

RANKL-OPG バランスによるカルシウム代謝制御機構の解明

木村 俊介, 武藤 麻未

北海道大学大学院医学研究科組織細胞学分野

概要 [目的] 骨からのカルシウム放出は体内のカルシウムバランスを保つために生体が備えるシステムの一つである。骨表面に存在する破骨細胞は骨組織を分解しカルシウムを血中へと放出する役割を持つ。Osteoprotegerin (OPG) は破骨細胞の活性を促進する RANKL-RANK シグナルを抑制する分子である。骨吸収は RANKL と OPG のバランスによって制御され、カルシウム代謝にも貢献すると考えられている。臨床的には腎障害において血中 OPG が上昇することが報告されている。OPG の産生制御については骨芽細胞が副甲状腺ホルモン(PTH)の刺激を受け、OPG の分泌を抑制すること、女性ホルモンのエストロゲンが OPG 産生を増加させることが報告されている。一方で、他の器官・組織における OPG の発現分布と産生制御機構の解析は進んでいない。本研究では腸管を解析対象とし OPG の発現分布と発現細胞の同定を行い、産生制御機構を明らかにすることを目的とした。

[方法] BALB/c系統のマウスから腸管を回収し、免疫組織化学によってOPGの発現分布の解析を行った。OPG陽性細胞はその腸組織分布と形態から、細胞を予測し細胞特異的マーカー分子との2重染色を行うことで細胞系統の同定をした。続いて、虚血再還流による急性腎障害モデルを同系統のマウスを用いて作製し、24時間後に血中OPGの濃度をELISA法によって計測した。同時に、腸管を採取し腸上皮と筋層に分離した後に腸上皮におけるOPG mRNA量を、定量的PCR法を用いて解析した。ホルモンの影響を調べるために、副甲状腺ホルモン(PTH1-34)とエストロゲンをマウスの腹腔内に投与し、同様に血中OPG濃度と腸上皮におけるOPG mRNA量を測定した。

[結果] OPG発現細胞は腸の絨毛上皮に点在していた。この細胞はその形態的特徴と分布そして、Chromogranin Aと共局在を示したことから、腸内分泌細胞であると考えられた。OPG陽性となる超内分泌細胞は十二指腸から結腸までの腸上皮に広く分布していた。腸上皮のOPG産生量は急性腎障害モデルによって上昇傾向を示した。PTHの投与では血中OPGの低下が認められたものの、腸上皮OPG発現量には変化が認められなかった。エストロゲンの投与では血中OPG濃度の低下と腸上皮OPG発現量に優位な低下が認められた。

[結論] 腸管からのOPG産生が腎障害とエストロゲン投与における血中OPG濃度の変動に寄与している可能性が示唆された。

1. 緒言

オステオプロテゲリン(OPG)は破骨細胞の分化を促進するRANKL-RANKシグナルを阻害し、分化の抑制に働く蛋白質である。細胞外分泌蛋白質として産生されRANKの代わりにRANKLと結合することでシグナルの伝達を阻害する。RANKL-RANK-OPGによる骨代謝制御はカルシウム代謝においては副甲状腺ホルモン(PTH)の刺激を受け、骨からのカルシウムの放出を制御していると考えられ

ている。臨床的には腎不全患者の血中OPG濃度が高くなることが知られている⁽¹⁾。この時OPGは腎不全によって過剰に分泌されたPTHによる骨吸収を抑え骨からのカルシウム流出を防いでいると想定されているが、実証はされていない。

カルシウムは細胞内の情報伝達に関わり、細胞の基本的な機能に重要である。OPG欠損マウスは破骨細胞の分化が促進され、骨粗鬆症様の症状を呈する。骨は体内に

おけるカルシウムの貯蔵庫と考えられているが、OPG欠損マウスでは通常状態における血中カルシウム、リン濃度は正常値に維持されている。高リン食を与えた研究から、OPG欠損マウスでは腎臓によるカルシウム、リンの再吸収を促進させることで、結果的に血中濃度が保たれると推測されている⁽²⁾。つまり、生体における恒常的なOPG-RANKLバランスの乱れは、他のシステムで補完されることによって血中カルシウム、リン濃度は維持される。一方で、ヒトRANKLモノクローナル抗体の投与によってRANKLシグナルを人工的に抑制することが可能になっている。この抗体は骨病変の治療薬として既に使用され、低カルシウム血症を副作用として発症することも知られている。このように、人工的に引き起こされた短期的なRANKL-OPGバランスの乱れがカルシウム恒常性の乱れを引き起こす例が現実となっている。

