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

学位論文

骨形成におけるゴルジ体キナーゼFam20Cの役割

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座（口腔病理学教室）

（指導教員：豊澤　悟　教授）

廣瀬　勝俊

目次

Ⅰ．諸言

Ⅱ．材料と方法

Ⅲ．結果

Ⅳ．考察

Ⅴ．まとめ

Ⅵ．結語

Ⅶ．謝辞

Ⅷ．参考文献

Ⅸ．図表

Ⅰ．緒言

哺乳類の細胞には、約１万種類の蛋白質が存在するが、実にその 3 分の 1 以上がリン酸化した蛋白質である。蛋白質のリン酸化は、リン酸基の 2 個の負電荷により蛋白質の立体構造を変化させて、生体内の蛋白質の活性制御に使われている。骨などの生体硬組織にも、リン酸化蛋白質が多く含まれており、骨基質蛋白質である osteopontin (OPN)、bone sialoprotein (BSP)、dentin matrix protein 1 (Dmp1)は、高度にリン酸化されていることが報告されている[1-3]。このリン酸化の意義に関しては、骨基質蛋白質がリン酸化されると、負に荷電し、Ca^{2+}結合能を獲得して、骨基質蛋白質が分布する骨組織でハイドロキシアパタイト形成の核となり、石灰化に関与するという仮説がある[4]。

蛋白質のリン酸化を担うプロテインキナーゼ (protein kinase)のほとんどは、細胞質内や核内に局在するため、分泌蛋白質をリン酸化するプロテインキナーゼは、長い間知られていなかった。カゼインはミルク中のリン酸化された分泌蛋白質であり、カゼインのリン酸化を担うプロテインキナーゼ探索が長年行われてきた。その中で、授乳期の乳腺のゴルジ分画にキナーゼ活性が検出され、ゴルジ体カゼインキナーゼ(G-CK ; Golgi enriched fraction casein kinase)と呼ばれていたが、その分子の精製・同定には至っていなかった。一方、ゴルジ体に局在するプロテインキナーゼとして、ショウジョウバエの Four-jointed (Fjx1)による細胞外カドヘリンドメインのリン酸化が報告され、Fjx1 のヒト相同アミノ酸配列探索から family with sequence similarity 20 member C (Fam20C)が同定された。この Fam20C は、合成ペプチド基質を用いたキナーゼ活性測定により、G-CK に特異的な Ser-x-Glu/pSer (S-x-E/pS)モチーフ配列を認識することから、Fam20C が G-CK であることが、近年明らかになった[5, 6]。

Fam20C は、造血幹細胞の細胞株の cDNA から発見された遺伝子であり、family with sequence similarity 20 (Fam20)のメンバーの 1 つである [7]。Fam20C は、全身臓器でその発現が確認されているが [7]、特に骨や歯の硬組織に高い発現が認められ、骨組織では骨芽細胞や骨細胞にその発現が認められる [8, 9]。また、Fam20C が特異的に認識する S-x-E/pS モチーフ配列を有する基質は、カゼイン以外にも、small integrin-binding ligand N-Linked glycoproteins (SIBLINGs) family に属する骨基質蛋白質があり、*in vitro* 実験では、OPN、BSP、Dmp1、matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) の S-x-E/pS モチーフ配列のセリン残基 (Ser) をリン酸化することが報告されている [5]。実際、生体内の骨組織から生化学的に抽出した OPN、BSP、Dmp1 には、蛋白質 1 モルあたり無機リン酸量は、OPN が 13 Pi/mol、BSP が 5.85 Pi/mol、Dmp1 が 53 Pi/mol 含まれており、これらの骨基質蛋白質の Ser のリン酸化に Fam20C が関与していると考えられる [1-3, 5]。Fam20C は骨基質蛋白質以外にも、成長因子、カルシウム・リン代謝因子、蛋白質分解酵素阻害因子などの多くの蛋白質のリン酸化に関与し、発生や成長、ホメオスタシスなど様々な生命現象に重要であると考えられている [10]。

ヒトの Fam20C の機能喪失型変異 (Loss-of-function mutation)疾患として Raine 症候群が知られている。Raine 症候群では、X 線画像的に骨硬化症を示し、全身骨格 (頭蓋顔面骨を含む)の形成異常、血中 FGF23 上昇による低リン血症性くる病、大脳や血管の石灰化等が認められ、大部分は致死性であるが非致死性症例も少数報告されている [11, 12]。致死性症例では Fam20C 遺伝子のキナーゼドメイン部にミスセンス変異が多く認められる [12]。非致死性症例では、歯の形成期までの長期生存により、エナメル質や象牙質の形成不全が認められる [13]。

Fam20C の機能解析のため、Fam20C 欠失マウス (Sox2-Cre;Fam20C$^{fl/fl}$ マウ

ス)が作製され、その解析により、Raine 症候群と同様、血中 FGF23 の上昇による低リン血症性くる病様病態を示し、骨や歯の形成不全が報告された [14, 15]。FGF23 は骨組織で産生されて血流で運ばれ、腎近位尿細管でリン再吸収を抑制して血中リン濃度を低下させることが知られているが [16, 17]、最近、Fam20C が活性型 FGF23 と不活性型 FGF23 の調節を担っていることが分かった [18]。活性型の全長 FGF23 は、アミノ酸配列の Arg179 と Ser180 の間で酵素の Furin により切断されて不活性型となる。その際、Fam20C は Ser180 をリン酸化して、GalNac-T3 による切断部近傍の O-グルコシル化を阻害することにより、Furin が FGF23 を切断することができ、不活性型となるのである。従って、Fam20C 機能不全では、FGF23 がリン酸化されず切断されないため、活性型の全長 FGF23 が血中で増加して、低リン血症となる [14, 18]。

このように、Fam20C 欠失マウスにおける骨の形成不全には、低リン血症による全身性の影響が大きいと考えられるが、骨組織局所での骨基質蛋白質等の低リン酸化状態も関与していると考えられる。しかし、Fam20C 欠失マウスでは低リン血症の影響を排除した骨組織の状態を検討できず、骨形成における Fam20C の真の役割は今だ解明されていない。そこで、S-x-E/pS 配列を保有する骨関連蛋白質を多く産生する骨芽細胞に、Fam20C が過剰発現するトランスジェニックマウス (Fam20C-Tg)を作製して、骨組織変化の解析から、骨形成における Fam20C の役割を検討することを試みた。

Ⅱ．材料と方法

1.　Fam20C-Tgマウスの作製

マウスcDNAライブラリーより*Fam20C* cDNA (Gene ID: 80752)をサブクローニングし、*Fam20C* の上流には*HindⅢ* 制限酵素配列と*Kozak* 配列を付与し、下流には*EcoRV* 制限酵素配列を付与した。*Fam20C* cDNAは*HindⅢ*と*EcoR* 配列を各酵素により切断し、pBSⅡSK(+)ベクターに挿入した。次に、*Fam20C* cDNAを骨芽細胞特異的に過剰発現するために、*Fam20C* cDNA上流の*Xho I* と*Shal I* 配列部位に骨芽細胞特異的プロモーターであるⅠ型コラーゲンプロモーター（2.3kbp)[19]を挿入してFam20C-Tg用DNAコンストラクトを作製した。作製されたDNAコンストラクトは、通法の如く野生型C57BL/6マウスの受精卵にマイクロインジェクション法により挿入され、Fam20Cファウンダーマウス（F0)を得た。作製されたFam20C-Tg・F0マウスは、野生型C57BL/6マウス（WT)とのヘテロ交配により維持し、以後の解析に用いた。

なお、本実験は、大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会および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、動歯29-021、遺伝子組換え実験承認番号：3588)。

2.　組織学的解析

① 組織標本の作製

Fam20C-Tgマウスに対し、ペントバルビタールナトリウム（200mg/kg体重)を腹腔内投与し安楽死させたのち後、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にて灌流固定を行ったのち、下肢長管骨を剖出した。長管骨は同固定液

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、通法に従いパラフィン包埋ブロックを作製した。次いで、パラフィン包埋ブロックより、4μm厚に薄切した組織切片を作製、ヘマトキシリン-エオジン（H.E.)染色と銀染色、免疫組織化学的染色に用いた。

② H.E.染色および銀染色

H.E.染色は通法に従い染色した。銀染色は、脱パラフィン後、0.5%プロテイン銀水溶液を滴下し、37℃一晩反応させた。ヒドロキノン・無水硫酸ナトリウム液を10分間、1%塩化金水溶液を1時間、2%ショウ酸水溶液を5分間反応させ、5%チオ硫酸ナトリウム水溶液にて定着させた。水洗後、透徹、封入した[20]。

③ 免疫組織化学的染色

4μm厚に薄切した組織切片を免疫組織化学的染色に用いた。一次抗体には、ウサギ抗Fam20Cポリクローナル抗体（300倍希釈、Abcam、Cambridge、U.K.）、マウス抗リン酸化セリンモノクローナル抗体（5000倍希釈、Sigma-Aldrich)を用い、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)法にて免疫反応部位を検出した。通法に従い脱パラフィン・親水処理された組織切片は、界面活性剤を用いた抗原賦活処理の後、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またはヤギ血清（10倍希釈、Dako)で30分間ブロッキング処理が行われた。その後、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（300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（300倍希釈、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'-ジアミノベンシ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。

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_1 (1000倍希釈、life technologies)とAlexa Fluor 594 (赤色)標識ヤギ抗ウサギIgG_1 (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)で封入した。

④ 観察、撮影

観察および画像撮影には、EclipseE600顕微鏡（Nikon、東京、日本)、共焦点レーザー顕微鏡LSM510 Ver.3.2 (Carl Zeiss)を用いた。

⑤ 骨形態計測

12 週齢マウスに、テトラサイクリン塩酸塩（Sigma-Aldrich）: 0.01mg/体重 g を皮下注射、その 72 時間後にカルセイン（同仁科学）: 0.02mg/体重 g を皮下注射し、さらに 48 時間後に大腿骨を剖出し、70%アルコールにて浸漬固定した。Villanueva bone 染色後に、非脱灰ブロックを作製した。大腿骨骨幹部横断面の研磨標本、大腿骨遠位部前額断面の薄切標本を作製し、それぞれ骨形態計測に用いた。

3. 骨格構造解析

12週齢マウスに対し、ペントバルビタールナトリウム（200mg/体重kg)を腹腔内投与し、安楽死せしめ、大腿骨を剖出し、70%アルコールにて浸漬固定した。μCT撮影装置（R_mCT2Rigaku)を用いて、大腿骨遠位部海面骨の骨梁構造の測定を行った。また、SKYSCAN 1272 (BRUKER)を用いて、大腿骨遠位部海綿骨と、大腿骨骨幹部皮質骨および血管の3次元画像を作製した。pQCT撮影装置（XCT Research SA+, Stratec Medizintechnik GmbH)を用いて、大腿骨遠位部海綿骨（計4スライス)、大腿骨骨幹部皮質骨（1スライス)の骨密度(BMD: bone mineral density)の測定を行った。骨質評価X線回折装置（R-AXIS BQ, Rigaku)を用いて、大腿骨皮質骨のハイドロキシアパタイトの配向性を測定した。

4. 血液学的解析

4週齢および12週齢マウスから安楽死後に心臓血を採取し、血中リン濃度(ホスファC-テストワコー、和光純薬工業)、血中カルシウム濃度（カルシウムE-テストワコー、和光純薬工業)を測定した。血中FGF23に関しては、intact FGF23 (iFGF23) (全長FGF23を認識)用ELISAキット（カイノス)と、c-

terminal FGF23 (cFGF23) (全長FGF23と切断されたFGF23のc末端断片を認識) 用ELISAキット (Immutopics)を用いて測定を行った。

5.　骨組織からの遺伝子抽出と遺伝子発現解析

長管骨における*Fam20C* 遺伝子発現を解析するため、4週齢Fam20C-Tg・F2マウスを安楽死させた後、下肢長管骨を採取した。可及的に軟組織を除去し、凍結粉砕後にTORzol Reagent (Thermo Fisher SCIENTIFIC)、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて、total RNAのみを抽出した。ReverTra Ace® qPCR Master Mix (TOYOBO)を用いて、得られたRNAからcDNAを合成し、Real-Time PCR法 (StepOne Real-Time PCR Systems, Thermo Fisher Scientific)にて、*Fam20C* 遺伝子発現量を測定した。*Fam20C* 遺伝子発現レベルは、内在性コントロールの*Glyceraldehyde3 –phosphate dehydrogenase (GAPDH)* で標準化した。測定にはFam20Cプライマー、GAPDHプライマーを用いた (表1)。

