

神戸学院大学大学院 薬学研究科 学位論文

骨形成におけるビタミン K 変換酵素 UBIAD1 の機能解明

2024 年 3 月

平島 俊亮

目 次

略語表

緒 論	1
本 論	6
第1章 遺伝子欠損マウスを用いた UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1) の骨における機能解析	6
第1節 Tamoxifen 誘導型全身性欠損マウスの作製	8
第2節 骨組織における UBIAD1 欠損の影響評価	12
第1項 体重、大腿骨形態、大腿骨長	12
第2項 大腿骨中 menaquinone-4 (MK-4) 濃度	15
第3項 大腿骨の μ CT 解析	20
第4項 大腿骨組織標本を用いた組織構造評価	
(1) Hematoxylin-Eosin (HE) 染色	23
(2) Safranin O 染色	25
第5項 軟骨組織における軟骨分化因子の mRNA 発現量	27
第3節 Tamoxifen 誘導型全身性 UBIAD1 欠損マウス由来初代軟骨細胞を用いた解析	32
第1項 増殖能	32
第2項 軟骨分化因子の mRNA 発現量	36
第4節 考 察	40
第5節 小 括	43
第2章 マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いた UBIAD1 の機能解析	44
第1節 siRNA による UBIAD1 ノックダウンの影響	45
第1項 増殖能	45
第2項 分化能	49
第3項 軟骨分化因子の mRNA 発現量	51
第2節 MK-4 処理による影響	53
第1項 増殖能	53
第2項 分化能	56
第3節 UBIAD1 発現プラスミド導入の影響	58
第1項 UBIAD1 発現量および MK-4 合成活性	58
第2項 増殖能	63
第3項 分化能	65
第4項 軟骨分化因子の mRNA 発現量	68
第4節 考 察	71
第5節 小 括	73

目 次

結 論.....	74
謝 辞.....	76
文 献.....	77

略語表

ALP	: alkaline phosphatase
APCI	: atmospheric pressure chemical ionization
Ampicillin ^r	: ampicillin resistance gene
BCA	: bicinchonic acid
BMD	: bone mineral density
bp	: base pair (s)
BSA	: bovine serum albumin
Ca	: calcium
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
cKO	: conditional knockout
CMV	: cytomegalo virus
Col2a1	: collagen type IIa1
Col10a1	: collagen type Xa1
CoQ	: coenzyme Q, ubiquinone
COQ2	: coenzyme Q2 homolog, prenyltransferase (yeast)
CoQ10	: coenzyme Q10
COX-2	: cyclooxygenase 2
CRISPR	: clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Ct	: threshold cycle
dATP	: deoxyadenosine triphosphate
dCTP	: deoxycytidine triphosphate
dGTP	: deoxyguanosine triphosphate
dNTP	: deoxynucleoside triphosphate
dTTP	: deoxythymidine triphosphate
DEPC	: diethyl pyrocarbonate
DNA	: deoxyribonucleic acid
DNase	: deoxyribonuclease
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
ER	: endoplasmic reticulum
ERAD	: ER-associated degradation
FBS	: fetal bovine serum
FOV	: field of view
FPP	: farnesyl pyrophosphate
FSP-1	: ferroptosis suppressor protein 1
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GGCX	: γ -glutamyl carboxylase

略語表

GGPP	: geranylgeranyl pyrophosphate
Gla	: γ -carboxyglutamic acid
Glu	: glutamic acid
GPP	: geranyl pyrophosphate
GDF15	: growth differentiation factor 15
HE	: hematoxylin-eosin
HMG-CoA	: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
HMGCR	: HMG-CoA reductase
HPLC	: high-performance liquid chromatography
IPP	: isopentenyl pyrophosphate
kVp	: kilovolt peak
LC-APCI-MS/MS	: HPLC-tandem mass-mass spectrometry with APCI
LDL	: low density lipoprotein
L-DMEM	: Dulbecco's modified Eagle medium (low glucose : 1.0 g/L glucose)
loxP	: locus of X-overP1
MATN2	: matrilin 2
MCT	: Medium Chain Triglyceride
MD	: menadione
MD-d ₈	: ² H(D)-labeled menadione
MEM	: minimum essential medium
MenA	: menaquinone A
Mg	: magnesium
MGP	: matrix Gla protein
μ CT	: micro- computed tomography
MK-n	: menaquinone-n
MK-4	: menaquinone-4
MK-4 epoxide	: menaquinone-4 epoxide
MK-4-d ₇	: ² H(D)-labeled menaquinone-4
MK-4-d ₇ epoxide	: ² H(D)-labeled menaquinone-4 epoxide
MK-7	: menaquinone-7
MRM	: multiple reaction monitoring
mRNA	: messenger ribonucleic acid
MS	: mass spectrometry
NAD	: nicotinate adenine dinucleotide
NADH	: nicotinate adenine dinucleotide hydrogen
Neomycin ^r	: neomycin resistance gene
NF κ B	: nuclear factor-kappa B
NPC1L1	: niemann-pick C1 Like 1
¹⁸ O	: heavy oxygen

略語表

OA	: osteoarthritis
OC	: osteocalcin
[¹⁸ O]-K	: ¹⁸ O-labeled vitamin K
[¹⁸ O]-MK-4	: ¹⁸ O-labeled menaquinone-4
OPG	: osteoprotegerin
[¹⁸ O]-PK	: ¹⁸ O-labeled phyloquinone
PBS(−)	: phosphate buffered saline (Ca, Mg-free)
pcDNA 3.1	: pcDNA TM 3.1 vector
pcDNA 3.3-hUBIAD1	: pcDNA TM 3.3-hUBIAD1 vector
pCMV	: CMV promoter
PCR	: polymerase chain reaction
PK	: phyloquinone
PK epoxide	: phyloquinone epoxide
PK-d ₇	: ² H(D)-labeled phyloquinone
PK-d ₇ epoxide	: ² H(D)-labeled phyloquinone epoxide
PKA	: protein kinase A
PS	: penicillin-streptomycin-mixed solution
P _{SV40}	: SV40 early promoter
pUC ori	: pUC origin
PXR	: pregnane and xenobiotic receptor
RANKL	: Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand
RCSE	: Rib Cage Specific Enhancer
RNA	: ribonucleic acid
RNAi	: RNA interference
RPLP2	: ribosomal protein lateral stalk subunit P2
RT-PCR	: reverse transcription-polymerase chain reaction
RXR	: retinoid X receptor
SCD	: Schnyder corneal dystrophy
SDS	: sodium dodecylsulfate
SE	: standard error
Sf9	: <i>Spodoptera frugiperda</i> cells
siRNA	: small interfering RNA
Sox 9	: SRY- box 9
SRY	: sex-determining region Y-type
SRBI	: Scavenger receptor B type I
SRM	: selected reaction monitoring
STC2	: stanniocalcin 2
SV40	: Simian virus40
SXR	: steroid and xenobiotic receptor
SXRE	: SXR responsive element

略語表

TAE	: tris-acetate-EDTA
Tam	: tamoxifen
TBS	: tris-buffered saline
TE	: tris-EDTA
TERE1	: transition epithelial response protein 1
TK pA	: TK polyadenylation signal
Tris	: 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
TSK	: tsukushi
ubiA	: 4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase
UBIAD1	: ubiA prenyltransferase domain containing 1
VKDP	: vitamin K-dependent protein
VKH ₂	: vitamin K hydroquinone
VKOR	: vitamin K epoxide reductase
VKORC1	: VKOR complex subunit 1
VKQR	: vitamin K quinone reductase
XREM	: xenobiotic-responsive enhancer module

