

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09635

研究課題名(和文) 骨細胞におけるリンの感知と低リンくる病責任分子の発現制御：Pit1の関与について

研究課題名(英文) Phosphate sensing and expression mechanism of genes responsible for hypophosphatemic rickets in osteocytes: Involvement of Pit1

研究代表者

山崎 美和(若林美和)(Yamazaki, Miwa)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・環境影響部門・研究員(移行)

研究者番号：50455549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞・骨細胞には複数の低リン血症性くる病責任分子が発現しているが、リンの過不足を感知する機構については不明である。本研究では、CRISPR/Casシステムを利用し、III型ナトリウム-リン酸共輸送担体であるPit-1およびPit-2をノックアウトした骨芽細胞株を樹立し、骨芽細胞におけるリン酸シグナルの受容とリン代謝関連分子の発現制御におけるPit-1およびPit-2の役割を解析した。Pit-1の欠損は細胞外無機リン酸応答性に影響を与え、またPit-2はリン酸取り込みを介して長期的なリンの作用に関与していることが示唆され、Pit-1とPit-2は異なる役割を有することが推察された。

研究成果の概要(英文)：As osteoblasts mature, they acquire the expression of multiple molecules involved in phosphate (Pi) metabolism. Osteoblasts/osteocytes may sense and respond to alterations in Pi availability in their microenvironment. However, the involvement of type III sodium/phosphate co-transporters, Pit-1 and Pit-2, in Pi handling in osteoblasts/osteocytes is unclear. In the current study, we have investigated the role of Pit-1 and Pit-2 in the responsiveness of osteoblasts to Pi by deleting Pit-1 and Pit-2 from MC3T3-E1 cells using CRISPR/Cas9 systems. Deletion of Pit-1 in osteoblastic cells affected the response to increased extracellular Pi. Although Pit-2 may play a role to mediate a long-term effect of high Pi in osteoblastic cells, it appears to be dispensable for responding to acute Pi elevation. In conclusion, Pit-1 and Pit-2 might have different roles in osteoblasts.

研究分野：骨ミネラル代謝学

キーワード：リン Pit-1

1. 研究開始当初の背景

リンは生命維持や骨の石灰化に必須のミネラルであり、生体にはリン恒常性維持のための調節機構が存在する。最終分化に至った骨芽細胞は骨基質に埋め込まれ、樹状の突起を有する骨細胞となる。近年、遺伝性低リン血症性くる病の責任分子が相次いで同定されたが、そのうち、fibroblast growth factor 23 (FGF23)、dentin matrix protein 1 (DMP1)、phosphate-regulating gene with homology to endopeptidase on X chromosome (PHEX)、family with sequence similarity 20, member C (FAM20C) は主として骨芽細胞・骨細胞に発現しており、リン恒常性維持にこれらの細胞が重要な役割を担っていることが示唆される。しかしながら、骨芽細胞・骨細胞がどのような機序で体内のリンの過不足を感知し、リン代謝関連分子群の発現を制御しているのかという点については、適切なモデル細胞の欠如もあり、現在のところ明らかになっていない。

我々はこれまで、複数の細胞種において細胞外無機リン酸により惹起されるシグナルが III 型ナトリウム-リン酸 (Na⁺/Pi) 共輸送担体である Pit-1 の下流で FGF receptor substrate 2 α のリン酸化をもたらし、FGF シグナルとカスケードを共有することを報告した (Kimata, et al. Bone, 2010; Yamazaki, et al. J Cell Biochem, 2010)。これらのことから、リン代謝調節における司令塔である骨芽細胞・骨細胞においても、細胞外環境中のリン酸濃度変化が Pit-1 を介して細胞内へシグナルとして伝達され、リン酸利尿因子である FGF23 をはじめとするリン代謝関連分子の発現制御に関わるのではないかと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集により、Pit-1 遺伝子を完全にノックアウトした骨芽細胞株を樹立し、骨芽細胞・骨細胞におけるリンの感知とリン代謝関連遺伝子の発現制御における Pit-1 の役割について解析することを目的とする。

3. 研究の方法

- 1) マウス骨芽系細胞株 MC3T3-E1 に CRISPR/Cas システムを適用し、Pit-1 ノックアウト細胞を樹立した。
- 2) Pit-1 の欠損が細胞へのリン酸取り込みに及ぼす影響を ³²P でラベルされた orthophosphate を用いて検討した。
- 3) Pit-1 の欠損が、細胞外無機リン酸刺激により惹起されるシグナルの受容や低リンくる病責任分子を含むリン代謝関連分子群の発現に及ぼす影響を検討した。
- 4) 長期のリン酸刺激に対する応答性を検討するため、Pit-1 ノックアウト細胞とコントロール細胞を 3 mM リン酸とアスコルビン酸存在下で 8 週間培養し、ALP 染色と Alizarin

red 染色を行った。

- 5) Pit-2 遺伝子のノックアウト細胞も樹立し、Pit-1 との機能の差異について明確化する。

4. 研究成果

細胞外無機リン酸濃度の上昇に応答性を示すことが知られているマウス骨芽系細胞株 MC3T3-E1 細胞を使用し、CRISPR/Cas システムによるゲノム編集を行い、Pit-1 ノックアウト細胞を作成した。CRISPR/Cas システムとは、Cas9ヌクレアーゼ(二本鎖 DNA 切断酵素)とヒト U6 ポリメラーゼ III プロモーターで発現される guide RNA (crRNA:tracrRNA)を共発現させ、標的ゲノム DNA を切断し、その後の修復過程においてゲノム切断部に塩基の置換や欠失を誘引し、遺伝子をノックアウトする手法である。Pit-1 遺伝子をノックアウトするため、CRISPR Genome Engineering Resources の CRISPR design tool (<http://www.genome-engineering.org/crispr>) を使用し、標的 DNA 部位に一致する 20 bp の guide sequences をデザインし Cas9 発現ベクター (Thermo Fisher Scientific) にクローニングした。このプラスミドを MC3T3-E1 細胞に Fugene HD (Promega) を用いて導入し、限外希釈法によりクローンとして単離した。各クローンのゲノムを調製し、Pit-1 遺伝子配列をシーケンサーにて確認し、欠損、変異が生じてフレームシフトが生じ Pit-1 遺伝子がノックアウトされているクローンを選択し以降の実験に使用した。

