

SLC20A2 が code するリン酸トランスポーターPiT の機能解析

研究分担者：保住 功（岐阜薬科大学薬物治療学）

研究協力者：位田雅俊、金子雅幸、山田 恵（岐阜薬科大学薬物治療学）

竹谷 豊（徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部臨床栄養学）

研究要旨

近年、フェール病の原因遺伝子として *SLC20A2* (*PiT-2*) が同定された。*PiT-2* はナトリウム依存性リン酸トランスポーターとして、生体内のリン恒常性維持に関与していると考えられている。しかし、詳細な *PiT-2* の脳内における発現分布などは不明である。未だ原因不明であるフェール病の発症機序を考える上でも、*PiT-2* の脳内分布に関する知見は非常に重要である。一方で、他のリン酸トランスポーターについても脳内分布などは不明な点が多い。そこで、マウス脳やヒト剖検脳を用いて網羅的なリン酸トランスポーターmRNAs の発現解析を行った。結果、フェール病における石灰化領域である基底核や小脳を含む脳内全体に *SLC20A1*, *SLC20A2* は分布し、特に小脳での発現が高かった。他のリン酸トランスポーターの発現は非常に低いものであり、脳内のリン酸ホメオスタシスは *SLC20A1*, *SLC20A2* が担っていると考えられる。そこで、それらの遺伝子のコードする *PiT-1* と *PiT-2* の発現細胞に関して、その発現が高かった小脳において免疫組織学的に解析した。*PiT-1*, *PiT-2* とともに神経細胞、アストロサイト、血管内皮細胞に発現していることを明らかにした。これらの成果は、フェール病の治療法確立の基盤となり、フェール病の発症分子機序の理解が進んだ。

A. 研究目的

原因遺伝子として報告された *PiT-2* を含むリン酸トランスポーターに関する mRNA 発現を網羅的に解析し、未だ不明な点が多い脳内でのリン酸トランスポーターの発現領域や発現細胞を明らかにし、フェール病の分子発症機序の基盤を構築する。

（倫理面への配慮）

ヒト剖検脳に関する研究は、岐阜大学および岐阜薬科大学の倫理審査委員会の承認のもとに実施した。動物実験に関する研究は、岐阜薬科大学動物実験委員会の承認のもとに実施

した。

B. 研究方法

各リン酸トランスポーター（*SLC20A1*, *SLC20A2*, *SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC34A1*, *SLC34A2*, *SLC34A3*）に特異的なプライマーを作成し、マウスおよびヒトの各脳部（大脳皮質、線条体、小脳）における各リン酸トランスポーターmRNAs の発現解析を行った。また、*SLC20A1*, *SLC20A2* においては、TaqMan プローブを用いて各脳部位における発現解析をリアルタイム PCR 法にて実施した。*PiT-1* と *PiT-2* を認識する抗体を用いて、

マウス脳およびヒト剖検脳における小脳を免疫組織学的に解析した。

C. 研究結果

各リン酸トランスポーター-mRNAs の発現解析をマウスおよびヒトの各脳部を用いて実施した結果、大脳皮質、線条体および小脳のいずれの部位においても *SLC20A1* と *SLC20A2* の発現が確認できた。一方で、他のリン酸トランスポーター (*SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC34A1*, *SLC34A2*, *SLC34A3*) の発現は非常に低いか、もしくは確認できなかった。さらに *SLC20A1* と *SLC20A2* の脳内の mRNA 発現の差異を検証する目的で、マウスおよびヒトの各脳部位における特異的プローブを用いたリアルタイム PCR 法を実施した。結果、マウスおよびヒト脳においても、*SLC20A1* と *SLC20A2* のいずれの遺伝子も小脳において高発現していた。*SLC20A1* と *SLC20A2* はそれぞれリン酸トランスポーターである PiT-1 と PiT-2 をコードしている。そこで、小脳における PiT-1 と PiT-2 の発現細胞を明らかにするため、免疫組織学的な解析を実施した。結果、フェール病における石灰化領域である小脳歯状核の神経細胞に PiT-1 および PiT-2 が共発現していた。さらに同じ部位で、PiT-1 および PiT-2 と GFAP 陽性のアストロサイトや CD31 陽性の血管内皮細胞との共局在も確認できた。また、プルキンエ細胞のマーカーである calbindin と PiT-1 および PiT-2 との共局在を確認した。今回の検討では、ミクログリアやオリゴデントロサイトとの共局在は確認できなかった。

D. 考察

SLC20A2 遺伝子の変異が報告され、フェール病発症に PiT-2 の機能破綻によるリン代謝調節機構の異常が、その発症に関与すると考えられる。興味深いことに PiT-2 の発現はこ

れまで考えられてきたアストロサイトや血管内皮細胞以外にも、多く神経細胞に発現していることが明らかとなった。一方で、ナトリウム依存性リン酸トランスポーターには *SLC20A2* 以外にも、同じファミリー内の *SLC20A1* (PiT-1) を含め *SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC34A1*, *SLC34A2*, *SLC34A3* などがある。今回の検討で、脳内に広く *SLC20A1* と *SLC20A2* が発現していること、一方で、*SLC17A1*, *SLC17A3*, *SLC34A1*, *SLC34A2*, *SLC34A3* の遺伝子発現は非常に低いか、もしくは確認できなかった。さらに *SLC20A1* と *SLC20A2* の発現はフェール病における主要な石灰化領域である小脳において高かった。この成果は、現在進行中である iPS 細胞を活用した PiT-2 機能解析の結果と共に、PiT-2 の機能破綻とフェール病発症機序とをつなぐメカニズムの解明を伸展させるものであり、今後の診断方法の確立と治療法の開発研究の基盤になる。

E. 結論

PiT-2 は広く脳内に分布し、これまで PiT-2 の発現細胞として考えられていた、アストロサイトや血管内皮細胞だけでなく、神経細胞にも発現していた。PiT-1 も PiT-2 の発現と同様な結果であったが、脳内では他のリン酸トランスポーターの発現が非常に低いことが明らかとなった。この結果は、他の神経変性疾患と同様にフェール病発症に PiT-2 の機能破綻によるリン代謝調節機構の異常が、その発症に関与すると考えられ、今後の機能解析も含めた詳細な検討が必要であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Inden M, Iriyama M, Takagi M, Kaneko M, Hozumi I. Localization of type-III

sodium-dependent phosphate transporter 2
in the mouse brain. *Brain Res.* **1531**:75-83
(2013).

2. 学会発表

入山真先，位田雅俊，金子雅幸，保住功．特発性
基底核石灰化症（ファール病）と関連したリン酸
トランスポーターPiT-2 のマウス脳内における局
在の検討．メタルバイオサイエンス研究会 2013
（2013/9/27，静岡）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし