



Title	骨細胞における骨基質蛋白質Dmp1の翻訳後修飾について
Author(s)	大家, 香織
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52359
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

骨細胞における骨基質蛋白質Dmp1の翻訳後修飾について

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻

顎口腔総合医療学講座（口腔総合診療部）

（指導教員：竹重文雄教授）

大家香織

諸言

骨細胞は、骨組織を構成する細胞の中で最もその数が多く、骨組織の全構成細胞数の約 90～95% (20,000～80,000 個/mm³ 骨組織) を占める^{1,2)}。骨細胞は骨小腔と呼ばれる骨基質内の空間に埋入された状態で骨の至る所に存在し、さらに骨細胞間や骨細胞-骨芽細胞間を繋ぐ多数の骨細管の中に細胞突起を伸ばして (図 1) 細胞間ネットワークを形成し³⁾、骨の形成・維持に重要な働きをしている。最近、骨細胞が特異的または高率に発現する分子が次々に発見され、これまで十分に理解されていなかった骨細胞の生理機能が次第に明らかになってきた^{4,5,6)}。

それらの分子の一つに、骨基質の中の酸性リン蛋白質である dentin matrix protein 1 (Dmp1) が挙げられる。Dmp1 のアミノ酸組成の約 24-30%は、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸(Asp)とグルタミン酸(Glu)からなり、pH が中性領域の生体内では Dmp1 はマイナスに荷電する。また、Dmp1 のアミノ酸組成の約 20%はセリン(Ser)で、Dmp1 にはセリンを含む多数のリン酸化モチーフが存在して、リン酸化されてマイナスに荷電すると考えられている。このように高度にマイナスに荷電した Dmp1 は Ca²⁺との強い結合能を獲得して、ハイドロキシアパタイト形成の核となり、骨の石灰化に関与すると考えられている。実際、*in vitro* の Dmp1 組換え蛋白質を用いた石灰化実験や培養細胞における Dmp1 の過剰発現実験において、Dmp1 がハイドロキシアパタイト形成能や石灰化促進能を有すると報告する多数の論文がある^{7,8,9)}。*in vivo* では、ヒトの Dmp1 機能不全 (常染色体劣性低リン血症性くる病 : autosomal recessive hypophosphatemic rickets) 患者や Dmp1 欠損マウスは低リン血症性くる病を発症し、骨の石灰化不全が認められるのに対して^{10,11)}、Dmp1 過剰発現マウスでは骨密度の亢進が認められるこ

とから¹²⁾、Dmp1 は骨の石灰化やリン代謝に関与して骨の形成・維持に重要であると考えられている。

Dmp1 は、その翻訳後修飾の過程で N 末端の 37kDa 断片と C 末端の 57kDa 断片へ切断され¹³⁾、生化学的解析からも未切断の全長 Dmp1 は骨基質中には殆ど存在しないことが報告されている¹⁴⁾。Dmp1 の N 末端断片と C 末端断片への切断が起こらない遺伝子改変マウスでは低リン血症性くる病を発症することからも¹⁵⁾、Dmp1 の N 末端断片と C 末端断片への切断は *in vivo* における骨の形成・維持に重要な翻訳後修飾であると考えられる。また、骨基質から抽出した Dmp1 は無機リン酸を豊富に含んでいることから¹³⁾、Dmp1 は生体内の分泌過程でリン酸化を受けていると考えられる。最近、骨基質をリン酸化するゴルジ体キナーゼの Fam20C が発見され、Dmp1 にも Fam20C が認識するリン酸化モチーフ(セリン-X-アスパラギン酸/ホスホセリン) が多数存在し、*in vitro* の実験で Fam20C により Dmp1 がリン酸化されることが報告されている¹⁶⁾。生体内でも Fam20C により Dmp1 がリン酸化されることが明らかになれば、Fam20C 欠損マウスは低リン血症性くる病を発症することから¹⁷⁾、Dmp1 のリン酸化は骨の形成・維持に重要な翻訳後修飾となる。

この Dmp1 を産生する骨細胞は、骨芽細胞に由来して、骨芽細胞が骨基質に埋まって骨細胞に移行するが、その成熟段階は電子顕微鏡観察によって形態学的に分類・命名されている¹⁸⁻²¹⁾。骨芽細胞層に隣接するが類骨に埋入され始めた骨芽細胞様骨細胞 (osteoblastic-osteocyte) (図 1 の①) と類骨内に完全に埋入された類骨骨細胞 (osteoid-osteocyte) (図 1 の②) は、豊富な細胞内小器官を有し、発達した粗面小胞体やゴルジ装置が認められる。石灰化骨に埋入されて間もない幼若骨細胞(young-osteocyte) (図 1 の③) では細胞内小器官が減少し、粗面小胞体やゴルジ装置の発達は乏しい。石灰化骨の深部に分布する成熟骨細胞

(old-osteocyte) (図 1 の④) は骨芽細胞と比較するとその細胞体積が約 70%も縮小し、細胞内小器官は殆ど認められなくなる。従って、骨組織中の全ての骨細胞が一様に Dmp1 を産生することはないと考えられる。同様に、Dmp1 が翻訳後修飾を受ける時期や部位は骨細胞の成熟に伴って変化し、骨の石灰化に関与していると思われるが、その詳細は明らかではない。

本研究では、Dmp1 の翻訳後修飾と骨の石灰化との関係を解明することを目的として、骨細胞の成熟に伴う Dmp1 の発現・分布を *in situ* hybridization と免疫組織化学的手法を用いて形態学的に観察し、次に Dmp1 の切断過程やリン酸化過程、さらにその分泌経路を、免疫組織化学的手法や超微構造学的解析法を用いて検討を行った。

材料と方法

1. 光学顕微鏡観察のための骨組織サンプルの作製

本実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認下で実施した（承認番号：動歯 24-011）。実験には、生後 2 週齢から 12 週齢の雄性 Wistar 系ラット（日本クレア、東京、日本）を 30 匹用いた。実験動物に、ペントバルビタールナトリウム（200 mg/kg 体重）を腹腔内投与して安楽死させた後、左心室から 1000 単位/ml ヘパリン（持田製薬株式会社、東京、日本）を加えた生理食塩水を灌流し、4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.4）にて灌流固定を行い、脛骨を剖出した。検体は同固定液で一晩浸漬固定し、0.05 M トリス緩衝生理食塩水（TBS）で洗浄を行った後、10% エチレンジアミン 4 酢酸 2 ナトリウム（EDTA・2Na、同仁化学研究所、熊本、日本）溶液にて、4°C で 4～10 日間、脱灰処理を行った。脱灰終了後、TBS で 9 時間洗浄した後、パラフィン包埋ブロックを作製し、ヘマトキシリン-エオジン（H.E.）染色と *in situ* hybridization ならびに免疫組織化学的染色に用いた。

2. *in situ* hybridization

RNA プローブ作製には、ラットの全長 Dmp1 cDNA を使用した。Dmp1 cDNA を pGEM-T Easy vector（Promega, Madison, WI, USA）内に遺伝子組換えを行ったプラスミドを、センスプローブ作製には制限酵素 *Sal* I（New England BioLabs Inc., Ipswich, U.K.）、アンチセンスプローブ作製には *Sac* II（New England BioLabs Inc.）により切断し直鎖状として使用した。DIG-RNA Labeling Kit (SP6/T7)[®]（Roche, Barsele, Switzerland）を用いて、センスプローブは T7 ポリメラーゼにて、アン

チセンスプローブはSP6ポリメラーゼにて digoxigenin (DIG)-UTP で標識し、RNA プローブを合成後、150bp にアルカリ加水分解してプローブとして用いた。

パラフィン包埋ブロックから、滑走式ミクロトーム (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて矢状断で 4 μ m 厚に薄切した組織切片を作製した。キシレンにて脱パラフィン後、水洗し、4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で前固定した。前処理として 10 μ g/ml プロテイナーゼ K (life technologies, Carlsbad, CA, USA) にて 37°C、10 分間処理後、4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で後固定した。0.25% 無水酢酸を含む 0.1 M トリエタノールジアミンで 10 分間アセチル化処理を行い、洗浄後、エタノールにて脱水し、乾燥させた。その後、RNA プローブはハイブリダイゼーションバッファー (和光純薬工業、大阪、日本) で約 1 ng/ml に希釈して切片に滴下し、52°C、16 時間ハイブリダイゼーションを行った。上記の全行程は RNase free 環境下で行った。使用する器具は 200°C で一晚乾熱滅菌処理を施し、固定液、組織切片作製時には DEPC 処理水を使用し、周囲環境は RNase 除去剤 (RNase Zap® Solution, life technologies) で清拭し RNase を除去した。

ハイブリダイゼーション終了後、2×標準クエン酸ナトリウム溶液 (SSC) を含む 50% ホルムアミド溶液中で、55°C、20 分間洗浄を 3 回行い、10 μ g/ml の RNase A (和光純薬工業) で 37°C、1 時間処理を行った。2×SSC で 55°C、20 分間の洗浄を 2 回行い、次に 0.2 M 塩化ナトリウムを含む TBS で 10 分間 3 回洗浄し、エタノールにて切片を脱水、乾燥後、水洗した。1% ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む TBS (TBS-BSA) で 10 倍に希釈した正常ヤギ血清 (Dako, Glostrup, Denmark) を室温、30 分間反応させブロッキングを行った後、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗 DIG ポリクローナル抗体 (Anti-DIG-AP®, Roche) を 37°C、30 分間反応させ、洗浄後、4-ニトロブルーテト

ラゾリウムクロライド/5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (NBT/BCIP Stock Solution[®], Roche) にて約 3 時間発色させた。反応終了後、グリセロールゼラチンにて封入を行った。なお、ネガティブコントロールには、アンチセンスプローブに対するセンスプローブを使用した。

3. 免疫組織化学的染色

4 μm 厚に薄切した組織切片を免疫組織化学的染色に用いた。その一部は、*in situ* hybridization 用パラフィンブロックから薄切し、H.E.や *in situ* hybridization 染色に連続する切片を用いた。一次抗体には、ウサギ抗ラット Dmp1 C 末端断片ポリクローナル抗体 (10000 倍希釈、ペプチド FRRSRVSEEDDRGEL を抗原として、受託作製) (IBL、群馬県、日本)、マウス抗ヒト Dmp1 (C-terminus) モノクローナル抗体 IgG₁ (500 倍希釈、Merck Millipore、Darmstadt、Germany)、ウサギ抗ラット Dmp1 N 末端断片ポリクローナル抗体 (10000 倍希釈、ペプチド SGDDTFGDEDNGPGPEERQWGG を抗原として、受託作製) (IBL)、ウサギ抗ヒト Fam20C ポリクローナル抗体 (200 倍希釈、Abcam、Cambridge、U.K.)、マウス抗ホスホセリンモノクローナル抗体 IgG₁ (1000 倍希釈、Sigma-Aldrich)、マウス抗ラット GM130 モノクローナル抗体 IgG_{2a} (100 倍希釈、Abcam) を用い、単染色の場合はペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン - ビオチン複合体 (sABC) 法にて、二重染色の場合は蛍光抗体法にて免疫反応部位を検出した。

単染色の場合は、切片を脱パラフィン後に通法の 0.1N クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 加熱処理による抗原賦活化を行い、TBS による洗浄を 4°C、10 分間行った。非特異的反応を阻止するために、1% ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) と 0.1% Tween20 を含む TBS (TBS-BSA) で希釈した正常ブタ血清 (10 倍希釈、Dako) で 30 分間ブロッキング処理を行った。TBS-BSA で希釈した一次抗体を

滴下し 4°C で一晩反応させた後、二次抗体のビオチン標識ブタ抗ウサギ免疫グロブリン（1000 倍希釈、Dako）またはビオチン標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン（300 倍希釈、Dako）を滴下して室温で 40 分間反応させた。TBS-BSA で 1.2% 過酸化水素水添加メタノール（和光純薬工業）中に室温で 15 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性の不活化を行った。次に TBS-BSA で 50 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン - ビオチン複合体（Dako）を滴下し、室温で 30 分間反応させた上記の各ステップの終了後は TBS で 4°C、10 分間の洗浄を 3 回行った。免疫反応の検出は、3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライドを使用し、室温で 10 分間発色させた。水洗後、ヘマトキシリンにて対比核染色を行い、脱水、透徹し、封入を行った。観察は、EclipseE600 顕微鏡（Nikon、東京、日本）にて行った。

