

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09947

研究課題名(和文) 骨膜におけるF-boxタンパク質FBXW2の骨誘導能に関する検証

研究課題名(英文) Bone regeneration by F-box and WD-40 domain-containing protein 2

研究代表者

秋山 真理 (Akiyama, Mari)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60340618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：コピキチン化以外の機能がほとんど知られていないF-box and WD-40 domain-containing protein 2 (FBXW2)の骨再生に及ぼす影響を検証した。FBXW2は弾性線維に含まれていることが明らかになり、従来の研究で、FBXW2上にオステオカルシンの発現が認められた現象は弾性線維において起きていたことがわかった。FBXW2は骨膜のみならず、血管の弾性板にも含まれるため、培養シャーレ上で、血管の弾性板を観察し、FBXW2、エラスチンおよびフィブリリン 1の変化を調べた。培養5週間後の血管においても、FBXW2とエラスチンは弾性板の形状を保っていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

弾性線維はエラスチンおよびフィブリリンなどから構成されていると言われていたが、従来、知られていなかった成分としてFBXW2も弾性線維に含まれていることを明らかにした。FBXW2は骨膜内でオステオカルシンによってコーティングされており、そのFBXW2が弾性線維に含まれることから、骨再生において弾性線維が重要な役割を果たしていると考えられる。弾性線維は血管にも含まれているため、弾性線維の変化と血管閉塞との関連を調べた結果、フィブリリン 1は血管の内・外弾性板から外れた場所に強く発現し、血管が閉塞する際には、フィブリリン 1が豊富に含まれる層が厚みを増していた。今後、心血管系疾患の解明につながる。

研究成果の概要(英文)： In previous study, elastin and fibrillin are known as components of elastic fibers. In this study, FBXW2 are found in periosteum and blood vessels as a component of elastic fibers. In blood vessels of bovine legs, three components of elastic fibers (elastin, FBXW2, and fibrillin-1) are compared. Elastin and FBXW2 expressed in the internal and external elastic laminae, whereas fibrillin-1 expressed outside of them.

In periosteum, osteocalcin was located on fibers of FBXW2. Elastic fibers containing FBXW2 might have important roles in bone regeneration. FBXW2 and osteocalcin kept their shapes of fibers on the condition with ascorbic acid, whereas FBXW2 and osteocalcin separated from elastic fibers without ascorbic acid.

研究分野：骨再生

キーワード：弾性線維 骨膜 血管 エラスチン フィブリリン1 Fボックスタンパク質 プロテオーム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨再生を目的とし、骨膜由来細胞の初代培養を行ってきた。培養時に得られる培養上清のプロテオーム解析および *in vitro* で培養した骨膜由来細胞の免疫染色の結果、初代培養のオリジンとなる骨膜側には F-box and WD-40 domain-containing protein 2 (FBXW2) が発現し、培養によって得られた骨膜由来細胞側には F-box/leucine-rich repeat protein 14 (FBXL14) が発現することが明らかになった。F ボックスタンパク質のよく知られている機能はユビキチン化であるが、上記 2 つの F ボックスタンパク質はユビキチン化以外に骨再生において重要な役割を果たしていると考えられた。

(2) 初代培養において *in vitro* で骨膜のみを観察している時にはわからなかったが、骨を含む組織の観察により、骨膜と骨の境界に存在する形成層と呼ばれる部位にも FBXW2 は発現し、骨膜から骨に向かって入射角約 30° の角度で埋入していることがわかった。骨から剥離した骨膜を explant culture した際に、ファイバー状の FBXW2 の表面をコーティングするように骨特有タンパク質であるオステオカルシンが発現していた。FBXW2 は骨再生プロセスにおいてオステオカルシンと関連性を持つことが示唆された。

