

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592355

研究課題名（和文）低ホスファターゼ症の発症メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanism of hypophosphatasia

研究代表者

織田 公光（ODA KIMIMITSU）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：10122681

研究成果の概要（和文）：低ホスファターゼ症は組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子の突然変異に起因する先天的な代謝異常症である。しかし、遺伝子上の変異がどのように本疾患の発症に係わっているのかに関してはよくわかっていない。本研究では、重症の低ホスファターゼ症で報告されたジスルフィド結合に関わる2例の変異と、優性遺伝することが知られているミスセンス変異の解析を分子レベルで行い、その発症メカニズムを示した。

研究成果の概要（英文）：Hypophosphatasia (HPP), an inborn error of metabolism, is caused by various loss-in-function mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. However, little has been known as to how these mutations lead to development of HPP. In this study we have examined two missense mutations related with disulfide bond linkage and one mutation involved in dominantly transmitted HPP at the molecular level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：遺伝子疾患、発症メカニズム、突然変異、石灰化不全、骨代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

低ホスファターゼ症（HPP）は1948年にはじめて報告された先天性常染色体遺伝疾患で、血清アルカリホスファターゼ（ALP）活性の低下を伴うことにその名を由来している。くる病とは異なり血中のカルシウムやリン酸の濃度は患者では減少しない。1988年に最初の変異が組織非特異型ALP（TNSALP）の遺伝子上に報告されて以来、全世界で約200例が知られており、そのうち約80%はアミノ酸が置き換ったミスセンス突然変異で

ある。HPPは重症型の周産期型、乳児型、軽症型の小児型、成人型、そして歯にだけ症状が限定されるodonto（歯限局）型の五つに分類されるが、骨の石灰化がほとんど起こらない致死型から乳歯の早期脱落、成人の偽骨折まで様々な症状が知られており、変異の場所、置換されるアミノ酸の種類により多様な臨床症状を呈することが考えられる。また、主として劣性形式で遺伝するが、優性遺伝する例も知られている。しかし、アミノ酸の置換に代表される突然変異によりTNSALP分子

の構造と機能にどのような分子欠陥を生じ、さらには変異型 TNSALP を発現する細胞の分化、増殖がどのように影響され、最終的に組織、身体レベルでどのような臨床症状として表れるのか、その分子機序は不明のままである。本研究は野生型および変異型酵素を発現した哺乳類細胞を対象に、酵素学ならびに合成を含めた細胞生物学的な多角的な解析を遂行することにその研究の特色と独創性があり、研究を通して HPP の特徴である軽度から重度に渡る広範囲の石灰化不全の分子機構を理解することで、病気の診断あるいは病気の進行を予測し、さらには治療法を開発する上でも多大な貢献が期待できる。

## 2. 研究の目的

石灰化は骨や歯などの硬組織を特徴づける構造である。しかし、歯科領域においても形態学を中心に多くの研究がなされているにも係らず、その形成、維持に関する分子機構に関しては現在でもなお不明な点が多い。ヒトの 4 種類の ALP の中で、TNSALP は古くから石灰化の指標として知られて来たが、その遺伝子の突然変異に起因する HPP 患者の主症状が石灰化不全である事実は、本酵素と石灰化を結びつける直接的な証拠である。石灰化の本体であるヒドロキシアパタイトはカルシウムイオンとリン酸イオンから数段階を経て形成されると推測されており、基質小胞内で形成された結晶が小胞膜をつき破って成長する過程で、無機ピロリン酸がその形成を阻害する結晶毒の役割をはたすと考えられている。基質小胞膜上の TNSALP はこの無機ピロリン酸を加水分解することで石灰化を促進するというのが現在の有力な仮説である。従って、その遺伝子の突然変異により基質小胞膜上の TNSALP 活性/分子数が減少する HPP では、石灰化部位での無機ピロリン酸濃度が上昇するために石灰化の過程が障害を受けると考えられる。本研究の最終目的は、様々な突然変異が TNSALP 分子に及ぼす影響を細胞生物学的に詳細に解析することを通して HPP の発症機構の解明に迫ることにある。