近年の研究からRANKL-RANK-OPGが骨代謝だけではなく、免疫応答、上皮系細胞の分化など幅広い制御に関与することが明らかになりつつあることを考慮すれば⁽³⁾、骨組織だけではなく全身の他の組織におけるRANKL-RANK-OPGにおける発現部位の理解、そして、それぞれの部位における産生制御機構の解明は喫緊の課題である。

本研究では腸管上皮に存在する内分泌細胞である基底顆粒細胞にOPGが発現していることを見出した。表面積の広い腸上皮からのOPGの分泌は体内におけるカルシウム代謝へと及ぼす影響も大きいと想定される。本研究では腸管からのOPGの産生制御機構の理解を目的とし、病理的状态、ホルモン投与における血中OPGの変動と腸上皮におけるOPG発現量の計測を行った。

2. 方法

2.1 免疫組織染色

BALB/cCr Slc系統、8週令～12週令の雄マウスは三協ラボサービスから購入した。致死量のペントバルビタールナトリウム塩により深麻酔後、4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行った後に腸管を摘出した。その後8時間室温にて同様の固定液によって浸漬固定を行い、30%シュウクロスへと一晚4°Cにて置換した。続いてTissue-Tek OCTコンパウンド(サクラファインテック・ジャパン)へと包埋し、クライオミクローム(Leica CM3050)によって厚さ12

μmの薄切切片を作製し、予めゼラチンコートをしたスライドガラス上へと貼り付けて免疫組織用標本を作製した。

組織標本は乾燥後、PBSで洗浄しOCTコンパウンドを除去し、0.3% Triton-X 100により浸透処理を行い、続けて10%正常ロバ血清(JacksonImmuno Research)を室温で30分処理しブロッッキング処理をした。OPGに対する特異抗体としてanti-Osteoprotegerin antibody (R&D system; CatNo.AF459)、腸内分泌細胞のマーカーとして、anti-Chromogranin A antibody (Abcam; ab15160)をそれぞれPBSによって200倍(anti-Osteoprotegerin antibody)、800倍(anti-Chromogranin A antibody)に希釈し、室温16時間処理した。続いて二次抗体としてCy3標識anti-Goat IgG antibody、Cy5標識 anti-Rabbit antibody (JacksonImmuno Research)を室温にて2時間処理後、細胞核の染色をSYTOX Green (Thermo Fisher Scientific)によって行った。

免疫組織染色後の標本は共焦点顕微鏡システムFV300 (Olympus)によって観察、画像の取得を行った。OPGの免疫染色に関しては抗体の特異性を確認するために、OPG欠損マウスの組織切片を作製し同様に免疫組織染色を行った。

2.2 腎虚血再還流誘発性急性腎不全モデルマウスの作製

大阪薬科大学の高松らの報告⁽⁴⁾に従い虚血再還流誘発性腎不全モデルマウスの作製を行った。BALB/cCr Slc雄8週令マウスを用いて、フローセン(武田薬品)による吸入麻酔下にて右腎を摘出した。その後、10日～14日の回復期間を得た後に、再び麻酔下にて左腎を露出し、非外傷性クリップ(夏目製作所)を用いて左腎動静脈の血流を遮断し45分間虚血状態にした。その後、クリップを外し、血流を再開させ、縫合後、麻酔からの覚醒を待ち通常の飼育へと戻した。同様の施術条件下で虚血処理を行っていない実験群をコントロール群とした。

24時間後にマウスを安楽死後、左腎を摘出し組織切片の作製を行った。同時に腸管上皮と血液を採取し腸管上皮のOPG mRNA量と血中OPG濃度の測定を行った。

2.3 副甲状腺ホルモン、エストロゲンのマウスへの投与

ヒト副甲状腺ホルモン(PTH)フラグメント(1-34)、β-EstradiolはSigma Aldrich社から購入した。マウスはBALB/cCr Slc雄8週令マウスを用いた。PTH溶液は終濃

