

機関番号 : 17301

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21791404

研究課題名 (和文) リン代謝および骨形成・維持における糖転移酵素 GALNT3
の機能解明

研究課題名 (英文) GALNT3 functions in phosphate homeostasis and bone biology

研究代表者 : 吉田 カロリナアンドレア (YOSHIDA CAROLINA ANDREA)

長崎大学大学院医歯薬総合研究科助教

研究者番号 : 50437828

研究成果の概要 (和文) :

本研究では *Galnt3* 遺伝子欠損 ($^{-/-}$) マウスの解析を通し、骨ハイパーオストシス高リン血症並びに腫瘍状石灰化症における GALNT3 の役割を確認し、GALNT3 の生理的機能を明らかにした。*Galnt3* $^{-/-}$ マウスは高リン血症の患者と類似した表現系を示し、野生型マウスに比べてリンは高濃度であり、FGF23 は減少していた。すなわち FGF23 によるリン代謝調節に GALNT3 が関与する事が確認できた。骨格においては *Galnt3* $^{-/-}$ マウスは野生型マウスに対して骨量が増加し、海綿骨内には軟骨組織が残存していた。また骨芽細胞分化や破骨細胞の機能は正常であった。さらに *Galnt3* $^{-/-}$ マウスの精巢上体では精子のアポトーシスが誘導されたため、雄は不妊状態を示した。

研究成果の概要 (英文) :

Loss of function mutations in the *GALNT3* gene result in under-glycosylation and subsequent proteolysis of FGF23, leading to hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome or tumoral calcinosis. Using *Galnt3* null ($^{-/-}$) mice, we corroborated the roles of GALNT3 in the maintenance of active FGF23, thus in Pi homeostasis and we analyzed its functions in bone and testis biology. We found that *Galnt3* $^{-/-}$ mice had increased bone volume and a trabecular bone with cartilage inclusions, despite the facts that osteoblast differentiation and osteoclast activity were normal. GALNT3 is also important for sperm production and maturation, as evidenced by the apoptosis seen in the epididymis of the *Galnt3* $^{-/-}$ mice.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野 : 整形外科

科研費の分科・細目 : 外科系臨床医学・整形外科

キーワード : Galnt3、骨、リン代謝

1. 研究開始当初の背景

ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 3 (GALNT3) は、ゴルジ器に局在するムチン-O-型糖鎖の形成を始める酵素の一

つであり、UDP-GalNAc から蛋白質のセリンとトレオニンのアミノ酸残基に GalNAc を付加する。GALNT3 は、腎臓の近位尿細管においてリンの再吸収を抑制する FGF23

(Fibroblast Growth Factor 23) に糖鎖を付加、その蛋白切断による不活化を阻害し、活性型 FGF23 の分泌に重要な働きをする。従って GALNT3 酵素活性の低下は FGF23 の切断、不活化が促進し、骨ハイパーオストシス高リン血症ならびに軟組織における異所性のカルシウム沈着を引き起こす。

我々は mRNA in situ hybridization 法を用いて *Galnt3* が骨髄細胞・軟骨細胞に発現していることが分り GALNT3 がリン代謝の調節以外に骨に何らかの機能をはたすかを疑問に思った。

また GALNT3 は膵臓、精巣、腎臓と皮膚では高い、前立腺、卵巣、消化管、肺と骨髄では低い発現をしめすと報告されてきたが、これらの臓器における GALNT3 生理的機能は明らかではないため調べる必要がる。

2. 研究の目的

我々は、GALNT3 の全身および骨格における生理的機能を明らかにするために、*LacZ* を組み込んだ *Galnt3* ノックアウト(^{-/-})マウスを作製した。

(1) 今回の申請では、このノックアウトマウスを解析することにより、骨ハイパーオストシス高リン血症・家族性腫瘍状石灰症が、FGF23 を介したリン酸代謝異常であることを証明するとともに、GALNT3 の他の生理的機能の探索する事を目的とした。

(2) また *Galnt3* 遺伝子発現における調節機構をプロモター解析により解明する事も目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Galnt3* の発現組織の確認

野生型マウスの各臓器の組織から RNA を抽出し、定量的 PCR 法にて *Galnt3* の発現を測定した。

また *Galnt3* ヘテロ変異マウスを用いて β

-galactosidase 染色により *Galnt3* の発現組織を調べた。

(2) 高リン血症・症腫瘍状石灰化症疾患の症状と作製した *Galnt3*^{-/-} マウスの表現系の比較

Galnt3^{-/-}マウスの血中リン・カルシウムの測定し、ELISA 法を用いて血中 FGF23 の測定を行った。軟組織における異所性石灰化は病理解析 (von Kossa 染色) を用いて評価した。