## 3. 研究の方法

### (1) 変異酵素の発現とその解析

- ① 変異型酵素を発現するために野生型酵素をコードするプラスミドに部位特異的突然変異法を用いて変異を導入後、変

異の有無並びに全コード領域の塩基配列を確認した。TNSALP (C184T)、TNSALP (C472S)、TNSALP (C184T C472S)、TNSALP (A116T)

- ② COS-1 細胞を用いた一過性の発現系での解析: pSG5-TNSALP のトランスフェクション
- ③ Tet-On CHO 細胞を用いた誘導発現系での解析: 変異型酵素の cDNA を p-TRE-hygro ベクターにサブクローニングした後、Tet-On CHO にトランスフェクション後にプラスミドを保持する細胞の選択。酵素の発現は培地中にドキシサイクリンを加えて行った。
- ④ 実験項目
  1. 蛍光抗体法による細胞内局在の観察
  2. 放射性メチオニンを用いたパルスーチェイス実験/免疫沈降 (細胞内輸送の速度の決定)
  3. パルスーチェイス実験/低温での中性界面活性剤での抽出 (ラフト構造への会合速度の解析)
  4. ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C による消化実験 (GPI 修飾の有無)
  5. ショ糖密度勾配遠心法による分子サイズの決定
  6. ウェスタンブロッティングによる分子サイズの解析

### (2) 変異酵素 TNSALP (D289V) の認識機構の解析

本変異酵素は一過性の発現系で急速に分解される。申請者はすでにこの分解には変異酵素がポリユビキチン化を受けたのちにプロテアソームで分解されるいわゆる小胞体分解機構の関与を示す結果を得ていた (Ishida et al. J. Biochem. 134, 63-70, 2003). そこでヒト肝細胞由来の HepG2 細胞にプラスミドを一過性にトランスフェクトし、24 時間後に細胞を回収して mRNA を抽出後に DNA マイクロアレイにより変異酵素の発現に伴って発現量が増加するタンパク質の網羅的な解析を行った。

## 4. 研究成果

本研究では重症例で報告されたミスセンス突然変異および軽症例 (優性遺伝) 関連した変異に着目してその影響を詳細に解析した。

(1) いずれも変異により、201番目あるいは497番目のシステインが他のアミノ酸に置換されたためにサブユニット内でジスルフィド結合ができない症例について。一過

性及び条件発現株化細胞を用いて細胞生物学的な解析を行った。その結果、野生型に比べて各変異酵素は活性を保持した酵素分子がわずかに細胞表面に発現するだけであることが明らかとなり、その原因はジスルフィド結合が形成されないためにサブユニットが適切な構造をとれないこと、従って活性発現に必須な2量体構造を獲得できないことが判明した。この研究はTNSALP分子の形成におけるジスルフィド結合の重要性を示したことによりで当該分野の雑誌に採択された(雑誌論文 2)。

(2) 小児型あるいは歯限局型HPPで報告されたTNSALPの116番目(非標準命名法)のアラニン残基がトレオニンに置換されたミスセンス変異[TNSALP(A116T)]を解析するために変異型酵素を一過性あるいは樹立細胞に発現して細胞生物学的な詳しい解析を行った。特に、野生型酵素がホモ2量体を形成するのに対して変異酵素はホモ2量体の形成できずに単量体あるいはそれがジスルフィド結合で架橋された高分子量の凝集体として細胞に存在することが明らかになった。興味深いことに、この単量体あるいは凝集体は細胞表面に到達できることも分かった。さらには野生型と変異酵素を共発現させると野生型酵素の一部が高分子量の凝集体に取り込まれることも明らかにした。本変異は優性遺伝することが家系の調査から明らかになっており、野生型と共発現すると野生型酵素を阻害する、いわゆるドミナントネガティブ作用を有することが知られているが、本研究からその分子メカニズムの一端が明らかとなった(雑誌報告 11)。

(3) DNAマイクロアレイ実験からTNSALP(D306V)の発現により著しく転写が亢進するF-boxタンパク質の一種をすでに見出した。このF-boxタンパク質はロイシンリピートを有するFBXLに分類されるが、細胞内ではSkp, Cullinと結合してSCF-E3複合体を形成して、変異酵素の分解に働いていると考えられる(未発表)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1: Poncin G, Beaulieu A, Humblet C, Thiry A, Oda K, Boniver J, Defresne MP. Characterization of spontaneous bone marrow recovery after sublethal total body

irradiation: importance of the osteoblastic/adipocytic balance. PLoS One. 2012; 7:e30818. 査読有.

