

学位論文題名

Altered distribution of bone matrix proteins and defective bone mineralization in *klotho*-deficient mice

(*klotho*欠損マウスにおける骨石灰化抑制と骨基質タンパクの局在の変化について)

学位論文内容の要旨

【緒言】

klotho タンパクはC末端に1回膜貫通ドメインを有するI型膜貫通タンパクである。しかし、後日、ホモログである β *klotho* がクローニングされたため、*klotho* は厳密には α *klotho* と呼ばれ区別されている。 α *klotho* タンパクは血中ミネラル恒常性に、また、 β *klotho* は胆汁・酸・コレステロール代謝に関与するという。 α *klotho* の役割の一つとして血中カルシウムとリンの恒常性をあげることができ、 α *klotho* は腎臓の近位尿細管において、線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor : FGF) 23の受容体であるFGFR1cの補助因子として機能している。つまり、骨細胞から産生されたFGF23は腎臓の近位尿細管においてFGFR1c-*klotho* 複合体に結合し、NaPiIIa/IIcならびに1 α -hydroxylaseを抑制することで血中リン・カルシウム濃度を調節している。1997年に作製された*klotho* 欠損マウスは α *klotho* 遺伝子上流に外来遺伝子を挿入することでその発現が欠損したマウスであり、この*klotho* 欠損(*kl/kl*)マウスでは、FGF23シグナルが遮断されているため、高リン・高カルシウム血症が生じている。現在、*kl/kl* マウスに認められる全ての異常はFGF23-*klotho* 軸の障害によって説明されている。また、骨細胞は、FGF23の産生を行い血中リン濃度調節、スクレロステチン産生による骨芽細胞抑制、メカニカルストレスの感知などを行うが、その中でも、骨基質ミネラルの調節に深く関わっていることが提唱されている。そこで我々は、高リン・高カルシウム血症を有する *kl/kl* マウスの骨基質を、骨細胞および非コラーゲン性タンパク質に注目して組織学的に解析した。

【材料と方法】

生後7週齢の雄性野生型マウスと *kl/kl* マウス(各群8匹)を用いた。これらマウスを4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、脛骨を摘出して同固定液にて浸漬固定を行った。その後、5%または10%EDTAにて脱灰を行い、それぞれ通法にてエポキシ樹脂ならびにパラフィンに包埋した。その他の試料は、液体窒素にて凍結しtotal RNAの抽出およびRT-PCR解析を行うと共に、ジメチルホルムアミドにて脱水後、グリコールメタクリレート(GMA)に包埋し超薄切片を作製した。パラフィン切片における組織化学として、アルカリフォスファターゼ(ALP)と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)の二重染色、dentin matrix protein (DMP)-1、基質グラ蛋白(MGP)、オステオカルシン(OCN)、オステオポンチン(OPN)およびE11の免疫染色を行うとともに、DMP1とE11の二重蛍光染色を行った。また、GMA切片でのimmuno-gold法を用いたDMP-1の免疫電顕ならびに光学顕微鏡レベルにおける銀増感法を行った。石灰化については、未脱灰標本のエポキシ樹脂を用いて透過型電子顕微鏡観察を行うと共に von Kossa 染色を行った。また、OCN, MGP, DMP-1 陽性骨細胞の割合を統計学的に解析した。

【結果】

*kl/kl*マウスの石灰化骨基質を von Kossa 染色と透過型電子顕微鏡観察を行うと、高リン・高カルシウム血症にもかかわらず、広範な未石灰化骨基質が認められた。特に、未石灰化骨基質における骨細胞は石灰化していることが明らかにされた。また、骨表面上のいくつかの細胞周囲が石灰化構造物で囲まれていた。*kl/kl*マウスの未石灰化骨基質は活性型骨芽細胞直下でも観察されることから、我々は骨形成の段階ではなく、骨形成後に石灰化ミネラルの流出が生じたものと推測した。そこで、石灰化結晶の Ca^{2+} と結合を示すことが知られている骨基質蛋白、すなわち、OCN, OPN, MGP, DMP-1 の局在を免疫組織化学的に検索した。その結果、野生型マウスの脛骨では、OCN は骨基質に均一に局在したが、*kl/kl*マウスの脛骨では、骨細胞とセメントラインと思われる構造物に強陽性反応を認めたものの、骨基質全体における反応は低下していた。OCN 陽性骨細胞数の割合は *kl/kl*マウスで高い値を示したが、RT-PCR により OCN 発現は低下していることが示された。MGP は、野生型マウスの骨端部の骨基質と軟骨基質との間など異種の基質間に局在したが、*kl/kl*マウスでは骨表面上の細胞の一部に陽性反応が観察された。さらに、野生型マウスにおいて、DMP-1 は骨小腔や骨細管に一致した局在を示したのに対し、*kl/kl*マウスの脛骨の骨細胞ならびに骨表面上のいくつかの細胞周囲が DMP-1 強陽性反応を示した。一方で、OPN の局在は両者マウス間で差は見られなかった。そこで、最も局在に変化が認められた DMP-1 の微細局在を免疫電顕観察すると、骨細胞の周囲を取り巻いていた石灰化構造物に相当する領域に過剰な DMP-1 の集積が認められること、また、骨基質上の細胞で、その周囲が石灰化構造物で取り囲まれていた領域に多量の DMP-1 の蓄積が観察された。よって、骨細胞や骨表面上のいくつかの細胞の周囲に DMP-1 が過剰産生されることで、石灰化が誘導されたものと推測された。何故、骨細胞や骨表面のいくつかの細胞が DMP-1 の過剰産生を行うか、骨細胞初期のマーカーである E11 と DMP-1 の二重染色ならびに鍍銀染色を行ったところ、*klotho* 欠損環境では、骨芽細胞から骨細胞への細胞分化が早熟かつ不規則に行われていることが強く示唆された。

