

36. 亜鉛トランスポーターを介した骨量制御機構の解明

古市 達哉

Key words : 骨代謝, 破骨細胞, 亜鉛トランスポーター,
ZIP14

岩手大学 農学部 共同獣医学科
実験動物学研究室

緒 言

骨は生涯にわたって新陳代謝をはかっており, 古い骨は破骨細胞によって吸収され (骨吸収), その場に骨芽細胞が新しい骨をつくっていく (骨形成). 骨吸収と骨形成の繰り返しは「骨リモデリング」と呼ばれており, 骨リモデリングの破綻は骨量を低下させ, 骨粗鬆症を引き起こす. 亜鉛は生命活動に不可欠な必須微量元素の一つで, 骨や皮膚など硬組織や結合組織に多く存在する. ラットに亜鉛欠乏餌を長期間に渡って与えると骨量は著明に低下することから, 亜鉛は骨量の維持に重要な役割を担っていることがうかがえる¹⁾. 哺乳動物の生体における亜鉛の恒常性は20種類を超える亜鉛トランスポーターによって厳密に制御されている²⁾. 亜鉛トランスポーターはZIPとZnTの2種類のファミリーに分類され, ZIPファミリーは細胞質内の亜鉛イオン濃度を上昇させ, ZnTファミリーは減少させるように機能する. ZIP13とZnT5亜鉛トランスポーターはともに骨芽細胞に発現しており, 骨芽細胞機能に対して促進的に働くことが報告されている^{2,3)}. しかし, 破骨細胞機能に関与する亜鉛トランスポーターは未だ同定されていない. 本研究ではZIPファミリーに属するZIP14の骨量制御における役割を検討するために, *Zip14*ノックアウト (*Zip14KO*) マウスの骨組織を詳細に解析した.

方 法

Zip14KO マウスは理化学研究所から分与を受けた⁴⁾. 野生型および *Zip14KO* マウスにおける骨量・骨質は, X線解析, 組織解析およびpQCT分析によって調べた. 生体内の骨形成活性と骨吸収活性は骨形態計測によって調べた. RT-PCRと*in situ*ハイブリダイゼーション解析によって, 野生型マウスの破骨細胞における *Zip14* mRNAの発現を調べた. 野生型および *Zip14KO* マウスの大腿骨から採取した骨髓細胞を用い, *in vitro*における破骨細胞形成能を比較した.

結 果

X線解析, 組織解析, pQCT分析を行った結果, *Zip14KO* マウスにおける海綿骨, 皮質骨の骨量は, 野生型マウスと比べ有意に低下していた (図1). 骨形態計測の結果, *Zip14KO* マウスにおける骨形成活性の指標となるパラメータ (骨芽細胞面, 石灰加速度, 骨形成率等) はいずれも野生型マウスと同程度であった (図2). しかし, 骨吸収活性パラメータでは, *Zip14KO* マウスにおける骨吸収面は野生型マウスと比べ有意に上昇していた (図2). 骨吸収面は (破骨細胞によって吸収された面 / 骨面の周長) によって算出される値であり, *Zip14KO* マウスでは破骨細胞による骨吸収が亢進した結果, 骨量が減少していることが示された. *in situ*ハイブリダイゼーション, RT-PCRを行った結果, *Zip14* mRNAは野生型マウスの破骨細胞で実際に発現していることが示された (図3). *in vitro*における *Zip14KO* マウス由来破骨細胞の分化は, 野生型マウス細胞より促進していた.

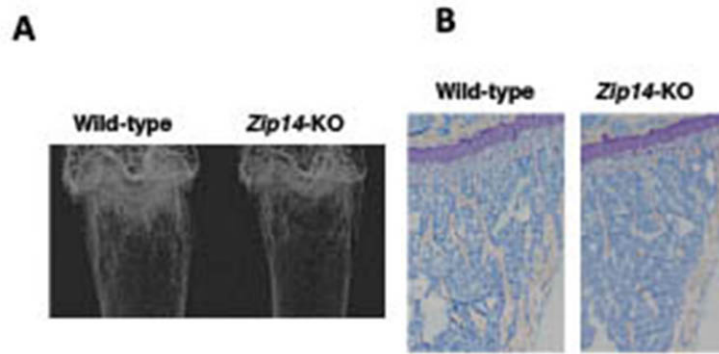


図1. *Zip14*KO マウスにおける骨量減少.