2: Satou Y, Al-Shawafi HA, Sultana S, Makita S, Sohda M, Oda K. Disulfide bonds are critical for tissue-nonspecific alkaline phosphatase function revealed by analysis of mutant proteins bearing a C(201)-Y or C(489)-S substitution associated with severe hypophosphatasia. Biochim Biophys Acta. 査読有, 2012, 1822:581-8.

3: Amizuka N, Hasegawa T, Oda K, Luiz de Freitas PH, Hoshi K, Li M, Ozawa H. Histology of epiphyseal cartilage calcification and endochondral ossification. Front Biosci (Elite Ed) 査読有. 2012, 4:2085-100.

4. Guo Y., Li M., Liu Z., Sasaki M., Hasegawa T., Hongo H., Tabata C., Suzuki R., Oda K., Yamamoto T., Kawanami M., Amizuka N.: Immunolocalization of sclerostin synthesized by osteocytes in relation to bone remodeling in the interradicular septa of ovariectomized rats. J Electron Microsc. 査読有 in press.

5. Sasaki M., Hongo H., Hasegawa T., Suzuki R., Liu Z., Freitas PHL., Oda K., Yamamoto T., Li M., Totsuka Y., Amizuka N.: Morphological Aspects on Osteocytic Function on Bone Mineralization. Oral Science International 査読有. in press.

6: Hasegawa T, Li M, Hara K, Sasaki M, Tabata C, de Freitas PH, Hongo H, Suzuki R, Kobayashi M, Inoue K, Yamamoto T, Oohata N, Oda K, Akiyama Y, Amizuka N. Morphological assessment of bone mineralization in tibial metaphyses of ascorbic acid-deficient ODS rats. Biomed Res. 査読有, 2011, 32:259-69.

7: de Freitas PH, Hasegawa T, Takeda S, Sasaki M, Tabata C, Oda K, Li M, Saito H, Amizuka N. Eldecacitol, a second-generation vitamin D analog, drives bone remodeling and reduces osteoclastic number in trabecular bone of ovariectomized rats. Bone, 査読有, 2011, 49:335-42.

8: Haga M, Nozawa-Inoue K, Li M, Oda K, Yoshie S, Amizuka N, Maeda T. A morphological analysis on the osteocytic lacunar canalicular system in bone surrounding dental implants. *Anat Rec (Hoboken)*. 査読有, 2011, 294: 1074-82.

9: Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, Ackland ML, Faundez V, Hiromura M, Masuda S, Nagao M, Enomoto S, Kambe T. Tissue nonspecific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transport complexes in the early secretory pathway. *J Biol Chem*. 査読有, 2011, 286:16363-73.

10: Ishida Y, Komaru K, Oda K. Molecular characterization of tissue-nonspecific alkaline phosphatase with an Ala to Thr substitution at position 116 associated with dominantly inherited hypophosphatasia. *Biochim Biophys Acta*. 査読有, 2011, 1812 :326-32.

11: Masuki H, Li M, Hasegawa T, Suzuki R, Ying G, Zhusheng L, Oda K, Yamamoto T, Kawanami M, Amizuka N. Immunolocalization of DMP1 and sclerostin in the epiphyseal trabecule and diaphyseal cortical bone of osteoprotegerin deficient mice. *Biomed Res*. 査読有, 2010, 31: 307-18.

12: Sohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Nakamura N, Ogata S, Sakisaka S, Hirose S, Ikehara Y, Oda K. Interaction of Golgin-84 with the COG complex mediates the intra-Golgi retrograde transport. *Traffic*. 査読有, 2010, 11:1552-66.

13: Narimatsu K, Li M, de Freitas PH, Sultana S, Ubaidus S, Kojima T, Zhucheng L, Ying G, Suzuki R, Yamamoto T, Oda K, Amizuka N. Ultrastructural observation on cells meeting the histological criteria for preosteoblasts--a study in the mouse tibial metaphysis. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 査読有, 2010, 59:427-36.