また、長管骨の海綿骨および皮質骨における遺伝子発現を解析するために12週齢マウスを用いた。マウスを前述の如く安楽死せしめた後、脛骨を剖出、実体顕微鏡下 (S9 D、Leica)で成長板軟骨直下の海綿骨領域、骨幹部を分離し採取した。採取した骨幹部の骨髄組織は、26G注射針によりTBSを注入し洗浄することで除去し、皮質骨組織とした。前述の如く、海綿骨、皮質骨組織からそれぞれtotal RNAを抽出後、逆転写し、Real-time PCR法にて遺伝子発現解析を行った。各遺伝子発現レベルは、*GAPDH* で標準化した。測定にはFam20Cプライマー、GAPDHプライマー、骨形成因子関連因子としてtype1 collagen α 1 (Col1) プライマー、alkaline phosphatase (ALP) プライマー、OPNプライマー、osteocalcin (OCN) プライマー、BSPプライマー、Dmp1プライマー、

MEPEプライマー、FGF23プライマー、骨吸収関連因子としてreceptor activator of NF-κB ligand (RANKL) プライマー、osteoprotegerin (OPG) プライマーを用いた (表1)。

6.　網羅的リン酸化解析

① 骨組織からの蛋白質抽出

前述の如く安楽死せしめた4週齢マウスの脛骨を、実体顕微鏡下で骨幹部のみを切離・採取した。採取した骨幹部より、TBSを用いて前述の如く骨髄を除去し、皮質骨組織とした。凍結粉砕した皮質骨組織を、500μlの蛋白質抽出液(9 M 尿素　20 mM HEPES-NaOH、pH 8.0、5μl Phosphatase inhibitor cocktail 2溶液 (Sigma-Aldrich)、5μl Phosphatase inhibitor cocktail 3溶液 (Sigma-Aldrich))に加え、冷却下でホモジナイズした。12000rpmで30分間遠心後、上清のみを採取し、質量分析に用いた。BCA™ Protein Assay Kitを用いて濃度測定を行った後、総蛋白質質量に換算して200 μg相当を分取し、トリプシンによる加水分解に供した。ジチオトレイトールを加え37℃で30分間保温し、ヨードアセトアミドによるアルキル化処理後、20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)を加えた。最後にトリプシン10 μgを加え、37℃で16時間保温して加水分解反応を行った。反応後のペプチド溶液には脱塩処理を施し、減圧下で乾燥した。

② リン酸化ペプチドの濃縮

脱塩処理済のペプチド試料からリン酸化ペプチドを分画回収した。リン酸化ペプチドの特異的吸着にはTiO_2樹脂を用いた。処理手順はGLサイエンス社の「Titansphere Phos-TiO Kit」に従った。マイクロチップに充填したTiO_2樹脂にリン酸化ペプチドを吸着させたあと、吸着ペプチドを強アルカリ溶液で溶出した。溶出試料は減圧下で乾燥した。

③ LC-MS/MS解析

乾燥状態のペプチド試料を、水、アセトニトリルおよびトリフルオロ酢酸からなる溶媒（体積比 98：2：0.1)に溶解し、質量分析（LC-MS/MS：Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry)に供した。質量分析には、LC：EASY-nLC (Thermo Fisher SCIENTIFIC)、MS/MS：Q Exactive質量分析計（Thermo Fisher SCIENTIFIC)を用いた。解析結果より、Nonlinear Dynamics社のProgenesis QI for proteomics (ver. 2.0) (http://www.nonlinear.com)を用いて、各試料のLC-MS/MSデータから検出ピークの強度値を算出した。また、同ソフトウェアを用いてMS/MSデータを抽出した。

④ ペプチド及び蛋白質の同定

抽出したMS/MSデータを配列データベース検索に供した。検索ソフトウェアとしてMatrix Science社のMascot (ver. 2.5.1) (http://www.matrixscience.com）を用いた。検索用の配列データベースは、SwissProt (http://www.uniprot.org/) に登録されているマウス由来の蛋白質エントリー（Reference proteome set）計16,930件に、The Global Proteome Machine Organization (http://www.thegpm.org/crap/index.html）から取得した蛋白質汚染物のアミノ酸配列（計116件)を加えて使用した。

データ処理の結果、有意なペプチド同定情報が付された合計2,795の検出ピークを取得した。ペプチド同定数は重複を除くと2,061種類に上り、このうち1,504ペプチドはリン酸化ペプチドであった（72.9%)。

⑤ リン酸化ペプチド情報の比較

1,504種類のリン酸化ペプチドについて2試料間の計量比較を行った。各リン酸化ペプチドにおける[Fam20C-Tgマウス由来のペプチド]/[野生型マウス由来のペプチド]比の倍数値（Fold）と検出強度を用いて散布図を作成した。また、骨基質蛋白質に関してのリン酸化ペプチドの検出結果を表にまとめた（表2)。

⑥ Gene ontology解析

Fam20C-Tgマウスでリン酸化の亢進が認められた蛋白質の機能を調べるために、米国NIH (National Institutes of Health)、National Institute of Allergy and Infections Disease (NIAID)の管理・維持するDAVID Bioinformatics Resources 6.8 (https://david.ncifcrf.gov)を用いてGene ontology (GO)解析を行った。野性型マウスの皮質骨検体から検出されたペプチドと比較して、Fam20C-Tgマウスの皮質骨検体で5倍量以上検出されたペプチド（計143種類)に相当する蛋白質(104種類)をGO解析に供し、Biological Processを調べた。*P* 値が0.05以下の項目を、*P* 値の小さい順に並べ、表とした（図10．A)。

7. 初代培養骨芽細胞を用いた解析

① 初代培養骨芽細胞株の分離・培養

生後3-5日齢マウスを安楽死後、頭蓋冠のみを切除し、α-minimum essential medium (αMEM) (和光純薬工業)に浸漬した。100ml PBSに10mg コラゲナーゼ（和光純薬工業)、5mg ディスパーゼ®Ⅱ（合同酒精株式会社)を添加した細胞分離液に、採取した頭蓋冠を移し、37℃の温浴槽で7分間加温した（1回目)。加温後、頭蓋冠を残し細胞分離液を除去し、再度、細胞分離液を注ぎ、加温した（2回目)。この操作を繰り返し、5回目の加温時は、15分間加温した。3-5回目の加温した細胞分離液を1500rpmで遠心し、細胞のみを沈殿させたのちに、10% Fatal bovine serum (FBS) (JRH Biosciences、Kansas、U.S.A)、100 Units/ml penicillin (Invitrogen、Carlsbad、U.S.A)、100μg/ml streptomycin (Invitrogen)を添加した培地（10%FBS添加 α-MEM培地)にて培養を開始した。

② ウェスタンブロット法

培養開始約3日後に、12well ディッシュに5×10^4個の細胞を再播種し、その約7日後に蛋白質の抽出を行った。蛋白質抽出には、cell lysis buffer (和光純薬工業)にphosphatase inhibitor (Invitrogen)とprotease inhibitor (Invitrogen)を添加した細胞可溶液を用いた。培養細胞は、細胞可溶液にてホモジナイズを行った。培養上清は、トリクロロ酢酸を用いて蛋白質を沈殿後、細胞可溶液にて再溶解を行った。抽出した蛋白質は、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE、Rockford、U.S.A)を用いて濃度測定を行った後に、SDS-PAGEにて展開、7.5%ポリアクリルアミドゲル (和光純薬工業)にて泳動分離し、PVDF膜に転写した。一次抗体には、ウサギ抗ヒトFam20Cポリクローナル抗体 (300倍希釈、Abcam)、マウス抗β-actinモノクローナル抗体 (1000倍希釈、Cell Signaling Technology)を用いた。二次抗体には、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリンとペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリンを用いた。PVDH膜は、5%スキムミルク添加TBSTにて、室温1時間ブロッキングを行った。一次抗体は、4℃一晩反応させ、二次抗体は室温1時間反応させた。各ステップ終了後には、TBSTにて十分洗浄を行った。検出には化学発光検出法 Western BLoT Quant HRP Substrate (TaKaRa)を用いた。Fam20C発現レベルの定量の為、内在性コントロールのβ-actinで標準化した。

③ キナーゼ活性解析

初代培養骨芽細胞を、24wellディッシュに2×10^4個の細胞を再播種し、その約7日後に培養上清50μl採取した。50μl 培養上清と50μl kinase reaction buffer (50 mM HEPES pH 7、10 mM $MnCl_2$)[1)]に、10μM ATPを添加し、30℃で30分間インキュベートした。50μlのKinase-Glo® 試薬(Kinase-Glo® Luminescent

Kinase Assay Kit、Promega Corporation)を添加し、10分間室温でインキュベートしたのち、マイクロプレートリーダーを用いて、ATP消費量を算出した。

④ 石灰化物形成能

初代培養骨芽細胞を、24wellディッシュに5×10^4個の細胞を再播種した(0日目)。10%FBS添加α-MEM培地に、100μg/ml アスコルビン酸と10mM β-グリセロリン酸ナトリウム、100ng/ml bone morphogenetic protein 2 (オリエンタル酵母工業)を添加した石灰化誘導培地へ、2日目に培地交換を行った。12日目に、石灰化物形成能を測定するため70%アルコールにて細胞を1時間固定後、アリザリン染色液 (pH4.2)にて10分間石灰化物の染色を行った。アリザリン染色後、塩化チセルピリジニウムを用いて、石化化物形成量を測定した。

⑤ 遺伝子発現解析

初代培養骨芽細胞を、6wellディッシュに5×10^4個の細胞を再播種した(0日目)。石灰化実験と同様に、2日目に石灰化誘導培地へ培地交換を行った。12日目に、TORzol Reagent (Thermo Fisher SCIENTIFIC)を用いて細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写後にReal-time PCR法にて遺伝子発現解析を行った。各遺伝子発現レベルは、*GAPDH* で標準化した。測定にはFam20Cプライマー、GAPDHプライマー、Col1プライマー、OPNプライマー、OCNプライマー、Dmp1プライマーを用いた (表1)。

8. 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$P < 0.05$とした。

Ⅲ．結果

1．Fam20C-Tgマウスの表現型解析

Fam20C-Tgマウスの作製

Ⅰ型コラーゲンのプロモーターの下流にマウス*Fam20C* cDNAをつなぎ、骨芽細胞が特異的にマウスFam20Cを過剰発現するよう設計したDNAコンストラクトを作製した（図1．A)。作製されたFam20C-Tg・F2マウスの4週齢の長管骨より抽出したmRNAを用いた遺伝子発現解析では、野生型マウス（WT)と比較して、約50倍の*Fam20C* mRNAの発現上昇が認められた(図1．B)。Fam20Cの免疫組織化学的染色では、Fam20Cは骨芽細胞や骨細胞のゴルジ領域に過剰に分布し、骨基質にも蓄積しているのが観察された（図1．C)。

Fam20C-Tgマウスの発育変化

Fam20C-Tgマウスの骨格変化を経時的に観察し、12週齢の外観に大きな変化は認められなかった（図1．D)。体重変化は、4週齢ではFam20C-Tgマウスが野生型マウスよりやや軽いものの、8週齢および12週齢では体重差は認められなかった（図1．E)。4週齢と12週齢の大腿骨長にも有意差は認められなかった（図1．F)。

血液学的解析

Fam20C欠失マウスでは、血中FGF23の上昇による低リン血症を引き起こすことが報告されているため[14)]、Fam20C-Tgマウスにおける血中リン濃度、カルシウム濃度、FGF23濃度の測定を行った。その結果、4週齢および12週齢で、リン濃度に有意差は認めず、カルシウム濃度にも有意差は認められなかった（図2．A)。

血中FGF23は、iFGF23（全長FGF23）とcFGF23（全長FGF23と切断されたFGF23のc末端断片）は両者で有意差は認められなかったが、切断されたFGF23のc末端断片のみの値を示すcFGF23値とiFGF23値の差（cFGF23－iFGF23）は、Fam20C-Tgマウスで有意に上昇していた（図2．B）。また、iFGF23/cFGF23比は、Fam20C-Tgマウスで有意に小さかった（図2．C)。以上から、Fam20C-Tgマウスでは，血中の活性型iFGF23値に変化はないが、切断されたFGF23が増加していることが示唆された。緒言で前述したように、Fam20Cにより活性型のiFGF23のSer180がリン酸化されると、切断されて不活性型となるため、Fam20C-Tgマウスではリン酸化亢進によりFGF23の不活性化が亢進したものと考えられる。