【考察】

これまで、*klotho* 欠損による異常は *klotho*/FGF23 軸を中心とした血中カルシウム・リン濃度調節で説明されてきた。しかしながら、*kl/kl*マウスは高リン・高カルシウム血症であるにもかかわらず未石灰化骨基質を示すことから、むしろ、骨細胞の機能異常、特に、DMP-1 産生という一部の機能のみが亢進してしまった局所的異常が推測された。つまり、 Ca^{2+} に対する親和性の高い DMP-1 が局所に集積した場合、骨細胞や骨表面上の細胞に石灰化を誘導し、また、骨細管に集積した場合には骨細管内部に石灰化を引き起こすと考えられた。その一方、骨細胞・骨細管系は、骨基質ミネラルの維持に機能するという報告があり、それを踏まえると、骨細胞から過剰に産生された DMP-1 によって自身が石灰化し、機能障害、強いては細胞崩壊を生じることで周囲の骨基質ミネラルの消失に繋がった可能性が推測された。DMP-1 の異常発現の原因として、*klotho* 欠損による骨芽細胞の早熟な骨細胞への分化が考えられた。それは、E11 と DMP-1 の二重蛍光染色の結果から、*klotho* 欠損状態では骨芽細胞は骨細胞への早熟な分化、しかし、全ての機能ではなく、DMP-1 をはじめとする一部の基質産生のみが亢進してしまったために、骨細胞機能が崩壊してしまったと推察している。以上から、骨芽細胞から骨細胞への正常な細胞分化には *klotho* が必要であり、形成された骨細胞ならびに骨細管系の機能として基質ミネラルの維持調節があることが強く示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 網 塚 憲 生
副 査 特任准教授 野 谷 健 治
副 査 教 授 土 門 卓 文

学 位 論 文 題 名

Altered distribution of bone matrix proteins and defective bone mineralization in *klotho*-deficient mice

(*klotho*欠損マウスにおける骨石灰化抑制と骨基質タンパクの局在の変化について)

骨細胞から産生された線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor : FGF) 23 は血流を介して腎臓の近位尿細管に作用し、NaPiIIa/IIc ならびに 1 α -hydroxylase を抑制することで血中リン・カルシウム濃度を調節している。 α klotho (以下、klotho) は腎臓の近位尿細管において、FGF23 の受容体である FGFR1c の補助因子として機能する因子である。従って、血中リン濃度は FGF23/klotho 軸によって調節されている。1997 年に、 α klotho 遺伝子上流に外来遺伝子を挿入することで作製された *kl/kl* マウスの異常は、当時、老齢化モデルとされていたが、近年では、FGF23/klotho 軸破壊による高リン血症によるものと説明されている。一方、骨細胞は骨基質ミネラルの調節に深く関わっていることが提唱されており、高リン血症環境は骨細胞の機能に影響を及ぼすと考えられる。そこで我々は、高リン血症を有する *kl/kl* マウスの骨基質を、骨細胞および非コラーゲン性タンパク質に注目して組織学的に解析した。

生後7週齢の雄性野生型マウスと *kl/kl* マウス (各群8匹) を 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、脛骨を摘出して同固定液にて浸漬固定を行った。その後、5%または 10%EDTA にて脱灰を行い、それぞれ通法にてエポキシ樹脂ならびにパラフィンに包埋した。その他の試料は、液体窒素にて凍結し total RNA の抽出および RT-PCR 解析を行うと共に、ジメチルホルムアミドにて脱水後、グリコールメタクリレート(GMA)に包埋し超薄切片を作製した。パラフィン切片における組織化学として、アルカリフォスファターゼ(ALP)と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)の二重染色、dentin matrix protein (DMP)-1、基質グラ蛋白(MGP)、オステオカルシン(OCN)、オステオポンチン(OPN)および E11 の免疫染色を行うとともに、DMP1 と E11 の二重蛍光染色を行った。また、GMA 切片での immuno-gold 法を用いた DMP-1 の免疫電顕ならびに光学顕微鏡レベルにおける銀増感法を行った。石灰化については、未脱灰標本のエポキシ樹脂を用いて透過型電子顕微鏡観察を行うと共に von Kossa 染色を行った。また、OCN, MGP, DMP-1 陽性骨細胞の割合を統計学的に解析した。