14: Li M, Seki Y, Freitas PH, Nagata M, Kojima T, Sultana S, Ubaidus S, Maeda T, Shimomura J, Henderson JE, Tamura M, Oda K, Liu Z, Guo Y, Suzuki R, Yamamoto T, Takagi R, Amizuka N. FGFR3 down-regulates PTH/PTHrP receptor gene expression by

mediating JAK/STAT signaling in chondrocytic cell line. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 査読有, 2010, 59:227-36.

15: Ermonval M, Baudry A, Baychelier F, Pradines E, Pietri M, Oda K, Schneider B, Mouillet-Richard S, Launay JM, Kellermann O. The cellular prion protein interacts with the tissue non-specific alkaline phosphatase in membrane microdomains of bioaminergic neuronal cells. *PLoS One*. 査読有, 2009, 4:e6497.

16: Amizuka N, Li M, Tamura M, Oda K. [Hormones and osteoporosis update. Histological aspects on the action of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide (PTHrP) on bone and cartilage]. *Clin Calcium*. 査読無, 2009, 19:935-43. Review. Japanese.

17: Ubaidus S, Li M, Sultana S, de Freitas PH, Oda K, Maeda T, Takagi R, Amizuka N. FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 査読有, 2009, 58:381-92.

18: Yoshida K, Uoshima K, Oda K, Maeda T. Influence of heat stress to matrix on bone formation. *Clin Oral Implants Res*. 査読有, 2009, 20:782-90.

19: Luiz de Freitas PH, Li M, Ninomiya T, Nakamura M, Ubaidus S, Oda K, Udagawa N, Maeda T, Takagi R, Amizuka N. Intermittent PTH administration stimulates pre-osteoblastic proliferation without leading to enhanced bone formation in osteoclast-less c-fos(-/-) mic, e. *J Bone Miner Res*. 査読有, 2009, 24:1586-97.

20: Amizuka N, Li M, Hara K, Kobayashi M, de Freitas PH, Ubaidus S, Oda K, Akiyama Y. Warfarin administration disrupts the assembly of mineralized nodules in the osteoid. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 査読有 2009, 58:55-65.

[学会発表] (計 27 件)

1. Kojima T.: Histological examination on bone regeneration induced by a porous beta-TCP block mingled with

- bone marrow stromal cells.  
International Bone-Tissue-  
Engineering Congress, , 2011.10.12-15  
Hannover, Germany
2. 郭 穎: 卵巣摘出ラットの下顎歯槽骨における sclerostin の組織化学的観察. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会 2011 年 9 月 30 日-10 月 2 日 J Oral Biosci. 53(suppl) : 148, 2011. 岐阜
  3. 韋 山良: 骨組織におけるオステオカルシンと基質グラ蛋白の局在について. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会 2011 年 9 月 30 日-10 月 2 日 J Oral Biosci. 53(suppl) : 192, 2011. 岐阜
  4. Hasegawa T.: Endochondral ossification in mice over-expressing tissue non-specific alkaline phosphatase driven by type II collagen promoter. IOF Regionals 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting, ANZBMS annual scientific meeting, with JSBMR, 2011.9.4-8, Osteoporos Int. 22 (suppl 4): S578-579, 2011. Gold Coast , Australia
  5. 李 敏啓: 卵巣摘出ラット脛骨の海綿骨におけるビタミン D アナログ - Eldecalcitol - の投与効果について. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 2011 年 7 月 28-30 日 プログラム抄録集 : 188, 2011. 大阪
  6. 長谷川智香: アルカリフォスファターゼトランスジェニックマウスにおける基質石灰化機構の解明. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 2011 年 7 月 28-30 日 プログラム抄録集 : 192, 2011. 大阪
  7. Sohda M. : Interaction of Golgin-84 with the conserved oligomeric Golgi (COG) complex mediates the intra-Golgi retrograde transport. 第 33 回日本分子生物学会・第 83 回日本生化学会 合同学会, 2010 年 12 月 7 日・8 日 神戸
  8. 金城奈津子: 歯限局型低フォスファターゼ症で報告された変異型組織非特異型アルカリフォスファターゼの解析. 平成 22 年度日本小児歯科学会秋季大会抄録 小児歯誌 48(5)57, 2010, 12 月 2-3 日 郡山
  9. 李 敏啓: 骨芽細胞特異的 PTHrP トランスジェニックマウスの骨組織における解析. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 20-22 日 J Oral Biosci. 52(suppl) : 102, 2010. 東京
  10. 長谷川智香: アスコルビン酸欠乏ラットの歯根膜異常における組織化学的検索. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 20-22 日 J Oral Biosci. 52(suppl) : 124, 2010. 東京
  11. 増木英郎: オステオプロテジェリン遺伝子欠損マウスにおける骨細胞産生蛋白の局在. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 20-22 日 J Oral Biosci. 52(suppl) : 147, 2010. 東京
  12. 郭 穎: 根間中隔歯槽骨の骨細胞は骨改造に応じて sclerostin 産生を調節する. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 20-22 日 J Oral Biosci. 52(suppl) : 104, 2010. 東京
  13. 佐々木宗輝: Klotho 遺伝子欠損マウスの脛骨骨端部における骨細胞産生蛋白の局在について. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 20-22 日 J Oral Biosci. 52(suppl) : 104, 2010. 東京
  14. 田幡千尋: ラット臼歯の歯周組織におけるペリオスチンとファイブロネクチンの局在について. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 20-22 日 J Oral Biosci. 52(suppl) : 124, 2010. 東京
  15. 宮本幸奈: RANKL 遺伝子欠損マウスにおける骨・軟骨基質を取り込む細胞と活性型骨芽細胞の組織化学的検索. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 20-22 日 J Oral Biosci. 52(suppl) : 189, 2010. 東京
  16. 李敏啓: 骨芽細胞特異的 PTHrP 過剰発現マウスの骨組織における組織化学的