(3) 骨格における GALNT3 の機能評価

① 野生型と *Galnt3*^{-/-}マウスの全身骨格標本をアルシアンブルーとアリザリンレッドで染色し、軟骨内骨化を比較した。

② 長官骨の 3 次元構造を評価するため μ CT 撮影をおこなった。

③ *Galnt3*^{-/-}マウスの軟骨細胞、骨芽細胞の分化段階はそれぞれのマーカー (*Col2a1*、アグリカン、*Col10a1*、*Col1a1*、オステオポンチン、オステオカルシン) を組織標本上で mRNA in situ hybridization を用いて評価した。

(4) *Galnt3*^{-/-}マウスの全身評価

① *Galnt3* 発現組織を中心に、*Galnt3*^{-/-}マウスの胎仔および成体マウスの組織切片の評価を行った。また、分泌性蛋白の修飾に関わる可能性もあるので、全身臓器の組織切片の評価、および von Kossa 染色にて異所性の石灰化がないか検討した。

② アポトーシスは TUNEL 染色で評価した。

4. 研究成果

(1) *Galnt3* の発現パターン

Galnt3 の発現を定量的 PCR、mRNA in situ hybridization 及び β -galactosidase 染色法で評価した結果、*Galnt3* は、肺、長官骨、腎臓 (図 1)、骨穿細胞・軟骨細胞 (図 2) と精巣 (図 3) に発現することが分かった。

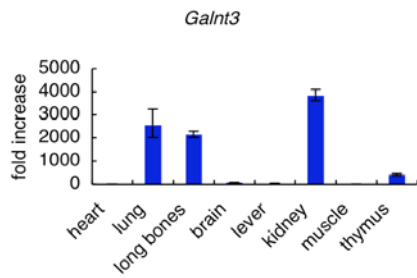


図1 15週齢野生型マウスにおけるGalnt3の発現(定量的PCR)。

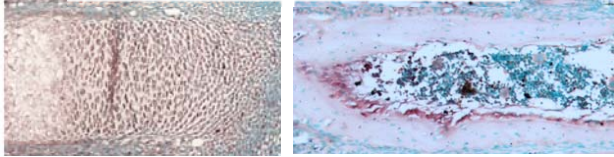


図2 Galnt3 mRNA in situ hybridization. 野生型マウス胎生14.5日の軟骨(左)と生後1週齢の肋骨の骨穿細胞に発現が見える(右)。

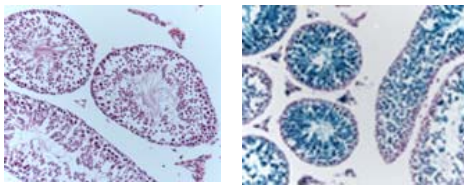


図3 8週齢の野生型(左)とGalnt3^{-/-}(右)マウスの精巣におけるβgalactosidase活性。

(2) 高リン血症・症腫瘍状石灰化症とGalnt3^{-/-}マウスの表現系の比較

Galnt3^{-/-}マウスは高リン血症に類似した表現系を示し、野生型マウスに比べて血清中のカルシウムは同量、リンは高濃度であり、FGF23は野生型マウスに比べて減少していた。また異所性石灰化は高齢Galnt3^{-/-}マウスの眼球回の皮膚に孤発的に現れた。これらはFGF23によるリン代謝調節にGALNT3が関与する事が確認できた。

(3) 骨格におけるGALNT3の機能評価

① 8週齢と17週齢の成獣マウスの大腿骨を摘出し、遠位骨端をμCT撮影(図4)した結果Galnt3^{-/-}マウスは野生型マウスに対して骨量、海綿骨数が増加していることが分かった。

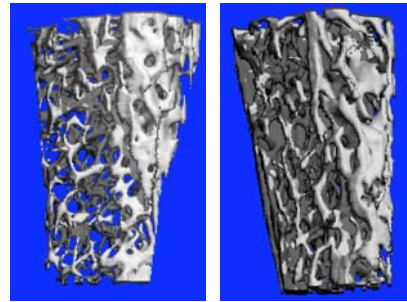


図4 17週齢の野生型(左)とGalnt3^{-/-}(右)マウスの大腿骨μCT撮影写真。

引き続き骨組織形態計測にて、骨量、海綿骨数、骨芽細胞数、骨細胞数、類骨厚、破骨細胞数、吸収面、骨形成速度等を計測し、骨量および骨芽細胞と破骨細胞の分化・機能を検討している。