緒 論

ビタミン K は、血液凝固や骨形成に重要な役割を担っており、骨粗鬆症治療や予防に臨床応用されている。ビタミン K は 2-methyl-1,4-naphthoquinone を基本骨格として、3 位の側鎖構造の違いにより同族体に分類される¹⁾。天然には、植物由来の phyloquinone (PK) と腸内細菌や発酵食品に由来する menaquinone 類 (MK-n) が存在する²⁾ (図 1)。PK は 3 位に phytyl 側鎖を有するが、MK-n は、側鎖の isoprenyl 基の数 (n) に応じて $n=1\sim 14$ の同族体が存在する³⁾。MK-n のうち、 $n=4$ である MK-4 はビタミン K₂ と呼ばれ、ビタミン K 同族体で最も多岐に渡る生理活性を有することが報告されている⁴⁾。これらビタミン K 同族体のうち、PK と MK-4 は、側鎖の炭素数が同じで、不飽和度のみが異なる。現在わが国では、PK は抗出血薬として、MK-4 は骨粗鬆症治療薬として臨床応用されている。この他、合成品として、2-methyl-1,4-naphthoquinone 骨格のみの構造体であるビタミン K₃[menadione (MD)] がある。ヒトは、日常の食事から緑色野菜などに含まれる植物由来の PK や、発酵食品中に多く含まれる MK-6~8 (納豆は MK-7 が最も多く含まれる) を摂取している。

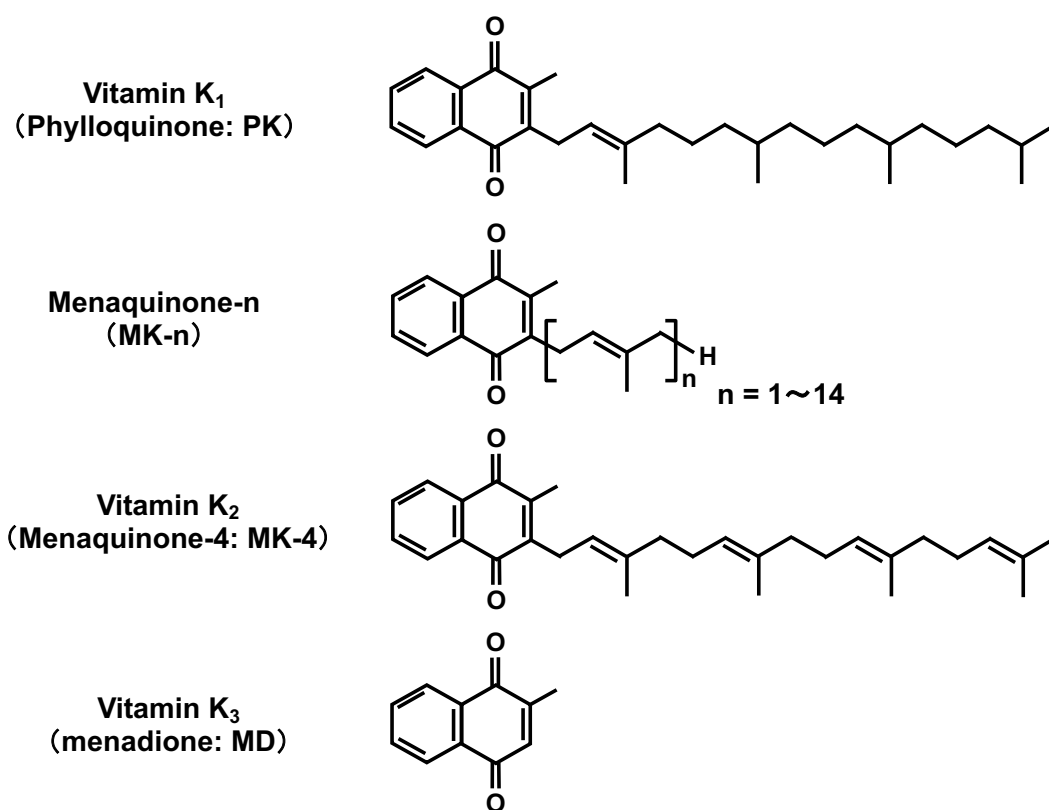


図 1 ビタミン K 同族体の化学構造

標的組織の細胞に移行したビタミン K は、細胞内の小胞体でビタミン K サイクルと呼ばれる酸化還元サイクルにより代謝されると同時に、 γ -glutamyl carboxylase (GGCX) の補因子として働き、ビタミン K 依存性タンパク質 vitamin K-dependent protein (VKDP) の活性化を担う⁶⁾。ビタミン K 依存性タンパク質としては、血液凝固第 II、VII、IX、X 因子やプロテイン C および骨に分布する osteocalcin (OC) や matrix Gla protein (MGP) などがあり、これらのタンパク質は GGCX により、glutamic acid (Glu) 残基が γ -glutamyl carboxyl 化 (Gla 化) され、 γ -carboxyglutamic acid (Gla) を有する活性型となり、血液凝固や骨形成に働く。ビタミン K は、ビタミン K サイクルで、まず vitamin K quinone reductase (VKQR) により quinone 体から還元型である hydroquinone 体に変換される。この hydroquinone 体が GGCX の補因子として働き、自身は、epoxide 体に酸化される。生成した epoxide 体は、vitamin K epoxide reductase (VKOR) によって再び quinone 体に還元され、ビタミン K サイクルを循環する⁶⁾ (図 2)。2022 年に Mishima らは、ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) がワルファリン非依存的に quinone 体から hydroquinone 体への還元反応を担うこと、鉄依存的に細胞膜成分のリン脂質の過酸化によって引き起こされる細胞死フェロトーシスを PK や MK-4 が抑制することを明らかにしている⁷⁾。

近年、ビタミン K サイクルにおける VKDP の Gla 化作用に加え、MK-4 が核内受容体である steroid and xenobiotic receptor (SXR) のリガンドとして遺伝子の発現を制御することが明らかとなった⁸⁻¹⁰⁾。SXR は、リファンピシンやクロトリマゾールをはじめ、様々な薬剤をリガンドとし、retinoid X receptor (RXR) とヘテロ二量体を形成して、標的遺伝子上の SXR responsive element (SXRE) に結合することにより、遺伝子の転写を調節している^{11, 12)}。ヒト骨芽細胞様 MG-63 細胞を用いた研究において、MK-4 は SXR を介して、薬物代謝酵素であるシトクローム P450 (CYP) 3A4、骨基質タンパク質である OC や MGP の他、コラーゲンの蓄積に関与する matrilin 2 (MATN2) や tsukushi (TSK) の発現を誘導することが報告されている^{13, 14)}。この SXR を介した作用は、ビタミン K のうち MK-4 に特異的に認められるものであり、PK は SXR を介した作用を示さない。最近ではさらに、ビタミン K サイクルや SXR を介した作用以外に、MK-4 が protein kinase A (PKA) のリン酸化作用を促進することが報告されている¹⁵⁾。MK-4 は、ヒト骨芽細胞の PKA を活性化し、細胞分化増殖因子である growth differentiation factor 15 (GDF15) およびカルシウム調節因子である stanniocalcin 2 (STC2) の発現を阻害する。このように MK-4 は、GGCX 活性、SXR を介した転写調節、PKA の活性化など様々な作用によって骨芽細胞の分化や骨の石灰化を促進することが明らかとなっている (図 2)。

