

カルシウム、リン酸の感知メカニズム ～Tspan8 ノックアウトマウスの表現型を解析する

伊村 明浩

京都大学医学部附属病院血液腫瘍内科

概要 (背景, 目的) ほ乳類のカルシウムイオン濃度に対する恒常性は体液塩類のうち最も頑強である。生体の Ca イオン濃度は 1.25 mM で、上下幅 5% でタイトに調節されていることは良く知られている。細胞内外の 10^4 の Ca イオン濃度差が活動電位の源であるので、厳密でなければならない、と考えられているが、その理解でよいのか、またそれを担保するメカニズムは、完全に判っているとは言えない。Ca センサー分子としては、カルシウム受容体 (CaR) がよく知られている (Nature93)。CaR は体液 Ca イオンに応答して副甲状腺ホルモン (PTH) 分泌を抑制する GPCR センサーである。ところが、カエル卵細胞で再構成された CaR 単分子の感度は約 4 倍の 5 mM であった (JBC95) ことから、CaR 分子のみで制御されているという理解は不十分であることが推測される。

そこで、Ca 感知システムにおいて CaR を補完する機構があるのではないかと考えて、副甲状腺の細胞内構造を詳細に調べた所、CaR が凝縮している小胞様構造を発見し、その構成要素の一つが Tspan8 であると判明した。

(方法) Tspan8-KO マウスを作製し、表現型を解析した。

(結果) Tspan8 は、主に腎臓、腸管に発現している。そこで、KO マウスについて、血清生化学、副甲状腺/骨/腸/尿細管の組織形態学、腎機能を解析した。まず、副甲状腺の形態を調べたところ、細胞内小胞の膨大化が起きていた。加えて、骨密度と骨量の低下、クレアチニンクリアランスと再吸収率は正常ながら尿量が増加し、Ca, Mg の排泄量が増加していた。その原因を理解するため、尿細管の微細形態を解析したところ、集合管ないしヘンレループの細胞内小胞のサイズが増大していた。現在、副甲状腺、尿細管、腸管上皮の細胞機能を解析中である。本研究では、Tspan8 分子に着目する事で、CaR が機能する場 (小胞様構造) の解析を行い、「生体カルシウムおよびリン酸の感知、調節」の理解を目指す。

1. はじめに

応募者は鍋島らが樹立した alpha Klotho マウスのミネラル代謝、特に副甲状腺のカルシウム (Ca) 感知に興味をもち、Ca 受容体 (CaR) を含めた Ca 感知機構を研究してきた (1-4)。一般に、体液の Ca イオン濃度は 1.25 mM である。Ca は体液組成中、最も厳密な制御を受けており、5% 程度の上下幅で調節されている (5)。ところが培養細胞では、Ca 濃度はそれほど厳密である必要がないうえ、Oocyte に再構成された CaR の感度閾値は実際の体液の約 4 倍の 5 mM であった (6)。なぜこのような不整合が生まれるのだろうか。生体、特に副甲状腺細胞には、CaR 分子の補助分子や補助機構が存在するのではないだろうか？

この仮説を検証するため、応募者は副甲状腺細胞の微小構造を認識する抗体群を樹立し、形態的解析を行った。その結果、Mx118 というモノクローナル抗体が、CaR が凝縮されている小胞様構造物を認識していた (図 1, 2)。副甲状腺細胞内の特殊な小胞に CaR が集中して存在している事が示唆され、その特性はミネラル研究の対象になりうると考えられた。MX118 抗体は、腎臓でも遠位尿細管を中心に、ヘンレループ、集合管に染色陽性であった (図 3)。MX118 抗体を用いて小胞まるごとの精製を実施し (図 4)、構成成分を MSpec で解析した。これにより Tspan8 が抗原である事が判明した (7,8)。Tspan8 は 4 回膜貫通型の膜

分子で, GWAS で二型糖尿病, 双極型精神病への関与が示唆されている。しかし, 生理的な機能はよく判っていない⁽⁹⁻¹⁵⁾。本研究者は, Mx118 抗体を用いて解析した結果, 次のような予備情報が得られた。