kl/kl マウスの石灰化骨基質を von Kossa 染色と透過型電子顕微鏡観察を行うと、高リン・高カルシウム血症にもかかわらず、広範な未石灰化骨基質が認められた。ところが、未石灰化骨基質における骨細胞は逆に石灰化していること、また、骨表面上のいくつかの細胞周囲が石灰化構造物で囲まれていることが明らかにされた。*kl/kl* マウスの未石灰化骨基質は活性型骨芽細胞直下で観察されることから、未石灰化骨基質は骨形成の段階ではなく、骨形成後の石灰化ミネラルの流出で生じたものと推測された。そこで、石灰化結晶の Ca²⁺ と結合を示すことが知られている骨基質蛋白、すなわち、OCN, OPN, MGP, DMP-1 の局在を免疫

組織化学的に検索した。その結果、野生型マウスの脛骨では、OCN は骨基質に均一に局在したが、*kl/kl* マウスの脛骨では、骨細胞とセメントラインに強陽性反応を認めたが、骨基質全体における反応は低下しており、RT-PCR によっても OCN 発現の低下が確認された。MGP は、野生型マウスの骨端部の骨基質と軟骨基質との間など異種の基質間に局在したが、*kl/kl* マウスでは骨表面上の細胞の一部に陽性反応が観察された。DMP-1 は、野生型マウスの骨小腔や骨細管に一致した局在を示したのに対し、*kl/kl* マウスでは、骨細胞ならびに骨表面上のいくつかの細胞周囲が DMP-1 強陽性反応を示した。一方で、OPN の局在は両者マウス間で差は見られなかった。そこで、最も局在に変化が認められた DMP-1 の微細局在を免疫電顕観察すると、骨細胞の周囲を取り巻く石灰化構造物に一致して過剰な DMP-1 の集積が認められること、また、骨基質上の細胞を取り囲む石灰化構造物に多量の DMP-1 の蓄積が観察された。DMP-1 が強力に結晶 Ca^{2+} と結合することから、骨細胞や骨表面上のいくつかの細胞が DMP-1 を過剰産生することで、石灰化が誘導されたものと推測された。さらに、骨細胞初期のマーカーである E11 と DMP-1 の二重染色の結果、*klotho* 欠損環境では、骨芽細胞から骨細胞へ早熟な細胞分化が誘導されていることが強く示唆された。

これまで、*klotho* 欠損による異常は *klotho*/FGF23 軸破綻による高リン血症で説明されてきた。しかしながら、*kl/kl* マウスは高リン・高カルシウム血症であるにも関わらず未石灰化骨基質を示すことから、むしろ、骨細胞の機能異常、特に、DMP-1 産生という一部の機能のみが亢進してしまった局所的異常が推測された。つまり、 Ca^{2+} に対する親和性の高い DMP-1 が骨小腔や骨細管に集積した場合、その場に石灰化沈着を誘導すると考えられた。以前の報告により、骨細胞・骨細管系は骨基質ミネラルの維持に機能する可能性が高く、それを踏まえると、骨細胞から過剰に産生された DMP-1 によって自身が石灰化し、強いては細胞崩壊を生じることで周囲の骨基質ミネラルの消失に繋がった可能性が推測された。DMP-1 の異常発現の原因として、*klotho* 欠損による骨芽細胞の早熟な骨細胞への分化が考えられた。つまり、*klotho* 欠損状態では骨芽細胞が骨細胞への早熟な分化、しかし、全ての細胞機能ではなく、DMP-1 をはじめとする一部の基質産生のみが亢進してしまったために、このような結果を生じたものと推察している。このことは、*klotho* は全身的なリン濃度調節だけではなく、局所的作用も有すると思われる。

以上から、*klotho* 欠損環境で高リン血症になっても骨基質石灰化は、骨細胞・骨細管系という細胞性ネットワークにより維持されていること、また、*klotho* の作用機序として、FGF23/*klotho* 軸による血中リン濃度調節だけでなく、骨芽細胞から骨細胞へ細胞分化において重要な役割を果たすことが強く示唆された。

引き続き論文内容及び関連事項について、以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

- (1) *kl/kl* マウスにおいて腎臓をはじめとする他臓器の石灰化の有無について
- (2) 骨組織における *klotho* と FGFR1c の発現について
- (3) 血中リン濃度が亢進する透析患者における骨組織の動態について
- (4) ALP/TRAP などの多重染色の手法について
- (5) 骨細胞周囲の不定形構造物と石灰化における微細構造学的関連性について
- (6) 骨細胞・骨細管系による骨基質石灰化維持の分子細胞学的メカニズムについて

この結果は、全身性疾患における歯科医学・歯科治療を鑑みたときに、重要な基礎科学的情報を提供しており、学術的にも高く評価されたと考えられた。加えて、上記の質疑応答から、申請者は本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認めた。