Suhara らは、MK-4の方が、PK に比べ標的細胞への取り込み速度やビタミン K サイクルにおける代謝変換が速く¹⁶⁾、GGCX に対する補酵素活性も高いと報告している¹⁷⁾。さらに、ビタミン K 同族体の中で、MK-4 が肝がん細胞や白血病細胞に対して、最も強いアポトーシス誘導作用を示すことも報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。しかしながら、現在のところ MK-4 が PK や他のビタミン K 同族体にはない特異的な作用を示す理由については明らかではない。

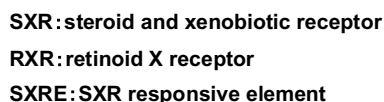


図2 MK-4の細胞内における生理作用

食事から摂取されたビタミン K は、植物成分の消化過程で生成する胆汁酸ミセルに包含された形で、小腸に発現する Scavenger receptor B type I (SRBI) や Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) の輸送蛋白質により吸収され、輸送系を介して標的組織へ移行すると考えられている²¹⁻²⁴⁾。ヒトは食事から主に PK や MK-7 を摂取しており、動物性食品に含まれる MK-4 の摂取量は極めて少ない。また、ラットやマウスの飼育飼料中に含まれるビタミン K は MD であり、その他には PK がわずかに含まれるのみである。しかし、ヒトやマウス、ラットの組織中には MK-4 が高濃度に存在する²⁵⁻²⁷⁾。このようにヒトやマウス、ラットは MK-4 をほとんど摂取していないにもかかわらず、組織中に MK-4 が最も高濃度に存在することから、摂取したビタミン K が MK-4 に変換されている可能性が高いと考えられていた。この MK-4 の合成については、1958 年に Martius らによって²⁸⁾、1998 年に Thijssen、Suttie らによって、PK や K₃ が MK-4 に変換されることが示されてきた^{29,30)}。しかし、この現象の科学

的な証明がなされてこなかった。2008 年に Okano らは、naphthoquinone 環のすべての水素を重水素に変換した重水素標識化 PK (PK-d₇) を合成し、これをマウスに経口、経腸、静脈内および脳室内投与して、大脳中に重水素標識した MK-4 (MK-4-d₇) が検出されるかを検討した。その結果、重水素標識ビタミン K を経口および経腸投与した場合においてのみ、大脳中に MK-4-d₇ が検出され、大脳中に生成した MK-4 が MK-4-d₇ であることを NMR により科学的に証明している²⁵⁾。さらに、培養細胞を用いた検討によって、MK-4 の合成が細胞レベルで起こることも発見し³¹⁾、これらにより、ビタミン K₁ が体内で MK-4 へ変換され、組織に蓄積することが明らかとなった。また、Hirota らはリンパ管、門脈、胆管あるいは静脈にカニューレーションを施したラットを用いた PK-d₇ の吸収実験により、PK-d₇ はリンパ管系を介して優先的に吸収され、小腸で側鎖切断を受けた MD-d₇ となり、これが体循環を経て組織に取り込まれ、組織細胞中のメバロン酸経路由来の geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) を側鎖源として MK-4-d₇ に変換されることが明らかとなった³²⁾。

MK-4 はビタミン K 同族体の中で、最も生理活性が強いことが知られており、長年にわたり MK-4 合成酵素の探索は行われてきたが、その同定には至らなかった。2010 年に Nakagawa らは、ヒトゲノムデータベースからプレニル化ドメインを有するタンパク質のうち、大腸菌でメナキノン類を合成する酵素 Menaquinone A (MenA) のプレニル化ドメインと相同性の高い UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1) に着目した。ヒト骨芽細胞様 MG-63 細胞および昆虫細胞 Sf9 を用いて UBIAD1 に対する RNA 干渉および高発現などにより、MD-d₈ から MK-4-d₇ への変換活性を検討し、変換酵素が UBIAD1 であることを突き止めた。マウスにおいて UBIAD1 はほぼすべての組織で発現しており、その組織内 UBIAD1 のタンパク質および mRNA 発現量、MK-4 濃度および MK-4 合成活性は高い相関性を示し、UBIAD1 が MK-4 合成を担う唯一の酵素であることを明らかにした³³⁾ (図 3)。

ヒト *UBIAD1* 遺伝子は、角膜にコレステロールやリン脂質が異常に蓄積することで視力障害が生じる Schnyder corneal dystrophy (SCD) の原因遺伝子として報告されている^{34, 35)}。2013 年に Wang らは、ヒト膀胱癌由来 T24 細胞において UBIAD1 が時間の経過とともに小胞体 (ER) から Golgi complex へ移動すること、そしてこの移動が UBIAD1 アミノ酸配列の特殊な Golgi 移行シグナル (RPWS motif) によって制御されることを報告している³⁶⁾。Hirota らは、UBIAD1 の SCD に関する点変異体 (D112A および K181A) が Golgi へ移行しないことを報告し³⁷⁾、UBIAD1 の細胞内局在が疾患に関係することを明らかにしている。また、Nickerson や Schumacher は、小胞体膜上で UBIAD1 と HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) が強く結合することで、HMGCR の小胞体関連分解 (Endoplasmic reticulum associated Degradation: ERAD) が抑制され、コレステロール合成量が増加することを報告している^{38, 39)}。しかし、Sever や Elsabrouty らが、MK-4 の側鎖源である非ステロールの GGPP が、HMGCR の ERAD を促進することを報告していたことから^{40, 41)}、Schumacher らは、HMGCR と UBIAD1 との相互結合について、GGPP の関与を評価した。その結果、UBIAD1 が GGPP と結合することで HMGCR から解離し、小胞体膜からゴルジ体に移行することを明らかにしている³⁹⁾。このことは、GGPP が UBIAD1 と HMGCR の結合を

制御し、細胞内コレステロール合成を調整する役割を担っていることを示唆するものといえる。

UBIAD1 の生理機能としては、先に述べたように、MK-4 を生合成することと、HMGCR の分解制御が明らかになっている。しかし、全身の組織に発現する UBIAD1 が各組織で担う役割や生体内で MK-4 が変換生成する意義はまだ十分に解明されていない。Nakagawa らはこれまでに、全身性 UBIAD1 欠損マウスが 7.5 日で胎生致死となること⁴²⁾、膵臓における UBIAD1 欠損では、膵腺房細胞の消失と空洞化による萎縮が起こることを明らかにしている⁴³⁾ (図 3)。これは、UBIAD1 が生命および組織の機能維持に重要な因子であることを示しており、他の組織においても UBIAD1 が重要な役割を担うことを示唆するものである。