1) Tspan8 により構成される数百ナノメートル径の小胞が, 副甲状腺に存在する。その他, 腎臓尿細管, 肺, 腸管上皮, 骨細胞に存在し, それぞれサイズと構成成分が少々異なる。一方, 肝臓, 血管, 心臓, 筋肉には発現していない。従って, Tspan8 遺伝子発現の分布は, ミ

ネラル代謝に関わる臓器に偏っているとも考えられる。

2) 副甲状腺において, Tspan8 小胞は PTH 顆粒とは区別できるが, CaR 分子の分布とほぼ一致する(図 2)。これは, 副甲状腺における体液 Ca 感知が, この小胞で行われる可能性を示唆する。最近, CaR のような GPCR はエンドサイトーシスにより細胞内の小胞に入り, 細胞内の小胞膜上で活性を持つ, という仮説が提唱されており(Kobilka, 2012), 応募者の知見は「GPCR エンドサイトーシス小胞」に一致する可能性がある。

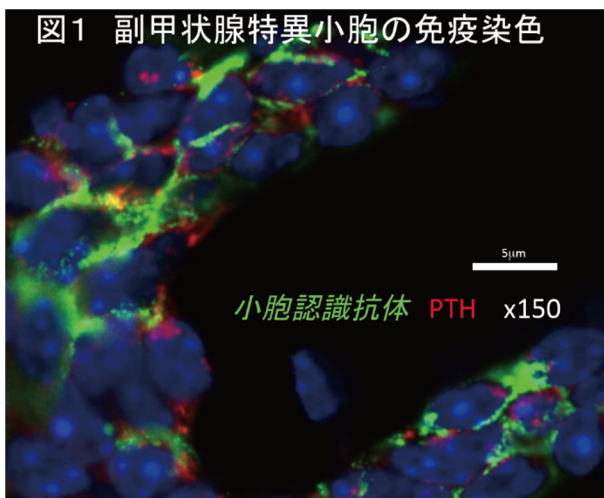


図 1. マウス副甲状腺の免疫染色。緑色=Mx118 抗原, 赤色=PTH 顆粒

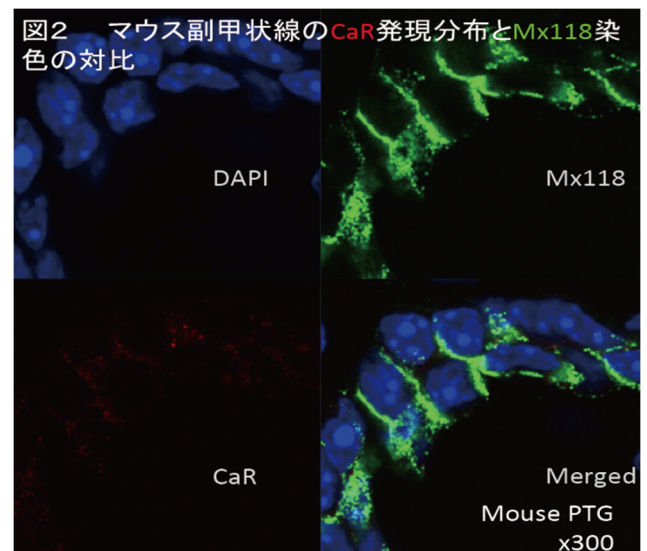


図 2. マウス副甲状腺の免疫染色。緑色=Mx118 抗原, 赤色=CaR

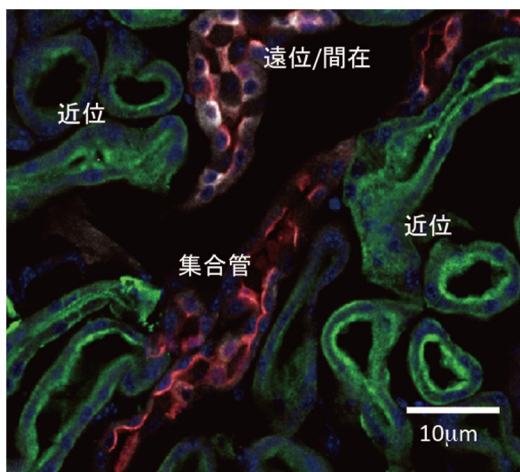


図 3. マウス腎臓免疫組織染色
AQ1 Mx118 αKlotho x20

図 3. マウス腎臓の免疫染色
緑色=AQP1 抗原(近位尿細管), 赤色=Mx118 抗原, 白色=クロソール(遠位尿細管)

