

平成 30 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05010

研究課題名(和文)骨細胞におけるリン酸イオン供与システムとFGF23フィードバック機構

研究課題名(英文)Biological synthesis of phosphate ions and its feedback mechanism of osteocyte

研究代表者

網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：30242431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,260,000円

研究成果の概要(和文)： klotho^{-/-}マウスおよびkl/klマウスに低リン食飼育を行うと、両マウスとも血中リン濃度の上昇が抑えられ、kl/klマウスの骨の石灰化異常は回復したが、klotho^{-/-}マウスの骨異常は回復しなかったことから、骨基質石灰化は血中リン濃度にだけ依存するのではないと考えられた。また、骨芽細胞から骨細胞に分化しつつある細胞はpodoplaninとリン酸化ezrinを細胞膜周囲に局在させていたが、ENPP1^{-/-}マウスとkl/klマウスでは、早期にpodoplanin陽性骨芽細胞が誘導されたことから、血中リン濃度またはリン酸イオン供与体が骨細胞分化を促進させる可能性が推察された。

研究成果の概要(英文)： Klotho^{-/-}mice and kl/kl mice prevented the increment of serum phosphate level, when being fed with low-phosphate diets. Low-phosphate diets rescued the reduced mineralization of kl/kl bone but not klotho^{-/-}bone, indicating that bone mineralization seems to be regulated not only by serum concentration of phosphate, but also other mechanism. In a normal state, osteoblasts being about to differentiate into osteocytes localized podoplanin and phosphorylated-ezrin along the cell membranes. ENPP1^{-/-}mice and kl/kl mice prematurely demonstrated many osteoblasts featuring podoplanin and phosphorylated-ezrin. Therefore, the elevated concentration of serum phosphate and/or membrane transporters/enzymes serving for phosphate ion-supplement may be involved in osteocytic differentiation from osteoblasts.

研究分野：骨代謝学・細胞組織学

キーワード：骨細胞 石灰化 FGF23 ENPP1 TNAP

1. 研究開始当初の背景

血中カルシウム濃度はほぼ一定に保たれているのに対して、リン酸濃度は日内変動が大きく、石灰化の場では局所的にコントロールされる必要がある。リン酸イオン生成については、ENPP1 (ピロリン酸合成酵素) で合成されたピロリン酸が石灰化を抑制する一方、TNAP (組織非特異型あり仮ホスファターゼ) によって、リン酸モノマーへと分解されて基質小胞内部へと輸送される。カルシウムイオン (Ca^{2+}) に関しては、membrane-bound Ca^{2+} -ATPase も基質小胞膜に存在し、組織液中の Ca^{2+} を内部に能動輸送する機構が考えられている。

しかし、このプロセスは、骨芽細胞により基質小胞性石灰化を行う場合であり、骨細胞が骨小腔という内部環境を作るためには、基質石灰化を抑制し、また、緻密な骨基質石灰化の状態を維持する機構が別途必要になる。骨細胞は FGF23 を分泌し、腎臓の FGFR1c/ α klotho 複合体に結合することで血中リン濃度を調節している。ところが、血中リン濃度は骨基質石灰化および骨基質内部に存在する骨細胞や骨小腔に影響を与えるのか、それとも、血中リン濃度に作用されるのではなく、骨細胞が産生する FGF23 がオートクリン/パラクリン的に骨細胞に作用するのかがという課題が生じた(課題1)。さらに、骨芽細胞から骨細胞に分化すると、TNAP などの発現が急に消失してしまい、ダイナミックに細胞極性が変化する。従って、骨芽細胞から骨細胞へ分化する際にトリガーとなる因子は何か、また、その因子が発現する骨芽細胞/骨細胞において、リン酸イオン膜輸送体である TNAP, ENPP1 などの発現・局在が変化するか(課題2)、といった課題を掲げた。

2. 研究の目的

上記に記した背景や問題点を踏まえて、本研究では、課題1に対しては「研究計画1:骨細胞における FGF23/ α klotho のオートクリン/フィードバック機構」について(詳細は「研究の方法」を参照)、課題2に対しては、「研究計画2:骨芽細胞・骨細胞のリン酸イオン膜輸送体の局所的 ON-OFF 機構」について(詳細は「研究の方法」を参照)検討することで、本題である「骨細胞におけるリン酸イオン供与システムと FGF23 フィードバック機構」の解明を行うこととした。