A) 6 週齢の雌マウスから摘出した大腿骨遠位端の X 線解析像. *Zip14*KO マウスでは X 線透過性が亢進している. B) 5 週齢の雌マウスから摘出した脛骨近位端の組織解析像. *Zip14*KO マウスでは海綿骨を構成する骨梁が著明に減少している.

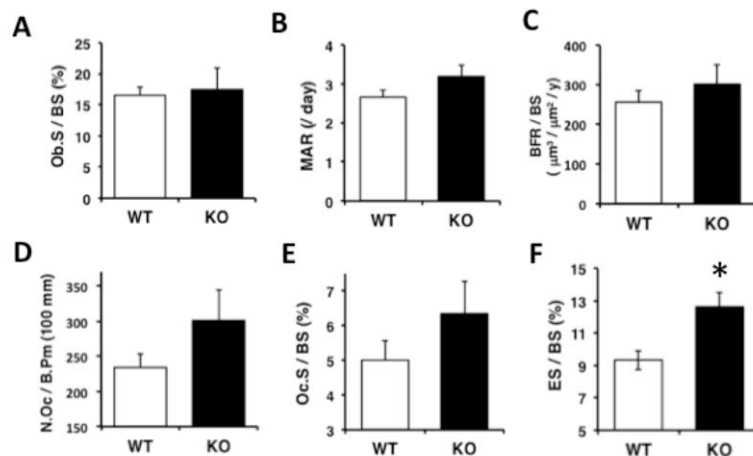


図2. 骨形態計測結果.

A-C) 骨形成パラメータの計測結果. (A) 骨芽細胞面, (B) 石灰化速度, (C) 骨形成率の結果を示す. (D-F) 骨吸収パラメータの測定結果. (D) 破骨細胞数, (E) 破骨細胞面, (F) 骨吸収面の結果を示す. 5 週齢の雌マウスから摘出した脛骨組織切片を用いて実施した. データは平均値 ± 標準誤差 (n=5) で示した. Mann-Whitney の U 検定による統計解析を行った. *P < 0.05, WT: 野生型マウス, KO: *Zip14*KO マウス.

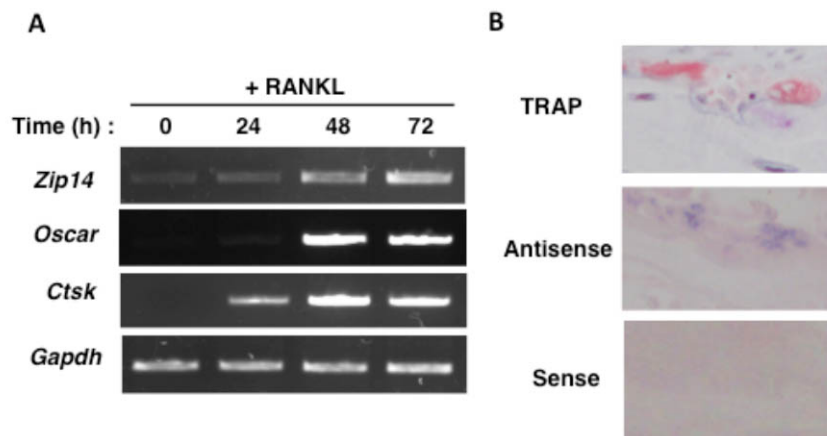


図3. 破骨細胞における *Zip14* mRNA の検出.

A) マウス骨髄細胞から破骨細胞分化を誘導し, *Zip14*, *Oscar*, *Ctsk* mRNA 発現を RT-PCR によって検出した. *Oscar*, *Ctsk* は破骨細胞マーカー. B) 4 週齢の野生型マウスの頸骨組織切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを実施した. 破骨細胞は TRAP 染色で赤色を呈する多核細胞である. 海綿骨表面に存在する TRAP 陽性の破骨細胞には, *Zip14* anti-sense プローブによって陽性シグナル (紫色) が検出された.

考 察

本研究の結果から, ZIP14 は破骨細胞に発現し, その機能を調節することによって骨量制御に関わっていることが示された. 破骨細胞機能を調節する亜鉛トランスポーターとしては, ZIP14 が初めての報告である. ZIP14 は細胞膜に発現し, 細胞外から細胞質内へ亜鉛を輸送する. *Zip14*KO マウスにおける骨吸収活性は上昇したことから, ZIP14 によって細胞内へ輸送される亜鉛を介した何かしらの細胞内シグナルが, 破骨細胞機能に対して抑制的に作用することが予測される. 破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の活性は, 細胞内カルシウム濃度に大きく影響を受ける⁵⁾.