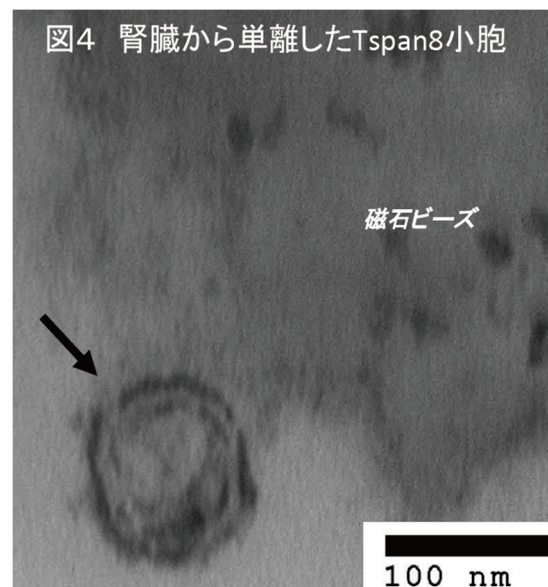


図 4. Mx118 を用いて腎臓から精製した細胞内構造の電子顕微鏡像(小胞様)

2. 研究・実験方法

2.1 実験動物ならびに飼育条件

日本 SLC より C57/B6J 雄マウスを購入し、本研究施設の規定に従って飼育した。また Tspan8 遺伝子改変マウスは、理化学研究所 CDB および京都大学医学研究科附属動物実験施設の規定に基づいて飼育の上、実験、観察に供した。

2.2 マウス生理学解析

Tspan8-KOM を用いて、次の解析を行ない、ミネラル代謝を理解する。

- i. 肉眼的所見
- ii. 血清生化学的検討
- iii. 組織学解剖学的解析
- iv. 骨形成、骨密度を形態、DXA法、マイクロCTの方法で検討する
- v. 24時間蓄尿により、Ca/Creatininを算出し、Caイオンの再吸収効率を概算する

3. 結果

i. 肉眼的所見

Tspan8がミネラル代謝に関与する可能性を検討するため、Tspan8-KOマウスを観察した。体重は対照群より僅かに少なかった。しかし、総体としてほぼ健康に見え、繁殖可能であった。

ii. 血液検査の結果、Ca, Mg, Piの異常値は検出されな

かった。

iii. 組織学解剖学的解析

〈骨〉マイクロCTの方法で検討すると、骨頭のサイズがやや小型であり、構造がやや粗鬆になっていることが判った(図5)。また、DXA法にて、骨密度が1割程度低下していた(図6)。これは、Champyらにより報告されたTspan8-KOマウスの表現型と同一であるので、再現性をもって観察できたことになる⁽¹³⁾。

iv. 血清ミネラル代謝には異常が見られず、形態学上の表現型としては骨だけに異常が見られた。なぜ骨に表現型がみられるのであろうか？これは、Tspan8が発現している部位である、腸管吸収か尿細管排泄に問題があるのではないかと想像されるので、まず腎臓に着目して、尿の解析を行った。

ノックアウトマウス2系統(EKO1, EKO2: n=4, 4)とリットー野生型(n=4)の比較を実施した結果、Ca/Cre比は優位差がつかなかったが、KOマウス2系統の尿量は多く、結果として一日Ca排泄量は2倍以上であった(図7, 8)。一日排泄量の差はNaにはみられず、タンパク質の漏出も観察されなかった。Tspan8が発現している尿細管のセグメントを考慮すると、Tspan8はカルシウムの調節性再吸収に関与しているのではないかと想定される。この検討により、尿細管再吸収の表現型が見いだされたものの、骨の表現型は腎臓だけが原因であるかどうかは不明である。