蛍光抗体法による二重染色は、上記の一次抗体を 2 種類混合して滴下した。二次抗体には、Alexa Fluor 488（緑色）標識ヤギ抗マウス IgG（H+L）（1000 倍希釈、life technologies）と Alexa Fluor 594（赤色）標識ヤギ抗ウサギ IgG（H+L）（1000 倍希釈、life technologies）を用いた。切片を脱パラフィン後に抗原を賦活化し、TBS による洗浄を 4°C、10 分間行った。非特異的反応を阻止するために、TBS-BSA で希釈した正常ヤギ血清（10 倍希釈、Dako）で室温にて 30 分間、前ブロッキング処理を行った。TBS-BSA で希釈した一次抗体を滴下し 4°C で一晩反応させた後、二次抗体を滴下し、4°C、2 時間反応させた。4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）（1000 倍希釈、life technologies）を室温で 3 分間反応させて対比核染色を行った。各ステップ終了時には、TBS で 4°C、10 分間の洗浄を 3 回行った。切片は、褪色防止用封入材 ProLong[®]（life technologies）で封入し、蛍光顕微鏡 Axio Imager M1（Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）および共焦点レーザー顕微鏡 LSM510 Ver.3.2（Carl Zeiss）にて観察を行った。

4. 免疫電顕観察のための骨組織サンプルの作製

免疫電顕観察には、4 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いた。光学顕微鏡観察用の骨組織サンプル作製時と同様に、麻酔により実験動物を安楽死させ、0.1% グルタルアルデヒド添加 4% パラホルムアルデヒド固定液を用いて灌流固定後、脛骨を剖出した。検体は同固定液で一晩浸漬固定し、TBS で洗浄を行った後、10% EDTA 脱灰液にて、4°C で 4 日間脱灰を行った。

5. 包埋後免疫電顕

前述の 4. で得られた免疫電顕用の骨組織サンプルは TBS で洗浄し、1 mm 角に切断後、親水性樹脂 LR Gold[®] (London Resin Company Limited, Berkshire, England) に包埋した。約 80 nm に薄切し (Ultracut E, Reichert-Jung, Wetzlar, Germany)、フォルムバール膜付 Ni グリッド (150 メッシュ、日新 EM 株式会社、東京、日本) に採取した。

二重染色には、一次抗体にウサギ抗ラット Dmp1 C 末端断片ポリクローナル抗体 (10000 倍希釈) (IBL) とマウス抗ホスホセリンモノクローナル抗体 (1000 倍希釈、Sigma-Aldrich) を用いた。非特異的反応を阻害するため、TBS-BSA で希釈した正常ヤギ血清 (10 倍希釈、Dako) を室温で 30 分間反応させた後、TBS-BSA で希釈した各一次抗体を同時に同切片に滴下し、4°C で一晩反応させた。免疫反応の検出には、2 種類の大きさの異なった金コロイドを標識した 2 次抗体を用いた。すなわち、20 nm 金粒子標識ヤギ抗ウサギ IgG (10 倍希釈、BBI Solutions、Madison、WI、USA) と 10 nm 金粒子標識ヤギ抗マウス IgG (20 倍希釈、BBI Solutions) を同時に滴下し、室温で 1 時間反応させた。上記の各ステップ終了後には、TBS で 4°C、10 分間の洗浄を 3 回行い、二次抗体の反応終了後

はさらに水洗を行った。切片を室温で 5 分間ウラン染色を行った後、透過型電子顕微鏡（H-7500、日立、東京、日本）にて観察を行った。

6. 包埋前免疫電顕

前述の 4. で得られた免疫電顕用の骨組織サンプルは、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、10% スクロース添加 PBS に 4°C、4 時間、15% スクロース添加 PBS に 4°C、4 時間、20% スクロース添加 PBS に 4°C、4 時間浸漬後、OCT compound（イーエムジャパン株式会社、東京、日本）にて包埋し、凍結した。クライオスタット（Leica Microsystems）にて 30 μ m 厚の切片を作製し、包埋前免疫電顕に用いた。

一次抗体には、ウサギ抗ラット Dmp1 C 末端断片ポリクローナル抗体（10000 倍希釈（IBL）を用いた。非特異的反応を阻害するため、TBS-BSA で希釈した正常ヤギ血清（10 倍希釈、Dako）を室温 30 分間反応させた後、TBS-BSA で希釈した一次抗体を切片に滴下し、4°C で一晩反応させた。免疫反応の検出には、1.4 nm 金粒子標識ヤギ抗ウサギ IgG（50 倍希釈、Nanoprobes, Inc., Yaphank, NY, USA）を用いて 4°C、2 時間反応させた。各ステップ終了後は TBS で洗浄した。2.5%グルタルアルデヒドにて室温 30 分間固定後、水洗し、Silver Enhancing Kit（BBI Solutions）を使用し 5 分間銀増感を行った。再び水洗し、1% 四酸化オスミウムにて室温 30 分間固定を行い、脱水後エポキシ樹脂（Quetol812、日新 EM 株式会社）に包埋した。

約 700 nm に薄切（Ultracut E, Reichert-Jung）し、フォルムバル膜付 Cu グリッド（50 メッシュ、日新 EM 株式会社）に採取し、室温にて 5 分間ウラン染色後、さらにフォルムバル膜を貼付し、オスミウム蒸着を行った。試料両面は 30 nm 金粒子（BBI Solutions）にてマーキングし、超高压電子顕微鏡（H-3000、

日立)にて観察を行った。細胞内三次元構造の観察のため、倍率 25000 倍、傾斜角 -66° ~ $+66^{\circ}$ にて 2° ごとに連続傾斜像撮影を行い、得られた画像の再構築・輪郭抽出 (IMOD software package²²⁾)を行った。

結果

1. *Dmp1* mRNA 発現と *Dmp1* 局在分布の検討

生後 2 週齢から 12 週齢のラット脛骨の皮質骨における *Dmp1* mRNA 発現と *Dmp1* 局在分布を検討した。週齢が異なっても、その発現分布は同様の結果を示したため、それらの代表所見として 4 週齢のラット脛骨の皮質骨における結果を以下に示す。

皮質骨における *Dmp1* mRNA 発現について

ラットの皮質骨における *Dmp1* mRNA 発現は、骨芽細胞には認められず（図 2. B）、類骨基質に埋入され始めた骨芽細胞様骨細胞（図 2. B, C）と、類骨内に分布する類骨骨細胞（図 2. B, D）で強発現していた。一方、石灰化骨に埋入されて間もない幼若骨細胞（図 2. B, E）ではその発現が減弱し、石灰化骨深部に広範囲に分布する成熟骨細胞（図 2. B, F）では、その発現は殆ど認められなかった。

皮質骨における *Dmp1* の局在分布について

ラットの皮質骨における *Dmp1* の分布は、*Dmp1* C 末端断片に対する抗体を用いて検討した。類骨に分布する骨芽細胞様骨細胞（図 3. B, C）や類骨骨細胞（図 3. B, D）の細胞内では核に隣接して *Dmp1* が局在するが、これらの細胞外の類骨基質に *Dmp1* 分布は認められなかった（図 3. B）。また、石灰化骨に分布する幼若骨細胞（図 3. B, E）では、骨細胞内に *Dmp1* が局在するとともに、骨小腔や骨細管構造に沿って *Dmp1* 分布が認められた。これらの骨細胞内に局在する *Dmp1* は、ゴルジ体マーカー（GM130）との蛍光 2 重染色により、ゴルジ領域に

局在することが明らかとなった（図 3. G-J）。成熟骨細胞（図 3. B, F）では、細胞内に Dmp1 分布は認められないが、骨小腔と骨細管構造に沿ってその分布が認められた。

2. Dmp1 の N 末端断片と C 末端断片の局在分布の検討

Dmp1 は分泌過程で N 末端断片と C 末端断片に切断され¹³⁾、骨基質中に未切断の全長 Dmp1 は殆ど存在しない¹⁴⁾ ことが知られている。また、N 末端断片にはプロテオグリカンが結合するのに対し、C 末端断片は高度にリン酸化されていることが報告されている¹³⁾。この両者の性質の違いから、両断片の局在分布に相違がある可能性を想定して、ラットの皮質骨における Dmp1 の N 末端断片と C 末端断片の分布を検討した。

免疫組織化学的染色により、Dmp1 N 末端断片は、主に骨小腔周囲の骨基質に分布するのに対し（図 4. A および挿入図）、Dmp1 C 末端断片は骨細管に一致して分布する傾向を認めた（図 4. B および挿入図）。

蛍光二重染色では、骨細管には C 末端断片の分布を示す緑色蛍光が強く発色し、骨小腔周囲には N 末端断片の分布を示す赤色蛍光が強く発色していた（図 5. C）。また、骨細胞内のゴルジ領域（図 5. C の矢印）や一部の骨小腔周囲（図 5. C の矢頭）は黄色蛍光が発色し、Dmp1 N 末端断片と Dmp1 C 末端断片の共局在が認められた。次に、切片の厚さによる細胞や骨細管等の構造上の重なりのために、緑色蛍光や赤色蛍光が互いの蛍光発色をマスクする可能性を否定するため、共焦点でスライスした一断面の蛍光発色を観察し、上記の蛍光発色パターンと同様の結果を示すことを確認した（図 5. 挿入図）。

以上の所見から、N 末端断片と C 末端断片の分布の相違が明確な部位は、緑色蛍光と赤色蛍光が単独で認められる細胞外であるため、両断片への切断はゴ

ルジ領域から細胞外に分泌されるまでの骨細胞内か、分泌直後の骨小腔周囲で起こると考えられた。

3. Dmp1 C 末端断片のリン酸化過程の検討

Dmp1C 末端断片は、ゴルジ体キナーゼ (Fam20C) により認識されるリン酸化モチーフを多数有しており¹⁶⁾、骨基質中で高度にリン酸化されていることから¹³⁾、Dmp1 の分泌経路におけるリン酸化過程を観察するキナーゼ基質として適している。そこで、Dmp1 機能に重要なリン酸化が分泌過程のどの段階で行われているかを検討するため、セリン残基のリン酸化を示すホスホセリンと Fam20C の局在分布を、Dmp1 C 末端断片の局在分布と比較検討した。

骨組織におけるリン酸化部位の検討

Dmp1 C 末端断片のリン酸化は、Dmp1 が含有するセリン残基がリン酸化されるため、まず、骨組織におけるホスホセリンの分布を検討した。ホスホセリンは骨細胞内や骨小腔および骨細管にその分布が認められた (図 6. A)。このホスホセリンの分布パターンは Dmp1 C 末端断片の分布パターンと類似しており (図 3. B)、Dmp1 C 末端断片とホスホセリンが共局在することが予測されたため、Dmp1 C 末端断片とホスホセリンの蛍光二重染色を行った (図 7)。その結果、骨細管や骨小腔周囲に Dmp1 C 末端断片 (図 7. C : 赤色) とホスホセリン (図 7. D : 緑色) が共局在していた (図 7. B : 黄色)。さらに、包埋後免疫電顕観察では、骨細管や骨小腔周囲の骨基質に Dmp1 C 末端断片 (図 8. A, B : 矢印) とホスホセリン (図 8. A, B : 矢頭) の局在が観察された。骨細管や骨小腔周囲の骨基質にはリン酸化された Dmp1 C 末端断片が局在分布することが示唆された。

骨細胞内ではホスホセリンは核に局在するが (図 6. B : 矢印)、細胞質内の核

近傍にもその局在が認められ（図 6. C：矢頭）、ゴルジ装置でリン酸化が行われている可能性が考えられたため、蛍光二重染色にて観察を行った。類骨に分布する骨芽細胞様骨細胞や類骨骨細胞では、ゴルジ領域（図 9. A-D：点線枠内）に Dmp1 C 末端断片の局在を認めたが（図 9. B, C：矢印）、ホスホセリンは認められなかった（図 9. B, D：矢印）。一方、石灰化骨に分布する幼若骨細胞では、ゴルジ領域（図 9. E-H：点線枠内）に Dmp1 C 末端断片（図 9. G：矢頭）とホスホセリン（図 9. H：矢頭）の共局在が認められ（図 9. F：矢頭）、Dmp1 C 末端断片は幼若骨細胞内のゴルジ領域でリン酸化されていることが示唆された。

以上から、Dmp1 C 末端断片は、骨細胞内のゴルジ領域でリン酸化された後に細胞外に分泌され、リン酸化された状態で骨小腔や骨細管の周囲の骨基質に沈着するものと考えられた。

骨組織におけるゴルジ体キナーゼの局在について

Dmp1 は、ゴルジ体キナーゼの Fam20C により認識されるリン酸化モチーフ（セリン-X-アスパラギン酸/ホスホセリン）を豊富に含み、*in vitro* の実験で Fam20C によりリン酸化されることが報告されている¹⁶⁾。従って、Fam20C は生体内で Dmp1 をリン酸化する最有力候補であるため、骨組織における Fam20C の局在分布を検討した。

Fam20C は骨芽細胞には認められず、主に類骨骨細胞や幼若骨細胞の細胞内に局在していた（図 10. A）。また、ゴルジ体に局在するキナーゼであることから²³⁾、骨細胞においてもゴルジ領域に局在することを確認するため、Fam20C とゴルジ体のマーカーである GM130 の蛍光二重染色を行い、両者が共局在することを確認した（図 10. B-E）。Fam20C と Dmp1 C 末端断片の蛍光二重染色では、類骨骨細胞や幼若骨細胞のゴルジ領域で両者が共局在しており（図 11）、Dmp1 C 末端

