

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04368

研究課題名(和文) Dmp1の分泌経路と翻訳後修飾が骨細胞の機能に果たす役割

研究課題名(英文) Significance of secretory processing of Dmp1 in the osteocyte function

研究代表者

豊澤 悟 (Toyosawa, Satoru)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30243249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞が特異的に産生する骨基質Dmp1(dentin matrix protein 1)は、その翻訳後修飾過程でN端とC端断片の2つに切断後、C端断片はキナーゼ(Fam20C)によりリン酸化されて骨細管壁に分布して骨細胞機能に関与すると考えられる。本研究では、Dmp1/C端断片の役割を骨芽細胞がFam20Cを過剰発現するマウスの骨格解析から検討した。その結果、リン酸化したDmp1/C端断片は局在部の石灰化亢進を介して皮質骨形成に関与する事が示された。また、N/C端断片の各々に異なる蛍光色をラベルしたDmp1の骨細胞株における発現解析から、切断後の両断片の細胞内輸送経路が異なる事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨に存在するDmp1等の酸性リン蛋白質は、多数のリン酸基が有する負電荷のため、Caイオンを引き寄せて骨形成に関与すると推測されていたが、これまで証明されていなかった。本研究では、生体でリン酸化したDmp1が石灰化を亢進して皮質骨形成に関与する事が示された。骨の全細胞の90%を占める骨細胞が特異的に発現するDmp1は、骨の形成・維持に深く関与すると考えられ、本結果は骨疾患の病態解明に繋がる有用な知見となる。

研究成果の概要(英文)：The bone matrix Dmp1 (dentin matrix protein 1), which is specifically produced by osteocytes, is cleaved into two fragments, N-terminal and C-terminal, during the post-translational modification. The C-terminal fragment is highly phosphorylated by kinase (Fam20C) and then localized at osteocyte canal wall, and will be involved in the osteocyte function. In this study, to investigate the role of Dmp1/C-terminal fragment, we studied the skeletal bone of transgenic mice (Fam20C-Tg) in which osteoblasts overexpress Fam20C. As a result, the highly phosphorylated Dmp1/C-fragment is involved in cortical bone formation due to elevated local mineralization. In addition, in vitro expression analysis of Dmp1 in which each N/C-fragments labeled with different colored-fluorescence suggested the intracellular transport pathways of both fragments were different after cleavage.

研究分野：口腔病理学

キーワード：Dmp1 骨細胞 翻訳後修飾 リン酸化 石灰化 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外基質である Dmp1(dentin matrix protein 1)は、骨芽細胞では発現せず、骨基質に埋まった骨細胞に特異的に発現する。これまでの研究では、Dmp1 欠失マウスが FGF23 を高発現する事から、Dmp1 の役割は FGF23 発現の抑制であると推測されている。しかし、腫瘍性骨軟化症という疾患では腫瘍細胞は Dmp1 と共に FGF23 を高発現しており、現在推測されている役割(FGF23 発現抑制)とは矛盾するため、真の役割は他にあると考えられる。

一方、Dmp1 の翻訳後修飾については研究が進んでおり、Dmp1 は翻訳後修飾過程で 2 つに切断され、37kDa の N 端断片はプロテオグリカンと結合して骨小腔周囲に分布し、57kDa の C 端断片はキナーゼ(Fam20C)によってリン酸化されて骨細管壁に分布する。この Dmp1 の N 端と C 端断片の翻訳後修飾と分布の違いから、両断片の骨細胞機能における役割は異なる可能性が推測される。

2. 研究の目的

研究の目的は、Dmp1 の翻訳後修飾過程で 2 つに切断され、異なる翻訳後修飾を受けて異なる分布を示す N 端と C 端断片の役割解明を通して、真の Dmp1 機能を探ることである。本研究では、高度にリン酸化される Dmp1 の C 端断片の役割解明のため、骨芽細胞が Fam20C を過剰発現するマウス(Fam20C-Tg)(既に作製済)の解析を行った。すなわち、Dmp1 は C 端断片が主にリン酸化されることから、骨芽細胞に Fam20C を過剰発現させれば、骨細胞が産生する Dmp1/C 端断片は高度にリン酸化されると考えられる。そこで、高度にリン酸化した Dmp1/C 端断片が骨組織に及ぼす変化を期待して、Fam20C-Tg における骨組織の変化を検討した。また、翻訳後修飾過程で 2 つに切断された N 端と C 端断片の分布の違いから、両断片の分泌経路が異なると考えられるため、両断片の細胞内輸送経路の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) Fam20C-Tg の骨組織の解析