骨組織におけるリン酸化状態の検討

Fam20C-Tg マウスが産生する外因性 Fam20C のキナーゼ活性を確認するため、Fam20C-Tg マウスと野生型マウス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。細胞抽出物と培養上清のウェスタンブロットから、Fam20C-Tg マウス由来の骨芽細胞は、野生型マウス由来のものより、Fam20C を過剰に産生し、分泌している事が示された（図 3．A)。Fam20C のキナーゼ活性の測定には、Fam20C が分泌されている培養上清を用いた。培養上清に 10μM の ATP を加え、Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assays kit を用いて消費 ATP を測定したところ、Fam20C-Tg マウス由来の培養上清では野生型のものより多くの ATP が消費された。この ATP 消費量の差は培養上清中に存在するキナーゼの量、すなわち Fam20C の量の差であり、外因性 Fam20C のキナーゼ活性が確認された（図 3．B)。次に、骨組織において、Fam20C がリン酸化するセリンのリン酸化状態を検討するため、リン酸化セリンに対する免疫組織化学的染色

を行った。その結果、Fam20C-Tg マウスの骨組織では、野生型マウスと比較して、骨基質、特に骨細管に沿ってリン酸化セリンに対する強陽性反応を認め、骨基質蛋白質等のリン酸化亢進が示唆された（図 3．C)。また、Fam20C-Tg マウスの骨芽細胞と骨細胞では、細胞内で Fam20C (図 3．D : 赤色)とリン酸化セリン（図 3．D : 緑色)の共局在が認められたことから（図 3．D : 矢頭)、Fam20C によるリン酸化は主に細胞内で行われていることが推測された。

2．骨組織の構造解析と形態学的解析

皮質骨解析

Fam20C-Tgマウスの大腿骨皮質骨（図4．右段)では、野生型マウス（図4．左段)と比較して、不規則な層板構造と骨細胞の配列不整と骨細管構造の不明瞭化が観察された（図4．A, B)。

骨形態計測により、Fam20C-Tgマウスでは皮質骨量（Ct.Ar)と皮質骨幅(Ct.Wi)は増加傾向であり（図5．B, C)、類骨面（Ps.OS/BS)と骨石灰化面(MS/BS)、骨石灰化速度（MAR)、骨形成速度（BFR/Ct.Ar)が有意に増加し（図5．C, E)、皮質骨における骨形成の促進が示された。また、Fam20C-Tgマウスでは骨細胞数（N.OC/BS)と骨の多孔性（Po.Ar/Ct.Ar)が有意に増加していた(図5．B, C)。皮質骨横断面でみられる骨小腔より大きい多孔領域（図5．B : 矢印)を高分解能CTにて抽出すると、骨膜から連続性のある血管を中心とした骨腔(ハバース管)であることがわかった[21] (図5．D)。この多孔性の増加は皮質骨における骨吸収の亢進を示しており[22, 23]、Fam20C-Tgの皮質骨において、骨形成の増加とともに骨吸収の亢進が起こっていることが明らかとなった。

骨密度（BMD)は、骨の多孔性と骨石灰化度を含むパラメーターである。Fam20C-Tgマウスの皮質骨では、野性型マウスと比較して、多孔性が増加し

ているにもかかわらず、骨密度に有意差は認められないことから（図5．A)、骨の石灰度が高いことが示唆された。

海綿骨解析

Fam20C-Tgマウスの大腿骨骨幹端部では、野生型マウスと比較して、海綿骨減少が観察され（図6．A)、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（図6．B-D)。

骨形態計測により、Fam20C-Tgマウスでは破骨細胞数（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(図7．A)。骨石灰化面（MS/BS)と骨石灰化速度（MAR)に有意差は認められなかったが、その二者から算出される骨形成速度（BFR/BV)はFam20C-Tgマウスで有意に減少していた（図7．B)。骨芽細胞数（N.Ob/BS)、類骨面（OS/BS)、類骨量（OV/BV)に有意差はみられなかった。以上より、Fam20C-Tgマウスの海綿骨の減少には、骨吸収の亢進と骨形成の抑制が関与していることが示唆された。

3．遺伝子発現解析

骨の形態学的解析により、Fam20C-Tgマウスでは、皮質骨で骨形成亢進と骨吸収亢進による骨量増加が認められ、海綿骨で骨形成抑制と骨吸収亢進による骨量減少が認められた。すなわち、皮質骨と海綿骨では異なる現象が認められることとなる。このことから、皮質骨領域と海綿骨領域とを分割して、12週齢マウス脛骨における遺伝子発現解析を行った。皮質骨と海綿骨の両者において*Fam20C* のmRNA上昇が認められた（図8．A, D)。

Fam20C-Tgマウスの皮質骨では、野生型マウスと比較して、骨芽細胞マーカーである*Col1* や*OPN* 等のmRNA発現レベルには有意差はみられなかった

が、成熟骨芽細胞マーカーの*OCN* と骨細胞マーカーの*Dmp1* のmRNA発現が有意に増加していた（図8．B)。この遺伝子発現結果は、骨細胞数の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、Fam20Cの過剰発現は成熟骨芽細胞や骨細胞への分化を促進する可能性が示唆された。破骨細胞分化、活性化の指標となる*RANKL/OPG* 比に有意差は認められなかった（図8．C)。一方、海綿骨では骨形成関連因子の発現に変化が認められなかった（図8．E)。また、骨吸収関連因子での遺伝子発現レベルにも有意差は認められなかった（図8．F)。

4．骨質解析

骨強度を非破壊的に推定する因子として、骨密度に加えて、骨質が着目されており、その中でも骨の無機質成分であるハイドロキシアパタイトの配向性は、骨の機械的強度と強い相関を示すことが知られている[24)]。そこで、Fam20C-Tgマウスの皮質骨の強度を推定するために、骨質評価X線解析装置(R-AXIS BQ) を用いてハイドロキシアパタイトの配向性を測定した。Fam20C-Tgマウスの12週齢の大腿骨では、野生型マウスと比較して、ハイドロキシアパタイト配向性の乱れが大きく(図9)、機械的強度が低下している事が示唆された。

5．リン酸化蛋白質の機能解析

網羅的リン酸化解析

Fam20C-Tgマウスと野生型マウス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結果、1,504種類のリン酸化ペプチドについて2試料間の計量比較情報が得られた（Fam20C-Tgマウス由来のペプチド：[Tg]、

野生型マウス由来のペプチド：[WT])。各リン酸化ペプチドにおける[Tg]/[WT]比の倍数値（Fold）と検出強度を用いて散布図を作成した（図10)。ただし、[Tg]と[WT]のどちらか一方で未検出のピークは散布図には記載していない。

[WT]と比較して[Tg]で10倍以上検出された、あるいは[Tg]でのみ検出されたペプチドは合計105ペプチド（計74蛋白質)であった。一方で、[WT]で10倍以上検出された、あるいは[WT]でのみ検出されたペプチドは合計20ペプチド（計18蛋白質)であった。同様に、[Tg]で5倍以上検出されたペプチドは合計143ペプチド（計104蛋白質)、[WT]で5倍以上検出されたペプチドは合計32ペプチド（計27蛋白質)であった。この結果により、Fam20C-Tgマウスの骨組織では野生型マウスと比較して全体的に蛋白質のリン酸化が亢進していることが示された。骨基質蛋白質に着目すると、Fam20C-TgマウスではOPN、Col1、OCNなどの骨基質蛋白質のリン酸化が亢進していた（表2)。

Gene ontology解析

Fam20C-Tgマウスでリン酸化の亢進が認められた蛋白質の機能を調べるために、DAVIDを用いてGene ontology解析を行った（図11．A)。その結果、mineral tissue developmentやosteoblast differentiationに関与する骨関連蛋白質のリン酸化が亢進していることが明らかとなった。また、protein foldingやactin cytoskeleton organization、cell cycleに関与する蛋白質もリン酸化が亢進していた。

初代培養骨芽細胞を用いた*in vitro*機能解析

Gene ontologyの結果を受け、Fam20C-Tgマウスと野生型マウス由来の骨芽細胞の初代培養を用いて、石灰化実験および遺伝子発現解析を行った。石灰化

実験では、野生型マウス由来のものと比較して、Fam20C-Tgマウス由来の骨芽細胞培養で、石灰化の亢進が認められた（図11．B)。同時期の遺伝子発現解析では、Fam20C-Tgマウス由来のものでは、野生型マウス由来のものと比較して、成熟骨芽細胞マーカーの*OCN* のmRNA発現は優位に増加し、骨細胞マーカーの*Dmp1* のmRNA発現も増加傾向であった（図11．C)。以上の結果は、*in vivo* の皮質骨の結果と類似していた（図5．E、図8．B)。

Ⅳ. 考察

本研究では、2.3kbp のラット I 型コラーゲンプロモーター[19]の下流にマウス Fam20C の cDNA を繋いだ遺伝子コンストラクトを用いてトランスジェニック (Fam20C-Tg) マウスを作製した。2.3kbp のラット I 型コラーゲンプロモーターに GFP を繋いだトランスジェニックマウスでは、骨芽細胞に加えて骨細胞にも GFP 発現が認められるが[25]、骨芽細胞に由来する骨細胞は骨芽細胞で産生された GFP をそのまま保持しているだけで、骨細胞では GFP を発現していない事も考えられる。しかし、GFP の半減期が約 26 時間であることを考慮すると[26]、このプロモーターでは骨細胞も GFP を発現すると考えるのが妥当だと思われる。野生型マウスの骨組織では、Fam20C は主に骨細胞で産生され、ゴルジ領域に分布するが[9]、Fam20C-Tg マウスの骨組織では、骨芽細胞と骨細胞で過剰に産生されてゴルジ領域に分布し（図 1．C)、骨芽細胞に加えて骨細胞が産生する分泌蛋白質も過剰に産生された Fam20C によりリン酸化されると推測される。Fam20C によるリン酸化は S-x-E/pS 配列のセリン残基に起こるため、リン酸化セリンを免疫組織化学的に検出した結果、Fam20C-Tg マウスでは骨基質、特に骨細管に沿ってリン酸化セリンの強陽性反応が見られ（図 3．C)、骨基質等のリン酸化亢進状態が示唆された。また、骨細管に沿ってリン酸化セリンの強陽性反応が認められることから、骨細管に沿って分布する Dmp1 [9]のセリン残基のリン酸化が亢進していることが示唆される。

<u>Fam20C は骨の石灰化と形成を促進する</u>

骨組織において、Fam20C は骨芽細胞や骨細胞の細胞質および細胞外基質に局在することから、形態学的に骨形成に関与することが示唆されている[9, 27]。従

来の仮説から、幾つかの骨基質蛋白質は、生体内でリン酸化されて負荷電体となって Ca^{2+}結合能を獲得し、骨組織で骨基質の石灰化に関与すると考えられている[4]。Fam20C を過剰発現させた骨芽細胞（MC3T3-E1）株で石灰化が促進し、Fam20C 欠失細胞株では石灰化が抑制される *in vitro* 実験は[8, 28]、基質の石灰化にはリン酸化が関与するという上記の仮説を示唆するものである[4]。また、今回の Fam20C-Tg マウスの皮質骨における骨の石灰化速度亢進と骨形成速度の促進は、*in vivo* で上記の仮説を実証したものと考えられる。一方、Fam20C-Tg の海綿骨では、皮質骨と同様に Fam20C が過剰発現しているにも関わらず、骨形成速度の低下が認められた。海綿骨では、皮質骨と比較して、骨の改造現象が著しく、骨の石灰化に大きく関与する成熟骨芽細胞や骨細胞が少ないことが、異なる結果を生じた一因ではないかと考えられる。

