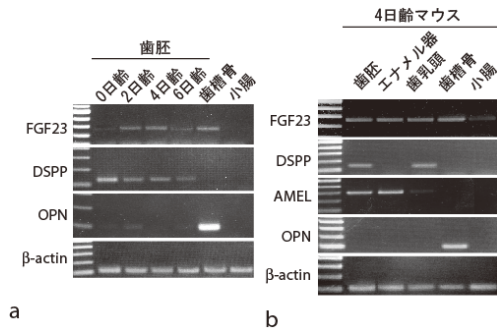


図 1 野生型マウス歯胚における FGF23 mRNA の発現

2 日齢野生型マウスの下顎第一臼歯の歯乳頭および内エナメル上皮では、すでにエナメル芽細胞および象牙芽細胞への分化が認められ、硬組織の形成も開始していた (図 2b)。in situ Hybridization 法の結果、前分泌期エナメル芽細胞 (図 2c, 矢印)、分泌期エナメル芽細胞 (図 2b) に FGF23 mRNA に特異的なシグナルを認めた。しかし、前エナメル芽細胞 (PA) および前象牙芽細胞は FGF23 mRNA 陰性であった (図 2c)。一方、象牙芽細胞においては Npt2b mRNA に特異的なシグナルを認めたが (図 2c, 矢頭)、成熟するにつれてシグナルが弱くなった (図 2b)。また、骨細胞の一部が FGF23 mRNA 陽性であった (図 2d, 矢印)

(2) 歯における Npt2b の分布

胎生 18 日齢マウスにおいて第一臼歯は鐘状期を呈していた (図 3a)。歯胚には Npt2b 陽性反応を認めなかった。それに対して、骨芽細胞は Npt2b 陽性反応を示していた (図 3b)。生後 2 日齢マウスでは、内エナメル上皮細胞および前エナメル芽細胞に Npt2b mRNA に対するシグナル (図 4), また、Npt2b タンパクに対する陽性反応を示した (図 5)。前分泌期エナメル芽細胞も Npt2b 陽性であったが、その反応は弱かった (図 5c)。一方、象牙芽細胞に Npt2b mRNA (図 4e, 矢印) および Npt2b タンパクが分布していたが、成熟するにつれてシグナルが弱くなった (図 5)。

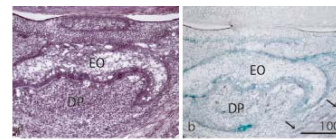
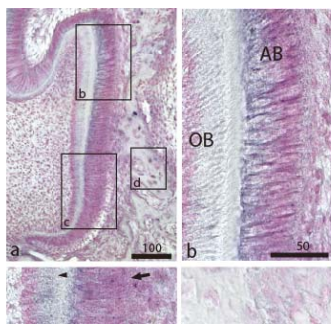


図 3 胎生18日齢マウス第一臼歯における Npt2b タンパクの分布
a: HE染色, b: 免疫染色

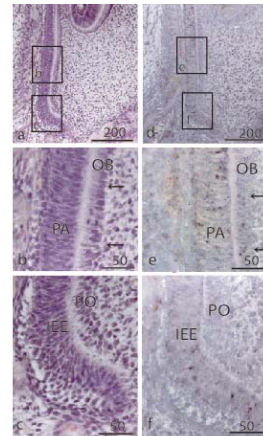
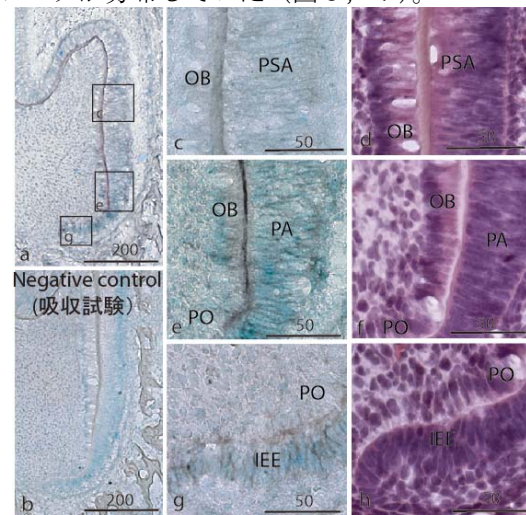


図 4 生後 2 日齢マウスにおける Npt2b mRNA の分布
a-c: HE染色, d-f: in situ hybridization

IEE: 内エナメル上皮, OB: 象牙芽細胞, PA: 前エナメル芽細胞, PO: 前象牙芽細胞

歯冠形成期において、分泌期エナメル細胞および成熟期エナメル細胞とともに、Npt2b mRNA および Npt2b タンパクが分布していた (図 6, 7)。しかし、エナメル芽細胞に隣接するエナメルフリーエリアの細胞は Npt2b 陰性であった (図 7c)。また、幼若な象牙芽細胞に Npt2b mRNA および Npt2b タンパクが分布していた (図 6, 7)。