細胞内カルシウム濃度の上昇によりカルシウムが結合したカルモジュリンは, カルシニューリンを活性化させる. 活性化カルシニューリンは NFATc1 を脱リン酸化し, 脱リン酸化された NFATc1 は核内へ移行し, 転写因子として機能する. 細胞内亜鉛はカルシウム結合に競合することによって, カルモジュリン活性を低下させることが報告されている^{6,7)}. 従って, ZIP14 によって破骨細胞内へ輸送される亜鉛は, カルシニューリン- NFATc1 シグナル伝達経路に対して抑制的に働くことが予想される (図 4). ZIP14 を介した破骨細胞の骨吸収活性抑制機序は, 骨量制御における亜鉛の役割を理解する上でとても重要であり, この機序を明らかにすることによって, 骨粗鬆症治療薬としての新しい骨吸収活性抑制剤の開発につながることを期待できる.

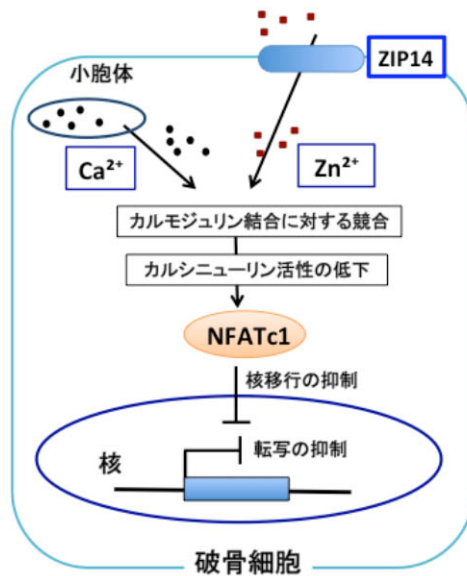


図4. ZIP14による破骨細胞の分化抑制機序.

ZIP14によって破骨細胞の細胞質内へ輸送された Zn^{2+} は、カルモジュリンへの Ca^{2+} 結合に競合し、カルシニューリン活性を低下させることが予測される。その下流では、NFATc1の脱リン酸化の抑制 → NFATc1の核内移行の抑制 → ターゲット遺伝子の転写の抑制、という経路で、破骨細胞分化に対して抑制的に働くことが予測される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、理研総合生命医学研究所の深田俊幸博士（現所属：徳島文理大学薬学部）と北條慎太郎博士（現所属：ドイツ リウマチ疾患研究センター）である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) Eberle, J., Schmidmayer, S., Erben, R. G., Stangassinger, M. & Roth, H. P. : Skeletal effects of zinc deficiency in growing rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **13** : 21-26, 1999
- 2) Fukada, T., Hojyo, S. & Furuichi, T. : Zinc signal : a new player in osteobiology. *J. Bone Miner. Metab.*, **31** : 129-135, 2013.
- 3) Fukada, T., Civic, N., Furuichi, T., Shimoda, S., Mishima, K., Higashiyama, H., Idaira, Y., Kitamura, H., Yamasaki, S., Hojyo, S., Nakayama, M., Ohara, O., Koseki, H., Dos Santos, H. G., Bonafe, L., Ha-Vinh, R., Zankl, A., Unger, S., Kraenzlin, M. E., Beckmann, J. S., Saito, I., Rivolta, C., Ikegawa, S., Suqerti-Furga, A. & Hirano, T. : The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 Is required for connective tissue development; Its involvement in BMP/TGF- β signaling pathways. *PLoS ONE*, **e3642**, 2008.
- 4) Hojyo, S., Fukada, T., Shimoda, S., Ohashi, W., Bin, B.H., Koseki, H. & Hirano, T. : The Zinc Transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth. *PLoS ONE*, **e18059**, 2011.
- 5) Negishi-Koga, T., & Takayanagi, H. : Ca^{2+} -NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol. Rev.*, **231** : 241-56, 2009.
- 6) Brewer, G. J., Aster, J. C., Knutsen, C. A. & Kruckeberg, W. C. : Zinc inhibition of calmodulin : a proposed molecular mechanism of zinc action on cellular functions. *Am. J. Hematol.*, **7** : 53-60, 1979.
- 7) Park, K. H., Park, B., Yoon, D. S., Kwon, S. H., Shin, D. M., Lee, J. W., Lee, H. G., Shim, J. H., Park, J. H. & Lee, J. M. : Zinc inhibits osteoclast differentiation by suppression of Ca^{2+} -Calcineurin-NFATc1 signaling pathway. *Cell Commun. Signal*, **11** : 74, 2013.