骨組織内で高度にリン酸化された骨基質蛋白質として、OPN、BSP、Dmp1 等が知られており[1-3]、*in vitro* 実験では、OPN は石灰化を抑制し[29]、逆に BSP ならびに Dmp1 は石灰化を促進する[30, 31]。Liu ら（2017)は、骨芽細胞特異的な Fam20C 欠失マウス（2.3 kbp Col1a1-Cre;Fam20C$^{fl/fl}$ マウス)において、全身性 Fam20C 欠失マウス（Sox2-Cre;Fam20C$^{fl/fl}$ マウス)と類似して低リン血症性くる病様病態を示す他に、OPN と BSP 発現の増加、骨細胞マーカーとなる Dmp1 発現の減少がみられることを報告している[32]。一方、Fam20C-Tg マウスの皮質骨では骨細胞数の増加を反映して *Dmp1* 発現上昇が認められたことから、Fam20C によるリン酸化は骨芽細胞から骨細胞への分化に関与する可能性が考えられた。

また、以前の報告から、生化学的に骨組織では Dmp1 は高度にリン酸化されている事が証明されているにもかかわらず[3]、今回の網羅的リン酸化解析では、リン酸化亢進状態の Dmp1 ペプチドは検出されておらず、同様にリン酸化され

た FGF23 のペプチドは検出されなかった。検出された骨基質蛋白質は、OPN、Col1、OCN などのリン酸化ペプチドで、主に骨芽細胞が産生する骨基質蛋白質であるのに対し、Dmp1 も FGF23 も主に骨細胞により産生される事から、今回の結果は骨から抽出した各々の蛋白量の多寡が大きく影響した可能性がある。また、今回用いた TiO2 樹脂を用いたリン酸化ペプチドの回収方法が妥当か否かの実験方法の検討も必要と思われた。

Fam20C は骨吸収を亢進する

Fam20C-Tg マウス・大腿骨骨幹端部の海綿骨量では、減少が認められた（図 7．B)。この海綿骨の減少には、骨形態計測結果から、主に破骨細胞性骨吸収の亢進に加えて、骨形成速度（BFR/BV）の低下も関与していると考えられた（図 7．A, B)。Fam20C-Tg マウス・大腿骨骨幹部の皮質骨では、ハバース管やフォルクマン管が多数形成されて、多孔性が著しく増加している（図 5．B-D)。げっ歯類では、ヒトやウサギのようなハバース管系骨改造現象が起こっているかどうかは明らかではなく、本研究では骨形態計測により破骨細胞数を測定していないが、高濃度 PTH 投与時のラット皮質骨に多孔性が生じることを考えると[22]、Fam20C-Tg マウス・皮質骨でも破骨細胞性骨吸収が亢進しているのではないかと考えられる。ただ、遺伝子発現解析では、大腿骨皮質骨と海綿骨における *RANKL/OPG* 比率は野生型と有意差はなく、RANKL-RANK 経路を介さない破骨細胞の分化・活性化経路があるのか、今後の検討が必要である。それでは、Fam20C-Tg マウスでは骨芽細胞と骨細胞に高発現する Fam20C が、なぜ破骨細胞に影響するのか、その可能性として OPN と BSP のリン酸化亢進状態が考えられる。破骨細胞の骨基質への接着や活性化には、明帯に存在するインテグリン αvβ3 と骨基質中の OPN や BSP の RGD 配列との結合が重要である事がよく

知られているが、OPN と BSP のリン酸化が破骨細胞の骨基質への接着や骨吸収に必要であることが報告されている[33, 34]。

Fam20C 機能不全疾患から想定される Fam20C 機能

ヒトの Fam20C の機能喪失型変異（Loss-of-function mutation）疾患である Raine 症候群では、Fam20C 欠失マウスと同様に、多くの症例で血中 FGF23 上昇による低リン血症が認められ、X 線画像で骨硬化像を伴った全身骨格（頭蓋顔面骨を含む）の形成異常が認められる[11, 12]。Whyte ら（2017）は、遺伝子診断により Raine 症候群と診断された X 線骨硬化像を示す剖検例を検討し、生前の血中リン濃度は正常にもかかわらず、X 線骨硬化像は、組織学的に石灰化不全骨が多量に蓄積したくる病様骨組織であることを報告した[35]。血中リン濃度が正常範囲であったにもかかわらず、多くの石灰化不全骨が認められた事は、Fam20C 機能不全による骨の石灰化障害が示唆され、健常状態でも Fam20C は骨の石灰化に関与すると推察される。また、Raine 症候群では、低リン血症にも関わらず、X 線骨硬化像を示す理由は分からないが、類骨等の石灰化不全骨は破骨細胞により吸収されないため[36]、海綿骨の類骨が吸収されずに蓄積することが X 線骨硬化像を示す一因ではないかと考えられる。同様の現象は、Fam20C 欠失マウスの海綿骨でも生じ、14 週齢になると、野性型マウスと比較して海綿骨量が多くなり、非脱灰切片では、海綿骨に類骨様の石灰化不全骨が多量に蓄積している[15]。一方、破骨細胞は類骨を吸収しないが、石灰化骨を吸収するため[36]、Fam20C-Tg マウスの皮質骨における石灰化亢進は、破骨細胞性骨吸収を亢進して多孔性を示す一因となるのかも知れない。

皮質骨における骨細胞数の変化

Fam20C-Tg マウス・皮質骨の単位面積当たりの骨細胞数は、野生型より有意に増加していた。骨細胞は骨芽細胞に由来することが知られており，骨基質を産生した骨芽細胞は骨基質に埋まって、その後、骨基質が石灰化して骨細胞になる。従って、Fam20C-Tg マウス・皮質骨骨膜部で骨芽細胞数が増加すれば骨細胞数も増加すると思われるが、骨芽細胞数は今回計測できず、骨芽細胞数の骨細胞数増加への関与は検討できない。骨芽細胞から骨細胞に移行する過程では、骨細胞突起形成に関連するアクチン等の細胞骨格蛋白質の増加と細胞内分布の変化や[37, 38]、ミオシン等の筋肉収縮関連蛋白質の増加[39]が生じることが知られている。これらの既知の報告に加えて、網羅的リン酸化解析による、Fam20C-Tg マウスの骨組織における細胞骨格や筋肉収縮蛋白質のリン酸化亢進の結果は、細胞骨格蛋白質のリン酸化が骨芽細胞から骨細胞への移行に関与する可能性を示唆する。また、骨細胞への分化は、MT1-MMP 等のマトリックスメタロプロテアーゼによる骨基質の分解が必要な能動的な骨基質への侵入であることが報告されており[40, 41]、S-X-E/pS モチーフを有する MT1-MMP は、Fam20C-Tg マウスではリン酸化亢進により活性化されて、骨細胞の骨基質への能動的侵入が促進される可能性が考えられる（なお、今回の網羅的リン酸化解析では MT1-MMP のリン酸化亢進は検出できなかった）。

骨芽細胞から骨細胞への移行時には，50～70％の骨芽細胞がアポトーシスによる細胞死により消失し，その残りが骨細胞や休止期骨芽細胞（bone lining cell）に移行すると考えられている[42]。従って、Fam20C-Tg マウスで骨芽細胞のアポトーシスが抑制されていれば、骨細胞数が増えると考えられるが、その候補因子である bcl-2 には S-X-E/pS モチーフはなく、網羅的リン酸化解析でも検出されない。ただ、骨芽細胞から骨細胞への移行に伴って，本来、骨細胞はその

大きさを最終的に骨芽細胞の約 30%まで縮小させるが[43]、Fam20C-Tg マウス・皮質骨に見られる骨細胞は比較的大きく円形で未熟なため、アポトーシスの抑制の有無は明らかではないが、骨細胞の成熟を抑制する機序が働いているのかもしれない。

V．まとめ

- Fam20C-Tg マウスの骨芽細胞や骨細胞が過剰産生する外因性 Fam20C は、キナーゼ活性を有し、骨基質蛋白質等のリン酸化を亢進していることが示唆された。
- Fam20C-Tg マウスの皮質骨では、骨の石灰化を介して骨形成が促進し、骨細胞の増加が認められるとともに、皮質骨内の多孔性が増し、骨吸収が促進していることが示唆された。
- Fam20C-Tg マウスの海綿骨では、骨吸収の促進と骨形成の抑制が海綿骨量の減少に関与すると考えられた。
- Fam20C-Tg マウスにおける骨吸収の促進は、骨芽細胞や骨細胞が産生した分泌蛋白質のリン酸化亢進が、破骨細胞性骨吸収の亢進にも関与しているのではないかと考えられた。

Ⅵ．結語

骨芽細胞や骨細胞が発現する Fam20C によるリン酸化は、皮質骨において骨の石灰化を介した骨形成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ことが示唆された。

Ⅶ. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科病因病態制御学講座（口腔病理学教室） 豊澤悟教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、終始変わらぬご指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科病因病態制御学講座（口腔病理学教室） 佐藤淳講師、宇佐美悠講師に厚く御礼申し上げます。

Ⅷ. 参考文献

1) Prince CW, Oosawa T, Butler WT, Tomana M, Bhown AS, Bhown M, Schrohenloher RE. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem.* 1987. 262(6): 2900-7.

2) Salih E. In vivo and in vitro phosphorylation regions of bone sialoprotein. *Connect Tissue Res.* 2003. 1: 223-9.

3) 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.

4) Gorski JP. Acidic phosphoproteins from bone matrix: a structural rationalization of their role in biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 1992. 50(5): 391-6.

5) 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.

6) 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.

7) Nalbant D, Youn H, Nalbant SI, Sharma S, Cobos E, Beale EG, Du Y, Williams SC. FAM20：an evolutionarily conserved family of secreted proteins expressed in hematopoietic cells. *BMC Genomics.* 2005. 6: 11.

8) Hao J, Narayanan K, Muni T, Ramachandran A, George A. Dentin matrix protein 4, a novel secretory calcium-binding protein that modulates odontoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2007. 282(21): 15357-65.

9) Oya K, Ishida K, Nishida T, Sato S, Kishino M, Hirose K, Ogawa Y, Ikebe K, Takeshige F, Yasuda H, Komori T, Toyosawa S. Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1 (Dmp1) phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of biomineralization. *Histochem Cell Biol.* 2017. 147(3): 341-351.

10) Tagliabracci VS, Wiley SE, Guo X, Kinch LN, Durrant E, Wen J, Xiao J, Cui J, Nguyen KB, Engel JL, Coon JJ, Grishin N, Pinna LA, Pagliarini DJ, Dixon JE. A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome. *Cell.* 2015. 161(7): 1619-32.

11) Simpson MA, Hsu R, Keir LS, Hao J, Sivapalan G, Ernst LM, Zackai EH, Al-Gazali LI, Hulskamp G, Kingston HM, Prescott TE, Ion A, Patton MA, Murday V, George A, Crosby AH. Mutations in FAM20C are associated with lethal osteosclerotic bone dysplasia (Raine syndrome), highlighting a crucial molecule in bone development. *Am J Hum Genet.* 2007. 81(5): 906-12.

12) Faundes V, Castillo-Taucher S, Gonzalez-Hormazabal P, Chandler K, Crosby A, Chioza B. Raine syndrome: an overview. *Eur J Med Genet.* 2014. 57(9): 536-42.

13) Acevedo AC, Poulter JA, Alves PG, de Lima CL, Castro LC, Yamaguti PM, Paula LM, Parry DA, Logan CV, Smith CE, Johnson CA, Inglehearn CF, Mighell AJ. Variability of systemic and oro-dental phenotype in two

families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations. *BMC Med Genet*. 2015. 16: 8.

14) 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.

15) Vogel P, Hansen GM, Read RW, Vance RB, Thiel M, Liu J, Wronski TJ, Smith DD, Jeter-Jones S, Brommage R. Amelogenesis Imperfecta and Other Biomineralization Defects in Fam20a and Fam20c Null Mice. *Vet Pathol.* 2012. 49(6): 998-1017.

16) Bhattacharyya N, Chong WH, Gafni RI, Collins MT. Fibroblast growth factor 23: state of the field and future directions. *Trends Endocrinol Metab.* 2012. 23(12): 610-8.

17) Farrow EG, White KE. Recent advances in renal phosphate handling. *Nat Rev Nephrol*. 2010. 6(4): 207-17.

18) Tagliabracci VS, Engel JL, Wiley SE, Xiao J, Gonzalez DJ, Nidumanda Appaiah H, Koller A, Nizet V, White KE, Dixon JE. Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. 111(15): 5520-5.

19) Rossert J, Eberspaecher H, de Crombrugghe B. Separate cis-acting DNA Elements of the Mouse Pro-cd(I) Collagen Promoter Direct Expression of Reporter Genes to Different Type I Collagen-producing Cells in Transgenic Mice. *J Cell Biol.* 1995. 29(5): 1421-32.