度10 µg/mLとなるようにPBSによって調製し40 µg/kgとなるようにマウスの腹腔内へと投与した。β-Estradiolはごま油へと溶解させ200 µg/Kgとなるようにマウスへと投与した。8時間後にマウスを安楽死させて、血液と腸管上皮の回収を行った。

2. 4 腸管上皮からのOPG mRNA量の定量

腸管上皮の分離は過去の文献に従って行った⁽⁵⁾。マウスの回腸を盲腸端から2 cm切除した後に、内容物を洗浄し、氷冷した30 mM EDTA/Hank's緩衝液へと入れ、10分間静置した。その後、実体顕微鏡下にて、脂肪組織、リンパ濾胞を除去し、注射針を用いて筋層から上皮の剥離を行った。剥離した上皮はHank's緩衝液にて洗浄した後に、遠心し余分なHank's緩衝液を除き、Trizol溶液(Thermo Fisher Scientific)を1 mL加えて、溶解後に全RNAの抽出を行った。RNAの抽出量を測定後、RevarTra Ace qPCR RT-PCR Kit(東洋紡ライフサイエンス)を用いて逆転写反応を行った。得られたcDNAを用いてKAPA SYBR Fast qPCR Kit(KAPA Biosystems)によりPCR反応を行い、RoterGene6000(Quiagen)装置を用いて定量的PCRを行った。

定量的PCRはGAPDHを内部標準遺伝子として用いた。各プライマー配列は次の通りである。

OPG mRNA (Tnfrsf11b),

Forward: ACCCAGAAACTGGTCATCAGC,

Reverse: CTGCAATACACACACTCATCACT, GAPDH,

Forward: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG,

Reverse: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA.

2. 5 ELISAによる血中OPG濃度の測定

回収した血液は4°Cに一晩静置した後に5,000x gによって遠心分離し血清を得た。血清はPBSによって10倍希釈し、ELISA法へと使用した。ELISAはMouse Osteoprotegerin/TNFRSF11B DuoSet ELISA (R&D systems)によって行い、ペルオキシダーゼ活性はELISA POD基質TMBキット(ナカライ)を用いて発色させ、プレートリーダーModel660(BioRad)によって計測した。