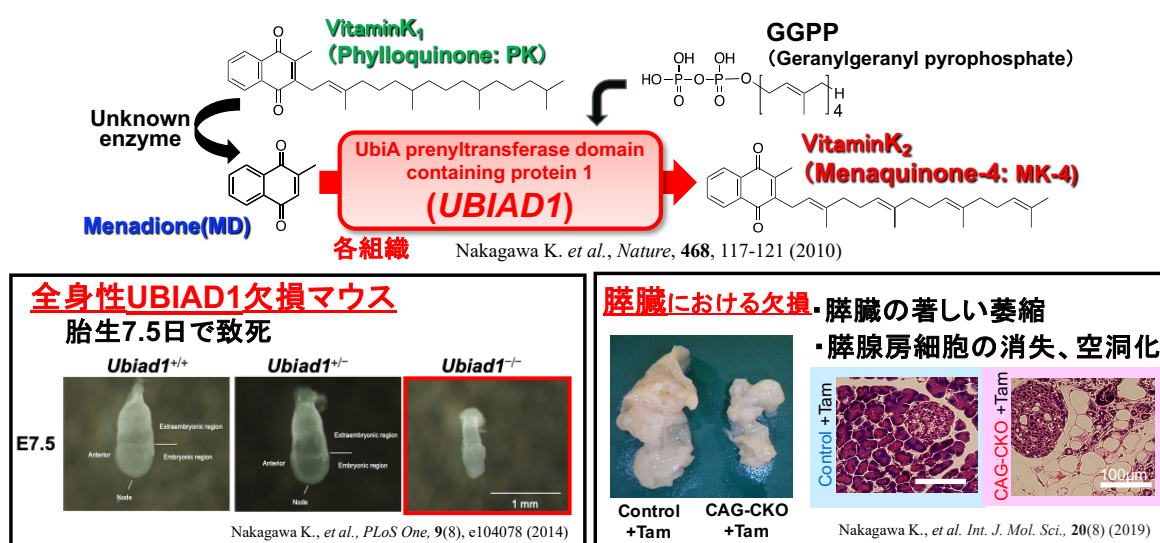


図 3 ビタミン K 変換経路および UBIAD1 欠損マウスの表現型

ビタミン K は、骨粗鬆症治療や予防に臨床応用されているが、最近では、ビタミン K 摂取が軟骨の異常により生じる変形性関節症の発症予防に有効であることが報告され、ビタミン K が骨・軟骨形成にも重要であることが示唆されている⁴⁴⁾。しかし、UBIAD1 による MK-4 の生成が、骨や軟骨形成に関与するのかは明らかではない。そこで著者は、UBIAD1 と MK-4 の骨形成に対する役割を明らかにすることを目的に、時期特異的 UBIAD1 欠損マウスおよびマウス前駆軟骨株化細胞を用いて、骨・軟骨における UBIAD1 の機能について解析を行った。

以下に、遺伝子欠損マウスを用いた UBIAD1 の骨における機能解析 (第 1 章)、マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いた UBIAD1 の機能解析 (第 2 章) について論述する。

本 論

第1章 遺伝子欠損マウスを用いた UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1) の骨における機能解析

ヒトが食事から摂取するビタミンKは、主に野菜に含まれるPKであるが、この他に肉類や卵からはMK-4を、納豆からはMK-7を摂取している。これまでにヒトやラット、マウスにおいてビタミンK同族体を摂取することにより、組織中にMK-4が高濃度に存在することが報告されている²⁵⁻²⁷⁾。MK-4はPKやMK-nから変換されて生成されており、NakagawaらによってビタミンK変換酵素UBIAD1が同定されている³³⁾。ビタミンKは、細胞内の小胞体でビタミンKサイクルと呼ばれる酸化還元サイクルにより代謝されると同時に、GGCXの補因子として働き、骨に分布するosteocalcinやmatrix Gla protein (MGP)などのビタミンK依存性タンパク質の活性化を担う(図4)⁵⁾。さらに、MK-4が核内受容体であるSXRのリガンドとして働き、骨基質タンパク質であるosteocalcinやMGPの他、コラーゲンの蓄積に関与するMATN2やTSKの発現を誘導することが報告されている(図4)^{13,14)}。このSXRを介した作用は、ビタミンKのうちMK-4に特異的に認められるものであり、PKはSXRを介した作用を示さない。このようにMK-4は、GGCX活性、SXRを介した転写調節、PKAの活性化など様々な作用によって骨芽細胞の分化や骨の石灰化を促進する作用があるため、骨粗鬆症治療薬として臨床応用されている。

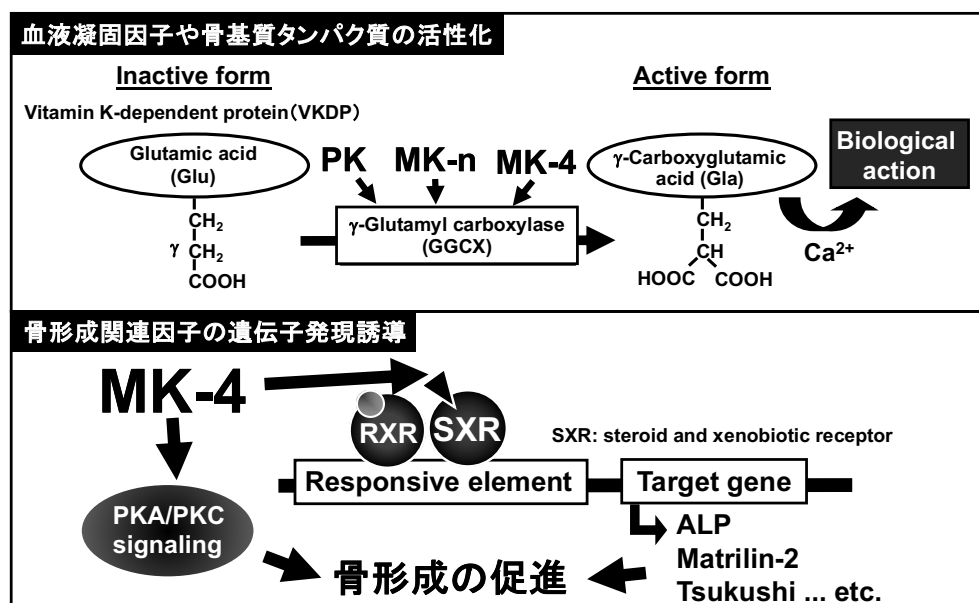


図4 ビタミンK同族体およびMK-4の生理作用

骨芽細胞のみではなく、最近では、ビタミン K 摂取が軟骨の異常により生じる変形性関節症の発症予防に有効であることが報告され、ビタミン K が軟骨形成にも重要であると示唆されている⁴⁴⁾。ヒト成人には 206 本の骨があるが、おおまかに分けると長管骨と扁平骨に分類される。それぞれ形状が異なるだけではなく、骨が形成されるメカニズムが異なっている。頭蓋骨のような扁平骨は骨芽細胞から直接骨がつくられる膜性骨化によって形成され、大腿骨などの長管骨は、骨端軟骨（成長板）において軟骨が石灰化した後に骨に置換される内軟骨性骨化によって形成される。骨は、出生後から成長期にかけて急速に形成されるが、特に内軟骨性骨化は、出生後から幼児期、児童期に著しく進行する。そこで著者は、骨形成における UBIAD1 の機能を明らかにする目的で、Tamoxifen 誘導型全身性 UBIAD1 欠損マウスを作製し（第 1 節）、骨形成が急速に進む 1 週齢より Tamoxifen 投与による UBIAD1 欠損を誘導することで、骨形成に対する UBIAD1 欠損の影響を評価した（第 2 節）。さらに、内軟骨性骨化に重要な軟骨細胞に着目し、Tamoxifen 誘導型全身性 UBIAD1 欠損マウス由来初代軟骨細胞を単離し、細胞レベルで検討した（第 3 節）。