3. 研究の方法

研究計画1(平成 27 年度):骨細胞における FGF23/ α klotho のオートクリン/フィードバック機構

kl/kl マウスも α klotho^{-/-} マウスも同じ骨組織異常を示すが、遺伝子レベルでの病因を考えると、

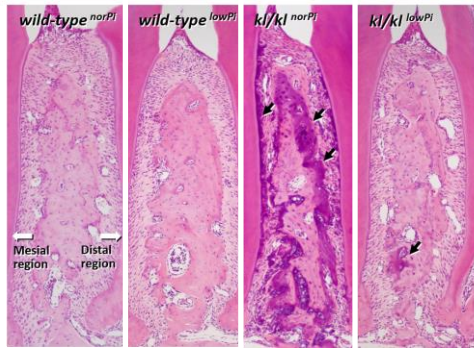
α klotho^{-/-} マウスでは klotho 蛋白の発現上昇は誘導されないが、 kl/kl マウスはプロモーター領域の変異であり、特定の環境によっては klotho 発現上昇の可能性がある。従って、in vivo において低リン食で kl/kl マウスも α klotho^{-/-} マウスも組織異常が回復する場合は、血中リン酸濃度が主たる因子と考えられる。これに対して、 kl/kl マウスで組織異常が回復し、 α klotho^{-/-} マウスでは回復しない場合は、リン酸濃度以外、特に、低リン状態で klotho 産生が誘導されることで回復する可能性が高く、これは骨細胞に FGF23/ α klotho シグナルが作用することを意味する。以上より、 kl/kl マウスと α klotho^{-/-} マウスに通常食または低リン食 + 3%リン吸着材を与えて、細胞組織化学的に解析することとした。

研究計画2(平成 28-29 年度):骨芽細胞・骨細胞のリン酸イオン膜輸送体の局所的 ON-OFF 機構

骨芽細胞から骨細胞に分化する際に、どのような因子が発現・局在してくるか様々な蛋白発現を検討する。また、その際に、細胞骨格の変化とともに、リン酸イオン膜輸送体である TNAP, ENPP1 などの発現・局在が変化するか、組織化学的に検討することとした(詳細は研究成果参照)。

4. 研究成果

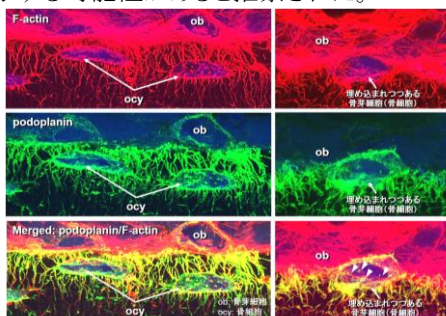
平成 27 年度では、 kl/kl マウスと α klotho^{-/-} マウスの3週齢以降に通常食(Ca:1.17%, P:0.69%)または低リン食(Ca:1.17%, P:0.315%) + 3%リン吸着材(塩酸セベラマー)を与えて、血中リン濃度が低下した(正常に近い)状態で、骨基質石灰化、DMP-1, osteopontin, osteocalcin, matrix Gla protein の免疫組織化学・透過型電子顕微鏡や real time PCR による FGF23, FGFR1c, α klotho などの遺伝子発現を大腿骨・脛骨、腎臓で計測したところ、通常食では、 kl/kl マウスと α klotho^{-/-} マウスでは、以前我々が報告した同じ低石灰化異常を示していたが、低リン食飼育を行うと、 kl/kl マウスでは骨の石灰化異常がほとんど正常化しており、その原因には、腎臓における α klotho の発現が wild-type マウスの発現量の約半分まで回復していたことがあげられる。一方、低リン食飼育でも α klotho^{-/-} マウスは、依然として、通常食と同じ異常を示しており、腎臓における α klotho 発現の回復は認められなかった。しかし、血中リン濃度は有意に低下しており、wild-type マウスおよび低リン食飼育の kl/kl マウスの値と有意差が認められなかった。このことから、血中リン濃度が、骨石灰化に直接影響を及ぼすのではないこと、また、FGF23 シグナルが腎臓による血中リン濃度を介さずに、直接、骨にオートクリン/パラクリン的に作用する可能性が強く示唆された。



kl/kl マウスと α klotho^{-/-}マウスの3週齢以降に通常食または低リン食+3%リン吸着材を与えた場合の、骨(歯槽骨)。kl/kl マウスに低リン食を与えた場合、骨組織の異常が回復している。