3. 結果

3. 1 腸管におけるOPG発現細胞の同定

マウス腸管の免疫組織染色では腸管上皮に散在してOPG陽性細胞が確認できた(図1)。腸管のOPG発現細胞

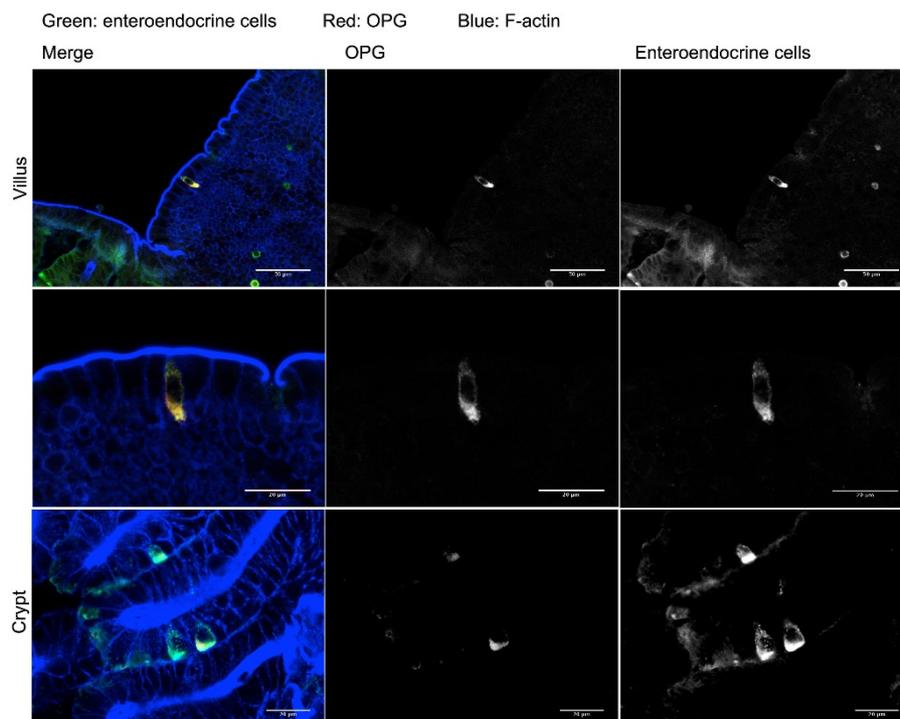


図1. 腸管上皮におけるOPGの発現。OPG抗体による免疫蛍光染色像。一番左の列は重ね合わせ画像を示す。赤がChromogranin A抗体による腸管内分泌細胞の染色。緑がOPGを示す。右側二列はOPGとChromogranin Aの蛍光画像を白黒で示した。Villusは腸絨毛部をCryptは腸陰窩部を示す。

は基底膜側が広く、管腔側が狭い、三角形の形状を持ち、腸陰窩部にも認められたことから、腸上皮に存在する内分泌細胞であると想定された。腸上皮内分泌細胞が発現するChromogranin A (ChgA)との二重染色を行ったところ、大部分が一致したことからOPGは腸上皮内分泌細胞が発現していると考えられた(図1)。OPG抗体の陽性反応はOPG欠損マウスでは認められなかったことから、この結果はOPGの正しい発現部位を反映しているものと考えられる(図2)。

3.2 消化器におけるOPG分泌細胞の分布

続いて胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸におけるOPG陽性細胞の分布を免疫組織染色によって解析した。その結果、OPG陽性となる腸内分泌細胞は十二

指腸から結腸まで認められた(データ未掲載)。

3.3 腎不全モデルマウスにおける血中OPG濃度の上昇と腸上皮OPG mRNA発現量の関係

慢性腎不全では血中OPG濃度の上昇が認められるが、その調節機構は不明である。従来、OPG産生細胞としては骨芽細胞における研究が中心である。腎不全モデルマウスを作成し、血中OPG濃度と腸上皮OPG発現量を測定した。

虚血再還流モデルマウスでは、再灌流後24時間で病理組織学的検討により著明な組織傷害が認められた。この時、有意な血中OPG濃度の上昇が認められた(図3A)。一方で腸上皮OPG mRNAは若干の上昇傾向が認められたものの、統計的な有意差は確認できなかった(図3B)。

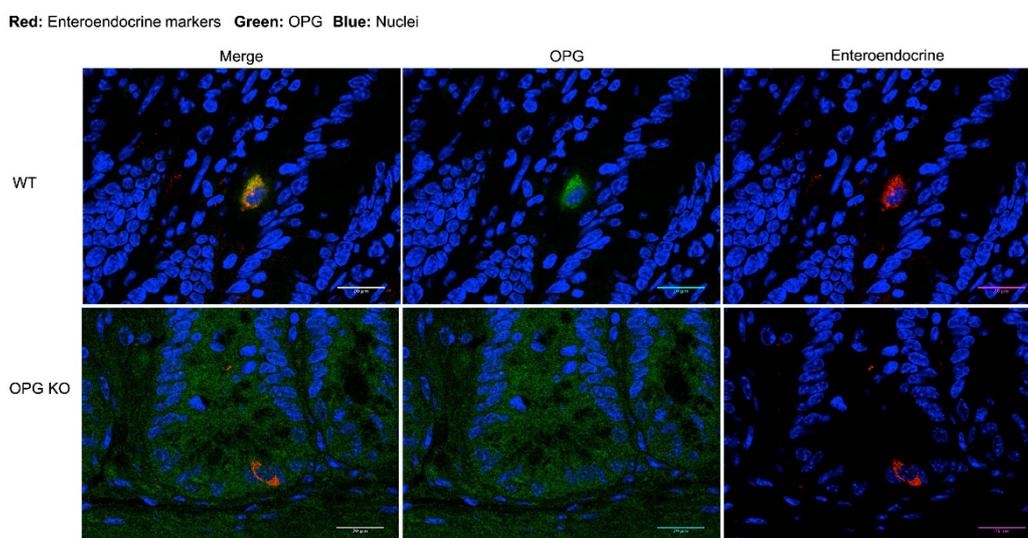


図2. OPG欠損マウスによる特異性の確認。上段が野生型マウスの腸管を示し、下段はOPG欠損マウスを示す。OPG欠損マウスの腸内分泌細胞ではOPGの反応が認められない。