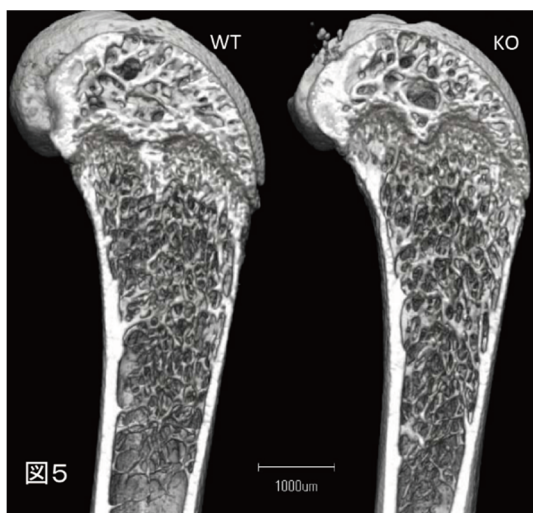


図5. 野生型およびTspan8ノックアウトマウスの大腿骨のマイクロCT像

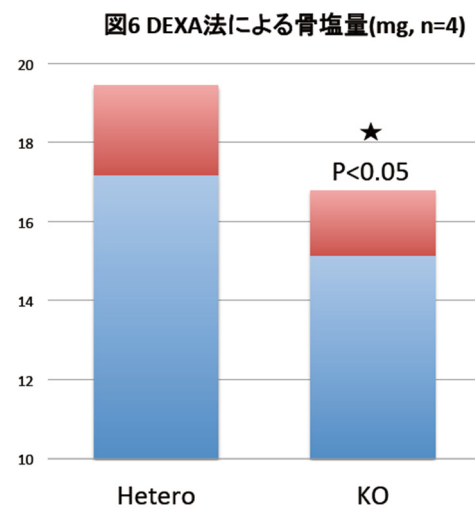


図6. 野生型およびTspan8ノックアウトマウスの大腿骨をDEXA法で解析し骨塩量を定量した結果

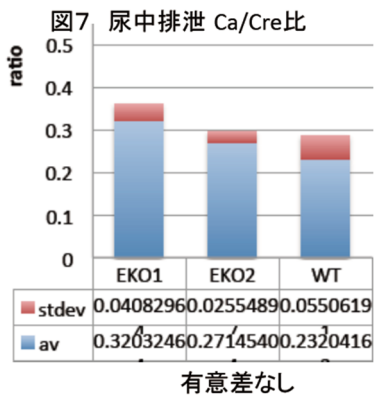


図7. 野生型およびTspan8ノックアウトマウスの1日尿を蓄積し, Ca, Creを計測して比を取った比較

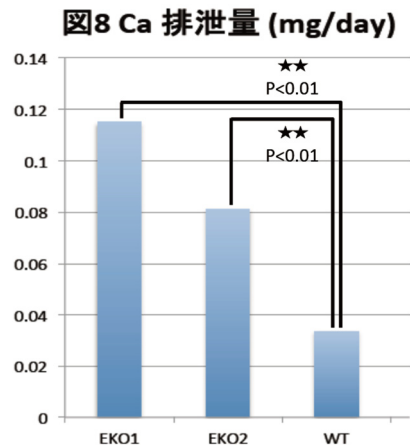


図8. 一日当たりのCa排泄量の比較

v. 電子顕微鏡的解析

＜副甲状腺＞TEM解析にて, 野生型に比べて, KOマウスでは細胞内部の小胞の膨大化が認められた(図9)。

＜尿細管＞ヘンレループのTEM観察において, KOマウスでは細胞内の小胞が膨大化していることが見いだされた(図10)。

＜腸管上皮＞空腸の絨毛細胞の分析で, 輸送小胞と思われるベンクルがノックアウトマウスにて膨大化していることが見いだされた(図11)。

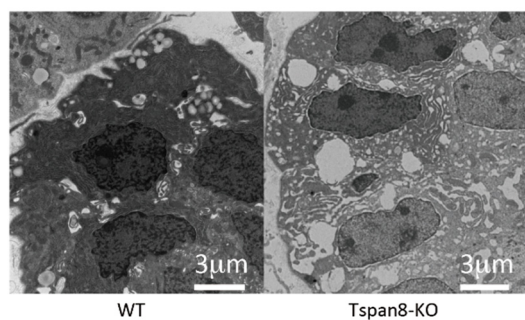


図9. 野生型および Tspan8 ノックアウトマウスの副甲状腺を電子顕微鏡 TEM で解析した

4. 考察

Tspan8は, おもに腸管上皮細胞, 尿細管上皮細胞に加え, 肺や神経細胞に発現している4回膜貫通分子である。この分子は, 抗体で精製して来ると細胞内小胞の形態として得られるので, 100~200 nm 直径の小胞の構成成分なのではないかと考えられた。