断片はゴルジ体で Fam20C によりリン酸化されることが示唆された。

4. 骨細胞内における Dmp1 の輸送経路の検討

以上の結果から、Dmp1 C 末端断片は骨細胞内のゴルジ領域で翻訳後修飾を受けて細胞外に分泌されることが考えられ、その細胞内輸送経路を超微構造学的解析により検討した。

包埋後免疫電顕では、細胞膜などの立体障害のためか骨細胞内に免疫反応を検出できなかったため、1.4 nm 金粒子で標識して銀で増感する包埋前免疫電顕により観察を行った。輸送小胞が立体的に観察できるよう、700 nm の厚みがある切片を作製して、超高圧電子顕微鏡で観察した結果、幼若骨細胞内では、Dmp1 C 末端断片は核に隣接する小胞体様またはゴルジ装置様構造内（図 12. A-D：矢印）や、輸送小胞様構造内（図 12. A, B, F：矢印）に認められた。この輸送小胞様構造物の断層像（図 13. A）の再構築により得られた三次元像からも、形態学的に輸送小胞であることが確認でき、その内部に Dmp1 C 末端断片が局在していることから（図 13. B, C）、Dmp1 C 末端断片は輸送小胞により骨細胞内を輸送され、骨細胞外に分泌されることが示唆された。

考察

本研究では、ラット脛骨の皮質骨を用いて Dmp1 の分泌過程における翻訳後修飾を、超微細構造学的に検討した。まず *in situ* hybridization と免疫組織化学的染色による Dmp1 の発現分布の検討から、骨の至る所に骨細胞が存在するが、骨細胞の Dmp1 産生能は一様ではないことが分かった。すなわち、Dmp1 mRNA 発現は、骨芽細胞様骨細胞、類骨骨細胞、幼若骨細胞に認められ、これらの骨細胞内のゴルジ領域に Dmp1 が局在するのに対し、骨深部に広範囲に分布する成熟骨細胞には Dmp1 mRNA 発現や細胞内 Dmp1 の局在は認められず、Dmp1 を盛んに産生するのは骨表層に分布する比較的未熟な骨細胞（骨芽細胞様骨細胞、類骨骨細胞、幼若骨細胞）であることが分かった。Dmp1 の免疫組織化学的染色では、成熟骨細胞の骨小腔や骨細管の周囲骨基質にも Dmp1 免疫反応が認められることから、一見すると、骨深部に広範囲に分布する多数の成熟骨細胞が Dmp1 を産生していると誤解されがちである。従って、骨細胞に特異的に発現するプロモーターとして研究に広く用いられている Dmp1 プロモーターを用いた遺伝子改変動物では、骨表層に分布する比較的未熟な骨細胞に目的遺伝子を発現させることはできるが、骨深部に広く分布する大部分の成熟骨細胞にその効果は及ばない。例えば、Dmp1 プロモーターの下流に connexin 43 のドミナントネガティブ体を過剰発現させたトランスジェニックマウスは、骨内部に広がる骨細胞間のネットワークを担当するギャップ結合チャネルとヘミチャネルの障害を目的として作製されているが²⁴⁾、骨細胞間のネットワークが障害されるのは Dmp1 発現が盛んな骨表層の骨細胞に限られる。また、Dmp1 プロモーターを用いた GFP 発現トランスジェニックマウスの骨組織から GFP の緑色蛍光標識細胞をセルソーティング^{4, 25, 26)}して得られた細胞は、主として全骨細胞の中

の未熟な骨細胞であり、骨の大部分を占める成熟骨細胞の性質を十分に反映しない可能性があると考えられる。

Dmp1 は、分泌過程で N 末端の 37kDa 断片と C 末端の 57kDa 断片へ切断されることが知られており¹³⁾、生化学的解析からも、骨基質中に未切断の全長 Dmp1 は殆ど検出されず、大部分は N 末端断片と C 末端断片に切断されていることが報告されている¹⁴⁾。また、Dmp1 の N 末端断片と C 末端断片への切断が起こらないように切断部位のアミノ酸配列を改変した遺伝子改変マウスは、Dmp1 欠損マウスと同様に、低リン血症性くる病を発症することから¹⁵⁾、切断は Dmp1 機能に必須の翻訳後修飾であると考えられる。その理由として、Dmp1 の N 末端断片と C 末端断片の機能の違いが想定される。C 末端断片には I 型コラーゲンの N テロペプチド領域との結合部位に多数のリン酸化モチーフが存在し、高度にリン酸化した Dmp1¹³⁾はマイナスに荷電して I 型コラーゲンと結合して、石灰化促進作用を有する。*In vivo* において、C 末端断片の過剰発現マウスは、交配により全長 Dmp1 欠損マウスをレスキューできることが報告されており²⁷⁾、C 末端断片が Dmp1 の機能ドメインであると考えられている。一方、N 末端断片にはコンドロイチン 4-硫酸が結合しており、*in vitro* の石灰化実験ではコンドロイチン 4-硫酸の結合した N 末端断片は石灰化抑制作用を有することが報告されている⁷⁾。すなわち、C 末端断片は石灰化を促進するのに対して、N 末端断片は石灰化を抑制するため、切断されずに両断片が共存すると互いの機能を相殺して機能しなくなると考えられる。骨基質中に全長 Dmp1 は殆ど存在しないことから、本研究では N 末端断片と C 末端断片に対する 2 種類の抗体を用いて、両断片の骨組織における分布を調べた。その結果、N 末端断片は主に骨小腔周囲の骨基質に、C 末端断片は主に骨細管に分布しており、互いの機能を相殺しないかのように、各断片が異なる局在分布を示すことは興味深い。これらの分布から、Dmp1

の分泌過程において両断片への切断が起こる部位は、両断片の分布の相違が明確になる前の骨細胞内か、分泌直後の骨小腔周囲と思われる。Dmp1 を切断すると考えられている bone morphogenetic protein 1 /tolloid-like proteinases²⁸⁾は骨組織で発現し²⁹⁾、ゴルジ領域で前駆体から活性化されることから³⁰⁾、Dmp1 の切断は骨細胞のゴルジ装置内や輸送小胞内、あるいは細胞外への分泌直後に起こるものと思われる。また、骨細管周囲に C 末端断片が主に分布しているのに比べ、骨小腔周囲には N 末端断片が主に分布していることは、骨小腔周囲の骨が骨小腔から離れた部位の骨に比べて低石灰化であること³¹⁾に関連すると思われる。Maciejewska らは³²⁾、象牙質における Dmp1 の両断片の局在分布について本研究と同様の所見を報告している。すなわち、コンドロイチン 4-硫酸を結合した Dmp1 N 末端断片は石灰化していない象牙前質に分布するのに対して、C 末端断片は石灰化象牙質に分布する。Dmp1 C 末端断片が局在する骨細管は、従来、力学的負荷を感知するのに重要であると考えられていたが、Dmp1 C 末端断片が石灰化促進作用を有することから、骨細管は骨の石灰化にも重要な役割を果たすものと考えられる。

ラットの骨組織から抽出した Dmp1 は、全長にして約 53 個のリン酸基を有しており、骨組織内で高度にリン酸化されている¹³⁾。骨細胞周囲の骨基質がリン酸化されていることは、骨の連続消化法により得られた骨細胞の豊富な分画にカゼインキナーゼ II (CKII) 活性が高く、この CKII により bone sialoprotein (BSP) がリン酸化されることから、以前から示唆されていた³³⁾。Suzuki ら³⁴⁾は、CKII のリン酸供与源である GTP を ³²P でラベルした[γ-³²P]GTP を用いた *in situ* 解析により、骨基質蛋白質は CKII によるリン酸化を受けていることを報告している。また、CKII によるリン酸化はセリン残基に起こるため、彼らは抗ホスホセリン抗体を用いた免疫組織化学的染色により、骨基質全域にホスホセリ

ンが局在することを報告しているが、その結果は本研究におけるホスホセリンの局在分布とは異なっていた。骨基質中のリン蛋白質には、Dmp1 以外に osteopontin (OPN) や BSP 等が含まれるが、Dmp1、OPN、BSP の 1 モル当たりの無機リン酸量は、OPN が 13 Pi/mol³⁵⁾、BSP が 5.85 Pi/mol³⁶⁾、Dmp1 が 53 Pi/mol (N 末端断片が 12 Pi/mol、C 末端断片が 41 Pi/mol)¹³⁾ で、無機リン酸量が最も多いのは Dmp1 であるため、ホスホセリンの免疫反応は、本研究結果で示したように、Dmp1 の分布に一致するのが妥当であると考えられる。また、本研究では、ホスホセリンの免疫組織化学的染色のコントロールとして、Alkaline Phosphatase (Calf intestine) により脱リン酸化した切片で免疫反応が減弱する事を確認し (結果示さず)、ホスホセリンの免疫反応の妥当性を確認している。両研究グループ間で、ホスホセリンの分布に違いが認められるのは、ホスホセリンに対する抗体の違いに依存するのかもしれない。

これまで骨基質をリン酸化する酵素は CKII と考えられていたが、CKII は主に核と細胞質に局在する事から³⁷⁾、分泌経路に存在する骨基質蛋白質が CKII に遭遇してリン酸化を受ける可能性は低いという矛盾を抱えていた。最近になって、その分泌経路のゴルジ体に局在するゴルジ体キナーゼ (Fam20C) が発見された¹⁶⁾。また、Fam20C が認識するリン酸化モチーフ (セリン-X-アスパラギン酸/ホスホセリン) を有する OPN や Dmp1 の組換え体が Fam20C によりリン酸化されることが、*in vitro* の実験で報告された¹⁶⁾。本研究結果では、Fam20C は骨芽細胞では認められず、骨細胞特異的に高発現していた。しかも、骨細胞のゴルジ領域に Fam20C と Dmp1 が共局在している (図 11) ことから、骨細胞のゴルジ体で Dmp1 がリン酸化されることが示唆された。Dmp1、特にその C 末端断片は Fam20C が認識するリン酸化モチーフ (セリン-X-アスパラギン酸/ホスホセリン) を多数有すること、Fam20C がリン酸化供与体として利用する ATP は骨細胞が

豊富に有し、細胞外にも放出する³⁸⁾ことなど、骨細胞には Fam20C が Dmp1 をリン酸化する環境が整っている。これらの結果を踏まえると、Fam20C 欠損マウスがくる病様病態を呈する¹⁷⁾のは、骨細胞が産生する Dmp1 が Fam20C が欠損するためにリン酸化されないためであろうと考えられる。

Dmp1 C 末端断片にはリン酸化モチーフが多数存在し、骨基質中では高度にリン酸化されていることから¹³⁾、Dmp1 C 末端断片の分泌過程におけるリン酸化状態を観察した。類骨骨細胞内のゴルジ領域には、キナーゼとそのキナーゼ基質である Fam20C と Dmp1 C 末端断片は局在するが、同領域にホスホセリンの免疫反応は認められず、類骨骨細胞内では Dmp1 C 末端断片は十分にリン酸化されていないものと考えられた。一方、幼若骨細胞に成熟すると、そのゴルジ領域には Fam20C と Dmp1、さらにホスホセリンの免疫反応が認められ、幼若骨細胞のゴルジ領域にはリン酸化した Dmp1 C 末端断片が存在することが示唆された(図 9. E-F)。その他に、石灰化骨に分布する骨細胞の骨小腔や骨細管周囲の骨基質には Dmp1 C 末端断片とホスホセリンが共局在しており、リン酸化した Dmp1 C 末端断片が細胞外の骨基質に存在することが示唆された(図 7、8)。分泌蛋白質は細胞質のリボソームで合成されて小胞体に運ばれ、ゴルジ体で翻訳後修飾を受けた後、輸送小胞により細胞外に分泌されるという分泌経路を考えると、Dmp1 C 末端断片も同様に、骨細胞内のゴルジ体で Fam20C によってリン酸化され、リン酸化された Dmp1 C 末端断片が輸送小胞により細胞外の骨基質に運ばれ、骨基質に分布するものと思われる(図 14)。ただし、Fam20C はゴルジ体に局在する事から細胞外にも分泌される可能性がある。実際に、Fam20C を遺伝子導入したヒト胎児由来腎臓細胞の培養液中に Fam20C が検出されており²⁴⁾、骨組織を用いた免疫組織化学的染色でも、細胞外基質に Fam20C が認められるという報告もあることから³⁹⁾、Dmp1 C 末端断片が細胞外でリン酸化される可

能性は否定できない。従って、本研究結果は、Dmp1 C 末端断片は分泌過程のゴルジ領域における翻訳後修飾の段階から既にリン酸化が始まっていることを示すものである。

