The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨形成におけるゴルジ体キナーゼFam20Cの役割
Author(s)	廣瀬, 勝俊
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69480
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　廣瀬　勝俊　　）	
論文題名	骨形成におけるゴルジ体キナーゼFam20Cの役割

論文内容の要旨

【緒言】

Fam20C (family with sequence similarity 20 member C)はゴルジ領域に局在し、S-X-E/pSモチーフ配列を有する分泌蛋白質のリン酸化修飾を行うキナーゼである。全身臓器でその発現が確認されているが、特に硬組織の骨や歯では高い発現が認められる。また、*in vitro*実験では、S-X-E/pS配列を有するカゼイン、SIBLINGsファミリーに属するosteopontinやdentin matrix protein 1(Dmp1)等の骨基質蛋白質をリン酸化する事が報告されている。リン酸化修飾を受けた骨基質蛋白質は、生体内では負に荷電してCa^{2+}結合能を獲得し、硬組織の石灰化に関与すると考えられる。

Fam20Cの骨形成における役割解明のため、Fam20C欠失マウス(Fam20C-KO)が既に作製され解析されている。Fam20C-KOでは、尿中へのリン排泄を促すFGF23 (fibroblast growth factor 23) がリン酸化されず不活化しないため、血中の活性型FGF23が高値になり、低リン血症を引き起こす。この低リン血症により全身性に骨の石灰化不全が誘導されることから、Fam20C-KOでは骨組織の局所におけるFam20Cの役割を検討することはできない。

本研究では、骨形成におけるFam20Cの役割を検討するため、骨芽細胞がFam20Cを過剰発現するトランスジェニックマウス(Fam20C-Tg)を作製し、骨組織の変化を解析した。

【材料と方法】

１．**Fam20C-Tgの作製：** type I collagen promoter (2.3kb)の下流に*Fam20C* cDNAを繋いで、骨芽細胞がFam20Cを過剰発現するFam20C-Tgを作製した。Fam20Cの発現レベルとキナーゼ活性を検討後、出生時より12週齢までの雄性マウスを経時的に各種解析に用いた。

２．**形態学的解析：** 4%パラホルムアルデヒド固定液にて灌流後に長管骨を採取し、脱灰・薄切後にHE染色、鍍銀染色、各種の抗体を用いた免疫染色を行い、形態学的解析に用いた。12週齢の大腿骨は、アルコール固定後、非脱灰樹脂包埋して骨形態計測に用いた。

３．**骨格構造解析：** 12週齢の大腿骨を採取し、μCT撮影装置、pQCT撮影装置、骨質評価Ｘ線回折装置を用いて骨格構造解析を行った。

４．**遺伝子発現解析：** 4週齢と12週齢の長管骨を採取し、凍結粉砕後、抽出RNAを用いてReal-time PCRにて骨関連遺伝子の発現解析を行った。

５．**リン酸化解析：** 4週齢の脛骨を採取後、皮質骨のみを分離して凍結粉砕後、抽出蛋白質を用いてリン酸化蛋白質の解析を行った。抽出蛋白質はトリプシン処理によりペプチド溶液にして、チタニアカラムを用いてリン酸化ペプチドを濃縮し、LC-MS/MSに供した。

６．**細胞培養実験：** 生後3‐5日齢の頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞を以下の実験に用いた。ATP消費アッセイでは、培養上清中にATPを添加し、30分間反応後、キナーゼにより消費したATP量を測定した。石灰化実験では、石灰化誘導培地へ交換して10日間培養後、アリザリンレッド染色にて石灰化レベルを評価した。

７．**統計処理：** スチューデントのt検定またはウェルチのt検定を行い、有意水準はいずれも危険率とした。

【結果と考察】

１．**Fam20C-Tgの表現型解析**

・Fam20C-Tgの長管骨では、野生型マウス(WT)と比較して、*Fam20C* mRNA発現が40-50倍上昇し、Fam20Cは骨芽細胞や骨細胞のゴルジ領域に過剰蓄積しているのが観察された。

・Fam20C-Tgが産生するFam20Cのキナーゼ活性を確認するため、Fam20C-TgとWT由来の骨芽細胞の初代培養にてATP消費アッセイを行った。その結果、Fam20C-Tg由来の骨芽細胞培養でより多くのATPが消費され、外因性Fam20Cのキナーゼ活性を確認した。次に、骨のリン酸化状態を検討するため、リン酸化セリンの免疫染色を行った。その結果、Fam20C-Tgの骨組織では、WTと比較して、骨基質、特に骨細管に沿った強陽性反応を認め、Fam20C-Tgの骨基質蛋白質のリン酸化亢進が示唆された。