(3) 骨膜由来細胞は初代培養において、アスコルビン酸添加条件では細胞同士が重なり合い、3次元構造を持つ細胞塊を形成するために人工のスカフォールド(足場材料)が不要であるが、アスコルビン酸無添加条件では単層構造になるためスカフォールドフリーでの骨再生は失敗に終わっている。そこで、骨再生のために必要なタンパク質は何なのかを突き止めたいと考えた。

2. 研究の目的

FBXW2 は骨膜と骨の間にある形成層において発現していることは明らかにした。そこで、形成層における FBXW2 は骨のリモデリングの際に司令塔の役割を果たしているのかを検証することが本研究課題の目的である。さらには、FBXW2 との相互作用において骨再生に関与するタンパク質群を見出すことも目的としている。骨膜由来細胞の特徴は自ら天然のスカフォールド(足場となる物質)を合成し、細胞塊を形成することである。この天然のスカフォールドには当然コラーゲンが含まれているが、コラーゲンのみで組織を再生させるのは困難である。本研究課題においては、骨膜由来細胞が合成し、自らの足場として利用している非コラーゲン性のタンパク質の解析を目指している。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色：死後 24 時間経過した食用用のウシの足から組織を採取し、培養前後においてパラフィン切片を作製した。FBXW2 および FBXW2 に関連のあるタンパク質の抗体を用いて、タンパク質の発現部位を可視化し、顕微鏡観察を行った。

(2) プロテオーム解析：ウシの足から採取した組織片を用いて explant culture を行い、培養 4 週間後に無血清培地に交換したのち、1 週間静置した。無血清の培養上清を回収し、外部業者委託(株式会社プロテオバイオロジクス)で、nanoLC-MS/MS 法にて解析した。

(3) 予定していた免疫沈降、ウエスタンブロットングおよび遺伝子ノックダウンに関しては、免疫染色の結果から研究開始当初は予期していなかった結果が得られたため、予定を変更した。

4. 研究成果

(1) FBXW2 との間に相互作用を及ぼすタンパク質：

FBXW2 抗体を用いて骨膜のパラフィン切片を免疫染色した結果、骨膜の中の毛細血管の一部に FBXW2 が発現していた。しかしながら、FBXW2 は血管のマーカーではなく、FBXW2 が発現していない毛細血管も存在していたため、FBXW2 が発現している毛細血管には弾性線維が存在し、血管内皮細胞のみから成る、より小さな毛細血管は FBXW2 を含まないという仮説を立て、仮説の検証を行った。まず、弾性線維と FBXW2 との関連を明らかにするために連続切片を作製し、エラスチカ・ワンギーソン染色、FBXW2 およびエラスチンの免疫染色を行い、画像を比較した。骨膜および骨の切片において、エラスチカ・ワンギーソン染色で弾性線維が染まっている部位には FBXW2 も発現していることが明らかとなった。当然、弾性線維の構成成分であるエラスチンも FBXW2 とほぼ同じ部位に発現していた。次に、肉眼で見ることのできる大きさの血管を用いて比較した結果、内弾性板および外弾性板においても FBXW2 は、エラスチカ・ワンギーソン染色およびエラスチンの免疫染色で染まっている部位とほぼ同じ部位に発現していた。仮説の検証を行った結果、骨膜および血管において弾性線維と FBXW2 の発現部位がほぼ一致しているという事実が明らかになった。骨膜の骨再生能について調べた従来の研究では、骨膜由来細胞が増殖していくにつれて骨膜内のファイバー状の FBXW2 がオステオカルシンでコーティングされていく様子を 2 重免

疫染色によって観察できたが、この現象は FBXW2 を含む弾性線維がオステオカルシンでコーティングされていたためと考えられる。このことから、弾性線維上のオステオカルシン発現は骨再生に影響を与えていることが示唆された。弾性線維と FBXW2 との関連性を示した文献は 2022 年の Akiyama の論文が最初である。