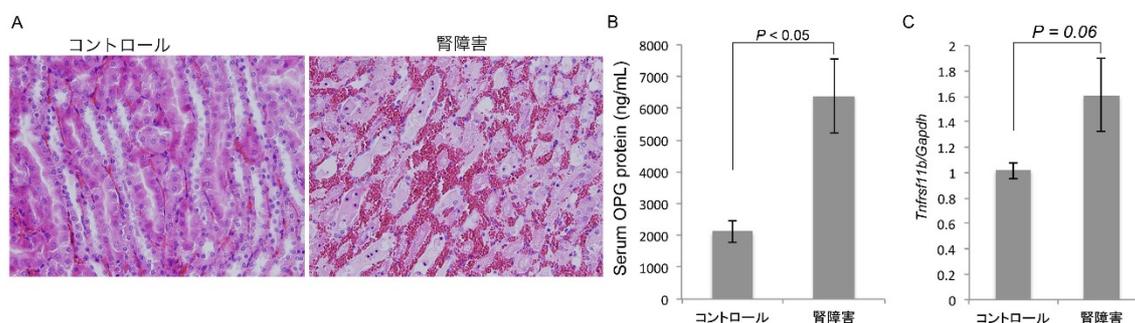


図3. 虚血再灌流による急性腎障害モデルマウスにおける血中OPG量と腸上皮OPG mRNAの変化

(A) 虚血再還流後の腎臓の組織像。尿細管上皮への著明な障害とうっ血が認められる。(B)ELISAによる血中OPG濃度の測定。3匹の平均値と平均誤差を示す。Pはt検定による有意差を示す。(C) 定量的PCR法によるmRNA量の解析。腸上皮を分離しRNAを回収し常法に従いcDNAを合成し定量的PCRに用いた。

3. 4 PTHによる腸上皮OPG発現量の変動

骨芽細胞へのPTHの処理はOPGの産生を抑制する⁽⁶⁾。腸上皮が発現するOPGの調節機構を明らかにするために、PTH投与したマウスから腸上皮を回収しOPG mRNAの定量解析を行った。その結果、マウスへのPTHの投与は投与後8時間での血中OPG濃度の低下を引き起こした。しかしながら、この時の腸上皮におけるOPG mRNA量にはほ

とんど差は認められなかった(図4)。

女性ホルモンのエストロゲンは骨芽細胞へのOPGの発現を促進することが報告されている⁽⁷⁾。同様に解析を行った結果、マウスへのエストロゲンの投与は血中OPG濃度の著明な低下を起し、腸上皮OPG mRNA量の有意な低下を引き起こしていた(図5)。

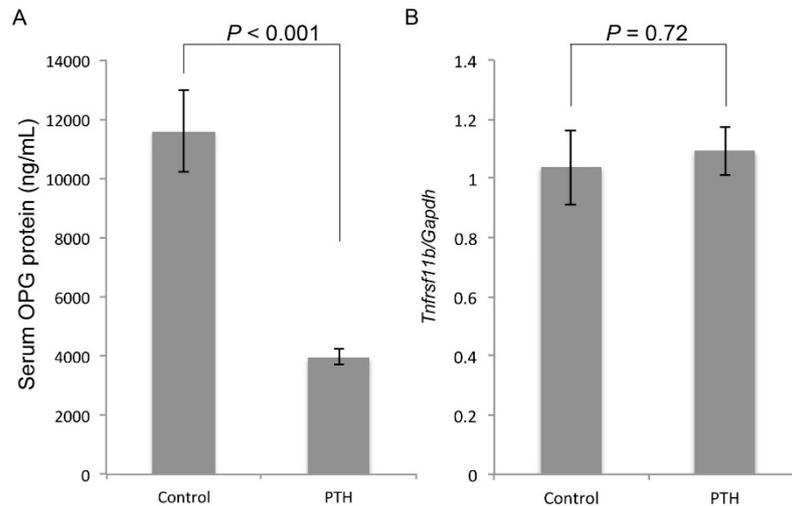


図4. PTH投与マウスにおける血中OPG量と腸上皮OPG mRNAの変化

(A) ELISAによる血中OPG濃度の測定。3匹の平均値と平均誤差を示す。Pはt検定による有意差を示す。(B) 定量的PCR法によるmRNA量の解析。腸上皮を分離しRNAを回収し常法に従いcDNAを合成し定量的PCRに用いた。