Dmp1 は、骨細胞内のゴルジ領域に局在する事から、分泌過程における細胞内輸送経路を検討した。超高压電子顕微鏡解析の断層像より、Dmp1 C 末端断片はゴルジ体様構造物や小胞様構造物内にその局在が認められた。また、小胞様構造物の断層像（図 13. A）の三次元的再構築により、小胞様構造物は Dmp1 C 末端断片を含む輸送小胞であることが確認でき、Dmp1 は輸送小胞により細胞内を輸送されることが示唆された。同様の分泌経路が、Dmp1 と同じ Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins (SIBLINGs) ファミリーに属する dentin sialophosphoprotein (DSPP) についても報告されている⁴⁰⁾。DSPP は、その分泌過程で N 末端の dentin sialoprotein (DSP) と C 末端の phosphoryn (DPP) に切断され、C 末端の DPP を含む輸送小胞は象牙芽細胞の体部に認められると共に、象牙前質から石灰化前線付近までの象牙芽細胞の突起内に認められることから、DPP は輸送小胞により象牙芽細胞突起内を運ばれ、石灰化前線付近で細胞外に分泌されと考えられている⁴⁰⁾。本研究では、時間の関係で骨細胞突起内に Dmp1 C 末端断片を含む輸送小胞様構造物を探せていないが、象牙芽細胞における DPP の輸送小胞による分泌経路を考えれば、骨細胞でも骨細胞突起内に Dmp1 を含んだ輸送小胞が存在し、Dmp1 C 末端断片を骨細管周囲の骨基質まで輸送しているのではないかと考えられる。

常染色体劣性低リン血症性くる病や Dmp1 欠損マウスでは、骨細胞における FGF23 発現亢進により血中の FGF23 濃度が上昇し、腎臓における尿中リン排泄量が増加して低リン血症性くる病を引き起こすことが分かっている^{10, 11)}。Dmp1 欠損マウスの骨組織では類骨が増加し、骨細胞周囲にも類骨が認められ、骨芽

細胞から骨細胞への分化異常が起こっている。この Dmp1 欠損マウスに高リン食を摂取させると骨格の成長は回復するが、依然として骨細胞周囲に類骨が残存することから、骨細胞周囲の石灰化障害は Dmp1 欠損による直接作用と考えられる。このように、骨細胞が産生する Dmp1 は局所では骨細胞周囲の石灰化に直接作用するとともに、全身では骨細胞による FGF23 発現をその上流で抑制してリン代謝に関与すると考えられている⁴¹⁾。Dmp1 による FGF23 発現制御メカニズムは未だに明らかではないが、そのメカニズム解明に向けて幾つかの研究結果が報告されている。Dmp1 欠損マウスから取り出した骨髄間質細胞を培養して分化誘導させると、形成された石灰化ノジュール内の骨細胞は FGF23 発現を亢進することから、Dmp1 欠損による骨細胞の FGF23 発現亢進は Dmp1 欠損の骨細胞自身に内在する異常による結果である⁴¹⁾。骨細胞の FGF23 発現亢進は、PHEX (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) の不活性変異を起こした X 染色体優性低リン血症性くる病 (X-linked hypophosphatemic rickets) のモデルマウスである Hyp マウスでも起こることが報告されている⁴²⁾。Martin ら⁴³⁾は、この Hyp マウスと Dmp1 欠損マウス、さらに両者の交配を組み合わせで作製した Hyp/Dmp1 欠損マウスの皮質骨から抽出した RNA のマイクロアレイ解析等から、PHEX 不活性変異や Dmp1 欠損による骨細胞の FGF23 発現亢進には FGF 受容体を介したシグナル伝達に関与することを示唆している。また、最近、Fam20C が Dmp1 発現を介して FGF23 産生を制御する可能性が報告されている。変異 Fam20C 遺伝子を導入した培養細胞実験から、Fam20C が Dmp1 発現を上昇させて FGF23 の産生を抑制していると報告されており⁴⁴⁾、Fam20C ノックアウトマウスでは Dmp1 発現が低下している現象を説明できる⁴⁵⁾。したがって、Fam20C 変異により発症する Raine syndrome 患者や Fam20C ノックアウトマウスで生じる血中 FGF23 の上昇は^{46, 17)}、

Dmp1 発現低下による可能性が考えられ、今後、全身のリン代謝における Dmp1 と Fam20C の機能解明が望まれる。

結論

1. 骨の至る所に骨細胞が存在するが、骨細胞の成熟段階によりDmp1の産生能は異なり、Dmp1を盛んに産生しているのは骨表層近くに分布する未熟な骨細胞（骨芽細胞様骨細胞、類骨骨細胞、幼若骨細胞）である。骨深部に広範囲に分布する大部分の骨細胞（成熟骨細胞）はDmp1 mRNAをほとんど発現していないが、未熟な骨細胞が分泌したDmp1は、成熟骨細胞周囲の基質で安定して維持されている。
2. Dmp1は、その分泌過程でN末端断片(37kDa)とC末端断片(57kDa)に切断されるが、骨細胞内のゴルジ領域や一部の骨小腔周囲では、N末端断片とC末端断片が共局在していた。一方、細胞外では、N末端断片は主に骨小腔周囲の基質に、C末端断片は主に骨細管周囲の基質に分布する傾向がある。このように、N末端断片とC末端断片の分布の相違が明確になるのは細胞外であるため、両断片への切断は骨細胞内か、分泌直後の骨小腔周囲で起こると考えられた。
3. 骨細管は従来、力学的負荷を感知するのに重要であると考えられていたが、石灰化促進作用を有するDmp1 C末端断片が骨細管に局在分布することから骨細管は骨の石灰化に重要な役割を果たすことが示唆された。
4. Dmp1の機能ドメインであるC末端断片は、骨細胞内のゴルジ領域でFam20Cによりリン酸化されて輸送小胞により運ばれて細胞外に分泌され、リン酸化された状態で骨小腔や骨細管周囲の骨基質に分布し、骨の石灰化に関与することが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えていただき、ご指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔総合医療学（口腔総合診療部）竹重文雄教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行において、総合的にご指導を賜りました大阪大学大学院顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学教室）豊澤悟教授に深く感謝いたします。また、本研究の遂行に際し、数多くのご指導とご教示を賜りました大阪大学大学院顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学教室）佐藤淳講師、大阪大学超高压電子顕微鏡センター西田倫希博士に厚く御礼申し上げます。最後に、本研究にご協力くださいました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔総合医療学（口腔総合診療部）ならびに大阪大学大学院顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学教室）の諸先生方に心から感謝いたします。

参考文献

- 1) Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2012. 10(2):118-25.
- 2) Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol.* 1996. 101(4): 25-79.
- 3) Kamioka H, Ishihara Y, Ris H, Murshid SA, Sugawara Y, Takano-Yamamoto T, Lim SS. Primary cultures of chick osteocytes retain functional gap junctions between osteocytes and between osteocytes and osteoblasts. *Microsc Microanal.* 2007. 13 (2): 108-17.
- 4) Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011. 17 (10): 1231–4.
- 5) van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Löwik CW. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005. 16 (3): 319-27.
- 6) Quarles LD. Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012. 8 (5): 276-86.
- 7) Gericke A, Qin C, Sun Y, Redfern R, Redfern D, Fujimoto Y, Taleb H, Butler WT, Boskey AL. Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization. *J Dent Res.* 2010. 89(4): 355-9.
- 8) Gajjaraman S, Narayanan K, Hao J, Qin C, George A. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J*

- Biol Chem.* 2007. 282(2): 1193-204.
- 9) Tartaix PH, Doulaverakis M, George A, Fisher LW, Butler WT, Qin C, Salih E, Tan M, Fujimoto Y, Spevak L, Boskey AL. In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions. *J Biol Chem.* 2004. 279(18): 18115-20.
- 10) Lorenz-Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pagès A, Amyere M, Wagenstaller J, Müller-Barth U, Badenhop K, Kaiser SM, Rittmaster RS, Shlossberg AH, Olivares JL, Loris C, Ramos FJ, Glorieux F, Vikkula M, Jüppner H, Strom TM. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nat Genet.* 2006. 38(11): 1248-50.
- 11) Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet.* 2006. 38(11): 1310-5.
- 12) Bhatia A, Albazzaz M, Espinoza Orías AA, Inoue N, Miller LM, Acerbo A, George A, Sumner DR. Overexpression of DMP1 accelerates mineralization and alters cortical bone biomechanical properties in vivo. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012. 5(1): 1-8.
- 13) Qin C, Brunn JC, Cook RG, Orkiszewski RS, Malone JP, Veis A, Butler WT. Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem.* 2003. 278(36): 34700-8.
- 14) Huang B, Maciejewska I, Sun Y, Peng T, Qin D, Lu Y, Bonewald L, Butler WT, Feng J, Qin C. Identification of full-length dentin matrix protein 1 in dentin and bone.

Calcif Tissue Int 2008. 82: 401–10.

- 15) Sun Y, Prasad M, Gao T, Wang X, Zhu Q, D'Souza R, Feng JQ, Qin C. Failure to process dentin matrix protein 1 (DMP1) into fragments leads to its loss of function in osteogenesis. *J Biol Chem*. 2010. 285(41): 31713-22.
- 16) Tagliabracci VS, Engel JL, Wen J, Wiley SE, Worby CA, Kinch LN, Xiao J, Grishin NV, Dixon JE. Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science*. 2012. 336(6085): 1150-3.
- 17) Wang X, Wang S, Li C, Gao T, Liu Y, Rangiani A, Sun Y, Hao J, George A, Lu Y, Groppe J, Yuan B, Feng JQ, Qin C. Inactivation of a novel FGF23 regulator, FAM20C, leads to hypophosphatemic rickets in mice. *PLoS Genet*. 2012. 8(5): e1002708.
- 18) Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, Marotti G. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta Anat (Basel)*. 1990. 137(4): 350-8.
- 19) Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone*. 1990. 11(6): 401-6.
- 20) Nefussi JR, Sautier JM, Nicolas V, Forest N. How osteoblasts become osteocytes: a decreasing matrix forming process. *J Biol Buccale*. 1991. 19(1): 75-82.
- 21) Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*. 2006. 235(1): 176-90.
- 22) Kremer JR, Mastrorade DN, McIntosh JR. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*. 1996. 116(1): 71-6.
- 23) Ishikawa HO, Xu A, Ogura E, Manning G, Irvine KD. The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates bio-mineralization proteins. *PLoS*

One. 2012. 7(8):e42988.

- 24) Xu H, Gu S, Riquelme MA, Burra S, Callaway D, Cheng H, Guda T, Schmitz J, Fajardo RJ, Werner SL, Zhao H, Shang P, Johnson ML, Bonewald LF, Jiang JX. Connexin 43 Channels are Essential for Normal Bone Structure and Osteocyte Viability. *J Bone Miner Res*. 2014. doi: 10.1002/jbmr.2374. [Epub ahead of print]
- 25) Chia LY, Walsh NC, Martin TJ, Sims NA. Isolation and gene expression of haematopoietic-cell-free preparations of highly purified murine osteocytes. *Bone*. 2015. 72: 34-42.
- 26) Paic F, Igwe JC, Nori R, Kronenberg MS, Franceschetti T, Harrington P, Kuo L, Shin DG, Rowe DW, Harris SE, Kalajzic I. Identification of differentially expressed genes between osteoblasts and osteocytes. *Bone*. 2009. 45(4): 682-92.
- 27) Lu Y, Yuan B, Qin C, Cao Z, Xie Y, Dallas SL, McKee MD, Drezner MK, Bonewald LF, Feng JQ. The biological function of DMP-1 in osteocyte maturation is mediated by its 57-kDa C-terminal fragment. *J Bone Miner Res*. 2011. 26(2): 331-40.
- 28) Steiglitiz BM, Ayala M, Narayanan K, George A, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *J Biol Chem*. 2004. 279(2): 980-6.
- 29) Scott IC, Blitz IL, Pappano WN, Imamura Y, Clark TG, Steiglitiz BM, Thomas CL, Maas SA, Takahara K, Cho KW, Greenspan DS. Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev Biol*. 1999. 213(2): 283-300.
- 30) Leighton M, Kadler KE. Paired basic/Furin-like proprotein convertase cleavage of Pro-BMP-1 in the trans-Golgi network. *J Biol Chem*. 2003. 278(20): 18478-84.

- 31) Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007. 1116: 281-90.
- 32) Maciejewska I, Cowan C, Svoboda K, Butler WT, D'Souza R, Qin C. The NH2-terminal and COOH-terminal fragments of dentin matrix protein 1 (DMP1) localize differently in the compartments of dentin and growth plate of bone. *J Histochem Cytochem.* 2009. 57(2): 155-66.
- 33) Mikuni-Takagaki Y, Kakai Y, Satoyoshi M, Kawano E, Suzuki Y, Kawase T, Saito S. Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *J Bone Miner Res.* 1995. 10(2): 231-42.34) Suzuki Y, Yamaguchi A, Ikeda T, Kawase T, Saito S, Mikuni-Takagaki Y. In situ phosphorylation of bone and dentin proteins by the casein kinase II-like enzyme. *J Dent Res.* 1998. 77(10): 1799-806.
- 34) Suzuki Y, Yamaguchi A, Ikeda T, Kawase T, Saito S, Mikuni-Takagaki Y. In situ phosphorylation of bone and dentin proteins by the casein kinase II-like enzyme. *J Dent Res.* 1998. 77(10): 1799-806.
- 35) Prince CW, Oosawa T, Butler WT, Tomana M, Bhowm AS, Bhowm M, Schrohenloher RE. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem.* 1987. 262(6): 2900-7.
- 36) Salih E. In vivo and in vitro phosphorylation regions of bone sialoprotein. *Connect Tissue Res.* 2003. 44 Suppl 1:223-9.
- 37) Litchfield DW. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* 2003. 369(Pt 1): 1-15.
- 38) Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, Yellowley CE, Donahue HJ. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *J Cell Physiol.* 2007. 212(1): 207-14.