しかしノックアウトマウスを作製して解析した結果は, 少々体重が低い以外の表現型は外見上見いだせず, 繁殖も正常であった。さらに詳細に調べると, 尿量が多いために, ミネラル(Ca)の漏出がおおく, 骨頭の形成に障害があり, 骨密度が低い事が判った(14,15)。これは, 入って来る量よりも出て行く量が多いので, 個体のミネラルバランスが崩れていて, 骨量骨密度に差が出るのではないかと想像された。ミネラルバランス不調の原因を調べるため, 尿細管細胞, 腸管上皮細胞の電子顕微鏡的解析を行った。これらの上皮は吸収, ないし再吸収を行う細胞なので, 小胞の多くは, 輸送小胞ではないかと考えられる。それらのサイズが膨大化しており, また異常な並び方である事が判明した。すなわち, Tspan8は細

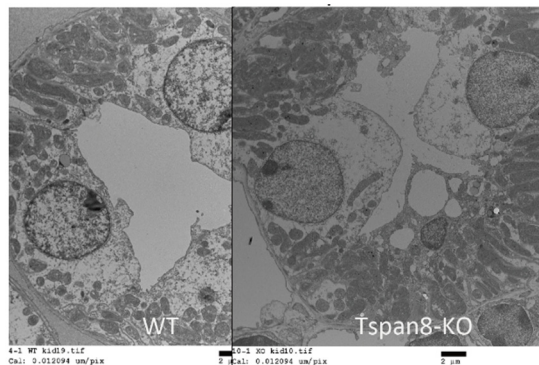


図10. 野生型および Tspan8 ノックアウトマウスの尿細管ヘンレループ上皮細胞を電子顕微鏡 TEM で解析した

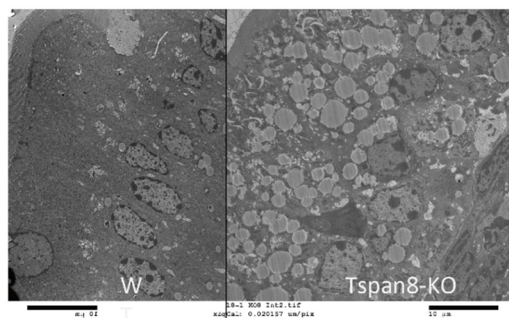


図11. 野生型および Tspan8 ノックアウトマウスの空腸上皮細胞を電子顕微鏡 TEM で解析した

胞内小胞の構成成分として、小胞の形成や輸送能力に大きな役割を果たしていることが想定された。また、これらの細胞学的な問題が、ミネラル代謝に対して直接的な影響となって出やすいということが想像された。

謝 辞

本研究は、公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団研究助成の援助を受けて実施したものであり、この場を借りて深く御礼申し上げます。