② 8週齢と17週齢のGalnt3^{-/-}マウスの血清中Trap5b濃度を測定し、野生型マウスに対して同量であった事により、破骨細胞の機能は正常であることが分かった。

③ 骨格組織学解析: HE & プロテオグリカン検出用サフランin O染色を行った結果、野生型マウスに比べてGalnt3^{-/-}マウスの骨組織では、海綿骨内に軟骨組織が多く残存していることが明らかになった(図5)。

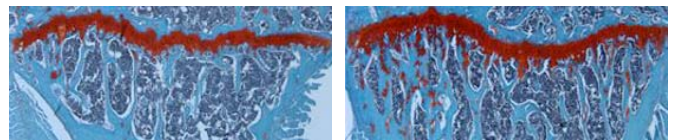


図5 17週齢の野生型(左)とGalnt3^{-/-}(右)マウスの頸骨。Safranin O染色により残存軟骨基質が赤く検出できる。

またmRNA situ hybridizationにより、骨芽細胞分化ステージのマーカーであるCol1a1、Spp1、Bglap2の発現は同様であると示唆された(図6)。

④ In vitro 骨穿細胞分化におけるGALNT3の機能評価

野生型マウス、Galnt3^{-/-}マウスの頭蓋冠由来細胞の初期培養を行い、骨芽細胞分化を調べ

つつある。また頭蓋冠由来細胞と骨髄細胞を共培養し、破骨細胞分化支持能を比較する。これにより骨芽細胞・破骨細胞分化それぞれに対する機能を明らかにする。

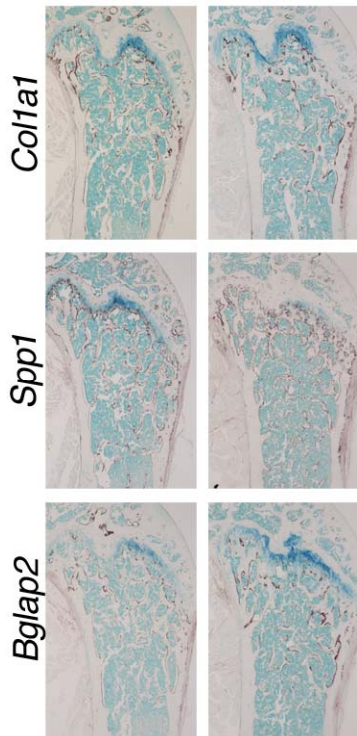


図6 17週齢の野生型(左列)と *Galnt3*^{-/-} (右列)マウスの大腿骨。mRNA in situ hybridization 法により *Col1a1*、*Spp1*、*Bglap2* を発現する骨穿細胞が検出できる。

(4) 生殖器における *Galnt3*^{-/-}マウスの表現系 *Galnt3*^{-/-} 雄マウスのみが不妊状態を示し、精巣・精巣上体の組織解析により *Galnt3*^{-/-} マウスでは精子の分化が阻害され、アポトーシス(図7)が誘導される事が分かった。(HE & Tunel 染色にて)。

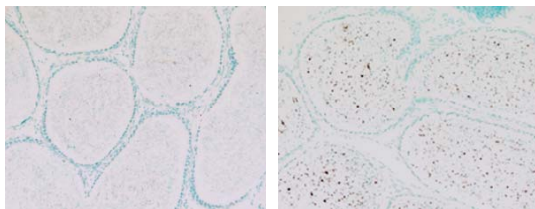


図7 17週齢の野生型(左)と *Galnt3*^{-/-}(右)マウスの精巣上体。Tunel 染色によりアポトーシスを起こしている細胞茶色く示される。

(5) *Galnt3* 遺伝子の発現調節

Galnt3 プロモーター配列を調べた結果、精子分

化に関わる多数の転写因子の DNA 結合配列が有ることが分った為、このプロモーター領域をクローニングし、解析をすすめている。

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1件)

① Rokutanda S, Fujita T, Kanatani N, Yoshida CA, Komori H, Liu W, Mizuno A, Komori T. Akt regulates skeletal development through GSK3, mTOR, and FoxOs. Dev Biol. Vol. 328 No. 1, 2009, pp. 78-93. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 カロリナアンドレア
(YOSHIDA, CAROLINA ANDREA)
研究者番号: 50437828