- 解析. 第 52 回歯科基礎医学会、2010 年 9 月 20-22 日東京
17. 郭穎：根間中隔齒槽骨の骨細胞は骨改造に応じて sclerostin 産生を調節する. 第 52 回歯科基礎医学会、2010 年 9 月 20-22 日、東京
18. 長谷川智香：アスコルビン酸欠乏ラットの歯根膜異常における組織化学的検索. 第 52 回歯科基礎医学会、2010 年 9 月 20-22 日、東京
19. 佐々木宗輝：Klotho 遺伝子欠損マウスの脛骨骨端部における骨細胞産生蛋白の局在について. 第 52 回歯科基礎医学会、2010 年 9 月 20-22 日、東京
20. 田幡千尋：ラット臼歯の歯周組織におけるペリオスチンとファイブロネクチンの局在について. 第 52 回歯科基礎医学会、2010 年 9 月 20-22 日、東京
21. 宮本幸奈：RANKL 遺伝子欠損マウスにおける骨・軟骨基質を取り込む細胞と活性型骨芽細胞の組織化学的検索. 第 52 回歯科基礎医学会、2010 年 9 月 20-22 日、東京
22. Kojima T.: Histological examination on bone augmentation with  $\beta$ -tricalcium phosphate and a thermoplastic bioresorbable plate. 20th Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, B 2010. 9. 14-18, Program Book: 1296, 2010. ruges, Belgium
23. 郭 穎：卵巣摘出ラットの下顎歯槽骨における骨細胞機能に関連する蛋白の局在について. 第 28 回日本骨代謝学会 学術集会 2010 年 7 月 20-22 日 プログラム抄録集：243, 2010. 東京
24. 李 敏啓：アスコルビン酸合成能欠如ラットの骨基質石灰化における微細構造学的観察 第 115 回日本解剖学会 2010 年 3 月 28-30 日 2010 岩手
25. 佐々木 理絵：c-fos 遺伝子欠損マウスにおける骨細胞の組織化学的解析. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 3 月 28-30 日 解剖学雑誌 85(Suppl)：201, 2010. 岩手
26. 依田浩子マウス歯胚発育過程におけるグリコーゲンおよびグルコース輸送体の局在 第 51 回歯科基礎医学会、2009 年 9 月 11 日 新潟市
27. 三浦俊英：ラット血中骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP-5b) 測定試薬の開発とその基礎性能 第 42 回新潟歯学会総会 2009 年 4 月 18 日 新潟市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

織田 公光 (ODA KIMITSU)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：10122681

### (2) 研究分担者

相田 美和 (SOHDA MIWA)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：20258528

### (3) 連携研究者 無