20) Hirose S, Li M, Kojima T, de Freitas PH, Ubaidus S, Oda K, Saito C, Amizuka N. A histological assessment on the distribution of the osteocytic lacunar canalicular system using silver staining. *J Bone Miner Metab.* 25(6): 374-82.

21) Cooper DM, Kawalilak CE, Harrison K, Johnston BD, Johnston JD. Cortical Bone Porosity: What Is It, Why Is It Important, and How Can We Detect It? *Curr Osteoporos Rep.* 2016. 14(5): 187-98.

22) Takakura A, Lee JW, Hirano K, Isogai Y, Ishizuya T, Takao-Kawabata R, Iimura T. Administration frequency as well as dosage of PTH are associated with development of cortical porosity in ovariectomized rats. *Bone Res.* 2017. 5: 17002.

23) Yamane H, Takakura A, Shimadzu Y, Kodama T, Lee JW, Isogai Y, Ishizuya T, Takao-Kawabata R, Iimura T. Acute development of cortical porosity and endosteal naïve bone formation from the daily but not weekly short-term administration of PTH in rabbit. *PLoS One.* 2017. 12(4): e0175329.

24) Ishimoto T, Nakano T, Umakoshi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using recombinant bone morphogenetic protein-2. *J Bone Miner Res.* 2013. 28(5): 1170-9.

25) Kalajzic I, Kalajzic Z, Kaliterna M, Gronowicz G, Clark SH, Lichtler AC, Rowe D. Use of type I collagen green fluorescent protein transgenes to identify subpopulations of cells at different stages of the osteoblast lineage. *J Bone Miner Res.* 2002. 17(1): 15-25.

26) Corish P, Tyler-Smith C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* 1999. 12(12): 1035-40.

27) 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.

28) Liu C, Zhang H, Jani P, Wang X, Lu Y, Li N, Xiao J, Qin C. FAM20C regulates osteoblast behaviors and intracellular signaling pathways in a cell-autonomous manner. *J Cell Physiol.* 2018. 233(4): 3476-3486.

29) Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner.* 1993. 22(2): 147-59.

30) Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993. 90(18): 8562-5.

31) 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.

32) Liu P, Ma S, Zhang H, Liu C, Lu Y, Chen L, Qin C. Specific ablation of mouse Fam20C in cells expressing type I collagen leads to skeletal defects and hypophosphatemia. *Sci Rep.* 2017. 7(1): 3590.

33) Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegård D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem.* 1994. 269(21): 14853-6.

34) Razzouk S, Brunn JC, Qin C, Tye CE, Goldberg HA, Butler WT. Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone.* 2002. 30(1): 40-7.

35) Whyte MP, McAlister WH, Fallon MD, Pierpont ME, Bijanki VN, Duan S, Otaify GA, Sly WS, Mumm S. Raine Syndrome (OMIM #259775), Caused By FAM20C Mutation, Is Congenital Sclerosing Osteomalacia With Cerebral Calcification (OMIM 259660). *J Bone Miner Res.* 2017. 32(4): 757-769.

36) Yovich S, Seydel U, Papadimitriou JM, Nicholson GC, Wood DJ, Zheng MH. Evidence that failure of osteoid bone matrix resorption is caused by perturbation of osteoclast polarization. *Histochem J.* 1998. 30(4): 267-73.

37) Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, Lim SS. Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. *J Bone Miner Res.* 1998. 13(10): 1555-68.

38) Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J Bone Miner Res.* 2004. 19(3): 471-8.

39) 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.

40) Karsdal MA, Andersen TA, Bonewald L, Christiansen C. Matrix metalloproteinases (MMPs) safeguard osteoblasts from apoptosis during transdifferentiation into osteocytes: MT1-MMP maintains osteocyte viability. *DNA Cell Biol.* 2004. 23(3): 155-65.

41) Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billinghurst RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci.* 2005. 118(Pt 1): 147-56.

42) Parfitt AM et al.: Bone-forming cells in clinical conditions. In: Hall BK, editor. Bone, Vol.1: the osteoblast and osteocyte. Boca Raton, FL: Telford Press and CRC Press. 1990. 351-429.

43) Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell* Biol. 2004. 36(1): 1-8.

表1. Real-time PCR解析用プライマー

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer
Fam20C	TGAAGATGATACTGGTGCGCAGGT	CAACAGCAATGTGCAAAGCGCAAG
Col1	CCTGGAATGAAGGGACACCG	CCATCGTTACCGCGAGCACC
ALP	CGCACGCGATGCAACACCAC	TGCCCACGGACTTCCCAGCA
OPN	GCAGAATCTCCTTGCGCCAC	CGAGTCCACAGAATCCTCGC
BSP	CAGAGGAGGCAAGCGTCACT	CTGTCTGGGTGCCAACACTG
OCN	CGCTCTGTCTCTCTGACCTC	GACTGAGGCTCCAAGGTAGC
Dmp1	CGCATCCCAATATGAAGACTG	GCTTGACTTTCTTCTGATGACTCA
MEPE	TGTTGGACTGCTCCTCTT CA	TCCTTCCCTCCGTAGTTC
FGF23	ACAAGGACACCTAAACCGAACAC	AGCTACTGACTGGTCCTATCACAGAA
RANKL	GCAGAAGGAACTGCAACACA	GATGGTGAGGTGTGCAAATG
OPG	AGCTGCTGAAGCTGTGGAA	GGTTCGAGTGGCCGAGAT

Fam20C (*family with sequence similarity 20 member C*), *Col1* (*type1 collagen α 1*), *ALP* (*alkaline phosphatase*), *OPN* (*osteopontin*), *BSP* (*bone sialoprotein*), *OCN* (*osteocalcin*), *Dmp1* (*dentin matrix protein 1*), *MEPE* (*matrix extracellular phosphoglycoprotein*) , *FGF23* (*fibroblast growth factor 23*), *RANKL* (*receptor activator of NF-κB ligand*), *OPG* (*osteoprotegerin*)

表2. 骨基質蛋白質のリン酸化部位

蛋白質名	リン酸化ペプチド	[Tg]/[WT] (fold)
Osteopontin	GDSLAYGLR	>10
	LEHSKESQESADQSDVIDSQASSK	>1.7
Bone sialoprotein	IKAEDSEENGVFK	>2
Type1 collagen α 1	ALLLQGSNEIELR	>10
	EGECCAFCPEEYVSPNSEDVGVEGPK	>10
	SLSQQIENIR	>10
Osteocalcin	KPSGPESDKAFMSK	>100
	LNPACDELSDQYGLK	>10
Fibronectin	TNTNVNCPIECFMPLDVQADRDDSRE	>2.5

赤字：リン酸化部位、下線：Fam20Cのリン酸化モチーフ配列

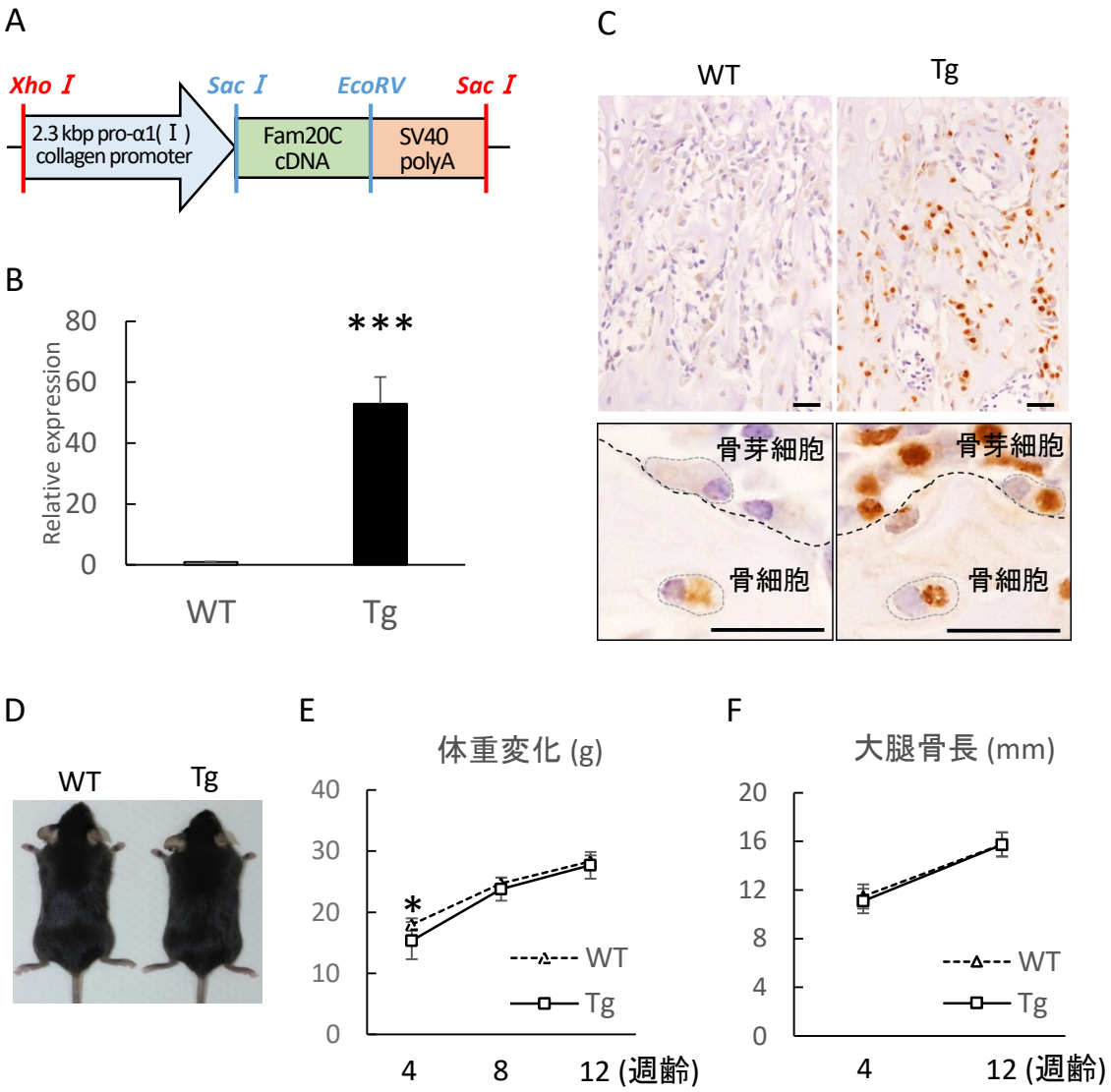

図1. 骨芽細胞特異的Fam20C過剰発現マウス (Fam20C-Tg)の作製

A : Fam20C-TgのDNAコンストラクト。*Fam20C* cDNAは骨芽細胞特異的プロモーターである2.3 kbp pro-α1(I) collagen promoterの下流に挿入された。

B : 骨組織における*Fam20C* mRNAの発現 (4週齢)。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倍上昇している。n=4匹以上、***P<0.001。

C : 骨組織におけるFam20Cの免疫染色 (4週齢)。Fam20C-Tg (Tg)の長管骨では、WTと比較して、Fam20C蛋白質は骨芽細胞や骨細胞のゴルジ領域に過剰に分布し、骨基質にも蓄積していた。スケール : 20 μm。下段: 拡大。

D : 全体像(12週齢)。

E, F : 経時的体重変化、大腿骨長の変化。12週齢では、体重や大腿骨長に有意差は認められなかった。n=6匹以上、*P<0.05。

A

血清生化学	4週齢		12週齢	
(平均 ± 標準誤差)	WT	Tg	WT	Tg
P濃度 (mg/dl)	10.53±0.30	10.23±0.58	8.70±0.38	9.12±0.45
Ca濃度 (mg/dl)	10.21±0.14	10.13±0.18	10.49±0.07	10.19±0.10

