

論文の内容の要旨

論文題目 リンの骨芽細胞に及ぼす影響

氏名 岡本 剛明

骨組織は、骨吸収と骨形成を繰り返す骨リモデリングにより、周囲の環境に対して最適な構造を維持しており、骨吸収は破骨細胞によって、また骨形成は骨芽細胞により担われている。これらの細胞は、全身性因子である副甲状腺ホルモンなどのホルモンに加え、サイトカインや接着分子を介した細胞間の種々のシグナル伝達によって連絡と協調を行い、分化・生存・活性化の調節をしている。一方、加齢やホルモンバランスの異常、ミネラル代謝異常といった様々な要因により、骨に存在する細胞の機能が変化し、骨リモデリングの動的平衡が崩れる事によって多くの骨疾患が引き起こされる。

こうした疾患の一つに、慢性腎臓病に認められる骨ミネラル代謝異常がある。近年慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常が、異所性石灰化を含む全身性疾患としてとらえ直された。また慢性腎臓病患者では、骨吸収に比し骨形成が抑制されていることが

示されていた。一方慢性腎臓病では、糸球体濾過量の低下により高リン血症が惹起され、高リン血症は異所性石灰化を促進するばかりではなく、血管平滑筋を骨芽細胞様細胞に分化させることによっても血管石灰化の原因となり、**chronic kidney disease (CKD)** 患者の死因のリスクファクターであることも報告されている。従って高リン血症は、二次性副甲状腺機能亢進症の原因であるばかりではなく、特に血管平滑筋では自らシグナル分子として作用することが報告されている。このシグナリング分子としてのリンの作用機序として、リンは血管内皮細胞で活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)産生を惹起するとともに、軟骨細胞などでは細胞の分化や増殖などを制御するシグナル伝達分子である **extracellular signal-regulated kinase (ERK)** のリン酸化を惹起することが分かってきた。ROS とは酸素分子 (O_2) に由来する反応性の高い分子群のことで、スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2) やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) などがある。シグナル伝達において、ROS は重要な役割を担うことが近年明らかになっており、ROS が骨細胞の分化や遺伝子発現といった骨代謝に影響を及ぼすことが示されていた。そこで、慢性腎臓病患者の骨代謝異常の発症におけるリンの作用、リンの骨芽細胞や骨形成に対する効果を明らかにすることを目的に、以下の検討を行った。

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞は、**bone morphogenetic protein 2 (BMP2)** に反応してアルカリホスファターゼ (ALP) などの骨芽細胞分化マーカーを発現する事が報告されており、骨芽細胞分化のモデル細胞として頻用されている。本細胞にリン酸 Na バッファーを添加することにより、4-ニトロブルーテトラゾリウムクロライド (NBT) アッセイ法で評価した **reactive oxygen species (ROS)** 産生が有意に上昇する事が明らかとなった。この ROS 産生の上昇は硫酸 Na では認められなかったことから、リンに特異的なものと考えられた。またリンによる ROS 産生の促進はナトリウム-リン共輸送体阻害剤である **foscarnet** により抑制されたことから、リンが細胞内に流入することにより惹起されるものと考えられた。ROS 産生の主な経路としては、

xanthine oxidase、ミトコンドリア、および NADPH oxidase が知られている。そこでリンにより ROS 産生に及ぼすこれらの経路の阻害剤の効果を検討した。その結果、NADPH oxidase の阻害剤である diphenyliodonium (DPI) と apocynin により、リンによる ROS 産生促進が抑制されることが明らかとなった。さらに NADPH oxidase には、いくつかの分子が存在することが知られている。このうち MC3T3-E1 細胞において発現が確認されている NADPH oxidase 1, NADPH oxidase 4 の siRNA を導入することにより、リンによる ROS 産生が抑制された。従ってリンは、NADPH oxidase を介して ROS 産生を促進することが明らかとなった。

そこでさらにこのリンの ROS 産生が、骨芽細胞分化に及ぼす効果を検討した。MC3T3-E1 細胞を BMP2 で骨芽細胞分化を誘導し、同時にリンと培養することにより、リンは BMP2 誘導性 ALP 活性の上昇を抑制することが明らかとなった。また代表的な ROS の一つである過酸化水素 (H_2O_2) も、同様に BMP2 誘導性 ALP 活性の上昇を抑制した。一方、硫酸 Na は BMP2 誘導性 ALP 活性を変化させなかった。さらにリンは、骨芽細胞に必須の転写因子である runt-related gene 2 (Runx2) や ALP、および骨芽細胞の後期分化マーカーであるオステオカルシンの発現を低下させることが、real-time PCR により認められた。更にリンによる BMP2 誘導性 ALP 活性促進の抑制は、NADPH oxidase の阻害剤である apocynin で解除されることが明らかとなった。従って、リンは血管平滑筋細胞を骨芽細胞様細胞に分化させ血管石灰化を促進するのとは対照的に、骨芽細胞様細胞においては、骨芽細胞への分化を抑制するという逆の作用を示すことになる。

酸化ストレスの増大やリンによるシグナル伝達に、NADPH oxidase 以外に ERK のリン酸化を介した経路が存在する、あるいは NADPH oxidase が ERK のリン酸化を介して酸化ストレスの増大を招き骨芽細胞分化が阻害される可能性が示唆されていた。

本検討でも、リンにより ERK のリン酸化が惹起されることが確認された。しかし ERK をリン酸化して活性化を引き起こす MAPK/ERK kinase (MEK) の選択的阻害剤である PD98059 では、リンによる ALP 活性抑制は完全には解除されなかった。従って、リンは骨芽細胞においても複数の細胞内情報伝達系を活性化するものの、骨芽細胞分化に対しては主に ROS 産生を介して抑制的に作用するものと考えられた。

以上マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 において、リンは NADPH oxidase を介して ROS 産生を促進し、骨芽細胞分化に抑制的に作用することが明らかとなった。今後は *in vivo* においても、このリンによる作用が認められるかどうかについて、検討を進める必要がある。