- 39) Wang X, Hao J, Xie Y, Sun Y, Hernandez B, Yamoah AK, Prasad M, Zhu Q, Feng JQ, Qin C. Expression of FAM20C in the osteogenesis and odontogenesis of mouse. *J Histochem Cytochem.* 2010. 58(11): 957-67.
- 40) Rabie AM, Veis A. An immunocytochemical study of the routes of secretion of collagen and phosphophoryn from odontoblasts into dentin. *Connect Tissue Res.* 1995. 31(3): 197-209.
- 41) Liu S, Zhou J, Tang W, Menard R, Feng JQ, Quarles LD. Pathogenic role of Fgf23 in Dmp1-null mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008. 295(2): E254-61.
- 42) Liu S, Tang W, Zhou J, Vierthaler L, Quarles LD. Distinct roles for intrinsic osteocyte abnormalities and systemic factors in regulation of FGF23 and bone mineralization in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007. 293(6): E1636-44.
- 43) Martin A, Liu S, David V, Li H, Karydis A, Feng JQ, Quarles LD. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB J.* 2011. 25(8):2551-62.
- 44) Kinoshita Y, Hori M, Taguchi M, Fukumoto S. Functional analysis of mutant FAM20C in Raine syndrome with FGF23-related hypophosphatemia. *Bone.* 2014. 67: 145-51.
- 45) Wang X, Wang S, Lu Y, Gibson MP, Liu Y, Yuan B, Feng JQ, Qin C. FAM20C plays an essential role in the formation of murine teeth. *J Biol Chem.* 2012. 287(43): 35934-42.
- 46) Rafaelsen SH, Raeder H, Fagerheim AK, Knappskog P, Carpenter TO, Johansson S, Bjerknes R. Exome sequencing reveals FAM20c mutations associated with fibroblast

growth factor 23-related hypophosphatemia, dental anomalies, and ectopic calcification. *J Bone Miner Res.* 2013. 28(6): 1378-85.

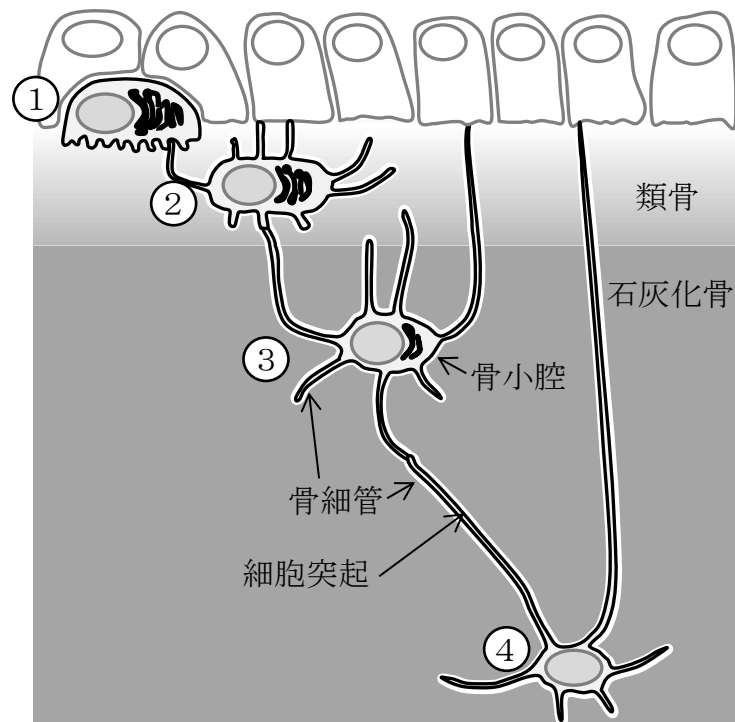


図 1. 骨細胞の形態学的分類 (Franz-Odendaal²¹⁾ の分類を参照)

骨芽細胞から骨細胞への成熟は、①骨芽細胞様骨細胞 (osteoblastic-osteocyte)、②類骨骨細胞 (osteoid-osteocyte)、③幼若骨細胞 (young-osteocyte)、④成熟骨細胞 (old-osteocyte) の順に進む。

- ① 骨芽細胞様骨細胞：骨芽細胞層に隣接するが、類骨に埋入されつつある骨細胞のことをいう。発達した粗面小胞体やゴルジ装置を有する。
- ② 類骨骨細胞：類骨内に完全に埋入されている骨細胞のことをいう。依然として、発達した粗面小胞体やゴルジ装置を有する。
- ③ 幼若骨細胞：石灰化骨に埋入されて間もない骨細胞のことをいう。細胞の体積は減少し、粗面小胞体やゴルジ装置の発達に乏しく、ミトコンドリア数も減少する。
- ④ 成熟骨細胞：石灰化骨の深部に存在する骨細胞のことをいう。骨芽細胞と比較すると、その体積が約 30%に縮小し、細胞内小器官は殆ど認められない。

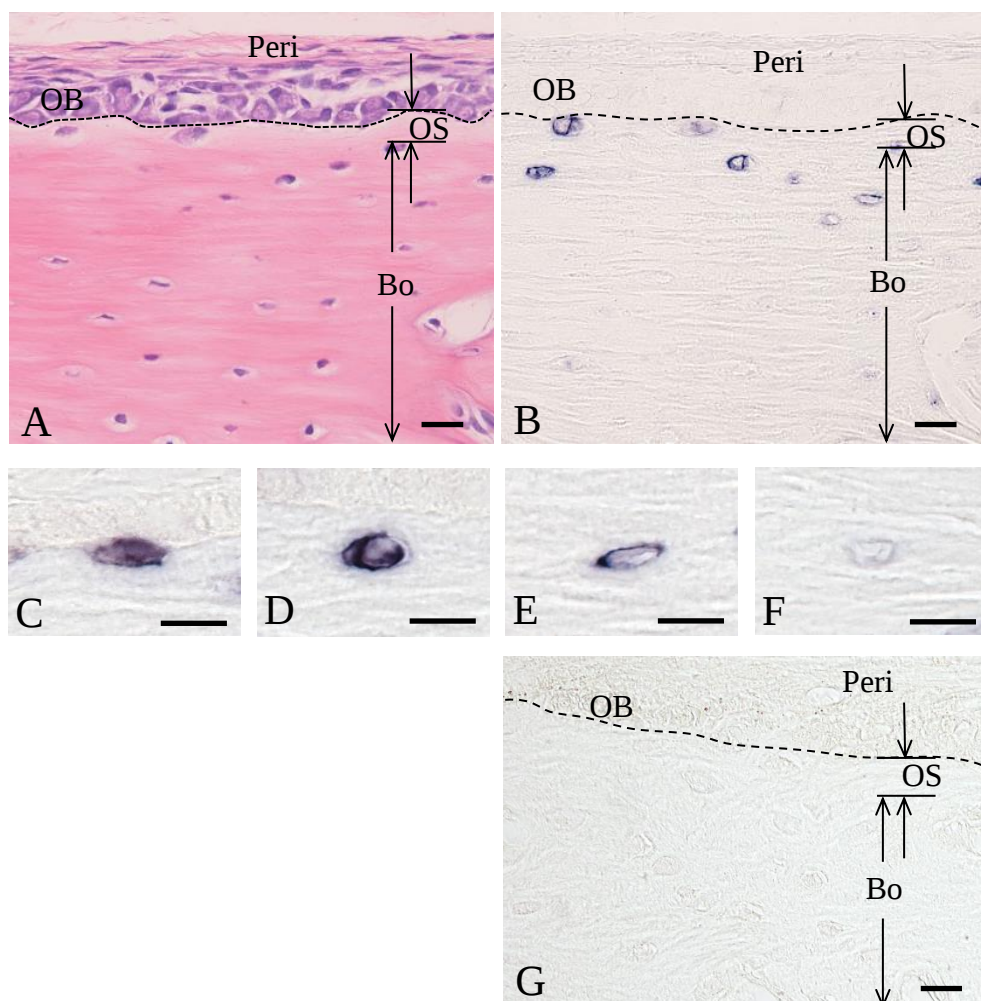


図 2. ラット脛骨の皮質骨における *Dmp1* mRNA の発現

A : ラット脛骨皮質骨 (H.E.染色)

B : ラット脛骨皮質骨における *Dmp1* mRNA の発現 (*in situ* hybridization)

C-F : 成熟過程の各骨細胞における *Dmp1* mRNA の発現 (*in situ* hybridization)

G : ネガティブコントロール (*in situ* hybridization)

A、B : 連続切片

Dmp1 mRNA は、骨芽細胞には発現せず、H.E.染色で薄い桃色として観察される類骨に埋入され始めた骨芽細胞様骨細胞 (B、C) と、類骨内に分布する類骨骨細胞 (B、D) で強発現している。一方、石灰化骨に埋入されて間もない幼若骨細胞 (B、E) では発現が減弱し、石灰化骨の深部に広範囲に分布する成熟骨細胞 (B、F) ではほとんど発現しない。

Peri : 骨膜、OB : 骨芽細胞、OS : 類骨、Bo : 石灰化骨

スケール : A、B、G=20 μ m、C-F=10 μ m

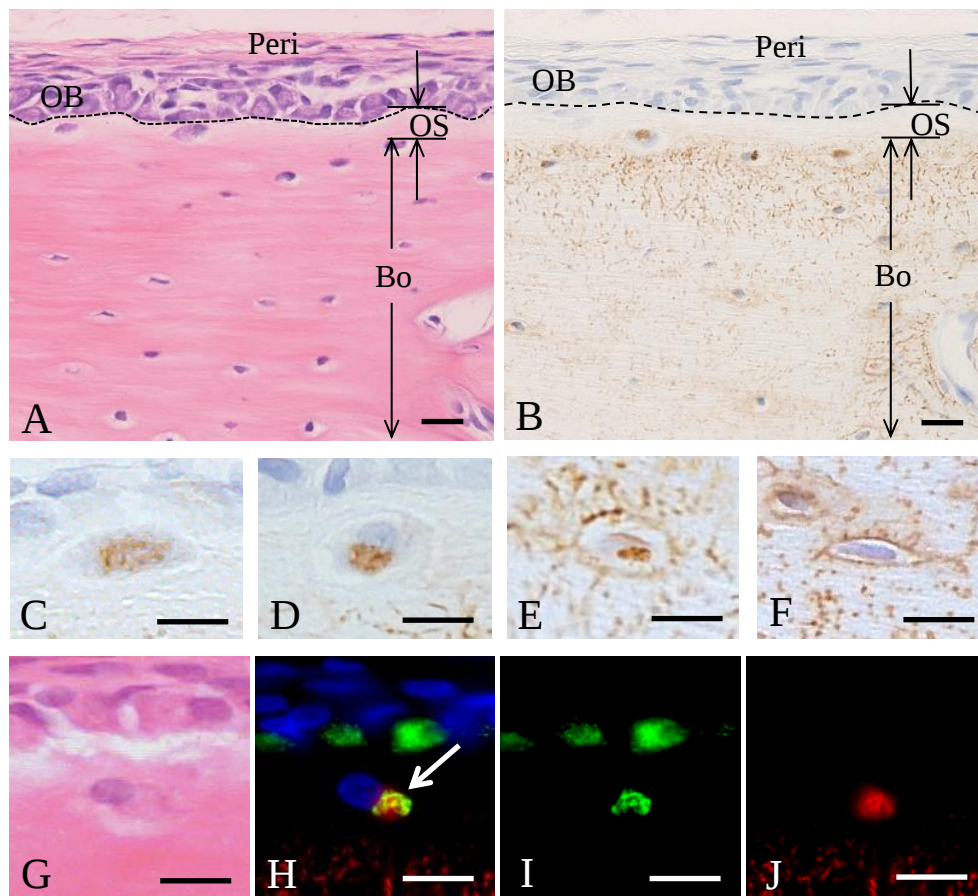


図 3. ラット脛骨の皮質骨における Dmp1 C 末端断片の局在分布

A : ラット脛骨皮質骨 (H.E.染色)

B : ラット脛骨皮質骨における Dmp1 C 末端断片の局在分布 (免疫組織化学的染色)

C-F : 成熟過程の各骨細胞における Dmp1 C 末端断片の局在分布 (同上)