Pit-1 ノックアウトクローンのリン酸取り込み能について検討した結果、MC3T3E1 親株と比較して、Pit-1 ノックアウトクローンはリン酸取り込み量が著明に減少していた。次に、MC3T3 親株と樹立した Pit-1 ノックアウトクローンの分化能を検討した。3 mM リン酸とアスコルビン酸存在下で 8 週間培養し、Alizarin red 染色により石灰化能を評価したところ、Pit-1 ノックアウト細胞においては親株と比較して、染色性が低下し、石灰化能の減弱が示唆された。また、同様に培養し、Pit-1 およびもう一つの III 型 Na⁺/Pi 共輸送担体である Pit-2、細胞外無機リン酸シグナルにより誘導されることが知られているリン酸応答遺伝子の一つである osteopontin の発現変化を検討した。MC3T3 親株においては、28 日目に Pit-1 の著明な発現増加を認めたが、Pit-1 ノックアウトクローンでは極めて低値にとどまった。Pit-2 の発現は、Pit-1 ノックアウトクローンと親株の間で差はなく、またいずれの細胞においても培養期間中に変動を示さなかった。また、osteopontin の発現が MC3T3 親株においては著明に上昇し、Pit-1 ノックアウト細胞においても Day0 と比較して Day28 で発現は有意に上昇していたが、その上昇は親株と比較して有意に減弱していた。

また、リン酸存在下で培養することでより

良好な石灰化を示すマウス骨芽細胞系細胞株 MC3T3-E1 Subclone4 を使用し、Pit-2 ノックアウトクローンも同様に作成した。Pit-2 ノックアウトクローンはリン酸の取り込み量がコントロールクローンと比較して有意に減少していた。急速な細胞外無機リン酸濃度の上昇は、Pit-2 ノックアウトクローン、コントロールクローンのいずれにおいてもFRS2 α や ERK1/2 のリン酸化を誘導した。また、48 時間のリン酸刺激はいずれの細胞においても Dmp1 の発現を誘導したが、Pit-2 ノックアウトクローンでは発現の増加がより軽度にとどまった。一方、長期的に高濃度リン酸存在下で培養したところ、Pit-2 ノックアウトクローンにおいても石灰化能は保持されていたが、osteopontin や Dmp1、Fgf23、Pit-1 の発現誘導が減弱していた。

今回の検討から、骨芽細胞系細胞における Pit-1 の欠損は細胞外無機リン酸応答性に影響を与えることが示唆された。また Pit-2 はリン酸取り込みを介して長期的なリン酸の作用に関与していると考えられた。一方、急性なリン酸上昇に対する応答性は Pit-2 ノックアウトクローンにおいても保持されていたことから、リン酸濃度の感知には Pit-2 は不要であることが示唆され、Pit-1 と Pit-2 は骨芽系細胞において異なる役割を有することが推察された。今後、これらのノックアウト細胞を使用し、骨芽細胞の分化と石灰化における III 型 Na⁺/Pi 共輸送担体の役割について検討していく予定である。

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 Michigami T, Kawai M, Yamazaki M, Ozono K. Phosphate as a signaling molecule and its sensing mechanism. *Physiol Rev*. 2018. 印刷中. 査読有
- ② Nishino J, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Yamamoto K, Miyagawa K, Kogo M, Ozono K, Michigami T. Extracellular Phosphate Induces the Expression of Dentin Matrix Protein 1 Through the FGF Receptor in Osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2017 May;118(5):1151-1163. 査読有 doi: 10.1002/jcb.25742.
- ③ Yamazaki M, Kawai M, Miyagawa K, Ohata Y, Tachikawa K, Kinoshita S, Nishino J, Ozono K, Michigami T. Interleukin-1-induced acute bone resorption facilitates the secretion of fibroblast growth factor 23 into the circulation. *J Bone Miner Metab*. 2015 May;33(3):342-54. 査読有 doi:

10.1007/s00774-014-0598-2.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山崎美和, 川井正信, 大藪恵一, 道上敏美. 骨芽細胞の細胞外無機リン酸応答性における III 型ナトリウム/リン酸共輸送担体の役割: Pit2 欠損細胞を用いた解析. 第 35 回日本骨代謝学会. 2017.7.27-29: 福岡
- ② Michigami T, Yamazaki M, Kawai M, Ozono K. Role of type III Sodium/Phosphate Co-transporters in the Responsiveness of Osteoblasts to Extracellular Inorganic Phosphate. 8th International Conference on Children's Bone Health. 2017. 6. 10-13. Würzburg, Germany
- ③ 山崎美和, 川井正信, 立川加奈子, 西野仁, 大藪恵一, 道上敏美. 骨芽細胞の細胞外無機リン酸惹起シグナル受容における Pit-1 の関与: CRISPR/Cas システムを用いた解析. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会. 2016.7.21-23. 東京

[図書] (計 0 件)

[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

山崎美和 (若林美和) (YAMAZAKI, Miwa)
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪
母子医療センター (研究所)・環境影響部
門・流動研究員
研究者番号: 50455549

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

道上敏美 (MICHIGAMI, Toshimi) 地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・環境影響部門・部長

研究者番号：00301804

(4) 研究協力者

なし