・Fam20C-TgとWTの外観に有意差はなく、血中のCa、P、活性型FGF23濃度に有意差は無かった。

２．***in vit*ro石灰化実験**

細胞抽出物と培養上清のウエスタンブロットから、Fam20C-Tg由来の骨芽細胞は、WT由来のものより、Fam20Cを過剰に産生・分泌している事が示された。また、石灰化実験では、WT由来のものと比較して、Fam20C-Tg由来の骨芽細胞培養で、石灰化の亢進が認められた。

３．**骨組織の構造解析と形態学的解析**

・皮質骨：Fam20C-Tgの大腿骨骨幹部には不規則な層板構造と骨細管構造が観察された。骨形態計測により、Fam20C-Tgでは骨細胞数(N.OC/BS)の有意な増加が認められ、骨石灰化速度(MAR)と骨形成速度(BFR/Ct.Ar)が有意に増加し、皮質骨形成の促進が示された。また、ハバース管様構造の増加により多孔性(Po.Ar/Ct.Ar)が有意に増し、骨吸収亢進が示唆された。

・海綿骨：Fam20C-Tgの大腿骨骨幹端部では海綿骨減少が観察され、μCT解析では骨量(BV/TV)と骨梁数(Tb.N)の有意な減少、pQCT解析では骨密度(BMD)の有意な減少が示された。骨形態計測により、Fam20C-Tgでは破骨細胞数(N.Oc/BS)と破骨細胞面(Oc.S/BS)が有意に増加し、骨吸収面(ES/BS)には増加傾向がみられた。一方、骨芽細胞数(N.Ob/BS)、骨芽細胞面(Ob.S/BS)、骨石灰化速度(MAR)に有意差は認められなかったが、骨形成速度(BFR/BV)はFam20C-Tgで有意に減少していた。以上より、Fam20C-Tgの海綿骨の減少には、骨吸収の促進と骨形成の低下が関与しているものと推測された。

４．**遺伝子発現解析**

Fam20C-Tgの脛骨皮質骨では、骨芽細胞マーカーの*type1 collagen* (*Col1*) mRNA発現に変化なく、成熟骨芽細胞マーカーである*osteocalcin* (*OCN*)と骨細胞マーカーである*Dmp1*のmRNA発現が有意に増加しており、骨細胞数増加が観察される皮質骨の状態を反映しているものと考えられた。一方、海綿骨では骨形成および骨吸収に関連する遺伝子発現レベルに有意差は認められなかった。

５．**骨質解析**

Fam20C-Tgの皮質骨では、WTと比較して、ハイドロキシアパタイト配向性の乱れが大きく、Fam20C-Tgでは骨の機械的強度が低下している事が示唆された。

６．**網羅的リン酸化解析**

Fam20C-TgとWTの脛骨皮質骨から蛋白質を抽出し、リン酸化蛋白質を網羅的に解析した。その結果、Fam20C-TgではWTと比較して、Col1、OCN、bone sialoprotein等の骨基質蛋白質のリン酸化ペプチドが多数検出され、骨基質蛋白質のリン酸化が亢進されている事が示された。

【結語】

骨芽細胞や骨細胞が発現するFam20Cによるリン酸化は、皮質骨形成における骨の石灰化と骨細胞分化に関与するとともに、皮質骨と海綿骨における骨吸収にも関与する事が示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　廣瀬　勝俊　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	豊澤　悟
	副 査　教授	西村　理行
	副 査　准教授	中澤　敬信
	副 査　講師	阿部　真土

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨芽細胞がFam20C (family with sequence similarity 20 member C)を過剰発現するトランスジェニックマウス(Fam20C-Tg)を作製し、骨芽細胞や骨細胞が発現する分泌蛋白質のリン酸化酵素であるFam20C の役割を解析したものである。

Fam20C-Tg の骨組織では、骨基質蛋白質を含む様々な分泌蛋白質のリン酸化が亢進していることが示された。Fam20C-Tg の皮質骨では、石灰化促進を介した骨形成の促進と、骨内部の多孔性の増加から骨吸収の促進が示された。Fam20C-Tg の海綿骨では、骨形成の減少と骨吸収促進が海面骨量の減少に関与すると考えられた。以上から、正常骨組織では、骨芽細胞や骨細胞が分泌する蛋白質のリン酸化は、石灰化を介した皮質骨形成と、皮質骨と海綿骨における骨吸収に関与することが示唆された。

以上の結果は、骨形成細胞が分泌する蛋白質のリン酸化の意義を理解する上で重要な知見を与えるもので、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。