

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16930

研究課題名（和文）Fam20CとDmp1/Dspp過剰発現マウスを用いた硬組織のリン酸化の役割解明

研究課題名（英文）Analysis of the role of Fam20C-mediated phosphorylation in mineralized tissues using Fam20C and Dmp1/Dspp overexpression mice

研究代表者

廣瀬 勝俊（Hirose, Katsutoshi）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：00824898

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：生体硬組織の石灰化は、骨では骨芽細胞が、歯の象牙質では象牙芽細胞が産生する基質蛋白質を核として起こる。特に、硬組織に豊富に存在する酸性リン蛋白質のリン酸化が、石灰化制御に重要であると考えられている。近年、Fam20Cが酸性リン蛋白質のリン酸化を担っていることが報告され、全身の中でも特に硬組織に高発現することから、そのリン酸化は硬組織形成に重要であることが示唆される。本研究では、骨芽細胞/象牙芽細胞特異的Fam20C過剰発現マウスと酸性リン蛋白質過剰発現マウスの解析を行い、Fam20Cによる酸性リン蛋白質のリン酸化は硬組織形成の調整に関与することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体硬組織に特異的かつ豊富に存在する酸性リン蛋白質のリン酸化は、硬組織形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。「リン酸化のコントロール」は、骨折治療、直接歯髄覆髄法での新規硬組織誘導、象牙質知覚過敏症、初期う蝕の再石灰化療法などの新規治療ターゲットと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Family with sequence similarity 20, member C (FAM20C) is highly expressed in mineralized tissues, and phosphorylates an acidic phosphoproteins. Dentin matrix protein 1 (DMP1) is one of the chief acidic phosphoproteins in bone and dentin, and plays an important role for biomineralization. These findings suggest the role of FAM20C-mediated phosphorylation in their homeostasis. However, the role of FAM20C-mediated phosphorylation in bone tissues and tooth dentin remains unclear. Here, we investigated the role of FAM20C-mediated phosphorylation in mineralized tissue formation using osteoblast/odontoblast-specific Fam20C overexpression mice and osteoblast/odontoblast-specific Dmp1 overexpression mice. This study revealed that FAM20C-mediated phosphorylation is involved in mineralized tissue formation.

研究分野：骨

キーワード：骨 象牙質 酸性リン蛋白質 Fam20C Dmp1 Dspp トランスジェニックマウス リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体硬組織の石灰化は、骨では骨芽細胞が、歯の象牙質では象牙芽細胞が産生する基質蛋白質を核として起こる。特に、硬組織に豊富に存在する酸性リン蛋白質のリン酸化が、石灰化制御に重要であると *in vitro* 実験では考えられている。

Family with sequence similarity 20 member C (Fam20C)は、骨や歯に高発現しており、分泌蛋白質のリン酸化を担うゴルジ体キナーゼである¹⁾。Fam20Cは、酸性リン蛋白質である Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLINGs) ファミリーのリン酸化も担っている^{2,3)}。SIBLINGs ファミリーは硬組織の主要な細胞外基質蛋白質であり、1つの祖先遺伝子から遺伝子重複により進化した遺伝子群で dentin matrix protein 1 (Dmp1)や dentin sialophosphoprotein (DSPP)などが含まれる⁴⁾。両者ともに高度に翻訳後リン酸化修飾されており、Dmp1は骨内で最も豊富な酸性リン蛋白質であり、DSPPは象牙質内の酸性リン蛋白質の大部分を占める⁴⁾。Dmp1とDSPPはよく似た構造をもち、分泌過程でリン酸化されるとともに、N末端断片とC末端断片に切断される。どちらもN末端側(DSPPではdentin sialoprotein: DSP)に糖鎖が、C末端側(DSPPではdentin phosphoprotein: DPP)にはリン酸基が多く、特に負に荷電したC末端がCaイオンを補足しながら石灰化を調節していると考えられている。

我々はこれまでに、骨芽細胞/象牙芽細胞がFam20Cを過剰発現するマウス(Fam20C-Tg)を作製し、その解析から、骨基質蛋白質全体のリン酸化は、石灰化亢進を介した骨形成を促進することを明らかとした⁵⁾。しかし、硬組織に豊富に存在する酸性リン蛋白質に限局すると、そのリン酸化される意義は未だ不明である。

2. 研究の目的

リン酸化酵素を過剰発現するFam20C-Tgと、そのリン酸化基質である酸性リン蛋白質を過剰発現するマウスとを交配させて、硬組織における酸性リン蛋白質のリン酸化の役割を *in vivo* 実験により明らかとしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