平成 28~29 年度は、「骨芽細胞・骨細胞のリン酸イオン膜輸送体の局所的 ON-OFF 機構」を解析した。我々は、podoplanin 陽性骨芽細胞が骨細胞へと分化することを突き止めた。podoplanin は CD44 結合部位を有する膜貫通蛋白であり、EMR family (ezrin, moesin, radixin) を介してアクチンなどの細胞骨格の再構築や細胞極性、そして、細胞分化にも影響することが知られている。podoplanin 陽性骨芽細胞は、骨細胞と同様のアクチンの細胞内分布を示しており、その細胞においてリン酸化 ezrin を細胞膜周囲に局在させていたことから、podoplanin 陽性骨芽細胞が骨細胞に分化する過程にある細胞と推測された。さて、その一方で、ENPP1 の免疫電顕を行うと、ほぼ全ての骨細胞に ENPP1 の陽性反応が出ていたが、細胞膜だけでなく粗面小胞体やゴルジ体を構成する膜構造に一致して局在していた。骨芽細胞でも骨細胞と同様の ENPP1 の分布を示したが、その反応の程度は骨細胞に比べて低かった。また、FGF23 はほぼ全ての骨細胞の小腔および細管内に認められた。

ところが、ENPP1^{-/-}マウスおよび kl/kl マウスでは、早期に podoplanin 陽性骨芽細胞が出現することが明らかとなった。ENPP1^{-/-}マウスと kl/kl マウスにおいて、基質石灰化が低下しているにも関わらず、podoplanin 陽性骨芽細胞が増加したことは、骨芽細胞から骨細胞へ分化することでリン酸イオン供与体の ON-OFF 機構が作動するのではなく、リン酸イオン供与体の機能・作用が骨芽細胞から骨細胞への分化の ON-OFF に関与する可能性があるかと推察された。



骨芽細胞および骨細胞の F-actin (上)、podoplanin (中)、および merge した STED 画像。Podoplanin 陽性骨芽細胞が骨細胞と同じアクチン分布を示す。

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 10 件)

1. Amizuka N., Hasegawa T., Yamamoto T., Mae T., Qiu Z., Kudo A., Abe M., Zhao S., Nagai T., Yokoyama A., Khadiza N., Haraguchi M., Yamamoto T., de Freitas PHL., Li M.: Cellular function of osteocytes in normal and α klotho-deficient mice. *Hokkaido of Dent Sci.* 38(Special issue):56-62, 2017.(査読無)
<http://hdl.handle.net/2115/67337>
2. Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuchiya E., Hongo H., Tsuboi K., Kudo A., Abe M., Yoshida T., Nagai T., Khadiza N., Yokoyama A., Oda K., Ozawa H., Freitas de PHL., Li M., Amizuka N.: Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated mineralization. *Japanese Dental Science Review.* 53(2):34-45, 2017. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2016.09.00>
3. Toraya H., Hasegawa T., Sakagami N., Tsuchiya E., Kudo A., Zhao S., Moritani Y., Abe M., Yoshida T., Yamamoto T., Yamamoto T., Oda K., Udagawa N., Freitas PHL., Li M., Amizuka N.: Histochemical assessment for osteoblastic activity coupled with dysfunctional osteoclasts in c-src deficient mice. *Biomed Res.* 38(2): 123-134, 2017. (査読有)
DOI: 10.2220/biomedres.38.123.
4. Hikone K., Hasegawa T., Tsuchiya E., Hongo H., Sasaki M., Yamamoto T., Kudo A., Oda K., Haraguchi M., Freitas PHL., Li M., Iida J., Amizuka N.: Histochemical examination on periodontal tissues of Klotho-deficient mice fed with phosphate insufficient diet. *J Histochem Cytochem.* 65(4): 207-221, 2017. (査読有)
DOI: 10.1369/0022155416689670.
5. Simomura-Kuroki J., Farooq M., Sekimoto T., Amizuka N., Simomura Y.: Characterization of a PTH1R missense mutation responsible for Jansen type metaphyseal chondrodysplasia. *Odontology.* 105(2):150-154, 2017. (査読有)
DOI:10.1007/s10266-016-0247-4.