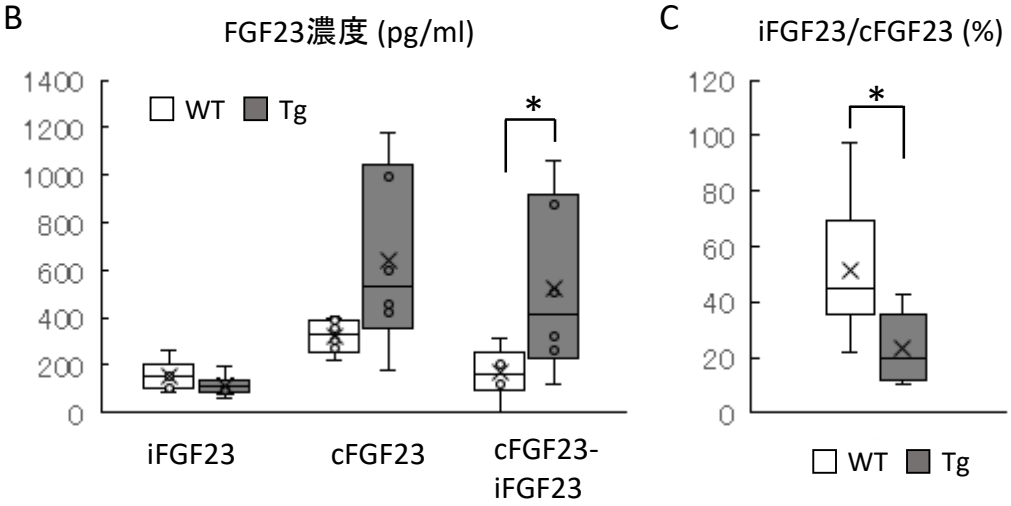

図2. 血中のリン濃度、カルシウム濃度およびFGF23濃度

A : 血中リン濃度 (P濃度)、カルシウム濃度 (Ca濃度)。血中のリン濃度、カルシウム濃度に有意差は認められない。

B : 血中のFGF23 (fibroblast growth factor 23)濃度。ELISA法を用いて iFGF23 (intact FGF23; 全長FGF23)およびcFGF23 (c-terminal FGF23;全長FGF23および切断されたFGF23)を測定し、切断されたFGF23を算出した (cFGF23-iFGF23)。切断されたFGF23は、WTマウスと比較して、Fam20C-Tgで増加していた。

C : intact FGF23/C-terminal FGF23の比。(B)で得られた結果より、12週齢におけるiFGF23/cFGF23比を算出したところ、iFGF23/cFGF23比が減少していた。

B, C: 箱の底部は25パーセンタイル、箱内の線は中央値、箱上部は75パーセンタイルを示し、Xは平均値、上端ひげ、下端ひげはそれぞれ最大値、最小値を示す。

4週齢 : WT=6匹、Tg=6匹、12週齢 : WT=6匹、Tg=6匹、 *P<0.05。

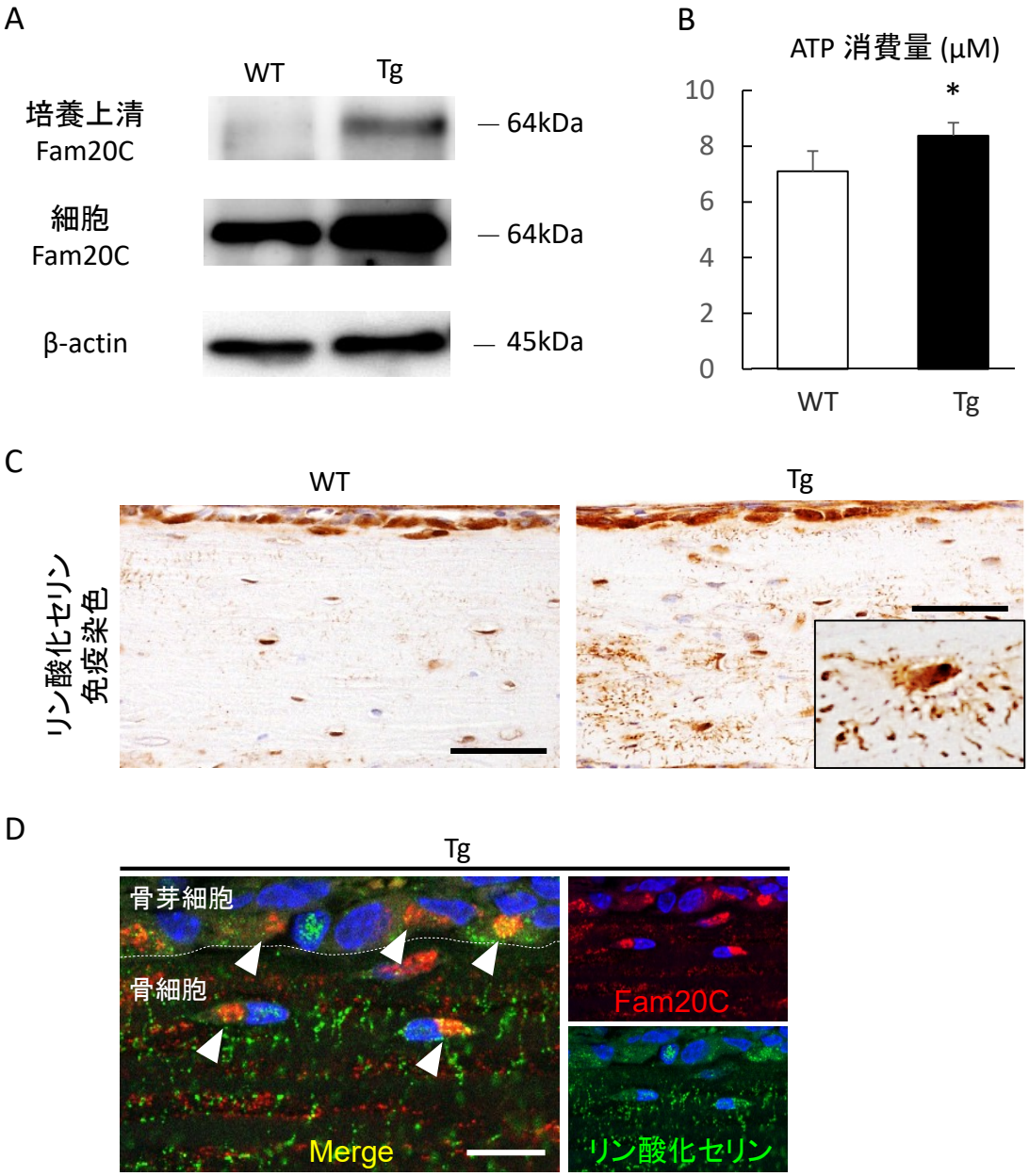

図3. Fam20C-Tgにおけるリン酸化状態の検討

A：初代培養骨芽細胞におけるFam20C蛋白質の発現。生後3-5日のFam20C-TgおよびWTの頭蓋骨より、骨芽細胞を分離・培養した。培養上清 (上段)、細胞 (中段、下段)よりそれぞれ蛋白質を抽出し、Fam20Cを検出した。下段はコントロールを示す。

B：培養上清を用いたATP消費アッセイ。骨芽細胞（$2x10^4$個)の培養液中にATPを添加・培養し、培養液中に残ったATP量より、Fam20-Tg、WT由来の骨芽細胞のATP消費量を算出したところ、外因性Fam20Cのキナーゼ活性が確認された。n=6、*P<0.05。

C：骨組織におけるリン酸化セリンの免疫染色。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の骨基質蛋白質等のリン酸化亢進が示唆された。スケール：50μm、Inset：一部拡大。

D：Fam20C-Tgの骨組織における、Fam20Cとリン酸化セリンの二重染色。Fam20C-Tgでは、骨芽細胞と骨細胞の主に細胞内で、Fam20C(赤色)とリン酸化セリン(緑色)の共局在が認められた。スケール：10μm。

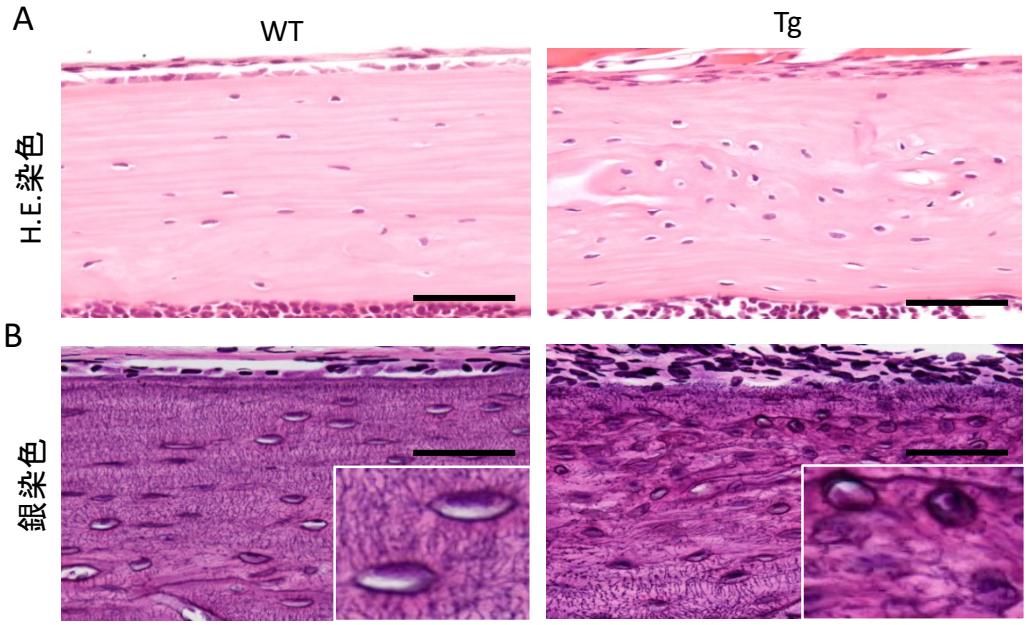

図4. 4週齢における大腿骨皮質骨組織の形態学的解析

A：H.E.染色、B：銀染色、左段：WT、右段：Fam20C-Tg。

Fam20C-Tgでは、WTと比較して、不規則な層板構造と骨細胞の不均一な配列が観察され (A)、骨細管構造が不明瞭となっていた (B)。スケール：50μm、Inset：一部拡大 (B)。

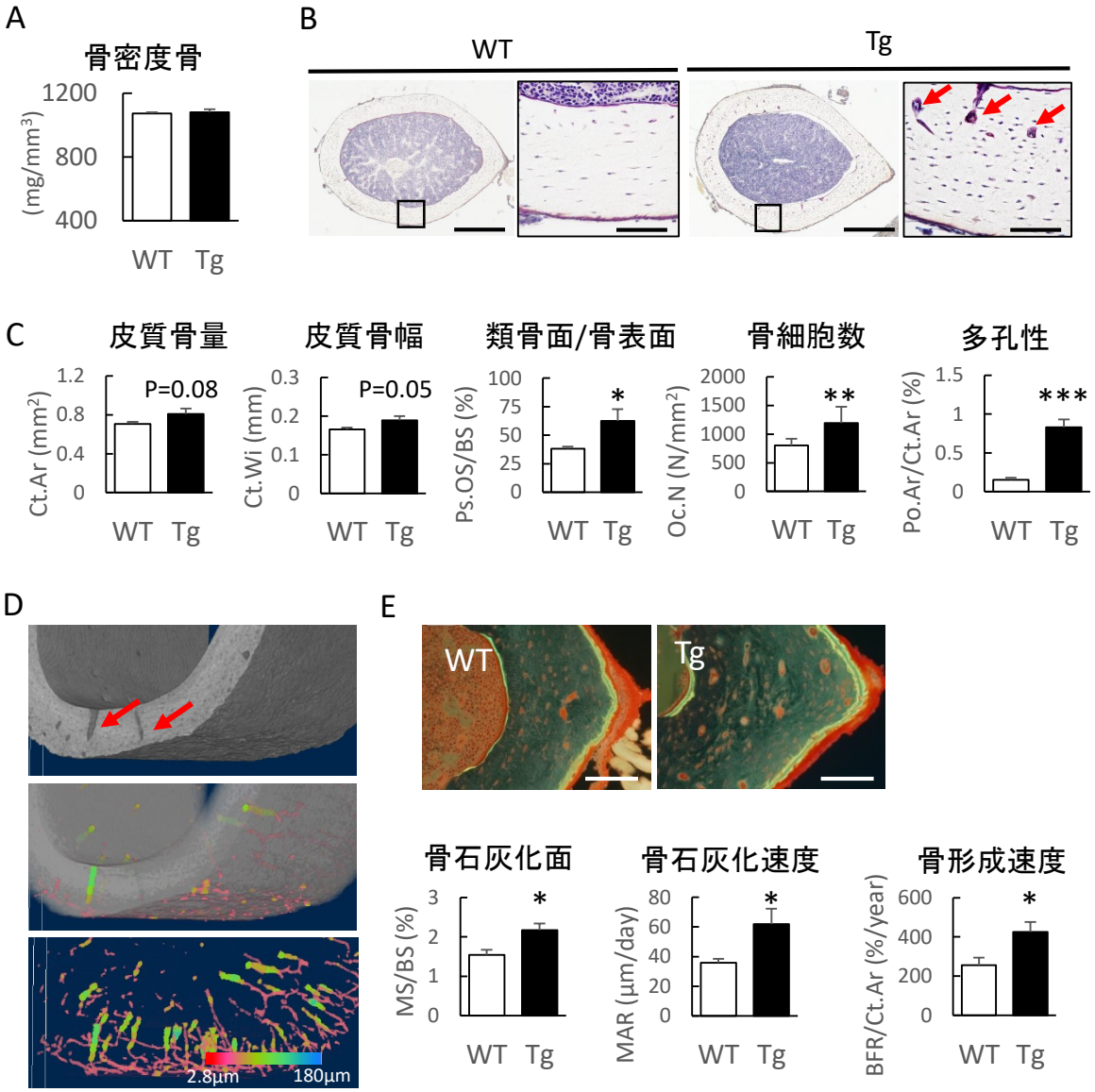

図5. 12週齢における大腿骨皮質骨の構造解析

A：骨密度。大腿骨皮質骨の骨密度をpQCTを用いて計測した。

B：皮質骨横断面 (Villanueva bone染色)。Fam20C-Tgでは、WTと比較して、骨小腔の増加と、骨膜から連続する血管を中心とした骨腔が増加している（矢印）。スケール：200μm (拡大: 50μm)。