第1節 Tamoxifen 誘導型全身性 UBIAD1 欠損マウスの作製

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

- 1) DNA 抽出試薬
 - (1) NaOH [nacalai tesque 社製]
 - (2) 1 mol/L-Tris-HCl Buffer Solution (pH 8.0) [nacalai tesque 社製]
- 2) KOD One™ PCR MasterMix [TOYOBO 社製]
- 3) Positive Control DNA [KYNO1 (flox)] 50 µg/µL
- 4) アガロース [nacalai tesque 社製]
- 5) Tris-Acetate-EDTA Buffer (50×) {TAE buffer (50×)} [nacalai tesque 社製]
- 6) 臭化エチジウム溶液 (0.44 mg/mL) [nacalai tesque 製]
- 7) ExcelBand 100 bp DNA Ladder [コスモ・バイオ製]
- 8) PCR 用プライマー [invitrogen 社に合成依頼] : 以下に示すプライマーを TE 緩衝液で 20 µM になるように調製した。
 - (1) マウス UBIAD1 DNA 増幅用プライマー
上流プライマー : 5'-CCTTGAATTCTCTTCCTGTCGTCGTCTC -3'
下流プライマー : 5'-CAGTGTTTCATAATCCACTGCCAAACCAG-3'
 - (2) マウス Cre recombinase DNA 増幅用プライマー
上流プライマー : 5'-AATGCTTCTGTCCGTTTGCC-3'
下流プライマー : 5'-CTACACCAGAGACGGAAATC-3'
 - (3) マウス InterPosi (IL-2) DNA 増幅用プライマー
上流プライマー : 5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'
下流プライマー : 5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC -3'
- 9) Tamoxifen [Toronto Research Chemicals 社製]
- 10) 中鎖脂肪酸 (MCT oil) [日清オイリオ社製]

2. 試薬の調製

- 1) 50 mM NaOH : NaOH 0.2 g を 100 mL の滅菌超純水に溶解した。
- 2) 1×Tris-Acetate-EDTA Buffer (1×TAE) : 50×TAE 溶液を滅菌超純水で希釈した。
- 3) 1%および2%アガロースゲル : アガロースを 1%または2%となるように添加し、加熱により溶解後、臭化エチジウム溶液を 10 mg/mL となるように添加してゲル作成板に流し込んだ。
- 4) 10×Loading Dye : 1 mol/L-Tris-HCl Buffer Solution 0.1 mL、Bromophenol Blue 10 mL、Glycerol 2 mL、蒸留水 7.9 mL を添加し混合した。

5) 4 mg/mL Tamoxifen: Tamoxifen 40 mg を MCT oil 10 mL で希釈した。

3. マウス

2014 年に公開された論文⁴²⁾に記載のある C57BL/6J マウスに対する遺伝子改変により loxP 配列が *UBIAD1* 遺伝子の exon1 領域に挿入された UBIAD1-floxed マウスおよび Jackson laboratories から入手した CAG-Cre-ERT2 マウス (#004453) を使用した。

4. UBIAD1 欠損の誘導

生後 1 週齢の CAG-Cre-ERT^{+/+}UBIAD1^{flox/flox} マウス (UBIAD1-cKO) に 200 µg/body となるように 4 mg/mL Tamoxifen を 4 日間連続で腹腔内投与し、3 週間飼育した。

5. UBIAD1 欠損の確認

1) DNA 抽出

切り取ったマウスの尾が入った 1.5 mL チューブに 50 mM NaOH 180 µL を入れ、95°C で 10 分インキュベートした。インキュベートしたサンプルに 1 mol/L-Tris-HCl Buffer Solution (pH 8.0) 20 µL を添加し、反応を停止した。以下この混合液を Lysis solution とした。

2) PCR

Mouse finger Lysis solution 1 µL に対し KOD One™ PCR MasterMix 10 µL、上流プライマー 0.6 µL、下流プライマー 0.6 µL、Nuclease-free H₂O 7.8 µL を加え、全量 20 µL としてよく混和した。T100™ Thermal Cycler [BIO-RAD 社製] にセットし、98°C 10 秒、62.5°C 15 秒、68°C 30 秒の反応を 1 サイクルとして、30 サイクル行い、DNA を増幅した。

3) 電気泳動

PCR 後のサンプル液 20 µL に対し 10×Loading Dye を 1 µL を添加し、TAE buffer で満たされた Mupid®- 2plus [ADVANCE 社製] にアガロースゲルを入れ、サンプル液を 10 µL ずつアプライした。また、マーカーとして ExcelBand 100 bp DNA Ladder を 5 µL アプライし、電流 100V で 25 分間泳動した。UltraSlim UV Transilluminator [MAESTROGEN 社製] を用いて紫外線を照射し、増幅産物のバンドを確認した。

6. 遺伝子型の評価

PCR、電気泳動を行い、電気泳動後のゲルを UltraSlim UV Transilluminator で観察した。Flox 領域では、1.4 kbp のみを野生型 (+/+)、1.4 kbp と 1.6 kbp の2本のバンドが検出された場合をヘテロ型 (flox/+)、1.6 kbp のみを Flox 型 (flox/flox) と判定した。また、Cre を有する場合には 562 bp にバンドが検出され、Positive Control は、395 bp にバンドが検出される。

— 実験結果 —

UBIAD1^{flox/+}マウス同士を交配し、ホモ接合体の対立遺伝子をもつ UBIAD1^{flox/flox} (flox) マウスを作製した。さらに、Jackson laboratories から入手した CAG-Cre-ERT2 マウスと UBIAD1^{flox/flox} マウスの交配により CAG-Cre-ERT^{+/-}UBIAD1^{flox/+}マウスを作製した。CAG-Cre-ERT^{+/-}UBIAD1^{flox/flox} マウス (UBIAD1-cKO) 以下 CKO と略す) は、flox マウスと CAG-Cre-ERT^{+/-}UBIAD1^{flox/+}マウスの交配により作製した (図 5 A)。作製した CKO マウスに対し、200 μ g/body となるように Tamoxifen を 4 日間連続で腹腔内投与した。3 週間飼育後のマウス尾より DNA を抽出し、PCR により遺伝子欠損を確認したところ、flox マウス (Control マウス) では 1.6 kbp にバンドが確認され、UBIAD1 が欠損していないこと、CKO マウスでは、0.4 kbp にバンドが確認され、Tamoxifen 投与により UBIAD1 欠損が誘導できていることが確認された (図 5 B)。