6. Hongo H., Sasaki M., Kobayashi Y., Hasegawa T., Yamamoto T., Tsuboi K., Tsuchiya E., Nagai T., Khadiza N., Abe M., Kudo A., Oda K., Freitas PHL., Li M., Yurimoto H., Amizuka N.: Localization of minodronate in mouse femora through isotope microscopy. *J Histochem Cytochem.* 64(10):601-622, 2016.(査読有)
DOI:10.1369/0022155416665577.
7. Tsuboi K., Hasegawa T., Yamamoto T., Sasaki M., Hongo H., Oda K., Michigami T., Li M., Freitas PHL., Kitagawa Y., Amizuka N.: Effects of drug discontinuation after short-term daily alendronate administration on osteoblasts and osteocytes. *Histochem Cell Biol.* 146(3):337-350, 2016.(査読有)
DOI: 10.1007/s00418-016-1450-7.
8. Tanaka Y., Hasegawa T., Yamada T., Yamamoto T., Sasaki M., Hongo H., Tsuboi K., Haraguchi M., de Freitas PHL., Li M., Oda K., Totsuka Y., Tei K., Amizuka N.: Histological assessment for femora of ovariectomized obesity (db/db) mice carrying mutated leptin receptor. *Histol Histopathol.* 31(12):1315-1326, 2016. (査読有)
DOI:10.14670/HH-11-758.
9. Dong B., Endo I., Ohnishi Y., Kondo T., Hasegawa T., Amizuka N., Kiyonari H., Shioi G., Abe M., Fukumoto S., Matsumoto T.: Calcilytic Ameliorates Abnormalities of Mutant Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Knock-In Mice Mimicking Autosomal Dominant Hypocalcemia (ADH). *J Bone Miner Res.* 30(11):1980-1993, 2015.(査読有)
DOI:10.1002/jbmr.2551.
10. Liu H., Guo J., Wei S., Lv S., Feng W., Cui J., Hasegawa T., Hongo H., Yang Y., Li X., Oda K., Amizuka N., Li M.: Expression of matrix Gla protein and osteocalcin in the developing tibial epiphysis of mice. *Histol Histopathol.* 30(1):77-85, 2015. (査読有)
DOI:10.14670/HH-30.77.

[学会発表] (計 17 件)

1. 長谷川智香、邱 紫璇、山本知真也、本郷裕美、松井 功、網塚憲生: Fgf23 遺伝子

欠損マウスの骨基質石灰化異常における SIBLING family の局所作用. 第 36 回日本骨代謝学会 長崎 2018 年 7 月 26-28 日 発表予定

2. 網塚憲生: 骨基質石灰化におけるリン-FGF23-Klotho axis 講演 ワークショップ「リン-FGF23-Klotho axis: 臨床から基礎へ」第63回日本透析医学会学術集会・総会 神戸 2018年6月29日-7月1日 発表予定
3. 長谷川智香、邱 紫璇、山本知真也、本郷裕美、松井 功、網塚憲生: Fgf23 遺伝子欠損マウスの骨基質石灰化異常における SIBLING family の関与. 第 38 回日本骨形態計測学会 大阪 2018 年 6 月 21-23 日 発表予定
4. 前 壮功仁、山本知真也、趙 申、邱 紫璇、長谷川智香、山崎 裕、網塚憲生: PTH 間歇投与マウスの骨組織におけるリン酸イオン供与膜輸送体・酵素群の局在. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 東京 2018 年 3 月 28-30 日 プログラム・抄録集:178, 2018.
5. 長谷川智香、本郷裕美、網塚憲生: 骨基質石灰化における局所リン酸供与と FGF23/klotho シグナル. アップデートシンポジウム16 第59回歯科基礎医学会学術大会 塩尻 2017年9月16-18日 プログラム・抄録集:170, 2017.
6. 長谷川智香、永井伯弥、本郷裕美、網塚憲生: 骨芽細胞から骨細胞へ: 微細構造学的知見. アップデートシンポジウム10 第59回歯科基礎医学会学術大会 塩尻 2017年9月16-18日 プログラム・抄録集:147, 2017.
7. 永井伯弥、長谷川智香、横山敦郎、網塚憲生: 骨芽細胞から骨細胞へのスイッチングにおける podoplanin の局在. 日本解剖学会第 63 回東北・北海道連合支部学術集会 弘前 2017 年 9 月 9-10 日 プログラム・抄録集:53, 2017.
8. 長谷川智香、山本知真也、網塚憲生: *kl/kl* マウスにおける基質小胞性石灰化の抑制メカニズムについて. 第 35 回日本骨代謝学会学術集会 福岡 2017 年 7 月 27-29 日 プログラム・抄録集:168, 2017.
9. 長谷川智香、網塚憲生: *aklotho*/FGF23 破綻による骨組織石灰化異常は低リン食