骨格構造解析

μCT 撮影装置(R_mCT2Rigaku)を用いて、Fam20C-Tg()の大腿骨海綿骨と骨幹部皮質骨の測定を行った。pQCT 撮影装置(XCT Research SA+,Stratec Medizintechnik GmbH)を用いて、大腿骨骨幹部皮質骨の骨密度(BMD:bone mineral density)の測定を行った。

形態学的解析

Fam20C-Tg の下肢長管骨を 4%パラホルムアルデヒドにて一晩浸漬固定し、10%EDTA 溶液にて低温脱灰後、通法に従いパラフィン包埋した試料をヘマトキシリン-エオジン(HE)組織解析や銀染色、免疫染色に用いた。

免疫組織化学的染色では、1 次抗体に、ウサギ抗 Fam20C ポリクローナル抗体、マウス抗リン酸化セリンモノクローナル抗体を用いた。各々に対するビオチン標識 2 次抗体を滴下し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて免疫反応部位を検出し、DAB 発色を行った。対比核染色を行い、脱水、透徹し、封入を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性は、1.2% 過酸化水素水添加メタノールにて不活化した。

骨形態計測は、12 週齢の Fam20C-Tg に、テトラサイクリン、その 72 時間後にカルセインを皮下注射し、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。

血液学的解析

4 週齢および 12 週齢 Fam20C-Tg の血液を採取し、キットを用いて血中の P 濃度と Ca 濃度を測定した。血中の FGF23 濃度と CTX-I 濃度に関しては、ELISA キットを用いて測定を行った。

ウェスタンブロット解析

12 週齢 Fam20C-Tg の脛骨から骨髄を除去した皮質骨組織を凍結粉碎して、Phosphatase inhibitor を添加した蛋白質抽出液に加え、冷却下でホモジナイズした。12000rpm で 30 分間遠心後、上清のみを採取して可溶化を行った。SDS-PAGE または Phos-tag[®] SDS-PAGE にて泳動分離して PVDF 膜に転写した。1 次抗体には、ウサギ抗 Dmp1/C 端断片ペプチド(FRRSRVSEEDDRGE)抗体を用い、2 次抗体にペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いて、化学発光にて検出した。

遺伝子発現解析

Fam20C-Tg の長管骨の海綿骨と皮質骨からそれぞれ total RNA を抽出後、逆転写を行い、骨関連遺伝子のプライマーを用いて 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。

細胞培養

Fam20C-Tg の初代培養には、生後 3-5 日齢の頭蓋冠から、コラゲナーゼとディスパーゼを用いて細胞を分離し、遠心して細胞を沈殿させた後に、10%FBS 添加 -MEM 培地にて培養した。

(2) Dmp1/N 端と Dmp1/C 端断片の細胞内輸送経路の解明

蛍光ラベル Dmp1 発現ベクターの構築

Dmp1 の N 端に赤色蛍光、C 端に緑色蛍光を付けた全長 Dmp1 と、それを段階的に短くしたディレーション変異体、また 2 つに切断されない Ala 変異体を発現するコンストラクトを作製した。

発現解析

10%FBS 添加 -MEM 培地にて培養した MC3T3-E1 細胞株および MLO-A5 細胞株に上記の Dmp1 発現コンストラクトをトランスフェクションし遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、各蛍光の分布を蛍光顕微鏡にて観察した。

4 . 研究成果

(1) Fam20C-Tg の骨組織の解析

Fam20C-Tg における Dmp1/C 末端のリン酸化

Fam20C-Tg の骨組織において、Fam20C によ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 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の強陽性反応を認めた。この骨細管に沿った陽性反応は、Dmp1 の C 端断片の分布に一致しているため(Histochem Cell Biol,147: 341-351,2017)、Fam20C-Tg では骨基質中の Dmp1/C 端断片のリン酸化が亢進している事が示唆された。

次に、12 週齢 Fam20C-Tg の皮質骨の可溶化抽出試料とアルカリフォスファターゼにて脱リン酸化した試料を、高リン酸化物の泳動速度が遅くなる Phos-tag^R SDS-PAGE にて泳動分離した。その後、抗 Dmp1/C 端断片抗体を用いたウエスタンブロット解析により、Dmp1/C 端断片のリン酸化状態を検討した。Fam20C-Tg では野生型マウス試料に比較して、抗 Dmp1/C 端断片抗体に認識される高位シフトのバンドが濃く観察され、脱リン酸化試料でも Fam20C-Tg で高位シフトのバンドが残存している事から、Fam20C-Tg では、Dmp1/C 端断片が野生型より高度にリン酸化されていることが示された。