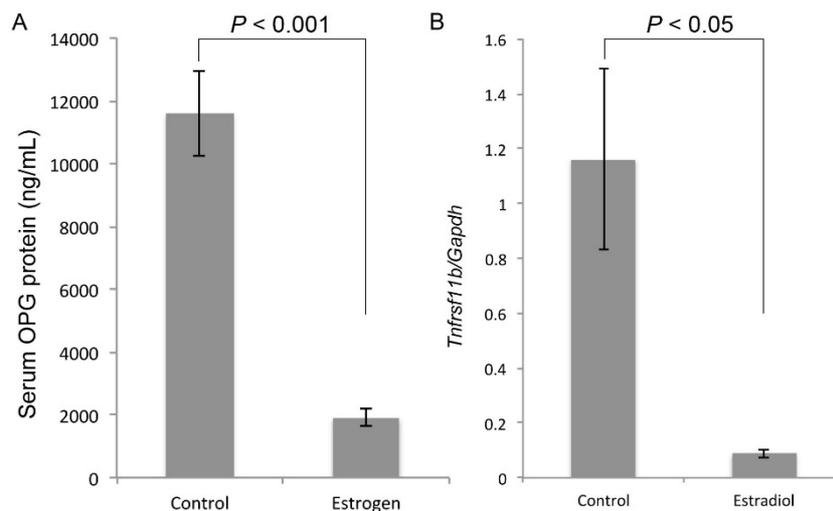


図5. エストロゲン投与マウスにおける血中OPG量と腸上皮OPG mRNAの変化

(A) ELISAによる血中OPG濃度の測定。3匹の平均値と平均誤差を示す。Pはt検定による有意差を示す。(B) 定量的PCR法によるmRNA量の解析。腸上皮を分離しRNAを回収し常法に従いcDNAを合成し定量的PCRに用いた。

4. 考 察

マウス腸内分泌細胞におけるOPGの発現は、腸上皮において骨代謝を制御する機構が存在することを示唆している。本研究では虚血再還流モデルマウスにおける血中OPG濃度の上昇と、それに伴う腸上皮におけるOPG mRNAの上昇傾向が認められた。これは、急性腎障害における血中OPG濃度の上昇に腸内分泌細胞が産生するOPGが寄与している可能性を示している。腎障害における血中OPG濃度の上昇は腎障害における臨床報告と一致する。しかしながら、腎障害におけるOPGの機能は不明であり、本研究モデルは良い研究モデルとなりうる可能性を持つ。

腸上皮におけるOPG産生制御機構を明らかにするための解析をおこなった。OPGの発現制御に関わることが知られているエストロゲンとPTHの効果を、マウスを用いて解析したところ、エストロゲンは短時間で血中OPG濃度の低下と腸上皮におけるOPG mRNA量の低下を引き起こした。一方でマウスへのPTHの投与は血中OPG濃度の上昇を引き起こすものの、腸上皮OPG mRNAには変化は認められなかったことから、腸上皮へのPTHの影響は少ないと考えられる。

女性の閉経などにおけるエストロゲン量の低下は骨代謝バランスを崩し、破骨細胞の活性化による骨吸収が進行する。本研究における雄マウスへの過剰量のエストロゲンの投与は短時間でOPGの低下を引き起こし、腸管上皮における顕著なmRNA量の低下を伴っていた。エストロゲン過剰やプロゲステロン低下によるエストロゲン・プロゲステロンのバランスの乱れはエストロゲン優位となり、骨代謝のバランスも崩れると言われている。その詳細は不明であるが、本研究における雄マウスへのエストロゲン過剰量投与によるOPG産生量の低下は、エストロゲン優位のモデルとなりうる可能性を示唆している。

5. 今後の課題

腎障害におけるOPGの血中濃度の上昇と血中カルシウム代謝、骨代謝における関係性には不明な点が多い。本研究で作成した虚血再灌流による急性腎障害を起こした動物モデルを用いることで、腎障害におけるOPG血中濃度の上昇に働く誘導因子を明らかにすることができると期待される。今後、OPG欠損マウスやRANKL投与モデルな