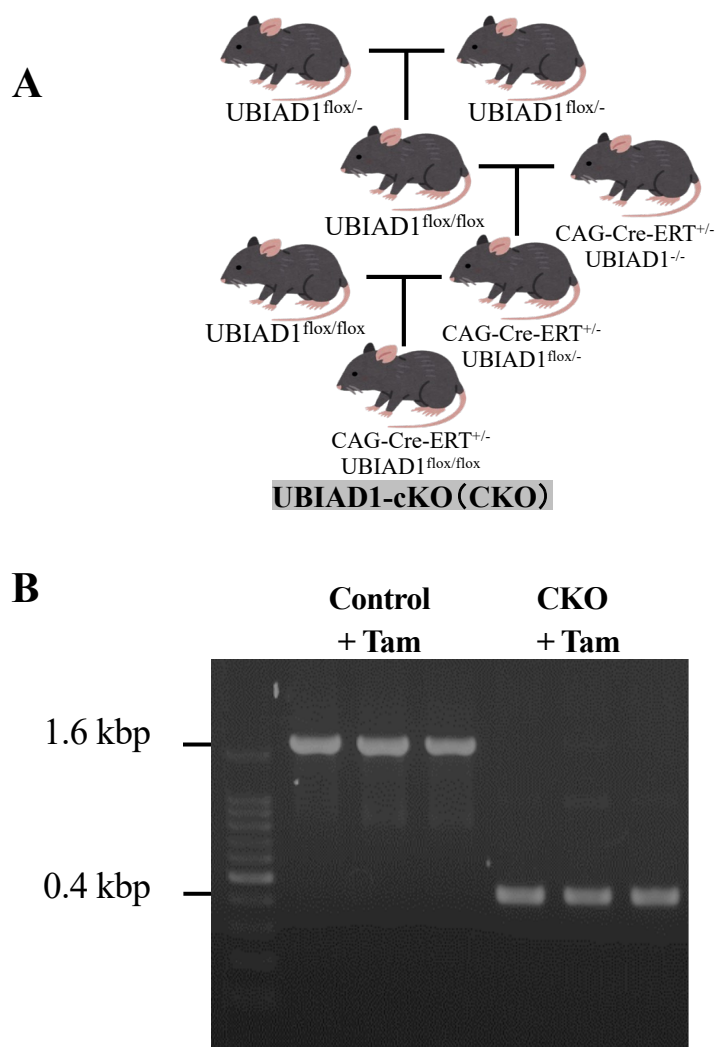


図 5 Tamoxifen 誘導型全身性 UBIAD1 欠損マウスの作製
(A) 作製の系統図
(B) Tamoxifen 投与後のマウスにおける遺伝子型の解析

第 2 節 骨組織における UBIAD1 欠損の影響評価

第 1 項 体重、大腿骨形態、大腿骨長

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

本章第 1 節と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

本章第 1 節と同様に調製した。

3. マウス

本章第 1 節と同様のマウスを使用した。

4. 遺伝子型の評価

本章第 1 節と同様に行った。

5. UBIAD1 欠損の誘導

本章第 1 節と同様に行った。

6. マウスの重量測定

4 週齢におけるマウスの体重を小動物用電子はかり [BiBRA 社製] を用いて計測した。

7. マウスの大腿骨長の測定

3D マイクロ X 線 CT CosmoScan GX [Rigaku 社製] を用いて μ CT 画像を FOV: 25 mm、High Resolution、撮影時間: 4 分、管電圧 90 kVp、管電流 88 μ A で撮影を行い、標準の解析ソフトウェア BoneAnalysis によって大腿骨の近位端部から遠位端部までの長さを測定した。

8. 統計処理

図中の数値は、全て平均値±標準誤差（mean±SE（standard error））を表す。なお、Control + Vehicle 群の検体数は n=9、Control + Tamoxifen 群の検体数は n=12、CKO + Vehicle 群および CKO + Tamoxifen 群の検体数は n=8 である。有意差の検定は、Tukey's-test を用いた。

— 実験結果 —

1 週齢より Control および CKO マウスに 4 日間連続で Tamoxifen を腹腔内投与し、UBIAD1 欠損を誘導した。4 週齢における各マウスの外観および骨を解析した結果を図 6～9 に示す。UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスは、Control マウスに比べ体長が小さいことがわかった (図 6)。UBIAD1 欠損を誘導したマウスは、UBIAD1 が欠損していない他の群と比べ、体重が有意に低値となった (図 7)。マウスから大腿骨を採取し大腿骨形態を評価したところ、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスは、UBIAD1 が欠損していない他の群と比べ全体的に小さいことがわかった (図 8)。そこで、3D マイクロ X 線 CT CosmoScan GX を用いて大腿骨長を測定した結果、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスは、UBIAD1 が欠損していない他の群と比べ大腿骨長が有意に低値であることがわかった (図 9)。



図 6 マウスの外観

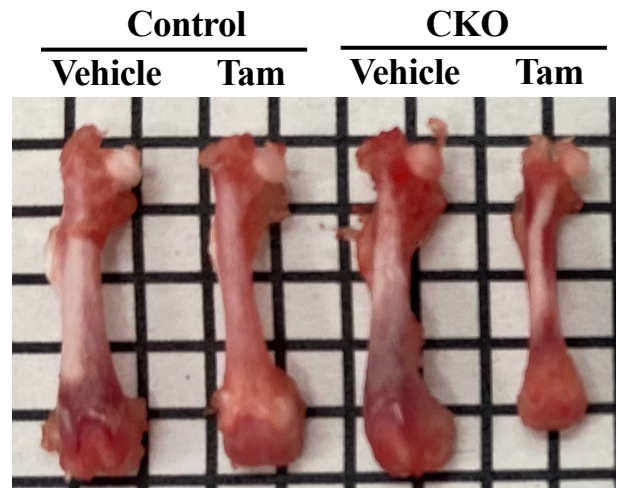


図 8 大腿骨の外観

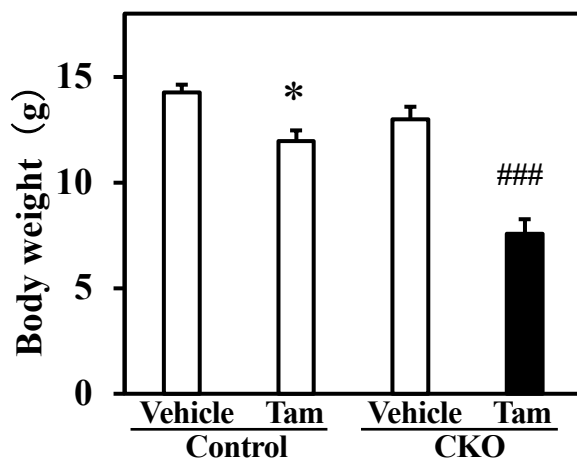


図 7 体重

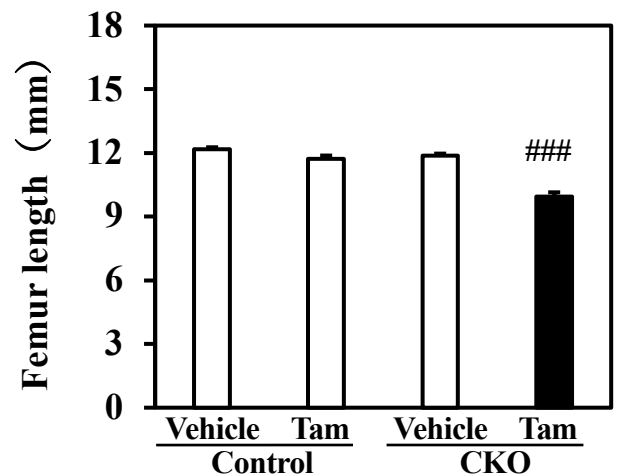


図 9 大腿骨長

Significant difference * $p < 0.05$ vs Control+vehicle,

$p < 0.001$ vs Control+vehicle, Control+Tam and CKO+vehicle (Tukey's-test)

第2項 大腿骨中 menaquinone-4 (MK-4) 濃度

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

- 1) Menadione 重水素標識体 (MD-d₈) [C/D/N Isotopes 社製] (図10)
- 2) MK-4 重水素標識体 (MK-4-d₇) [本研究室にて合成] (図10)
- 3) MK-4 重酸素標識体 ([¹⁸O]-MK-4) [本研究室にて合成] (図10)
- 4) メタノール [nacalai tesque 社製]
- 5) エタノール [nacalai tesque 社製]
- 6) ヘキサン [nacalai tesque 社製]
- 7) 2-プロパノール [nacalai tesque 社製]
- 8) 海砂 425 ~ 850 μm [和光純薬社製]