C：皮質骨横断面の骨形態計測。Fam20C-TgではWTと比較し、皮質骨量、皮質骨幅が増加する傾向が見られた。またFam20C-TgではWTと比較し、類骨面が増加し、骨細胞数および骨小腔より大型の腔 (多孔性)が増加していた。WT=8匹、Tg=6匹、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001 。

D：Fam20C-Tgにおける皮質骨のハバース管様構造 (矢印)。高分解能CT画像。上段：骨のみ、中段：骨と血管、下段：血管のみ。

E：二重標識した皮質骨横断面。テトラサイクリン、カルセイン二重標識 (上段)による動的な骨形態計測 (下段)。WTに比べFam20C-Tgでは骨形成速度の亢進が見られる。スケール：100μm (上段)、WT=8匹、Tg=6匹、*P<0.05。

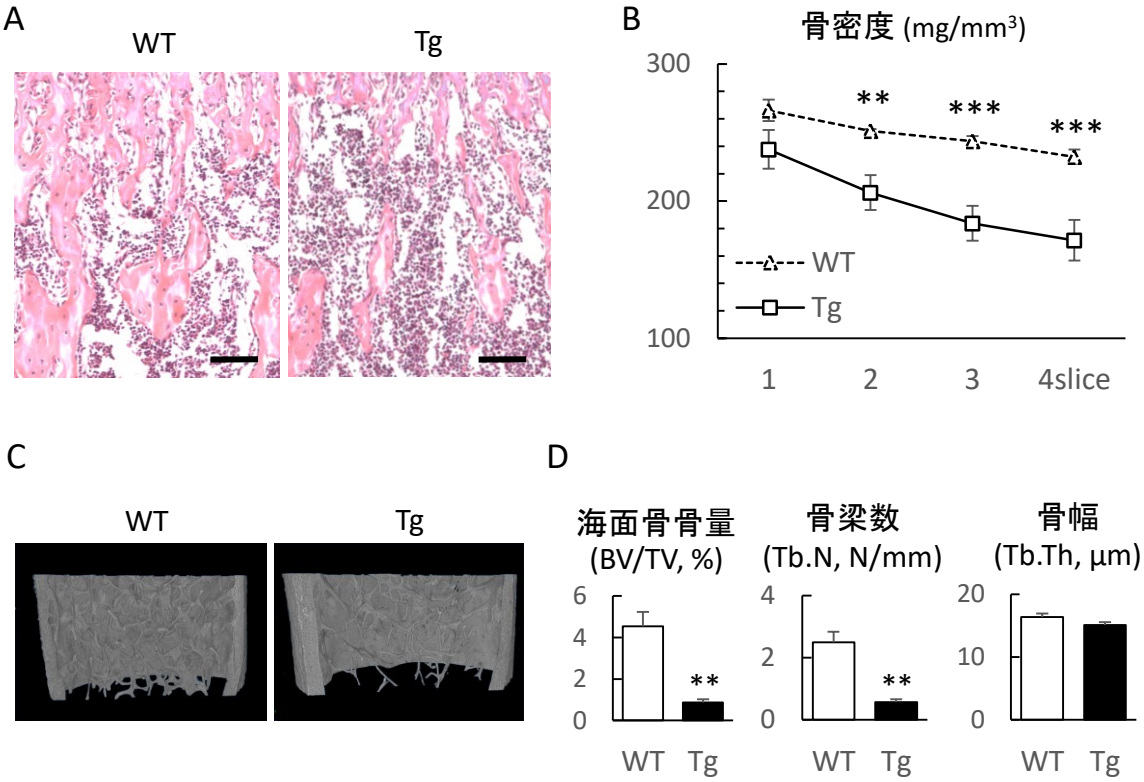

図6. 大腿骨海綿骨の構造解析

A：海綿骨のH.E標本(4週齢)。WTに比較してFam20C-Tgでは、海綿骨の減少が見られる。スケール：100µm。

B：骨密度。大腿骨海綿骨の骨密度をpQCTを用いて計測した。Fam20C-Tgでは、骨幹端部海綿骨領域 (スライス1)から骨幹中央よりの海綿骨領域 (スライス4)にかけて、骨密度の減少が見られた。WT=8匹、Tg=6匹、**P<0.01、***P<0.001 。

C：骨梁構造 (12週齢)。高分解能CT画像。

D：骨梁構造解析 (12週齢)。Fam20C-TgではWTに比べて、骨量と骨梁数の減少が示された。WT=8匹、Tg=6匹、**P<0.01。

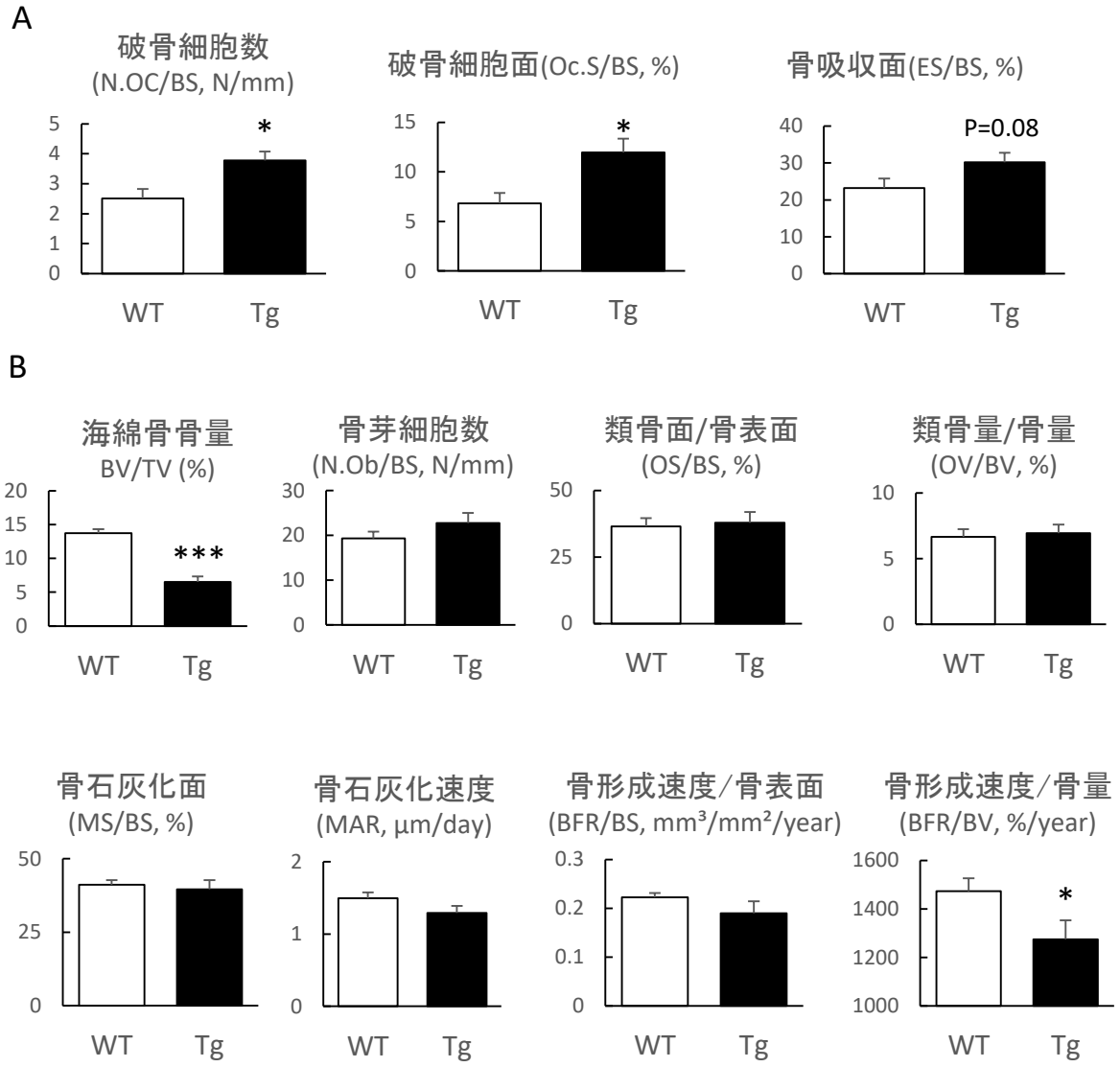

図7. 12週齢における大腿骨海綿骨の骨形態計測

A：骨吸収に関わる因子：Fam20C-TgではWTと比較し、破骨細胞数と破骨細胞面の増加が見られた。WT=8匹, Tg=6匹、*P<0.05。

B：海綿骨骨量および骨形成に関わる因子：Fam20C-TgではWTと比較し、海面骨骨量の減少が見られた。また、海綿骨におけるテトラサイクリン、カルセイン二重標識による動的な骨形態計測では、WTに比べFam20C-Tgの海綿骨では骨形成速度(BFR/BV)の減少が見られる。WT=8匹、Tg=6匹、*P<0.05、***P<0.001。

