

Title	Osteocrin, a peptide secreted from the heart and other tissues, contributes to cranial osteogenesis and chondrogenesis in zebrafish
Author(s)	千葉, 彩乃
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61540
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	千葉 彩乃
論文題名 Title	Osteocrin, a peptide secreted from the heart and other tissues, contributes to cranial osteogenesis and chondrogenesis in zebrafish (心臓その他の臓器から分泌されるOsteocrinはゼブラフィッシュ頭部の骨形成と軟骨形成に寄与する)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
心臓は循環をつかさどるポンプとしてだけでなく内分泌器官としても機能している。しかし、心臓から分泌されて遠位の臓器に作用するホルモンは、ナトリウム利尿ペプチド (NP) 以外には発見されていない。そこで心臓の内分泌器官としての新たな機能を探索するために、ゼブラフィッシュの心臓に発現する分泌因子を探索した。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
心臓に発現する分泌因子を探索するために、心筋細胞特異的プロモーター制御下でmCherryあるいはactn2-tdEosを発現するトランスジェニック(Tg) ゼブラフィッシュを樹立し、心筋細胞をfluorescence activated cell sorting (FACS) でソートした。心筋細胞に発現する遺伝子をRNA-Seqで網羅的に解析した結果、軟骨形成を促進するペプチドホルモンとして知られるOsteocrin (Ostn)がゼブラフィッシュ心筋細胞に発現することを見出した。ゼブラフィッシュostnの発現をwhole mount <i>in situ</i> hybridizationで確認したところ、心臓と脳内に発現することを確認した。 ゼブラフィッシュ生体内のOstnの機能を明らかにするために、transcription activator-like effector nuclease (TALEN)を用いてostn欠損ゼブラフィッシュ (<i>ostn^{ncv105}</i>) を樹立した。7日目胚の<i>ostn^{ncv105}</i>の頭部は野生型(<i>ostn⁺</i>)と比較して短縮し、骨形成抑制の可能性が考えられた。骨形成の過程は、骨芽細胞から直接骨化する膜性骨化と、軟骨を経てから骨化する軟骨内骨化の二種類が存在する。頭部の膜性骨と軟骨の長さを測定したところ、どちらも<i>ostn^{ncv105}</i>で短縮することが分かった。さらに、<i>ostn^{ncv105}</i>の膜性骨短縮は、心筋細胞特異的にOstnを過剰発現することで回復したため、心臓から分泌されたOstnが骨形成に寄与しうると考えられた。 Ostnによる膜性骨形成促進作用はこれまで報告されていない。そこで、Ostnによる膜性骨形成促進機構を明らかにするため、代表例としてostn欠損で短縮する副蝶形骨 (ps) を解析した。Ostn欠損はps骨芽細胞の分化、増殖、アポトーシスに影響を与えなかった。しかし、転写コアクチベーターYap1/Wwtr1による転写活性をGFPの発現でモニターするTgゼブラフィッシュでは、<i>ostn</i>ノックダウンでps骨芽細胞のGFP蛍光強度が増大した。さらに、骨芽細胞特異的にYap1/Wwtr1のドミナントネガティブ体 (Ytip) を発現するとpsは伸長し、核内移行型のYap1 (Yap1-5SA) を発現するとpsは短縮したことから、OstnはYap1/Wwtr1の核外移行を促進して膜性骨を伸長すると考えられた。 OSTNがYAP1/WWTR1の核外移行を促進するメカニズムを明らかにするために、マウス骨芽細胞様MC3T3-E1細胞を使用した。OSTNはNPのクリアランス受容体であるNPR3に結合し、クリアランスを抑制することでNPの作用を増強すると知られている。MC3T3-E1細胞をC型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)で刺激したところ、YAP1/WWTR1の核外移行が増加した。OSTN刺激は、単独ではYAP1/WWTR1の核外移行を変化させないが、CNP刺激による核外移行を増強した。この核外移行は、CNPの受容体であるNPR2の発現抑制、あるいはその下流のプロテインキナーゼG (PKG) の阻害剤によって打ち消された。しかし、核外移行作用が最大となるCNP濃度で刺激した際も、OSTNはCNP刺激によるYAP1/WWTR1核外移行を増強した。このことからOSTNはNPR3以外の受容体を介してCNP-NPR2-PKGを介したYAP1/WWTR1核外移行を促進する可能性が考えられた。	
〔総括(Conclusion)〕	
以上の結果より、ゼブラフィッシュの心臓はOstnの供給する内分泌器官の一つとして機能しており、OstnはCNP-Npr2-PKGを介したYap1/Wwtr1の核外移行を促進することで膜性骨、軟骨形成を促進すると考えられた。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 千葉 彩乃			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学招聘教授	望月 千佳
	副 査	大阪大学教授	高倉 伸幸
	副 査	大阪大学教授	坂田 泰史
論文審査の結果の要旨			
申請者 千葉彩乃は博士課程で心臓から分泌されるOsteocrin (Ostn) をゼブラフィッシュで同定し、生体での機能を調べた。Ostnが骨形成の膜性骨化・内軟骨性骨化の両方を促進することを明らかにした。分子メカニズムとして、C-type natriuretic peptide (CNP) のクリアランス受容体であるNpr3 に結合し、CNP の分解を抑制することで骨への作用を発揮することを突き止めた。さらに、CNPが転写共役因子Yap1/Wwtr1 の核外移行を促進するが、Ostnによりさらに核外移行を増強することを骨芽細胞を用いて証明した。以上の結果は、心臓が内分泌臓器として機能し、骨形成を調節しうることを初めて明らかにした研究であり、学位論文に値すると思われる。			