G-J : 骨細胞内における Dmp1 C 末端断片と GM130 の局在分布 (蛍光二重染色)

A、B : 連続切片、G-J : 同一切片

Dmp1 C 末端断片は類骨に分布せず、石灰化骨では骨小腔周囲と骨細管に分布する。骨芽細胞様骨細胞 (B、C)、類骨骨細胞 (B、D)、幼若骨細胞 (B、E) 内には、Dmp1 C 末端断片が局在するが、成熟骨細胞 (B、F) 内には認められない。類骨骨細胞 (G : H.E.染色) 内 Dmp1 C 末端断片 (J : 赤色) はゴルジ体マーカー (GM130、I : 緑色) と共局在する (H : 矢印)。

Peri : 骨膜、OB : 骨芽細胞、OS : 類骨、Bo : 石灰化骨

スケール : A、B=20 μ m、C-J=10 μ m

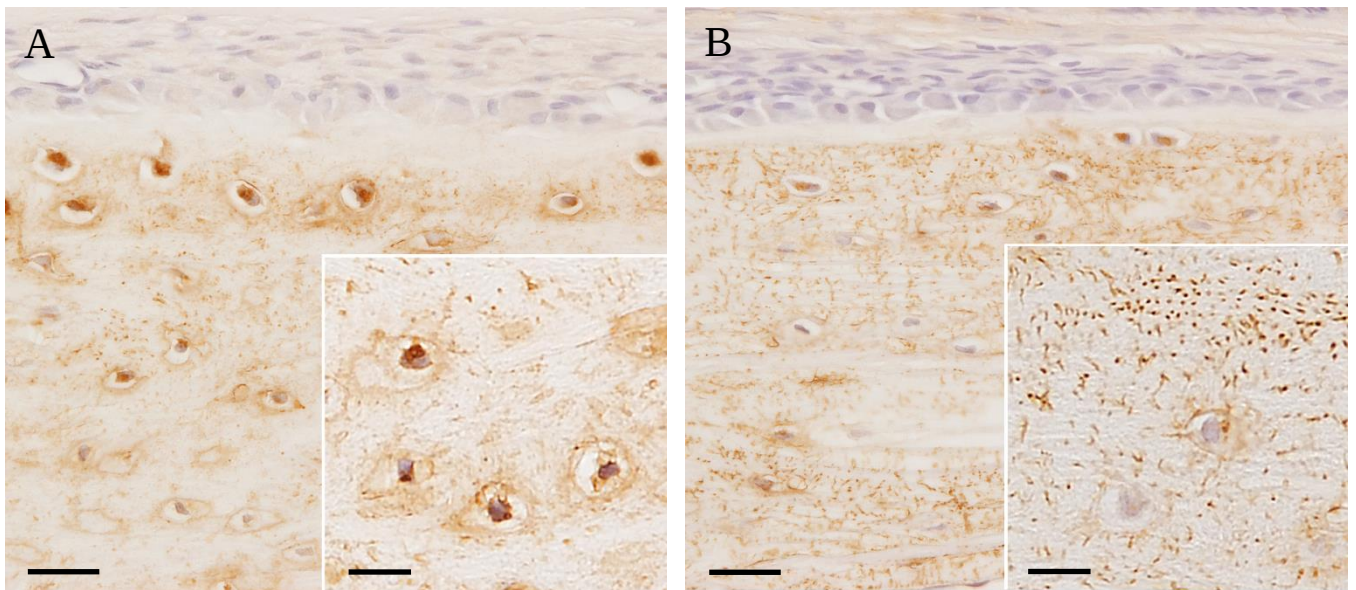


図 4. ラット脛骨の皮質骨における Dmp1 N 末端断片と C 末端断片の局在分布
(免疫組織化学的染色)

A : Dmp1 N 末端断片の局在分布 (挿入図 : 強拡大)

B : Dmp1 C 末端断片の局在分布 (挿入図 : 強拡大)

Dmp1 N 末端断片は主に骨小腔周囲に分布し、Dmp1 C 末端断片は主に骨細管に分布する傾向があり、両者の分布に相違がみられる。

スケール : A、B =20 μm 、挿入図=10 μm

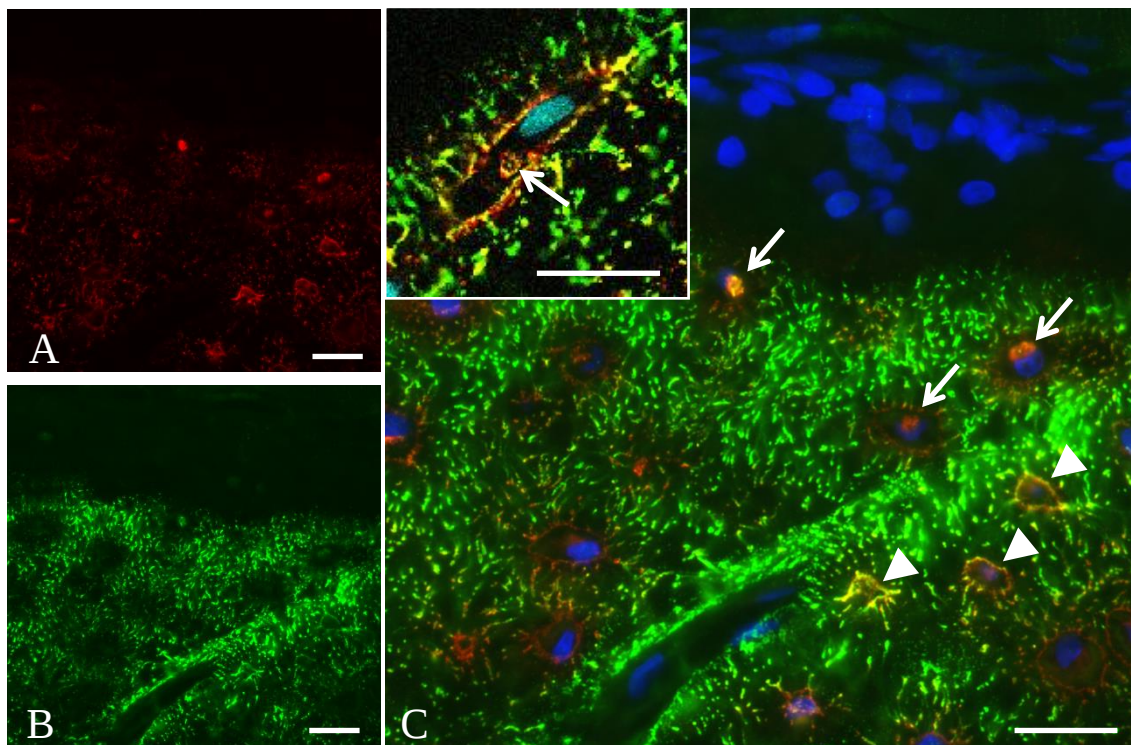


図 5. ラット脛骨の皮質骨における Dmp1 N 末端断片と C 末端断片の局在分布 (蛍光二重染色)

A-C : Dmp1 N 末端断片 (A) と C 末端断片 (B) の蛍光二重染色像

C の挿入図 : Dmp1 N 末端断片と C 末端断片の蛍光二重染色像 (共焦点レーザー顕微鏡)

A-C : 同一切片

Dmp1 N 末端断片 (A : 赤色) は主に骨小腔周囲に分布し、Dmp1 C 末端断片 (B : 緑色) は主に骨細管に分布する。一部の骨小腔周囲では Dmp1 N 末端断片と C 末端断片が共局在する (C : 矢頭)。骨細胞内のゴルジ領域では、Dmp1 N 末端断片と Dmp1 C 末端断片が共局在する (C : 矢印、挿入図 : 矢印)。

スケール : A-C=20 μm 、挿入図=10 μm

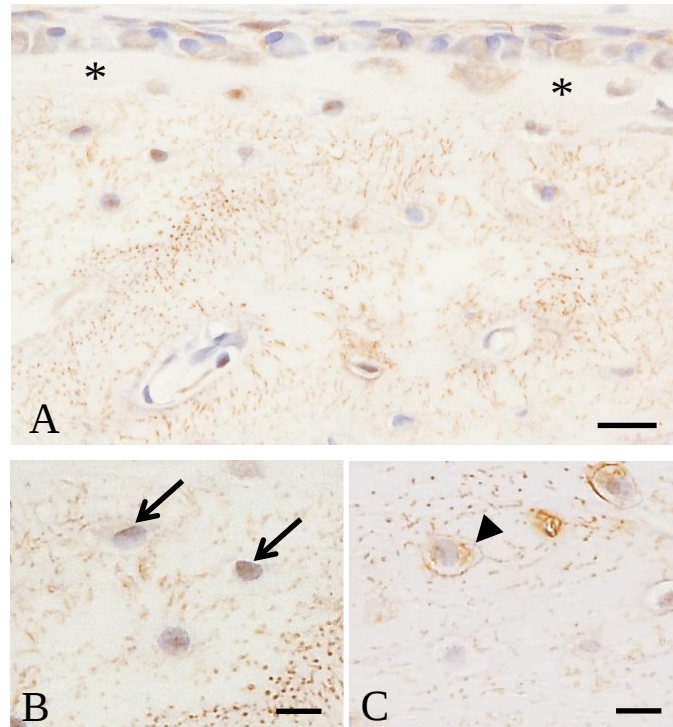


図 6. ラット脛骨の皮質骨におけるホスホセリンの分布（免疫組織化学的染色）

A：ラット脛骨皮質骨におけるホスホセリンの分布

B、C：ラット脛骨皮質骨におけるホスホセリンの分布（強拡大）

ホスホセリン陽性反応は、骨細胞の核（B：矢印）や細胞質内（C：矢頭）に認められる。石灰化骨において骨小腔周囲や骨細管にホスホセリン陽性反応を認めるが、類骨基質（*）には認められない。

スケール：A = 20 μm 、B、C = 10 μm

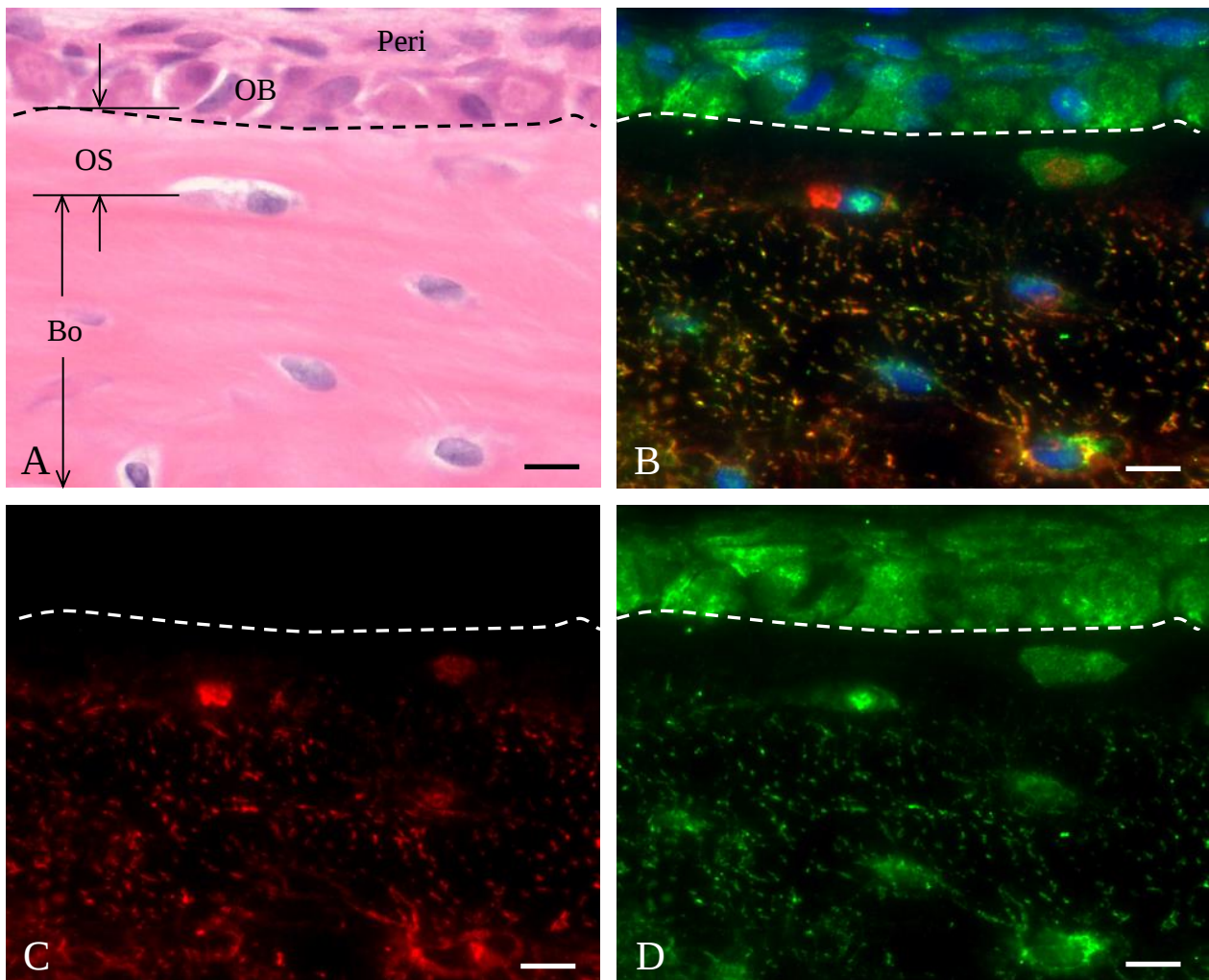


図 7. ラット脛骨の皮質骨における Dmp1C 末端断片とホスホセリンの局在分布
A-D : ラット脛骨皮質骨 (A : H.E.染色) における Dmp1 C 末端断片 (C) とホスホセリン (D) の蛍光二重染色像 (B)