なお、Fam20C-Tg の皮質骨の可溶化抽出試料を用いて網羅的リン酸化解析を行ったが、Dmp1 ペプチドは検出できなかった。Fam20C-Tg 試料では野生型マウス試料よりも高度にリン酸化した蛋白質を多く検出できたが、その中に Dmp1 ペプチドは含まれておらず、今回の TiO₂ 樹脂用いた回収方法の検討が必要と思われる。

Fam20C-Tg の骨組織の変化

野生型マウスと比較して、Fam20C-Tg の血中 P 濃度や Ca 濃度および FGF23 濃度に有意差はみられなかった。

Fam20C-Tg の大腿骨皮質骨では、皮質骨量が有意に増加し、骨石灰化面(MS/BS)と骨石灰化速度 (MAR)が有意に亢進し、石灰化骨形成速度(Md.BFR)が促進した。一方、I 型コラーゲン発現亢進や骨芽細胞数の増加は見られなかった。従って、石灰化亢進を介して骨形成が促進することが示された。また、骨細胞数 (N.OC/BS)と骨多孔性 (Po.Ar/Ct.Ar)が有意に増加していた

一方、Fam20C-Tg の大腿骨海綿骨では、海綿骨量と密度が有意に減少していた。骨形成量に変化はないため、破骨細胞数の有意な増加や骨吸収面の増加傾向、および CTX-1 (骨吸収マーカー) 亢進から判断して、骨吸収促進により海綿骨が減少したと考えられる。また、皮質骨における骨多孔性の増加も骨吸収促進によるものと考えられる。骨芽細胞に高発現させた Fam20C が破骨細胞を活性化する理由は明らかではないが、リン酸化骨基質は、破骨細胞の骨への接着促進を介して骨吸収活性を促進するのかもしれない。

皮質骨と海綿骨の骨形成態度の相違については、海綿骨では、リン酸化骨基質はすぐに骨改造現象により吸収されてしまうため、骨形成におけるリン酸化の効果が現れにくいのではないかと考えている。

Fam20C-Tg 由来の骨芽細胞培養

Fam20C を過剰発現させたことによる骨芽細胞自律的な変化を検討するため、Fam20C-Tg の頭蓋冠から分離した骨芽細胞を培養した。その結果、Fam20C-Tg の骨芽細胞に I 型コラーゲン発現や細胞増殖に変化は見られなかったが、石灰化球(mineralization nodules)形成が促進した。この Fam20C-Tg の骨芽細胞自律的な特質が、皮質骨形成促進に関与したのと考えられる。

まとめ

Fam20C-Tg の骨組織では、Dmp1/C 末端は高度にリン酸化されており、皮質骨形成促進に関与していることが示された。本研究では、骨の様々な蛋白がリン酸化され、Dmp1/C 末端を特異的にリン酸化した訳ではないが、Dmp1/C 末端は海綿骨より皮質骨で重要な働きをされると考えられる。

(2) Dmp1/N 端と Dmp1/C 端断片の細胞内輸送経路の解明

Dmp1 の N 端に赤色蛍光、C 端に緑色蛍光を付けた全長 Dmp1 の発現ベクターを、MC3T3-E1 細胞と MLO-A5 細胞に発現させて蛍光分布を観察した。その結果、全長 Dmp1 発現では、赤色蛍光は顆粒状に主に核周囲に、緑色蛍光は細胞質や細胞突起を含めて細胞全体に均一に分布していた。また、2 つに切断されない Ala 変異体を発現させると、両蛍光は重複して細胞全体に均一に分布したため、N 端断片および C 端断片には、各々の輸送シグナル配列が存在すると考えた。

