

審 査 報 告 書

令和 5 年 2 月 5 日

薬学研究科長

福 島 昭 二 殿

論文審査委員会

主査 教 授 岡本 正志

副査 教 授 糟谷 史代

副査 教 授 中川 公恵

副査 准教授 辻本 貴江



本学学位規則第8条の規定により論文審査の結果の要旨および学位の授与に関

し下記のとおり報告致します。

記

論文題目	骨形成におけるビタミン K 変換酵素 UBIAD1 の機能解明
氏 名	平島 俊亮

論文審査の結果の要旨

本論文は、脂溶性ビタミンの一つであるビタミン K を生体内でビタミン K₂ (メナキノン-4: MK-4) に変換する酵素である UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1) および MK-4 の骨形成における生理的機能を解析したものである。ビタミン K は、1,4-ナフトキノン構造を基本骨格として、側鎖構造の違いにより同族体に分類され、ヒトは、緑色野菜に含まれフィチル側鎖を有するビタミン K₁ (フィロキノン: PK) や、発酵食品に含まれ長鎖のイソプレノイド側鎖を有するメナキノン類 (MK-n, n=6~14) を主として摂取している。この他、肉類や卵にはゲラニルゲラニル側鎖を有する MK-4 が含まれているが、PK や MK-n から比べるとその量は非常に少ない。しかし、ヒトを含め哺乳動物の組織内には、摂取量の少ない MK-4 が最も多く含まれている。これは、摂取した PK や MK-n が組織内で MK-4 に変換されているからであり、その変換を担う酵素が UBIAD1 である。UBIAD1 は、MK-4 を変換生成する唯一の酵素であり、その欠損により体内の MK-4 濃度は著しく低下する。全身で UBIAD1 が欠損したマウスでは、胎生致死となり、出生成熟後に欠損を誘導したマウスにおいても欠損誘導後 1~1.5 ヶ月で致死になることが明らかにされている。つまり、UBIAD1 および組織内で MK-4 を生合成することは、生存維持に必須であると考えられる。UBIAD1 は全身の組織に発現しているが、各組織に UBIAD1 が存在し、MK-4 が生合成されていることに関して、組織ごとにおける UBIAD1 や MK-4 の生理機能は明らかではない。骨に関しては、ビタミン K は骨形成を促進する作用を有しており、MK-4 は骨粗鬆症治療薬として臨床応用されているが、UBIAD1 が骨形成にどのように関与しているのかは不明である。

学位申請者は、骨形成における UBIAD1 の機能を解明し、ビタミン K の生体内変換が担う生理的意義を明らかにすることで、骨粗鬆症をはじめとする骨疾患に対する新たな治療・予防戦略が構築できると考え、第 1 章と第 2 章の研究を展開している。

第 1 章では、申請者は最も成長が著しい時期である幼若期の骨形成に着目し、この時期で特異的に UBIAD1 欠損を誘導し、骨形成における UBIAD1 欠損の影響を解析した。解析には Tamoxifen 投与依存的に UBIAD 欠損を誘導できるマウス (CKO マウス) を用いている。生後 1 週齢の CKO マウスに Tamoxifen を投与して UBIAD1 欠損を誘導し、4 週齢における成長状態や骨形成状態の評価を行った。その結果、対照群である Control マウスおよび Tamoxifen を投与していない CKO マウスに比べ、Tamoxifen 投与により UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスでは、体長や体重が小さく、成長不良となることがわかった。UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスの大腿骨では、MK-4 濃度は対照群に比べ有意に減少しており、骨形態においては、骨長が短く、海綿骨・皮質骨・骨全体の骨密度低下が認められている。このことから、UBIAD1 欠損が骨形成の低下を引き起こすことが明らかとなった。申請者は、この骨形成の低下が何に起因するのかを明らかにするため、骨組織標本作製し評価を行った。その結果、大腿骨骨端部の軟骨層において、増殖軟骨層と肥大軟骨層が圧縮されており、特に肥大軟骨層が薄く細胞が小さいことを見出した。そこで、骨端軟骨における軟骨形成因子の mRNA 発現量を解析した結果、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスでは、軟骨形成・分化に必須の因子である Sox9, Aggrecan, Collagen type2 (Col2a1), Collagen type10 (Col10a1) の mRNA 発現