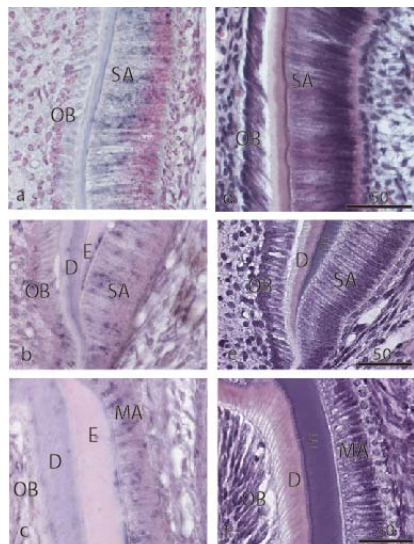


図6 生後3日齢 (a, d), 6日齢 (b, c, e, f) マウスにおける *Npt2b* mRNA の分布
a-c: in situ hybridization, d-f: HE染色
D: 象牙質, E: エナメル質, MA: 成熟期エナメル芽細胞,
OB: 象牙芽細胞, SA: 分泌期エナメル芽細胞

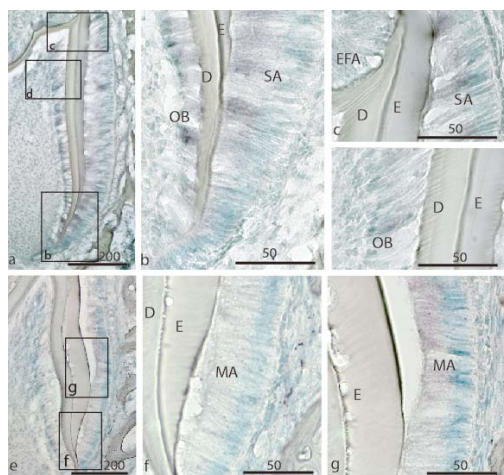


図7 生後4日齢 (a-d), 7日齢 (e-g) マウスにおける *Npt2b* タンパクの分布
D: 象牙質, E: エナメル質, EFA: エナメルフリーエリア,
MA: 成熟期エナメル芽細胞, OB: 象牙芽細胞, SA: 分泌期エナメル芽細胞

10日齢野生型マウスの下顎第一臼歯では歯根の形成が開始していた(図8)。形成途上の歯根部において、象牙芽細胞に *Npt2b* mRNA に特異的なシグナルを認めた(図8)。この時期の成熟期エナメル芽細胞は特異的なシグナルを示さなかった(図8a)。 *Npt2b* タンパクはヘルドウィッチ上皮鞘に配列する幼若な象牙芽細胞に分布し、さらに、一部

の歯根膜線維芽細胞が *Npt2b* 陽性であった(図9)。

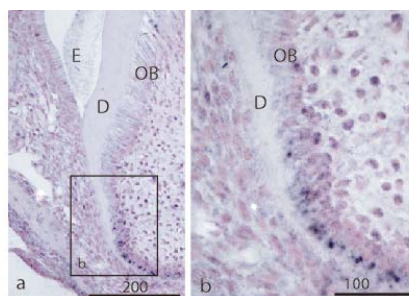


図8 生後10日齢マウスにおける *Npt2b* mRNA の分布
D: 象牙質, DP: 歯乳頭, E: エナメル質, OB: 象牙芽細胞

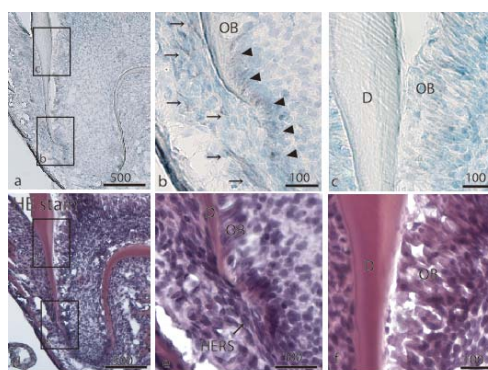


図9 生後10日齢マウスにおける *Npt2b* タンパクの分布
a-c: 免疫染色, d-f: HE染色
D: 象牙質, HERS: ヘルドウィッチ上皮鞘, OB: 象牙芽細胞

(3) Hyp マウスにおける *FGF23* 遺伝子の発現異常

定量的 RT-PCR 法の結果、生後2および6日齢において Hyp マウスの歯における *FGF23* mRNA の相対的発現量は野生型マウスと比較して有意に高い値を示した(図10)。