次に、全長 Dmp1 を段階的に短くしたディレーション変異体を発現させたが、全長 Dmp1 と同様の蛍光分布が観察され、輸送シグナル配列断片を同定することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirose Katsutoshi, Ishimoto Takuya, Usami Yu, Sato Sunao, Oya Kaori, Nakano Takayoshi, Komori Toshihisa, Toyosawa Satoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Overexpression of Fam20C in osteoblast in vivo leads to increased cortical bone formation and osteoclastic bone resorption	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115414 ~ 115414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bone.2020.115414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Usami Yu, Gunawardena Aruni T, Francois Noelle B, Otsuru Satoru, Takano Hajime, Hirose Katsutoshi, Matsuoka Masatake, Suzuki Akiko, Huang Jiahui, Qin Ling, Iwamoto Masahiro, Yang Wentian, Toyosawa Satoru, Enomoto Iwamoto Motomi	4. 巻 34
2. 論文標題 Possible Contribution of Wnt Responsive Chondroprogenitors to the Postnatal Murine Growth Plate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 964 ~ 974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1002/jbmr.3658	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamamoto Yuri, Toyosawa Satoru, Sato Sunao	4. 巻 15
2. 論文標題 Inorganic phosphate induces cementogenic/osteogenic gene expression and mineralization in dental follicle cells in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 13 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/S1348-8643(17)30042-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirose Katsutoshi, Okura Masaya, Sato Sunao, Murakami Shumei, Ikeda Jyun-Ichiro, Noda Yuri, Fukuda Yasuo, Morii Eiichi, Toyosawa Satoru	4. 巻 70
2. 論文標題 Gnathic giant-cell-rich conventional osteosarcoma with MDM2 and CDK4 gene amplification	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 1171 ~ 1173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1111/his.13141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oya Kaori, Ishida Ken, Nishida Tomoki, Sato Sunao, Kishino Mitsunobu, Hirose Katsutoshi, Ogawa Yuzo, Ikebe Kazunori, Takeshige Fumio, Yasuda Hidehiro, Komori Toshihisa, Toyosawa Satoru	4. 巻 147
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1 (Dmp1) phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of biomineralization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 341 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1007/s00418-016-1490-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 廣瀬勝俊, 浪花耕平, 宇佐美悠, 佐藤淳, 大家香織, 小守壽文, 豊澤悟
2. 発表標題 象牙質形成におけるFam20Cの役割
3. 学会等名 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirose K, Naniwa K, Usami Y, Oya K, Komori T, Toyosawa S
2. 発表標題 The role of Fam20C in dentin formation
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇佐美悠, 廣瀬勝俊, 岩本資巳, 豊澤悟
2. 発表標題 Ranvier 's grooveにおける軟骨前駆および骨芽細胞前駆細胞群の同定
3. 学会等名 日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirose K, Usami Y, Sato S, Sharyo M, Oya K, Komori T, Toyosawa S
2. 発表標題 The role of Fam20C in Bone and tooth formation.
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣瀬 勝俊、宇佐美 悠、佐藤 淳、大家 香織、社領 美紀、小守 壽文、豊澤 悟
2. 発表標題 骨形成におけるゴルジ体キナーゼFam20Cの役割
3. 学会等名 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 社領 美紀、佐藤 淳、宇佐美 悠、廣瀬 勝俊、白銀 陽一郎、豊澤 悟
2. 発表標題 3次元細胞培養モデルを用いた骨芽細胞から骨細胞への初期分化の検討
3. 学会等名 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirose K, Usami Y, Sato S, Sharyo M, Oya K, Komori T, Toyosawa S
2. 発表標題 Analysis of the role of Fam20C in Fam20C-transgenic mice
3. 学会等名 American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣瀬勝俊、宇佐美 悠、佐藤 淳、豊澤 悟
2. 発表標題 Fam20C過剰発現マウスを用いた骨形成におけるリン酸化の意義の解明
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣瀬勝俊、宇佐美悠、佐藤淳、小守 壽文、豊澤悟
2. 発表標題 Fam20C過剰発現マウスにおける骨組織の変化
3. 学会等名 日本骨代謝学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣瀬勝俊、宇佐美悠、佐藤淳、社領美紀、小守壽文、豊澤悟
2. 発表標題 The role of Fam20C in bone formation
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 編集 豊澤 悟、高田 隆、監修 高木 實	4. 発行年 2018年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 380
3. 書名 口腔病理アトラス	

1. 著者名 El-Mofly SK, Nelson B, Toyosawa	4. 発行年 2017年
2. 出版社 IARC (International Agency for Research on Cancer)	5. 総ページ数 5
3. 書名 Fibro-osseous and osteochondromatous lesions in WHO Classification of Head and Neck Tumours	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	阿部 真土 (ABE MAKOTO) (40448105)	大阪大学・歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	宇佐美 悠 (USAMI YU) (80444579)	大阪大学・歯学研究科・講師 (14401)	
研究分担者	保田 英洋 (YASUDA HIDEHIRO) (60210259)	大阪大学・工学研究科・教授 (14401)	
研究協力者	廣瀬 勝俊 (HIROSE KATSUTOSHI) (00824898)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	
研究協力者	石本 卓也 (ISHIMOTO TAKUYA) (50508835)	大阪大学・工学研究科・准教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	佐藤 淳 (SATO SUNAO) (70335660)	大阪大学・歯学研究科・講師 (14401)	
連携研究者	大家 香織 (OYA KAORI) (00779126)	大阪大学・歯学部附属病院・助教 (14401)	