FBXW2 が弾性線維に含まれることが明らかになり、次の段階として、他の構成成分であるエラスチンおよびフィブリリン 1 との関連性を調べた。エラスチンおよびフィブリリン 1 についてさらに詳しく調べた理由は、FBXW2 の抗体を用いて免疫染色を行った際に、抗体が他のタンパク質を誤認識し、非特異的に反応していなかったかを確認するためでもある。骨膜において、今度は FBXW2 とエラスチンとの 2 重免疫染色を行った結果、培養液のアスコルビン酸添加条件では 2 つのタンパク質は発現している部位はほぼ同じだが、強拡大で観察すると少しだけズレていることがわかった。培養条件をアスコルビン酸無添加にすると、FBXW2 はエラスチンからさらに離れていくことが明らかになった。FBXW2 とエラスチンの発現部位はまったく同じではないことから FBXW2 抗体はエラスチンを誤認識していないと結論付けた。次に、FBXW2 抗体がフィブリリン 1 を誤認識する可能性を考え、肉眼で見える程度の大きさの、弾性線維を含むことがわかっている血管の連続切片を用いて、FBXW2 およびフィブリリン 1 の免疫染色を行った。当初の予想では、フィブリリン 1 も FBXW2 やエラスチン同様、内弾性板および外弾性板に発現していると考えられたのだが、本研究結果では、フィブリリン 1 は内弾性板の内側および外弾性板の外側で強く発現し、FBXW2 やエラスチンの発現部位から大きく外れていることがわかった。従来から知られている構成成分であるフィブリリン 1 よりも FBXW2 のほうがエラスチンに近い部位に存在することが明らかになった。弾性線維を構成する主なタンパク質は不溶性であるため、免疫沈降およびウエスタンブロットングでは検出は困難であるが、FBXW2 が弾性線維に含まれている事実を発見したことで予定を変更し、FBXW2 と他の弾性線維構成成分との関連を免疫染色によって調べた。siRNA を用いた遺伝子ノックダウンの研究については、培養開始前から骨膜や血管に存在している弾性線維内のタンパク質をノックダウンするのは不可能であり、FBXW2 の遺伝子ノックダウンを中止した。

(2) 骨膜由来細胞における FBXL14 の役割：

骨膜由来細胞の培養条件をアスコルビン酸添加および無添加の 2 条件に分けて、得られた細胞の構造および FBXL14 の発現を観察した。アスコルビン酸添加条件では FBXL14 が骨膜の内部で厚みのある層状の構造物をつくり、骨膜由来細胞を支持していたのに対して、無添加条件では FBXL14 の発現が弱く、骨膜由来細胞も多層構造を形成できなかった。この結果から細胞自らが合成した天然のスカフォールドとなり得るタンパク質は FBXL14 であることが示唆された。

(3) プロテオーム解析：

10 年以上前に骨膜由来細胞の培養上清を用いて Electrospray ionization quadrupole time-of-flight (ESI-Q-TOF) MS/MS analysis による質量分析を行い、骨膜に関連のあるタンパク質を同定したことがあるが、本研究課題では、その手法をさらに発展させ、ウシ血管の explant culture を行い、得られた培養上清に含まれた血管由来のタンパク質を nanoLC-MS/MS 法にて同定した。その結果、タンパク質同定数は 1427 であり、表 1 で示したように同定したタンパク質名および検出したスペクトルの強度が明らかになった。今回の結果は、血管由来培養上清のみの結果であり、血管に特異的なタンパク質の解析のためには、今後、他の組織との比較を行う必要がある。以前行った骨膜の質量分析では、タンパク質の部分的なアミノ酸配列まで検出できたが、定性が可能なタンパク質の数が少なかったため、再度 nanoLC-MS/MS 法にて骨膜由来細胞の培養上清を用いて解析を行い、血管の場合との比較を行う必要がある。