どと組み合わせることで、腎障害におけるRANKL-OPGバランスの関係性を明らかにしていくことが課題である。

エストロゲン投与によるOPG産生量への影響は引き続き詳細な条件の検証が必要である。腸上皮におけるエストロゲン受容体の発現分布の解析を進め、腸管上皮におけるエストロゲンの効果を明らかにしていく必要がある。

エストロゲンとPTHの効果は培養骨芽細胞を用いたこれまでの研究報告と、我々の腸上皮において結果が異なる。これは組織における反応性の違いであるとも考えられるが、実験対象が培養細胞とマウス個体と異なるため、慎重な検討が必要である。今後、腸内分泌細胞の培養細胞株を用いた研究と、マウス骨組織の解析が重要であると考えられる。培養細胞については広く用いられている腸上皮内分泌細胞株STC-1にはOPGの発現は認められなかった(データ未掲載)。今後、腸上皮幹細胞からのオルガノイド培養系などを用いて、腸上皮細胞におけるエストロゲンのOPGの産生制御機構について明らかにしていく。

今回エストロゲンの単回投与では8時間での効果を示したが、24時間後には血中OPG量は低下しているもののがかなり回復しており、腸管OPGのmRNA量はコントロールと変わらなかった。これはエストロゲンの血中安定性の影響もあると考えられる。今後エストロゲンチューブなどの体内への埋め込みなどで、長期的な影響を解析していく必要がある。

6. 参考文献

- [1] Kazama J, Shigematsu T, Yano K, Tsuda E, Miura M, Iwasaki Y, Kawaguchi Y, Gejyo F, Kurokawa K, & Fukagawa M.: Increased circulating levels of osteoclastogenesis inhibitory factor (osteoprotegerin) in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis.*, 39(3):525-32, 2002.
- [2] Kagami, S., Ohkido, I., Yokoyama, K., Shigematsu, T. & Hosoya, T. : Osteoprotegerin affects the responsiveness of fibroblast growth factor-23 to high oral phosphate intake. *Clin. Nephrol.*, 70:306-311, 2008.
- [3] Akiyama T, Shinzawa M, Akiyama N.: RANKL-RANK interaction in immune regulatory systems. *World J Orthop.* 3:142-50, 2012.

- [4] 高山 淳二, 高岡 昌徳, 松村 靖夫. :ラットおよびマウスにおける腎機能低下モデルの簡便な作製方法—急性および慢性腎不全モデル—. 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) .131: 37-42, 2008.
- [5] Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, Hase K, Kitamura H, Ohno H, & Iwanaga T.: Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. Mucosal Immunol. 8(3):650-60, 2015.
- [6] Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, Nissenson RA.: PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. J Bone Miner Res. 19:235-44., 2004.
- [7] Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE.: The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. Bone. 32(2):136-41., 2003.

Calcium Metabolism Regulated by RANKL/OPG Balance in the Gut

Shunsuke Kimura, Mami Mutou

Hokkaido University

Summary

Calcium is stored primarily in bone and released to blood with bone remodeling by regulating various hormones. Bone turnover is thus inextricably associated with calcium metabolism. The bone remodeling is maintained by a balance between bone formation by osteoblast and bone resorption by osteoclast. The osteoclast differentiation is regulated by receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) and its receptor, RANK. Osteoprotegerin (OPG) is a soluble decoy receptor of RANKL and serves as an endogenous inhibitor of RANKL-RANK signaling, resulting in the suppression of osteoclast activation. OPG itself may be involved in calcium metabolism. Circulating OPG is increased in chronic kidney disease patients. Parathyroid hormone (PTH) inhibits OPG expression in primary cultures of human osteoblast cells; on the other hand, estrogen stimulates OPG expression. Here we show that enteroendocrine cell, which is specialized cells of gastrointestinal tract with endocrine function, express OPG. The ischemia-induced acute nephritis in BALB/c mice simultaneously increased circulating OPG and stimulated OPG mRNA expression in the intestinal epithelium. Administration of estrogen to BALB/c mice decreased the expression of OPG mRNA in intestinal epithelium although PTH did not change OPG expression. These data suggest that OPG secreted from enteroendocrine cells contributes to the amount of circulating OPG in acute nephritis and estrogen treated mice.