- 給餌により回復する. 第37回日本骨形態計測学会 大阪 2017年6月22-24日 日本骨形態計測学会雑誌 27(1):S109, 2017.
10. 網塚憲生、長谷川智香: 骨の細胞に対するPTH作用の組織学的知見. ワークショップ:08 二次性副甲状腺機能亢進症治療の新たな知見 第62回日本透析医学会学術集会・総会 横浜 2017年6月16-18日
 11. 網塚憲生、長谷川智香: 骨質に影響を及ぼす骨の微細構造と細胞群の役割. シンポジウム SY-29 天然骨と再生骨の骨質を科学する. 第16回日本再生医療学会総会 仙台 2017年3月7-9日 日本再生医療学会雑誌 再生医療 増刊号 Vol.16 Suppl 第16回日本再生医療学会総会 プログラム・抄録:108, 2017.
 12. 網塚憲生: 骨粗鬆症治療薬における骨の細胞・組織学的知見について -動物モデルを用いた基礎研究-. ランチョンセミナー3 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 福岡 2016年10月13-14日 日本整形外科学会雑誌 90(8):S1439, 2016.
 13. 網塚憲生、長谷川智香: 骨基質石灰化異常における微細構造学的知見. パネルディスカッション「クル病、骨軟化症を考える」第36回日本骨形態計測学会 新潟 2016年6月23-25日 プログラム・抄録集:S71, 2016.
 14. 長谷川智香、佐々木宗輝、山本知真也、本郷裕美、坪井香奈子、網塚憲生: FGF23/klotho 軸破綻による骨・血管の石灰化異常. シンポジウム S6 第121回日本解剖学会総会全国学術集会 郡山 2016年3月28-30日 プログラム・抄録集:90, 2016.
 15. 網塚憲生、長谷川智香、本郷裕美: Overview: 骨基質石灰化における微細構造学. シンポジウム S6 第121回日本解剖学会総会全国学術集会 郡山 2016年3月28-30日 プログラム・抄録集:90, 2016.
 16. 網塚憲生、長谷川智香: FIB-SEM を用いた骨組織の微細構造解析. シンポジウム 日本顕微鏡学会第71回学術講演会 京都 2015年5月13-15日 プログラム・抄録集:24, 2015.
 17. Amizuka N., Hasegawa T., Hongo H., Yamamoto T.: Histological aspects on the biological function of osteocytes. 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Tokyo, Japan, 2015.4.27-29, Program & Abstracts :20, 2015.
- [図書] (計7件)
1. 網塚憲生、邱 紫璇、長谷川智香: 7. 骨代謝の病態生理学的機序 ミネラル代謝の生理 CKD-MBD 3rd Edition「骨代謝の病態生理学的機序」東京 印刷中
 2. 小澤英浩、網塚憲生: 骨の組織観察法とイメージング 1 骨の構造 第2章 硬組織の構造 「新・骨の科学」第2版 医歯薬出版株式会社 東京 pp.29-34, 2016年
 3. 小澤英浩、網塚憲生: 骨・軟骨の再生法 3 骨(軟骨)の組織発生(膜性骨化と軟骨内骨化) 第3章 骨と歯の形づくりの分子メカニズムと、組織発生ならびに成長 「新・骨の科学」第2版 医歯薬出版株式会社 東京 pp.68-71, 2016年
 4. 小澤英浩、網塚憲生: 骨細胞の形態学 2 骨細胞 第4章 硬組織の細胞とその分化 「新・骨の科学」第2版 医歯薬出版株式会社 東京 pp.96-102, 2016年
 5. 小澤英浩、網塚憲生: 4 骨の細胞の相互作用 第4章 硬組織の細胞とその分化 「新・骨の科学」第2版 医歯薬出版株式会社 東京 pp.122-124, 2016年
 6. 小澤英浩、網塚憲生: 基質小胞からコラーゲンへの石灰化の移行 5 基質小胞学説 第6章 石灰化の機構 「新・骨の科学」第2版 医歯薬出版株式会社 東京 pp.185-189, 2016年
 7. 網塚憲生、長谷川智香: 骨・硬組織の染色法・微細構造解析 第3部3章 keyword (2)(3) 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典 日本骨代謝学会・編集 羊土社 東京 pp.304-309, 2015.
- [その他]
- 北海道大学大学院歯学研究院 口腔健康科学分野 硬組織発生生物学教室ホームページ
http://www.den.hokudai.ac.jp/anatomy2/hokudai_d/index.html
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
 網塚 憲生 (AMIZUKA, Norio)
 北海道大学・大学院歯学研究院・教授
 研究者番号: 30242431

(2)連携研究者

織田 公光 (ODA, Kimimitsu)
新潟大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号： 1 0 1 2 2 6 8 1

(3)研究協力者

長谷川 智香 (HASEGAWA, Tomoka)

本郷 裕美 (HONGO, Hiromi)

山本 知真也 (YAMAMOTO, Tomomaya)