その他の試薬および化合物は、本章第1節と同様のものを使用した。

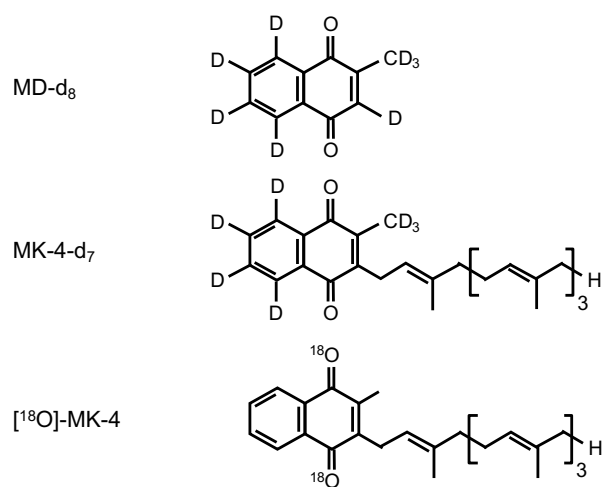


図10 ビタミン K 同族体の重水素標識体および[¹⁸O]-MK-4 の化学構造式

2. 試薬の調製

標準溶液 : MK-4、MK-4-d₇ を各々 3,200 ng/mL 含むエタノール溶液を調製し、これをエタノールで希釈して 25、50、100、200、400 ng/mL の標準系列を作成した。この標準系列 1 mL に、内部標準物質として [¹⁸O]-MK-4 を 100 ng/mL となるように溶解したエタノール溶液を 1 mL ずつ加えた。調製した標準溶液中の各化合物の最終濃度は 12.5、25、50、100、200 ng/mL であり、内部標準物質は 50 ng/mL である。なお、MK-4、MK-4-d₇ に対する内部標準物質には [¹⁸O]-MK-4 を用いた。

その他の試薬は、本章第 1 節と同様に調製した。

3. マウス

本章第 1 節と同様のマウスを使用した。

4. 遺伝子型の評価

本章第 1 節と同様に行った。

5. UBIAD1 欠損の誘導

本章第 1 節と同様に行った。

6. 大腿骨のビタミン K 抽出

マウスから摘出した大腿骨頭を乳鉢に入れ、海砂と共にすり潰した。そこに滅菌超純水を 1 mL 添加し、破碎組織を溶解した。溶解液を褐色遠沈管に取り、エタノール 1.9 mL、内部標準物質として [¹⁸O]-MK-4 を 100 ng/mL となるように溶解したエタノール溶液 100 μL (1 サンプルあたりの内部標準物質量は 10 ng である)、ヘキサン 3 mL を加え、5 分間混和した。この溶液を 4°C、2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 3 mL を分取してロータリーエバポレーターにて減圧留去した。ヘキサン 2 mL による共沸を行なった後、得られた残渣をメタノール 120 μL に溶解し、LC-APCI-MS/MS の測定に供した。

7. LC-APCI-MS/MS 測定

1) HPLC 部の測定条件

装置 : 1260 Infinity [Agilent Technologies 社製]

カラム : COSMOSIL 5C18 AR-II (4.6 mm i.d. × 150 mm) [ナカライテスク社製]

カラム温度 : 40°C

移動層 : イソプロパノール : メタノール = 1 : 3 (v/v)

流速 : 1.0 mL/min

注入量 : 40 µL

2) APCI-MS/MS 部の測定条件

装置 : QTRAP®4500 LC/MS/MS System [SCIEX 社製]

イオン源 : Heated Nebulizer

イオン化温度 : 450°C

測定法 : Selected reaction monitoring (SRM) 法を用いた。Precursor ion の測定は positive ion scan [M+1] (m/z) で行い、product ion は intensity の最も高い fragment ion を選択した。

3) APCI-MS/MS のイオン質量とイオン化条件

各化合物の測定は、表 1 に示す precursor ion、product ion および collision energy にて行った。

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)
MK-4	445.4	187.1	27
MK-4-d ₇	452.3	194.2	31
[¹⁸ O]- MK-4	449.3	191.2	29

表 1 APCI-MS/MS のイオン質量とイオン化条件

8. データの解析

データの解析は Analyst 1.4.2 [Applied Biosystems 社製] を用いた。標準物質の各濃度のピーク面積を内部標準物質^[18O]-MK-4 のピーク面積で除して得られた値を基に、検量線を作成した。1 サンプルあたりに含まれる各ビタミン K 化合物の濃度は、検量線を基に算出した値を以下の計算式により、組織 1 mg あたりの各ビタミン K 化合物のモル数として算出した。なお、各ビタミン K 化合物の分子量は MK-4 : 444、MK-4-d₇ : 451 である。

組織 1 mg あたりのビタミン K 化合物量 (pmol/mg)

$$= K \times \frac{100}{1000} \text{ (mL)}$$

K : 検量線から算出された各ビタミン K 化合物量 (ng/mL)

M : 分子量

P : タンパク質量 (mg)

9. 統計処理

本章第2節第1項と同様に行った。

— 実験結果 —

1 週齢において CKO マウスに 4 日間連続で Tamoxifen を腹腔内投与することにより UBIAD1 欠損を誘導し、4 週齢におけるマウスの評価を行ったところ、UBIAD1 を欠損誘導した CKO マウスは、UBIAD1 が欠損していない他の群と比べ大腿骨頭中の MK-4 濃度が有意に低下した（図 1 1）。

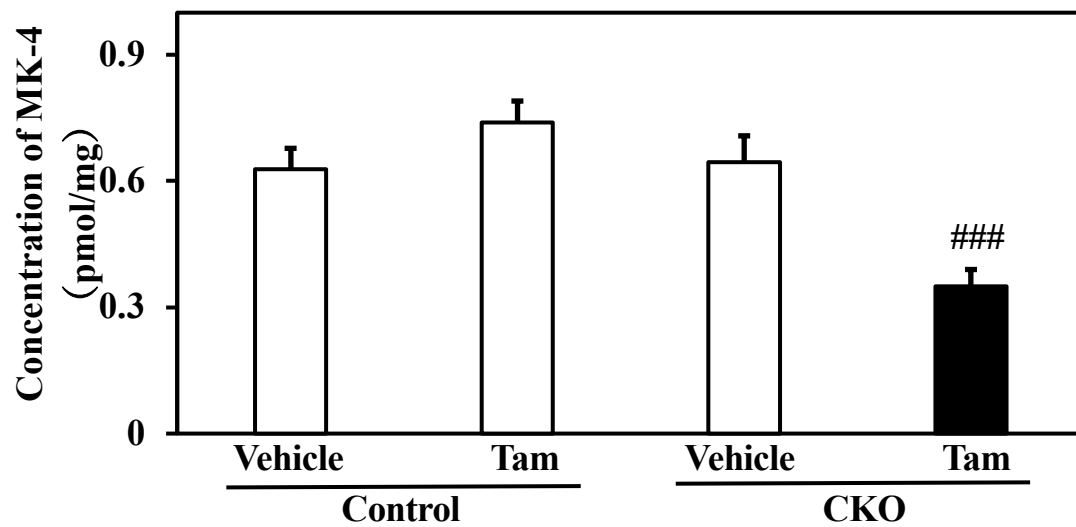


図 1 1 大腿骨頭中の MK-4 濃度

Significant difference ### $p < 0.001$ vs Control+vehicle, Control+Tam and CKO+vehicle (Tukey's-test)