A-D : 同一切片

石灰化骨では、骨細管や骨小腔周囲に Dmp1 C 末端断片 (C : 赤色) とホスホセリン (D : 緑色) が共局在している (B)。

破線 : 類骨と骨芽細胞層との境界

Peri : 骨膜、OB : 骨芽細胞、OS : 類骨、Bo : 石灰化骨

スケール : 10 μ m

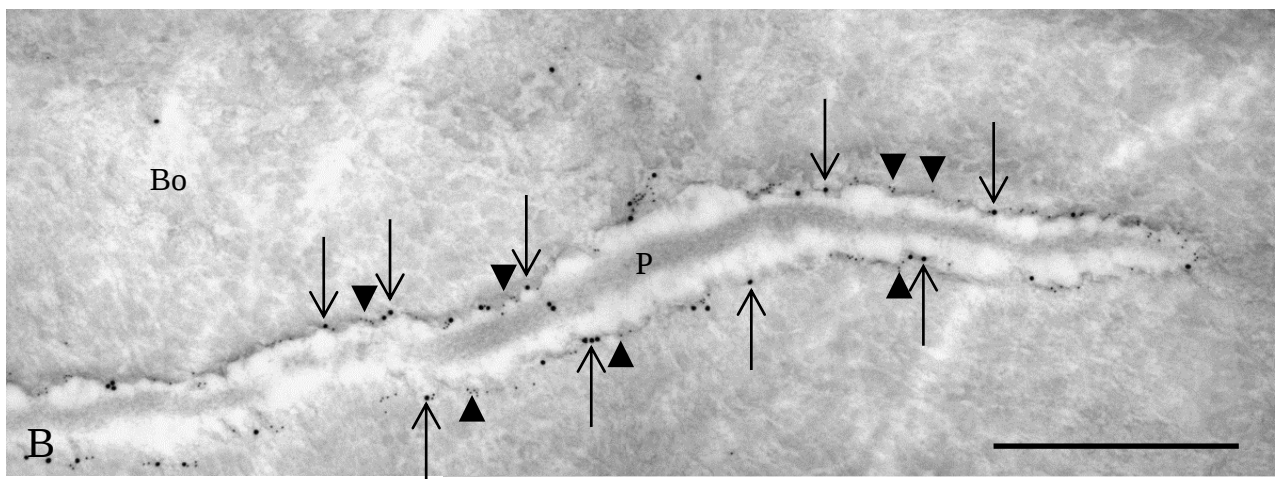
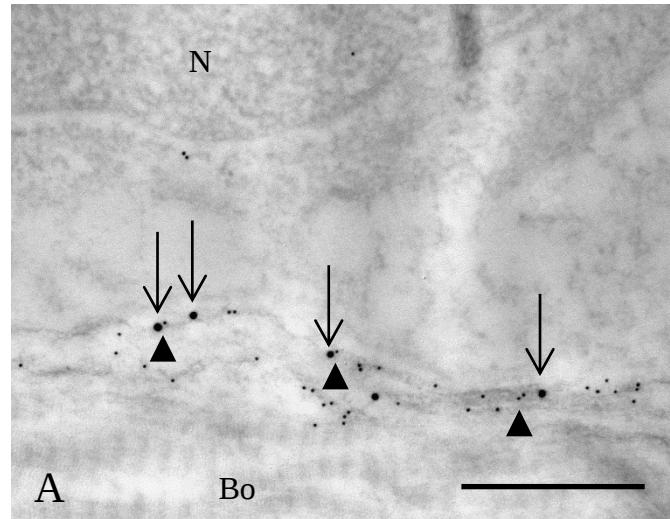


図 8. ラット脛骨の皮質骨における Dmp1 C 末端断片とホスホセリンの局在分布
(包埋後免疫電顕)

A : 骨小腔周囲における Dmp1 C 末端断片とホスホセリンの局在分布

B : 骨細管周囲における Dmp1 C 末端断片とホスホセリンの局在分布

骨小腔周囲基質 (A) と骨細管周囲基質 (B) に、Dmp1 C 末端断片 (矢印) とホスホセリン (矢頭) が共局在していることが確認できた。

N : 核、Bo : 石灰化骨基質、P : 骨細胞突起

スケール : A=500 nm、B=1 μ m

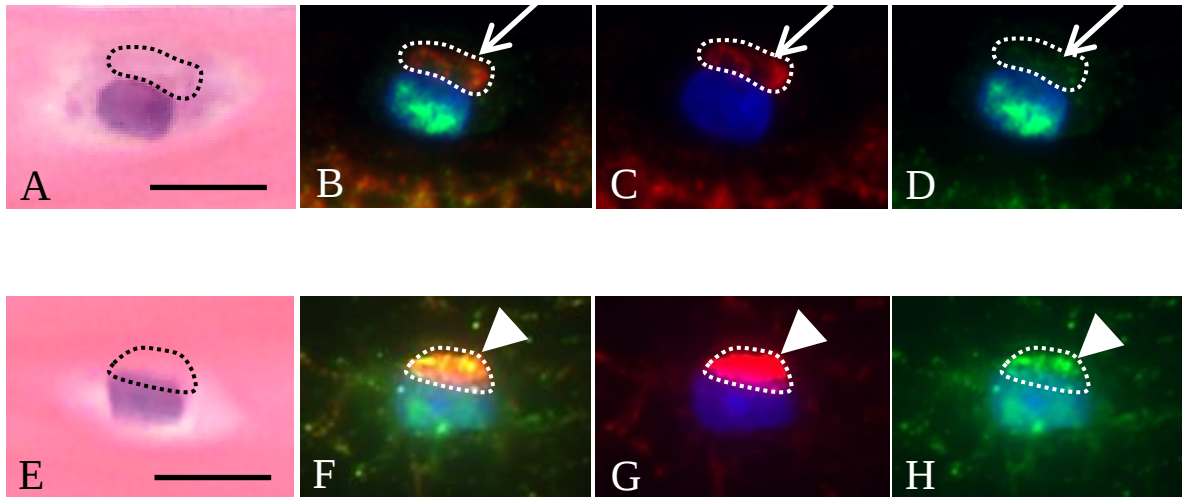


図 9. 骨細胞内における、Dmp1C 末端断片とホスホセリンの局在

A-D : 類骨骨細胞 (A : H.E.染色) における Dmp1C 末端断片 (C) とホスホセリン (D) の蛍光二重染色像 (B)

E-H : 幼若骨細胞 (E : H.E.染色) における Dmp1C 末端断片 (G) とホスホセリン (H) の蛍光二重染色像 (F)

A-D : 同一切片、E-H : 同一切片

類骨骨細胞では、ゴルジ領域に Dmp1C 末端断片 (C : 矢印) の局在を認めるが、ホスホセリン (D : 矢印) は認められない (B : 矢印)。幼若骨細胞では、Dmp1 C 端断片 (G : 矢頭) とホスホセリン (H : 矢頭) の共局在が認められる (F : 矢頭)。核にもホスホセリンの局在を認める。

点線枠内 : ゴルジ領域

スケール : 10 μ m

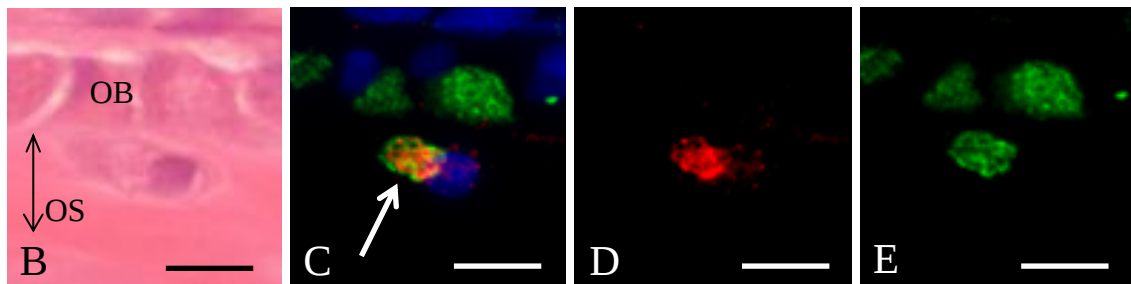
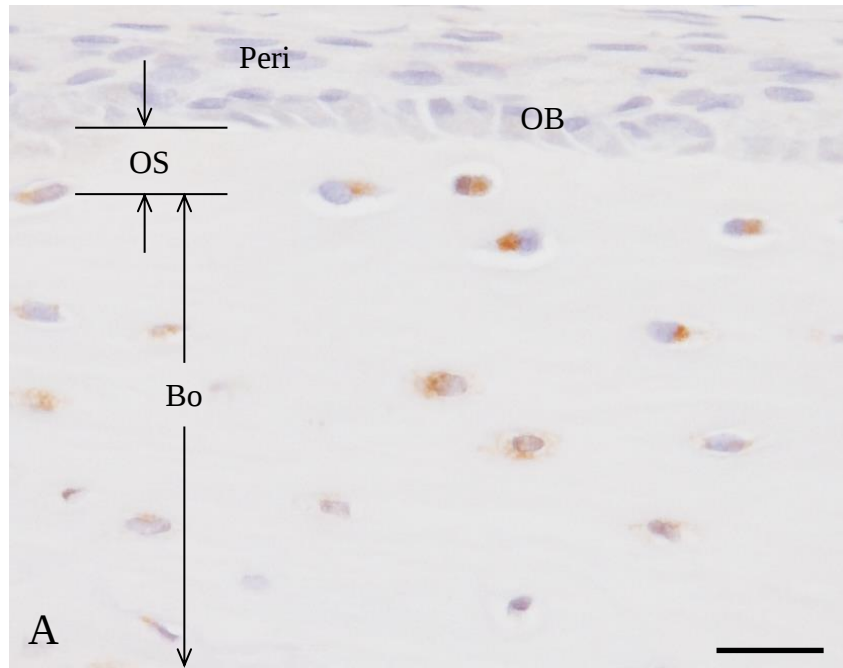


図 10. ラット脛骨の皮質骨における Fam20C の局在分布

A : ラット脛骨皮質骨における Fam20C の局在分布 (免疫組織化学的染色)

類骨骨細胞、幼若骨細胞の細胞内に Fam20C を認めた。

B-E : 皮質骨表層 (B : H.E.染色) における Fam20C (D) と GM130 (E) の蛍光二重染色像 (C)

B-E : 同一切片

骨細胞内では、Fam20C (D : 赤色) と GM130 (E : 緑色) の共局在が認められる (C : 矢印)。

Peri : 骨膜、OB : 骨芽細胞、OS : 類骨、Bo : 石灰化骨

スケール : A = 20 μ m、B-E = 10 μ m

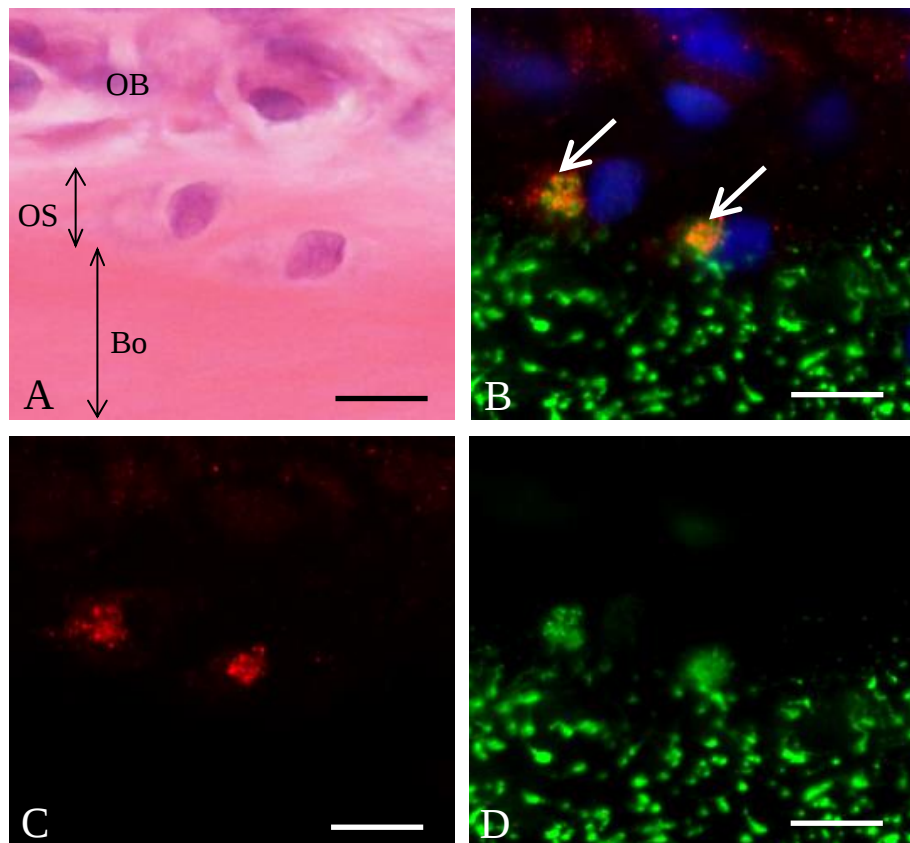


図 11. ラット脛骨の皮質骨における Fam20C と Dmp1 C 末端断片の局在分布
A-D: 皮質骨表層 (A: H.E. 染色) における Fam20C (C) と Dmp1 C 末端断片 (D)
の蛍光二重染色像 (B)