2.3kb型プロモーターを用いて作製した骨芽細胞/象牙芽細胞特異的にFam20Cが過剰発現するマウス(Fam20C-Tg)⁵⁾と、2.3kb型プロモーターを用いて作製した骨芽細胞/象牙芽細胞特異的にDmp1が過剰発現するマウス(Dmp1-Tg)における骨及び歯について解析を行う。次に両マウスを交配させてFam20C-Tg;Dmp1-Tgを作製し、骨及び歯について解析を行う。骨や歯は、剖出後に10%パラホルムアルデヒドにて固定し、EDTA脱灰した後にパラフィン包埋し、組織学的解析に用いた。

4. 研究成果

(1) Fam20C-Tgの解析結果

Fam20C-Tgマウスでは、野生型マウスと比較して、体格の変化や体重の変化は認められなかった^{5,6)}。網羅的リン酸化蛋白質解析の結果、Fam20C-Tgマウスの大腿骨および象牙質では、野生型マウスのものと比較して、酸性リン蛋白質が高度にリン酸化されていることが明らかとなった^{5,6)}。Fam20C-Tgマウスの骨の解析から、骨の細胞外基質のリン酸化は、骨組織の石灰化亢進、破骨細胞性骨吸収の促進、骨芽細胞分化の調整に関与することが明らかとなった⁵⁾。Fam20C-Tgマウスの歯の解析から、象牙質の細胞外基質のリン酸化は、歯冠象牙質の石灰化亢進、歯根象牙芽細胞の分化の調整にも関与することが明らかとなった⁶⁾。

(2) Dmp1-Tgマウスの解析結果

Dmp1-Tgマウスは、野生型マウスと比較して、4週齢と12週齢において顕著な体格の変化や体重の変化は認められなかった。X線解析では、野生型マウスとFam20C-Tgマウスと比較して、Dmp1-Tgマウスの全身骨格に著変は認められなかった。

Dmp1のN末端に対する抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果、野生型マウスでは主に骨細胞内に陽性像が認められるのに対して、Fam20C-Tgマウスでは骨芽細胞内と骨基質内に強陽性像が認められた(図1)。また、Dmp1のC末端に対する抗体を用いた免疫組織化学的染色の結果、野生型マウスでは骨細胞の突起に陽性像が認められるのに対して、Fam20C-Tgマウスでは骨芽細胞と骨基質内にも強陽性像が認められた(図1)。

以上より、Dmp1-Tgでは骨芽細胞/骨細胞にDmp1が過剰発現していることが示された。

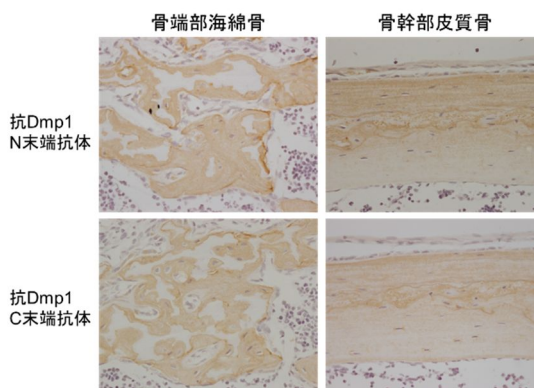


図1. Dmp1-Tgマウス大腿骨の免疫組織化学的染色

(3) Fam20C-Tg;Dmp1-Tg マウスの解析

Fam20C-Tg;Dmp1-Tg マウスでは、Fam20C-Tg マウス及び Dmp1-Tg マウスと比較して、体格が小さく(図2A)、体重も軽量であった(図2B)。X線解析では、多発骨折、脊椎湾曲などの表現型が認められた(図2A)。

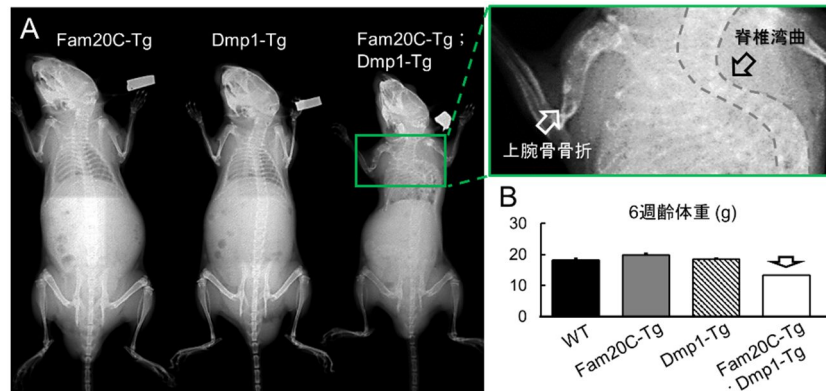


図2. (A)X線解析、(B)体重:Fam20C-Tgマウス、Dmp1-Tgマウスでは全身骨格に大きな変化がみられない。Fam20C-Tg;Dmp1-Tgマウスでは、体格が小さく、多発骨折、脊椎湾曲がみられる。緑枠は拡大を示す。白矢印は上顎骨折、黒矢印は脊椎湾曲を示す。

