

論文内容要旨

骨の石灰化機構における MEPE 由来リン酸化 ASARM の役割

主指導教員：香西 克之教授

(統合健康科学部門 小児歯科学)

副指導教員：吉子 裕二教授

(基礎生命科学部門 硬組織代謝生物学)

副指導教員：光畑 智恵子准教授

(統合健康科学部門 小児歯科学)

櫻井 薫

(医歯薬保健学研究科 博士課程医歯薬学専攻)

論文内容要旨

研究題目

骨の石灰化機構における MEPE 由来リン酸化 ASARM の役割

学位申請者 櫻井 薫

硬組織の非コラーゲン性基質タンパク、SIBLING (Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins) ファミリーメンバーである MEPE (Matrix extracellular phosphoglycoprotein) は腫瘍性骨軟化症の腫瘍組織から同定された。ASARM (Acidic serine aspartate-rich motif) は SIBLING ファミリーに共通するモチーフで、とりわけ MEPE-ASARM については、プロセッシングの過程で遊離し、ヒドロキシアパタイト結晶の成長阻害やリン利尿の促進など、生理活性ペプチドとしての機能が論じられている。

一方、骨芽細胞や象牙芽細胞に局在する PHEX (Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) は、X連鎖性低リン血症性くる病の原因因子として同定された。PHEX はエンドペプチダーゼ活性を有する膜タンパクで、その機能欠損は低リン血症や石灰化不全を引き起こす。したがって、PHEX は未知のリン利尿因子を分解してリン代謝、骨・象牙質石灰化を正常に維持すると考えられている。最近、ASARM が PHEX の基質となる可能性が示唆され、石灰化やリン代謝と ASARM の関係がクローズアップされている。そこで、本研究は、骨代謝における MEPE 由来 ASARM ペプチドの役割を明らかにするため、以下の実験を行った。

ラット胎仔頭頂骨由来細胞 (RC 細胞) を用いた *in vitro* 骨形成モデルにおいて、19 残基からなるヒト ASARM は細胞増殖・骨芽細胞分化に影響することなく、基質石灰化のみ抑制した。ASARM 配列中 5 箇所の Ser はリン酸化される可能性があり、そのうち Ser-Ser-Ser-Glu-Ser で示される配列の 1、3、5 番目のホスホセリンの少なくとも 2 カ所が活性に必須であった。3 カ所のホスホセリンを持つ ASARM (pASARM) から上記配列の N 末端側アミノ酸を除去すると、石灰化抑制作用は消失した。pASARM はマウス血清中において長時間活性

を維持したが、PHEX 存在下で少なくとも一部の活性消失を認めた。そこで、この反応産物を TOF-MS で解析したところ、pASARM の上記活性ドメインを含む領域の切断が確認された。また、RC 細胞に線維芽細胞増殖因子 23 を添加して *Phex* の発現を低下させると、pASARM の蓄積が確認された。pASARM のみを認識するポリクローナル抗体を作製し、PHEX が低値を示すマウスの大腿骨を免疫染色したところ、骨芽細胞、骨細胞および骨基質において pASARM の著しい蓄積が認められた。一方、マウスマクロファージ細胞株 RAW-D あるいはマウス骨髄細胞を用いた破骨細胞形成モデルにおいては、pASARM の有意な影響は見られなかった。

次に、pASARM の骨代謝への影響を調べるため、6 週齢の C57BL/6J 雄性マウスに浸透圧ポンプを用いて pASARM を 2 週間腹腔内投与した。あわせて、カルセイン投与による石灰化標識を行った。脛骨のマイクロ CT 解析によると、pASARM 投与マウスは皮質骨、海綿骨とも骨量、骨面積等の石灰化パラメーターが低下した。これと一致して、同マウスでは、カルセインで標識される骨表面長が減少した。大腿骨組織切片のビラヌエバ染色およびエネルギー分散型 X 線分析によると、pASARM 投与マウスの皮質骨および海綿骨表層において低石灰化領域が増加した。一方、同マウスの血中および尿中のカルシウムおよびリン値に変動はなく、腎臓のリン再吸収に関わるトランスポーター、ビタミン D 水酸化酵素の遺伝子発現レベルも正常であった。非脱灰脛骨切片の骨形態計測における破骨細胞数、骨芽細胞数等に変化は認められず、血中の骨形成、骨吸収マーカーも正常であった。

以上の結果から、MEPE 由来 pASARM は PHEX とともに内在性の石灰化抑制因子として機能することが推察された。また、pASARM は血中カルシウムやリン濃度に影響しないことから、くる病・骨軟化症などの低石灰化病態に直接関与する可能性が示唆された。