量が有意に低値であることがわかった。UBIAD1 欠損が骨において特に軟骨形成に影響していることが示唆されたことから、申請者は細胞レベルでの解析を行うため、CKO マウスより初代培養軟骨細胞を単離培養し、軟骨細胞の増殖能および分化能に対する UBIAD1 欠損の影響を解析した。CKO マウス由来初代培養軟骨細胞に 4-OH-Tamoxifen を添加することで UBIAD1 欠損を誘導した結果、細胞の増殖能および分化能は有意に低下し、軟骨細胞分化因子である Col2a1 および Col10a1 の mRNA 発現量の有意な低下が認められた。

以上より、申請者は UBIAD1 が骨形成に必須の因子であり、特に軟骨形成に重要な役割を担っていることをマウス個体レベルおよび細胞レベルで明らかにし、UBIAD1 が骨形成に重要な役割を担っていることを見出している。

第2章では、申請者は軟骨細胞の増殖および分化に対する UBIAD1 の影響および UBIAD1 により変換生成する MK-4 の影響について、軟骨前駆細胞株である ATDC5 細胞を用いて細胞レベルで検討をしている。第1章では、UBIAD1 欠損により生じた軟骨形成不全が、UBIAD1 欠損そのものの影響によるのか、変換生成する MK-4 量が減少したことによるのかは明らかにできていない。そこで第2章では、ATDC5 細胞に UBIAD1 に対する siRNA を導入することで UBIAD1 発現をノックダウンし、UBIAD1 発現低下による軟骨細胞への影響を評価し、その細胞に対して MK-4 を処理することで、MK-4 の作用について解析している。また、UBIAD1 発現をノックダウンした ATDC5 細胞に、ヒト UBIAD1 発現プラスミドを導入して UBIAD1 を強制発現させることで、軟骨細胞機能に対する UBIAD1 の寄与について解析をしている。その結果、UBIAD1 発現をノックダウンした ATDC5 細胞では、第1章で認められた UBIAD1 欠損マウス由来初代培養軟骨細胞と同様に、増殖能および分化能の有意な低下が認められた。しかし、MK-4 を処理した場合においては、UBIAD1 ノックダウンの有無にかかわらず、MK-4 により増殖能と分化能が有意に低下する結果となった。このことについて申請者は、MK-4 が軟骨細胞に対し、増殖や分化を抑制する方向に制御調節している可能性があるのではないかと考察している。一方、UBIAD1 ノックダウン ATDC5 細胞に、ヒト UBIAD1 発現プラスミドを導入し、UBIAD1 発現を増加させた場合においては、増殖能および分化能が有意に亢進する結果となった。これらの結果から申請者は、軟骨細胞の増殖や分化に対して、UBIAD1 は促進する方向に働き、逆に UBIAD1 により変換生成される MK-4 は、軟骨細胞が過剰に増殖・分化することを防ぐように抑制的に働いていると推察している。これまで、軟骨細胞や軟骨形成における UBIAD1 や MK-4 の役割は全く解析されていなかったが、申請者の研究により、初めて UBIAD1 および MK-4 が軟骨細胞の増殖や分化を調節する重要な役割を担うことが明らかとなった。

以上より、申請者が明らかにしたこれらの研究成果は、加齢に伴い進行する骨粗鬆症や変形性関節症などの骨疾患の予防や治療に対して、UBIAD1 およびビタミン K が有用かつ重要であることを立証する科学的エビデンスの一つとなっており、将来の骨疾患予防・治療に大いに貢献できるものであると評価される。

したがって、本論文は骨形成におけるビタミン K 変換酵素およびビタミン K の重要性について、新たな知見を与えるものであり、審査委員会は申請者を博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものと認める。