組織学的解析の結果、Fam20C-Tg;Dmp1-Tg マウスの皮質骨は菲薄化し、多発骨折が認められた(図3)。この表現型には、急速な骨の石灰化による成長障害や、骨芽細胞分化異常、破骨細胞性骨吸収の促進などが影響しているものと推測された。今後、この表現型の詳細な解析を進めていく予定である。

本研究により、生体硬組織に特異的かつ豊富に存在する酸性リン蛋白質のリン酸化は、硬組織形成に関与することが明らかとなった。「リン酸化のコントロール」は、骨折治療、直接歯髄覆髄法での新規硬組織誘導、象牙質知覚過敏症、初期う蝕の再石灰化療法などの新規治療ターゲットとなると考えられる。

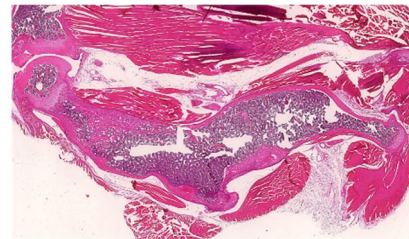


図3. Fam20C-Tg;Dmp1-Tgマウス上腕骨のHE組織像。

<引用文献>

- Ishikawa HO, Takeuchi H, Haltiwanger RS, Irvine KD. Four-jointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science*. 2008;321:401-404. PMID:18635802.
- Oya K, Ishida K, Nishida T, et al. Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1 (Dmp1) phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of biomineralization. *Histochem Cell Biol*. 2017;147:341-351. PMID:27614627.
- Ishikawa HO, Xu A, Ogura E, et al. The Raine syndrome protein FAM20C is a Golgi kinase that phosphorylates bio-mineralization proteins. *PLoS One*. 2012;7:e42988. PMID:22900076.
- Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*. 2012;57:1165-1175. PMID:22534175.
- Hirose K, Ishimoto T, Usami Y, et al. Overexpression of Fam20C in osteoblast in vivo leads to increased cortical bone formation and osteoclastic bone resorption. *Bone*. 2020;138:115414. PMID:32416287.
- Naniwa K, Hirose K, Usami Y, et al. Fam20C overexpression in odontoblasts regulates dentin formation and odontoblast differentiation. *J Mol Histol*. 2023;54:329-347. PMID:37357253.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 廣瀬勝俊, 豊澤悟	4. 巻 65
2. 論文標題 分泌型キナーゼFam20Cによるリン酸化を介した骨形成制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 大阪大学歯学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Naniwa Kohei, Hirose Katsutoshi, Usami Yu, Hata Kenji, Araki Rikita, Uzawa Narikazu, Komori Toshihisa, Toyosawa Satoru	4. 巻 54
2. 論文標題 Fam20C overexpression in odontoblasts regulates dentin formation and odontoblast differentiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Histology	6. 最初と最後の頁 329 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10735-023-10123-y	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浪花耕平、廣瀬勝俊、宇佐美悠、小守壽文、豊澤悟、青田桂子
2. 発表標題 象牙質形成におけるFam20Cによるリン酸化の役割について
3. 学会等名 第58回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katsutoshi Hirose, Kohei Naniwa, Miho Hyodo, Yu Usami, Makoto Abe, Kenji Hata, Toshihiro Inubushi, Satoru Toyosawa
2. 発表標題 Osteocytic constitutive activation of G s activity exerts an anabolic effect on the bone.
3. 学会等名 ASBMR 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣瀬勝俊
2. 発表標題 分泌型キナーゼFam20Cによるリン酸化を介した骨形成制御
3. 学会等名 大阪大学歯学会 第67回総会 第130回 例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Naniwa, Katsutoshi Hirose, Yu Usami, Toshihisa Komori, Satoru Toyosawa
2. 発表標題 Fam20C overexpression in odontoblasts regulates dentin mineralization and odontoblast differentiation
3. 学会等名 ASBMR 2021 Annual Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣瀬勝俊, 浪花耕平, 宇佐美悠, 阿部真土, 豊澤悟
2. 発表標題 骨細胞における Gs の構成的活性化による骨格形成への影響
3. 学会等名 第39回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浪花耕平, 廣瀬勝俊, 宇佐美悠, 小守壽文, 豊澤悟
2. 発表標題 Fam20C の過剰発現は、歯冠象牙質の石灰化を促進し、歯根形成において象牙芽細胞の 骨芽細胞への形質転換を誘導する
3. 学会等名 第39回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------