参考文献

1. alpha-Klotho as a regulator of calcium homeostasis. Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, Obuse C, Togashi K, Tominaga M, Kita N, Tomiyama K, Iijima J, Nabeshima Y, Fujioka M, Asato R, Tanaka S, Kojima K, Ito J, Nozaki K, Hashimoto N, Ito T, Nishio T, Uchiyama T, Fujimori T, Nabeshima Y. *Science*. 2007 Jun 15; 316(5831):1615-8
2. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. *Nature*. 2006 Dec 7; 444(7120):770-4.
3. alpha-Klotho: a regulator that integrates calcium homeostasis. Nabeshima Y, Imura A. *Am J Nephrol*. 2008; 28(3):455-64.
4. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, Honjo H, Tsujikawa H, Yasui K, Lee JK, Kamiya K, Kitaichi K, Yamamoto K, Ito M, Kondo T, Iino S, Inden Y, Hirai M, Murohara T, Kodama I, Nabeshima Y. *Circulation*. 2004 Apr 13; 109(14):1776-82.
5. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs. Garrett JE, Capuano IV, Hammerland LG, Hung BC, Brown EM, Hebert SC, Nemeth EF, Fuller F. *J Biol Chem*. 1995 May 26; 270(21):12919-25. PMID: 7759551
6. Cloning and characterization of an extracellular Ca (2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. *Nature*. 1993 Dec 9; 366(6455): 575-80. PMID: 8255296
7. A direct effect in vitro of phosphate on PTH release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Vol 11, 9, Pp. 1762, 2007
8. Generation of specific monoclonal antibodies against the extracellular loops of human claudin-3 by immunizing mice with target-expressing cells. Ando H, Suzuki M, Kato-Nakano M, Kawamoto S, Misaka H, Kimoto N, Furuya A, Nakamura K. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015; 79 (8): 1272-9. doi: 10. 1080/09168451. 2015. 1018124.
9. Kidney Diseases Enhance Expression of Tetraspanin-8: A Possible Protective Effect against Tubular Injury. Hirukawa T, Wu Q, Sawada K, Matsusaka T, Saka S, Oka A, Hirawa N, Umemura S, Kakuta T, Endoh M, Inoko H, Ichikawa I, Fukagawa M. *Nephron Extra*. 2014 Apr 30; 4(1):70-81. doi: 10.1159/000362451.
10. Tetraspanins CD81 and CD82 facilitate $\alpha\beta 1$ -mediated adhesion of human erythroblasts to vascular cell adhesion molecule-1. Spring FA, Griffiths RE, Mankelov TJ, Agnew C, Parsons SF, Chasis JA, Anstee DJ. *PLoS One*. 2013 May 21; 8(5):e62654. doi: 10.1371/journal.pone. 0062654.
11. Tspan8, CD44v6 and alpha6beta4 are biomarkers of migrating pancreatic cancer-initiating cells. Wang H, Rana S, Giese N, Büchler MW, Zöller M. *Int J Cancer*. 2013 Jul 15; 133(2):416-26. doi: 10.1002/ijc.28044.
12. TM4SF3 promotes esophageal carcinoma metastasis via upregulating ADAM12m expression. Zhou Z, Ran YL, Hu H, Pan J, Li ZF, Chen LZ, Sun LC, Peng L, Zhao XL, Yu L, Sun LX, Yang ZH. *Clin Exp Metastasis*. 2008; 25(5):537-48. doi: 10.1007/s10585-008-9168-0.
13. Tetraspanins as regulators of protein trafficking. Berditchevski F, Odintsova E. *Traffic*. 2007 Feb; 8(2):89-96.
14. Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced

membrane fusion. Gordón-Alonso M, Yañez-Mó M, Barreiro O, Alvarez S, Muñoz-Fernández MA, Valenzuela-Fernández A, Sánchez-Madrid F. *J Immunol*. 2006 Oct 15; 177(8):5129-37. PMID: 17015697

15. Reduced body weight in male Tspan8-deficient mice. Champy MF, Le Voci L, Selloum M, Peterson LB, Cumiskey AM, Blom D. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Apr; 35(4):605-17. doi: 10.1038/ijo.2010.165.

Study of Mineral Sensor System: Phenotype of Tspan8-KO Mice

Akihiro Imura

Kyoto University Hospital

Summary

Calcium-sensing receptor (CaR) can make ionic regulation by sensing serum minerals. We have found that CaR is aggregated in a vesicle of parathyroid chief cells of mice. Then we analyzed the components of the vesicle and found that Tspan8 would be an important part. To elucidate influence of Tspan8 in Ca sensing mechanism, we decided to make Tspan8-knockout mice and study the phenotype including morphology.

Bone mineral density was 10% decreased and bone head of femur was relatively small compared with that of wild type mice. Ca excretion in urine was significantly increased. This was estimated as a cause of bone mineral density loss. In addition, transporting vesicles were enlarged, in both intestinal villus and tubular cells. These findings led us hypothesize that Tspan8 should play an important for vesicle plasticity in cells. Due to lacking Tspan8, mineral maintenance were impaired through malfunction of intracellular vesicle, resulting in a plenty loss of bone mineral salt. In conclusion, Tspan8 is essential for maintenance of mineral ions. CaR might make sense of mineral ion concentration in the fluid of intravesicular space where is closed by Tspan8-derived membrane.