A-D: 同一切片

類骨骨細胞と幼若骨細胞のゴルジ領域 (A) で、Fam20C (C: 赤色) と Dmp1
C 末端断片 (D: 緑色) の共局在が認められる (B: 矢印)。

OB: 骨芽細胞、OS: 類骨、Bo: 石灰化骨

スケール: 10 μ m

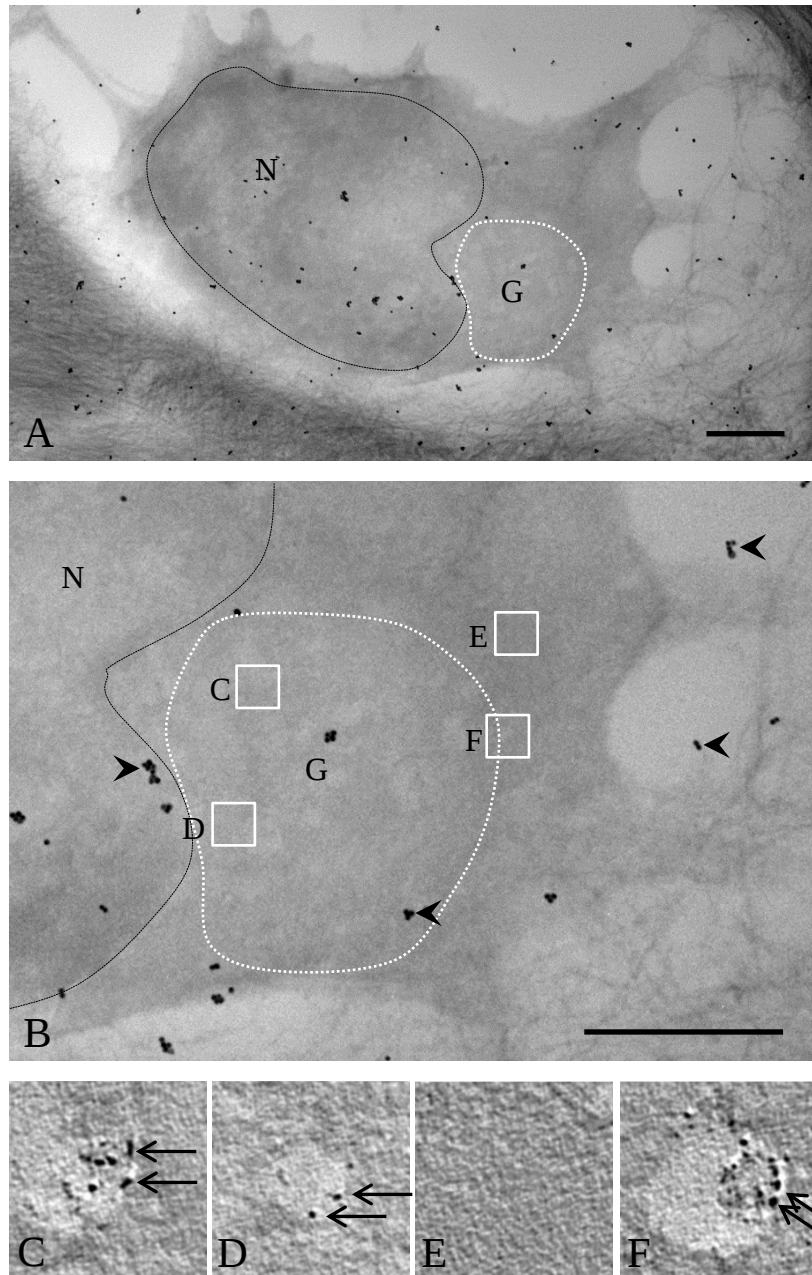


図 12. 骨細胞内における Dmp1 の局在分布 (包埋前免疫電顕)

A : Dmp1 を金粒子標識した骨細胞の超高压電子顕微鏡による観察

B : A の拡大写真

C-F : B の拡大断層像。ゴルジ体内に Dmp1 が認められる (C、D : 矢印) が、小胞様構造の外部には認められない (E)。小胞様構造内に Dmp1 が認められる (F : 矢印)。

G : ゴルジ体 (点線枠内)、N : 核、矢頭 : 位置標識マーカー

スケール : A、B=1 μ m

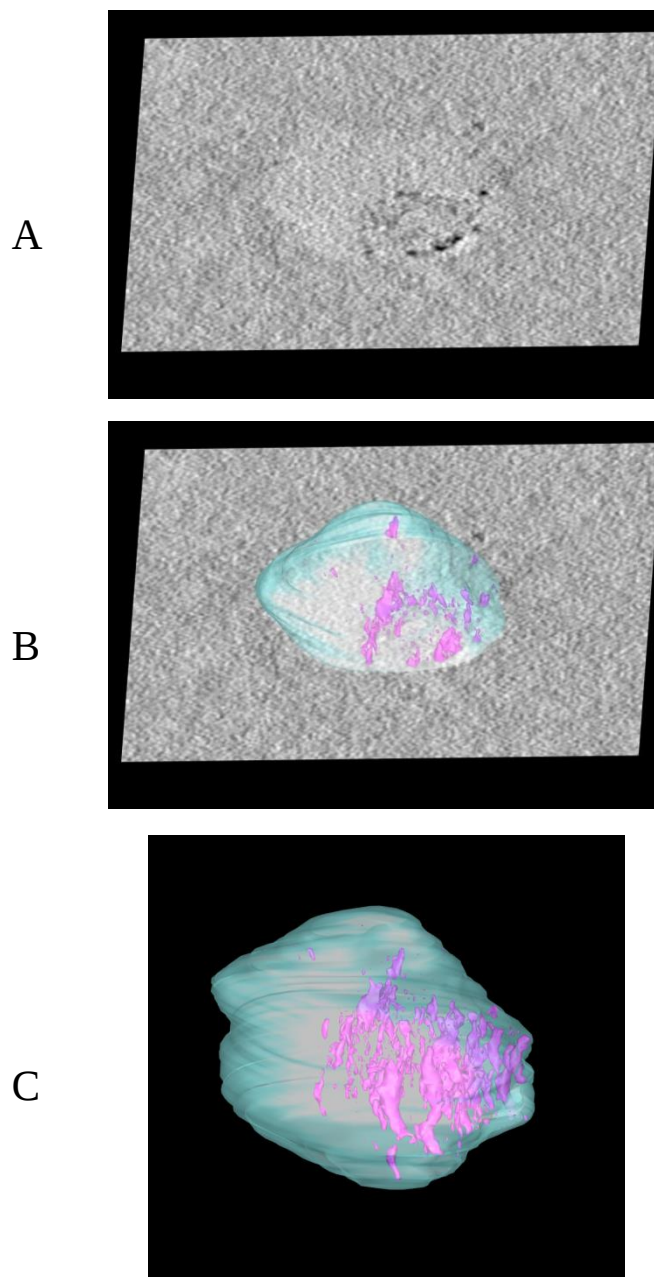


図 13. Dmp1 が局在する輸送小胞の三次元モデル

A : 図 12. c 領域の断層像の一つ

B、C : 図 12. c 領域の断層像から三次元像を再構築し、輪郭抽出を行い得られた輸送小胞の三次元モデル (B、C)。輸送小胞 (青色) 内に Dmp1 (桃色) が局在する。

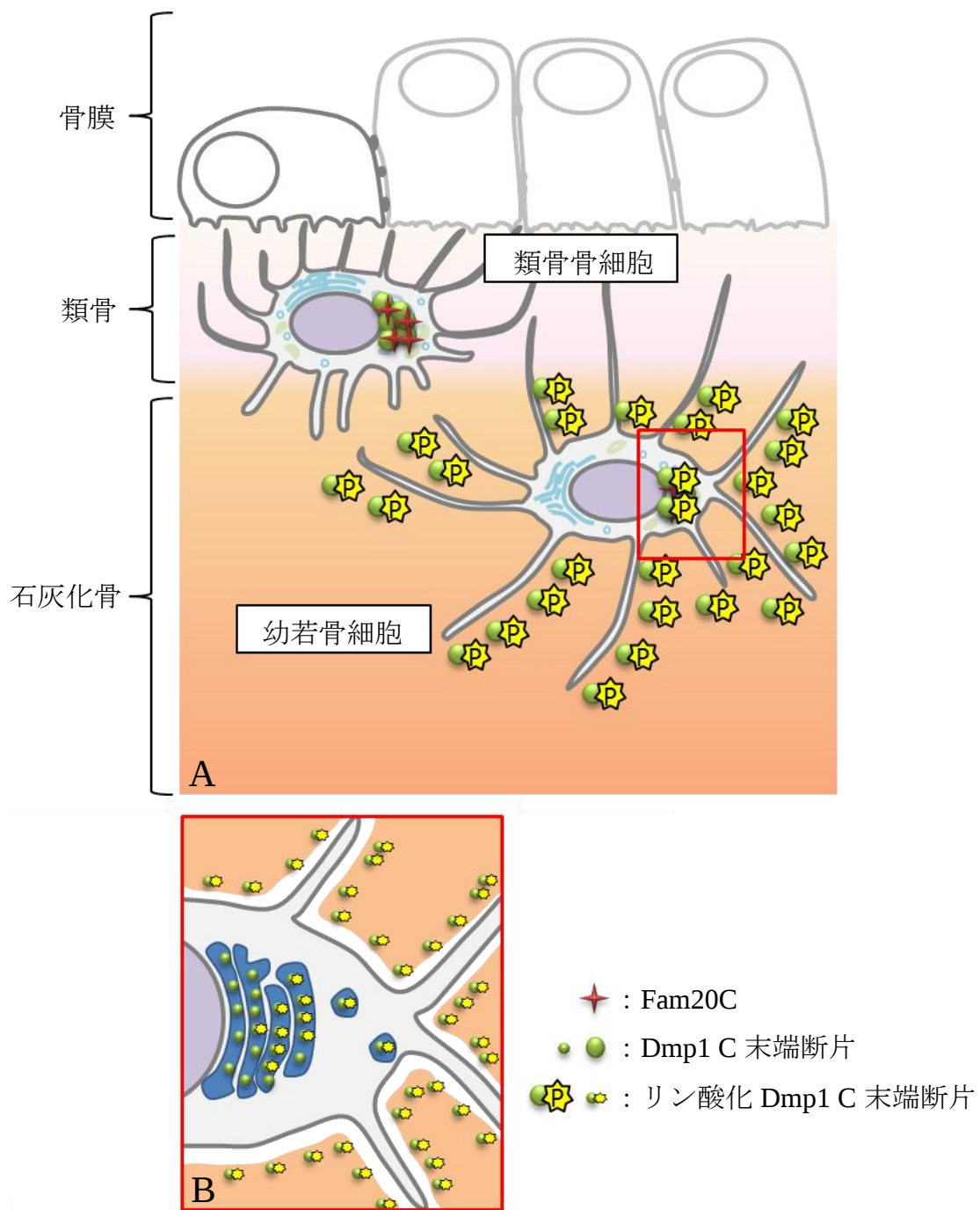


図 14. 分泌過程における Dmp1 C 末端断片のリン酸化

A : 類骨骨細胞と幼若骨細胞における Fam20C、Dmp1 C 末端断片とリン酸化 Dmp1 C 末端断片の局在分布

B : A の赤枠内の拡大図

未熟な骨細胞が産生する Dmp1 は、ゴルジ体で Fam20C によりリン酸化される。特に C 末端断片は幼若骨細胞内で高度にリン酸化され、輸送小胞により細胞内を輸送されて細胞外基質にリン酸化した状態で分布する。