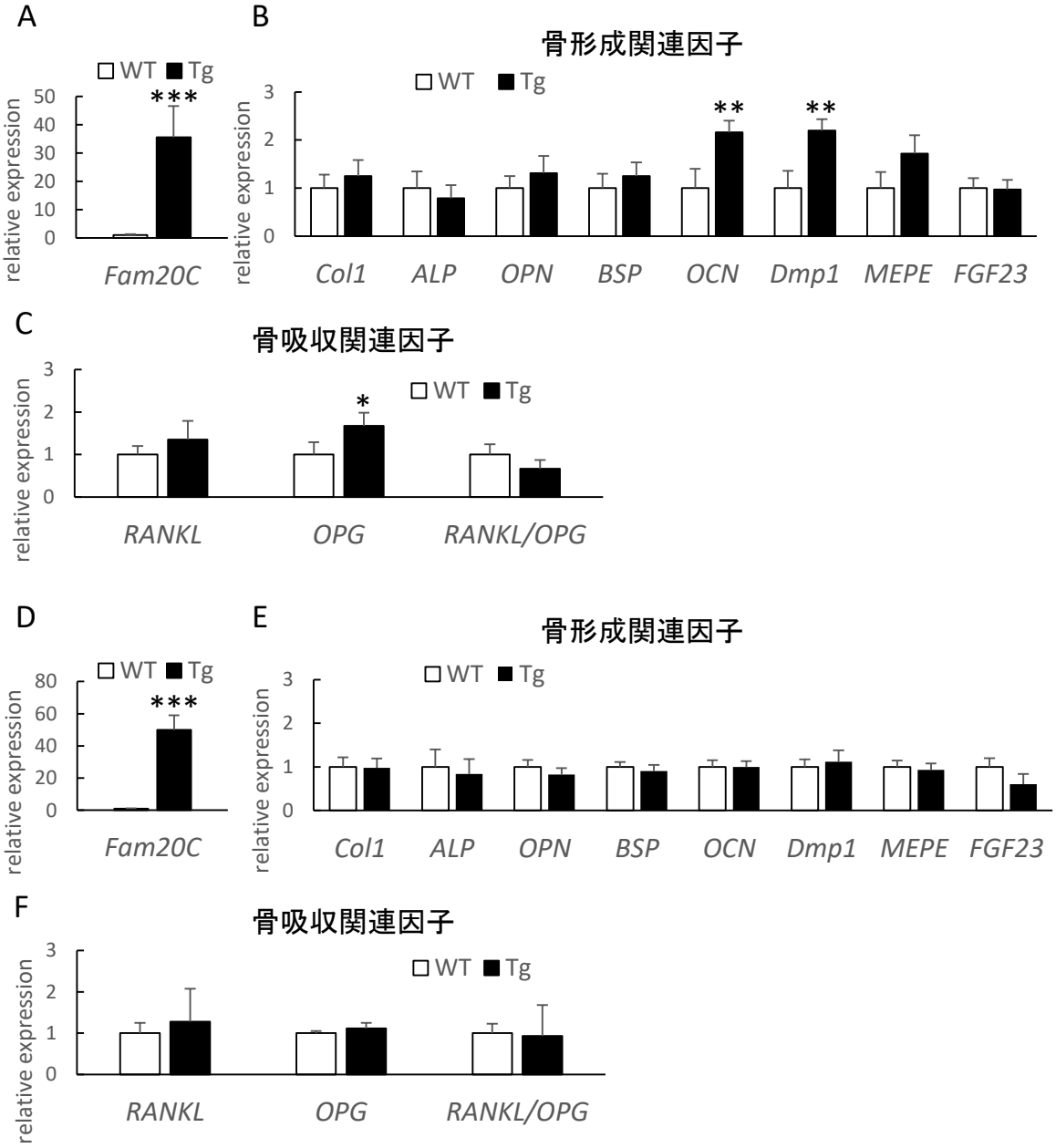

図8. 12週齢の皮質骨および海綿骨における遺伝子発現解析

A-C: 皮質骨の遺伝子発現。D-F: 海面骨の遺伝子発現。

12週齢マウスの脛骨より実体顕微鏡下で皮質骨および海綿骨を分離・採取し、骨髄を除去した後、RNAを抽出し、cDNAを得た。

A, D: *Fam20C* 発現。皮質骨と海綿骨において*Fam20C* の発現上昇が認められた。

B: 皮質骨における骨形成関連遺伝子。Fam20C-Tgの皮質骨では、WTと比較して、成熟骨芽細胞マーカーの*OCN*、骨細胞マーカーの*Dmp1* の上昇が認められた。

C: 皮質骨における骨吸収関連遺伝子。Fam20C-Tgの皮質骨では、WTと比較して、*OPG* の上昇が認められた。

E: 海綿骨における骨形成関連遺伝子。いずれも明らかな差は認められない。

F: 海綿骨における骨吸収関連遺伝子。いずれも明らかな差は認められない。

Gene symbol: 表1参照。n=5匹、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

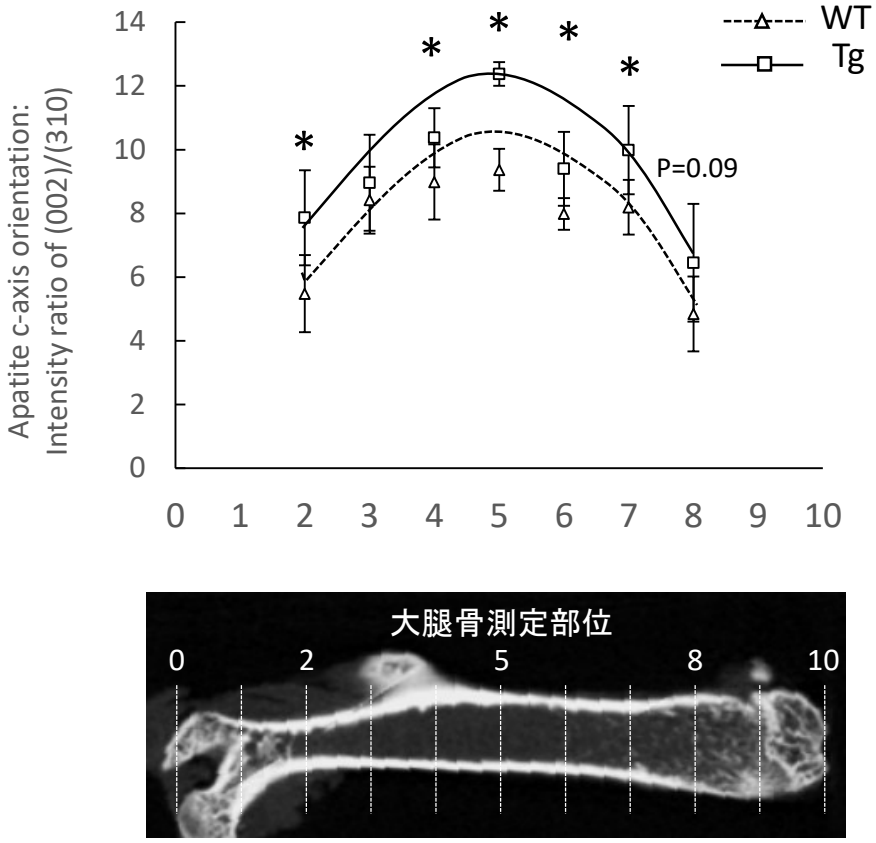

図9. ハイドロキシアパタイト配向性の解析による骨質の評価

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。
下段：測定部位(皮質骨2-8)、WT=8匹、Tg=6匹、 *P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

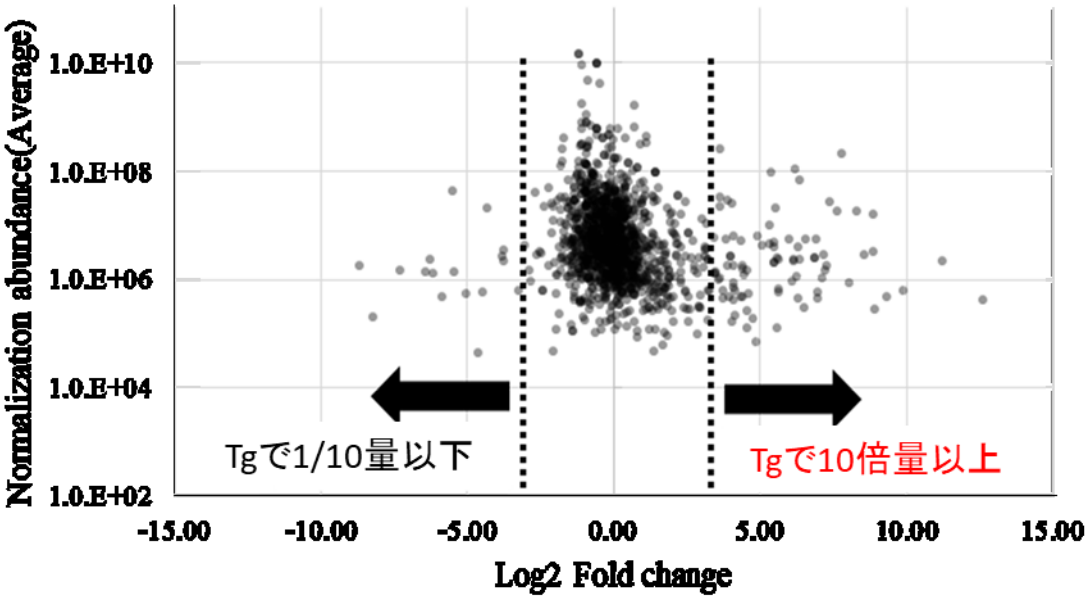

図10. 網羅的リン酸化解析

4週齢マウスの脛骨皮質骨より蛋白質を抽出し、リン酸化ペプチドを回収したのちLC-MS/MS解析により網羅的なリン酸化蛋白質の解析を行った。

Fam20C-Tgで、WTと比較して10倍以上検出されたペプチド(右の点線より右の範囲)。WTで、Fam20C-Tgと比較して10倍以上検出されたペプチド(左の点線より左の範囲)。Fam20C-Tgでは、WTと比較して全体的に蛋白質のリン酸化が亢進していることが示された。

A

GO Term	%	Gene name
Protein folding	5.6	Fkbp15, Ranbp2, Hsp90aa1, Hsp90b1, Pdia4, Tmx1
Actin cytoskeleton organization	4.7	Iqsec1, Dmtn, Epb41l2, Myh10, Slc9a3r1
Biomineral tissue development	2.8	OCN, Fam20C, Spp1
Protein transport	8.4	Mon1a, Ranbp2, Ranbp3, Ap3b1, As3d1,Col1a1, Kpna3, Mcfd2, Nup98
Response to stress	2.8	Hsp90aa1, Hsp90b1, Npm1
Actin filament bundle assembly	2.8	Lima1, Dmtn, Lcp1
Cell cycle	8.4	Cd2ap, Clasp1, Camk1, Cqref1, Mcm3, Mapk1, Txlng, Timeless, Tacc1
Antigen processing and presentation, exogenous lipid antigen via MHC class Ib	1.9	Ap3b1, As3d1
Osteoblast differentiation	3.7	Col1a1, Igfbp5, Spp1, Snrnp200
Cellular response to cAMP	2.8	App, Dmtn, Igfbp5
Positive regulation of NK T cell differentiation	1.9	Ap3b1, As3d1
Negative regulation of sodium ion transport	1.9	Nedd4, Slc9a3r1
Regulation of genetic imprinting	1.9	Ctr9, Trim28
Positive regulation of translation	2.8	Rbms3, Mapk1, Npm1
Regulation of cell shape	3.7	Dmtn, Epb41l2, Myh10, Slc9a3r1
Negative regulation of cell motility	1.9	Ctnna1, Slc9a3r1

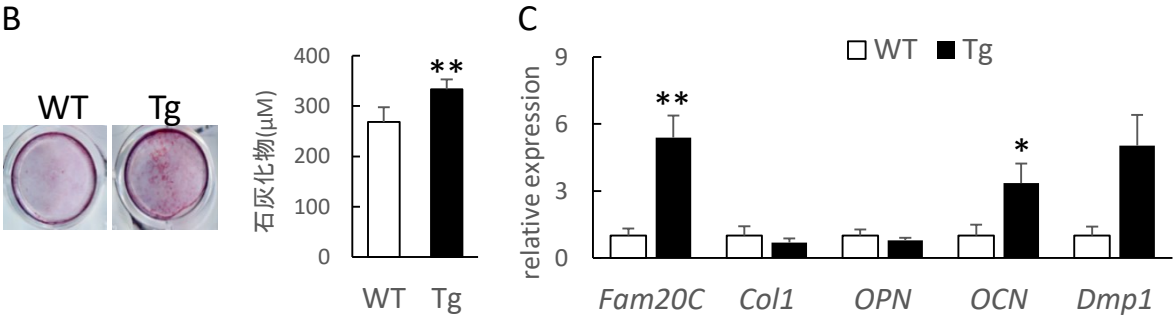

図11. 分泌蛋白質のリン酸化修飾が硬組織形成に及ぼす影響

A：Gene ontology解析。網羅的リン酸化蛋白質解析により得られた情報より、Fam20C-Tgでリン酸化の亢進が見られた蛋白質を抽出し、Gene ontology解析をBiological Processについて解析した。$P<0.05$であるもののみを示す。リン酸化修飾を受けた蛋白質はbiomineral tissue developmentやosteoblast differentiationに関与することが示された。

B：初代培養骨芽細胞を用いた石灰化実験。Fam20C-Tg由来の初代培養骨芽細胞は、WT由来の初代培養骨芽細胞と比較して、石灰化の亢進が認められた。左：アリザリン染色像、右：アリザリンの定量。n=6匹、**$P<0.01$。

C：初代培養骨芽細胞の遺伝子発現解析。成熟骨芽細胞マーカーの*OCN*、骨細胞マーカーの*Dmp1*の発現上昇が認められた。Gene symbol: 表1参照。n=5匹、*$P<0.05$、**$P<0.01$。