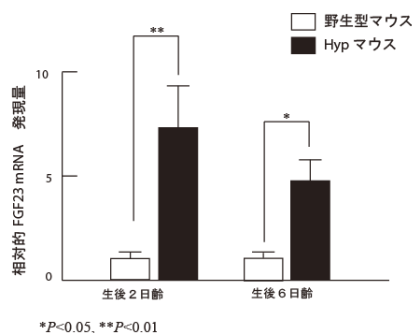


図10 野生型および Hyp マウスにおける *FGF23* mRNA 発現量の比較

また、胎生17日齢 Hyp および野生型マウス由来の下顎第一臼歯歯胚を14日間培養したサンプルを用いた RT-PCR 法の結果、どちらも *FGF23* mRNA に対するバンドを認めた(図11)。さらに、定量的 RT-PCR 法の結果、Hyp マウス由来の培養歯胚の相対的発現量は野生型マウスと比較して有意に高い値を示した(図12)。

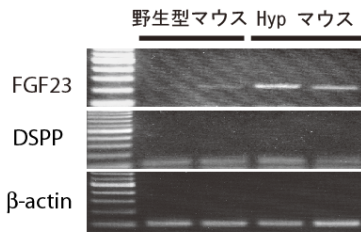


図 11 野生型および Hyp マウス由来培養歯胚における FGF23 mRNA の発現

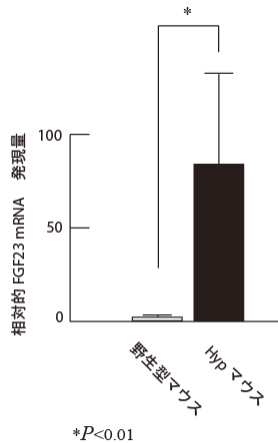


図 12 野生型および Hyp マウス由来培養歯胚における FGF23 mRNA の発現量の比較

以上の結果をまとめると、歯冠形成期のマウス臼歯において FGF23 が発現しており、主に、前分泌期および分泌期エナメル芽細胞、幼若な象牙芽細胞に分布していた。また、Hyp マウスの歯における FGF23 mRNA の発現量は、野生型マウスと比較して有意に高かった。さらに、胎生期に分離し培養した歯胚においても、同様に、Hyp マウスにおける FGF23 の過剰発現が認められた。XLH および Hyp マウス の原因遺伝子である PHEX (Phex) は、主に骨芽細胞や象牙芽細胞に発現することから、FGF23 が Hyp マウスにおいて過剰に発現することは、Phex が FGF23 の発現を負に制御している事を示唆している。一方、歯の形成過程において Npt2b は前エナメル芽細胞、エナメル芽細胞、象牙芽細胞、歯根膜線維芽細胞といった様々な細胞に分布していた。よって、Npt2b が歯の形成過程時のリン代謝において、重要な働きを有している事が示唆される。リンの代謝異常を有する疾患において FGF23 が過剰に発現することが知られている。しかし、Npt2b は FGF23 よりも発生の早期に発現する事や、FGF23 よりも分布が広い事から、Npt2b の発現を FGF23 が直接的に制御しているとは考えにくい。

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 3 件)

- ① Tomoyuki Onishi, Serina Umemura; Megumi Yanagawa; Mieko Matsumura; Yasushi Sasaki; Takeshi Ogasawara and Takashi Ooshima. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Archiv. Oral Biol.* 53 257-260, 2008. 査読あり
- ② Tomoyuki Onishi, Seikou Shintani, Satoshi Wakisaka, and Takashi Ooshima. Relationship of vitamin D with calbindin D9k and D28k expression in ameloblasts *Archiv. Oral Biol.* 53 117-123, 2008. 査読あり
- ③ Tomoyuki Onishi, Serina Umemura, Seikou Shintani, and Takashi Ooshima. Phex mutation causes overexpression of FGF23 in teeth. *Archiv. Oral Biol.* 53 99-104, 2008. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 大西智之, 新谷誠康, 大嶋 隆, Hyp マウス歯における FGF23 の発現異常, 第 49 回歯科基礎医学会総会(札幌), 2007.
- ② 梅村瀬里菜, 大西智之, 大川玲奈, 大嶋隆, Hyp マウス臼歯における FGF23 の発現異常, 第 45 回日本小児歯科学会総会(東京), 2007.
- ③ 大西智之, 梅村瀬里菜, 大川玲奈, 大嶋隆, 歯の形成時における II 型ナトリウム-リン共輸送体の分布, 第 45 回日本小児歯科学会総会(東京), 2007

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 智之 (ONISHI TOMOYUKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・招聘教員
研究者番号：30303978

(2)研究分担者

大嶋 隆 (OOSHIMA TAKASHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：80116003

(3)新谷 誠康 (SHINTANI SEIKOU)

東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：90273698