表 1 血管由来培養上清のプロテオーム解析結果（一部抜粋）

Intensity_No1_245無	Protein.IDs	Protein.names	Genes	First.Protein.Description
23.35110664	IPI:CON_00729194	A2MG_BOVIN	A2M	Alpha-2-macroglobulin
13.23263931	F1MH24	AAK1_BOVIN	AAK1	AP2-associated protein kinase 1
14.24480247	Q32PA8	AAMDC_BOVIN	AAMDC	Mth938 domain-containing protein
13.59062195	Q3S273	ABHDB_BOVIN	ABHD11	Protein ABHD11
14.95581341	Q08DW9	ABD12_BOVIN	ABHD12	Lysophosphatidylserine lipase ABHD12
17.56195259	A7YY28	ABHEB_BOVIN	ABHD14B	Putative protein-lysine deacylase ABHD14B
13.92372704	Q2HJ19	AB17A_BOVIN	ABHD17A	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 17A
12.72300339	Q5EA59	ABHD4_BOVIN	ABHD4	(Lyso)-N-acylphosphatidylethanolamine lipase
13.52825832	A6QNS3	ABR_BOVIN	ABR	Active breakpoint cluster region-related protein
15.0451498	Q3ZBN0	ABRAL_BOVIN	ABRACL	Costars family protein ABRACL
16.35943985	Q3TOR7	THIM_BOVIN	ACAA2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial
14.19200802	Q0NXR6	ACAD8_BOVIN	ACAD8	Isobutyryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
15.61733246	Q3SZB4	ACADM_BOVIN	ACADM	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
15.14782143	Q3ZBF6	ACADS_BOVIN	ACADS	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
16.29560661	P48818	ACADV_BOVIN	ACADVL	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial

<引用文献>

Akiyama, M.; Nonomura, H.; Kamil, S.H.; Ignatz, R.A. Periosteal cell pellet culture system: a new technique for bone engineering. *Cell Transplant* 15, 2006, 521-532.

Akiyama, M. Identification of UACA, EXOSC9, and TMX2 in bovine cells by mass spectrometry and immunohistochemistry. *Anal Bioanal Chem* 406, 2014, 5805-5813.

Akiyama, M. Characterization of the F-box Proteins FBXW2 and FBXL14 in the Initiation of Bone Regeneration in Transplants given to Nude Mice. *Open Biomed Eng J* 12, 2018, 75-89.

Akiyama, M. FBXW2 localizes with osteocalcin in bovine periosteum on culture dishes as visualized by double immunostaining. *Heliyon* 4, 2018, e00782.

Akiyama, M.; Nakamura, M. Bone regeneration and neovascularization processes in a pellet culture system for periosteal cells. *Cell Transplant* 18, 2009, 443-452.

Akiyama, M. Elastic Fibers and F-Box and WD-40 Domain-Containing Protein 2 in Bovine Periosteum and Blood Vessels. *Biomimetics (Basel)*, 8, 2022,7.

Akiyama, M. Roles of Two F-Box Proteins: FBXL14 in the Periosteum and FBXW2 at Elastic Fibers. *Osteology*. 3, 2023, 1-10.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akiyama M	4. 巻 8
2. 論文標題 Elastic Fibers and F-Box and WD-40 Domain-Containing Protein 2 in Bovine Periosteum and Blood Vessels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomimetics	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomimetics8010007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama M	4. 巻 3
2. 論文標題 Roles of Two F-Box Proteins: FBXL14 in the Periosteum and FBXW2 at Elastic Fibers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Osteology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/osteology3010001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama Mari	4. 巻 14
2. 論文標題 Role of FBXW2 in explant cultures of bovine periosteum-derived cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-021-05825-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akiyama M
2. 発表標題 Elastic fibers in bovine periosteum
3. 学会等名 International Dental Materials Congress 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山 真理
2. 発表標題 質量分析と骨再生メカニズム・骨膜におけるF-boxタンパク質の役割
3. 学会等名 第48回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋山 真理
2. 発表標題 ウシ血管の中のエラスチン, フィブリリン 1および F-box タンパク質 FBXW2 の比較
3. 学会等名 令和5年度日本歯科理工学会近畿・中四国地方会セミナー
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関