第 3 項 大腿骨の μ CT 解析

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

本章第 1 節と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

本章第 1 節と同様に調製した。

3. マウス

本章第 1 節と同様のマウスを使用した。

4. 遺伝子型の評価

本章第 1 節と同様に行った。

5. UBIAD1 欠損の誘導

本章第 1 節と同様に行った。

6. マウスの大腿骨画像撮影および骨密度測定

3D マイクロ X 線 CT CosmoScan GX [Rigaku 社製] を用いてマウスから摘出した大腿骨の μ CT 画像を FOV: 10 mm または 25 mm、High Resolution、撮影時間: 4 分、管電圧 90 kVp、管電流 88 μ A で撮影を行った。皮質骨については、大腿骨の中心部を 0.5 mm の範囲で抽出し、海面骨については大腿骨遠位端の成長板より 0.5 mm から 1 mm 下部の範囲で抽出し標準の解析ソフトウェア BoneAnalysis によって骨密度を測定した。

7. 統計処理

本章第 2 節第 1 項と同様に行った。

— 実験結果 —

1 週齢において CKO マウスに 4 日間連続で Tamoxifen を腹腔内投与することにより UBIAD1 欠損を誘導し、4 週齢におけるマウス的大腿骨の評価を 3D マイクロ X 線 CT CosmoScan GX を用いて行ったところ、UBIAD1 を欠損誘導した CKO マウスでは、UBIAD1 が欠損していないマウスに比べ、海面骨の骨梁が著しく減少しており、皮質骨も薄くなっていることがわかった (図 1 2)。また、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスは他の群と比べ大腿骨全体、海面骨、皮質骨の骨密度が有意に低下した (図 1 3 ~ 1 5)

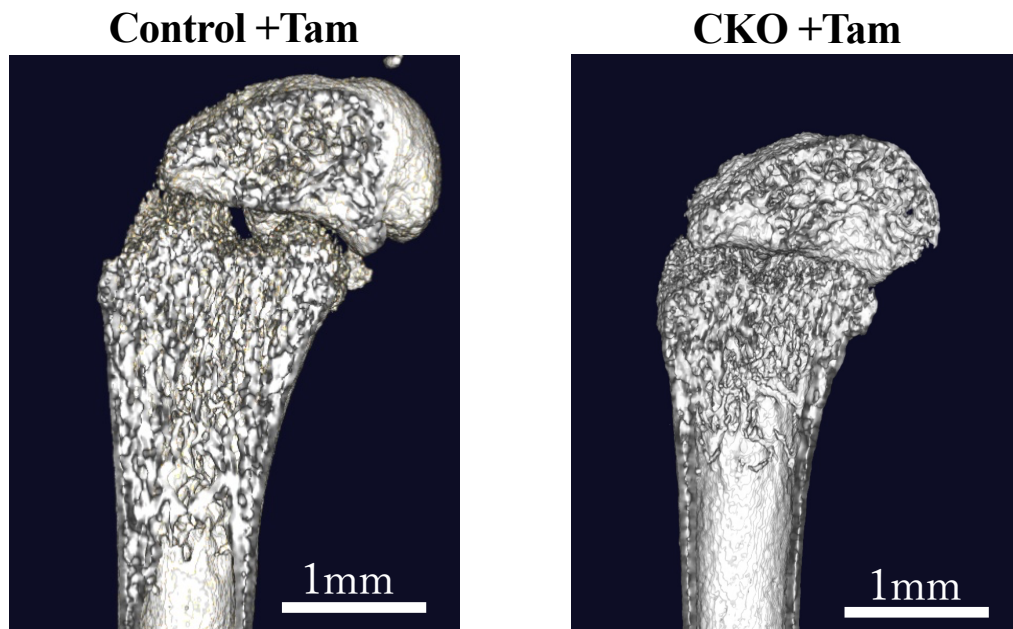


図 1 2 大腿骨の μ CT 画像

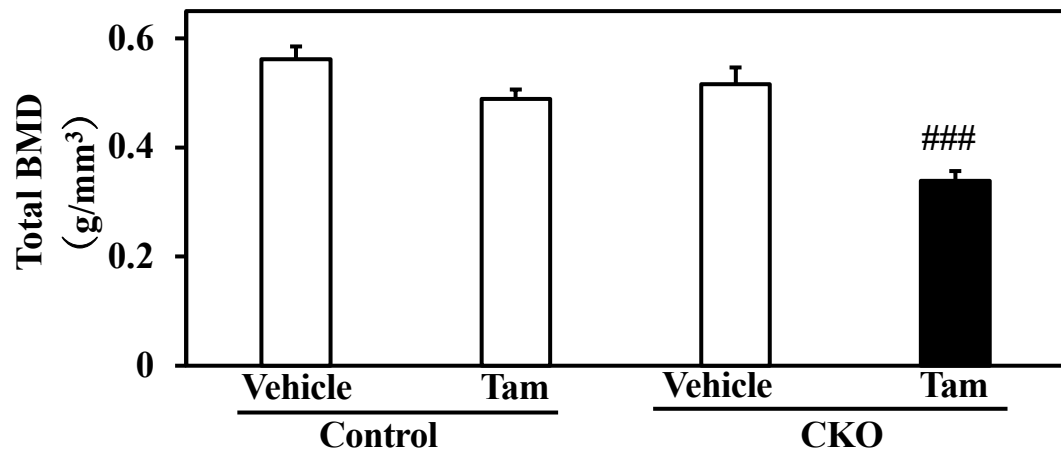


図1 3 大腿骨全体の骨密度

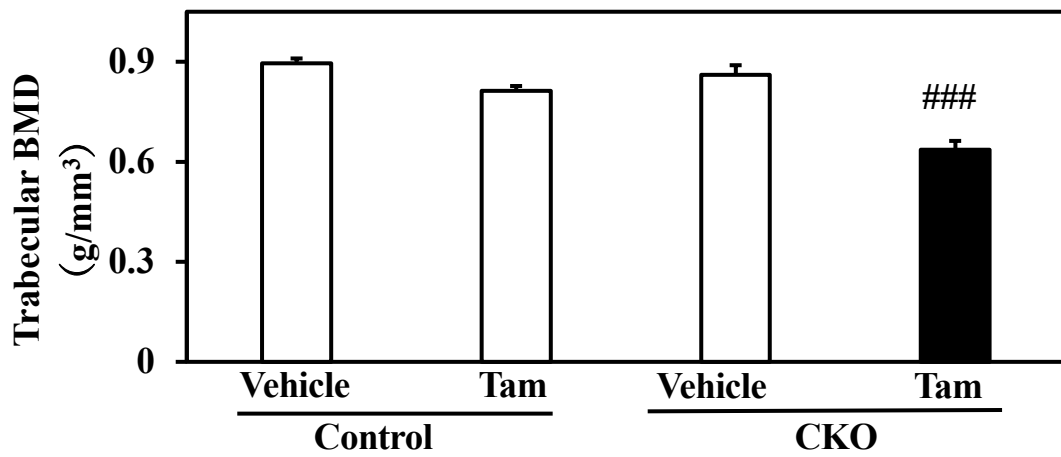


図1 4 海面骨の骨密度

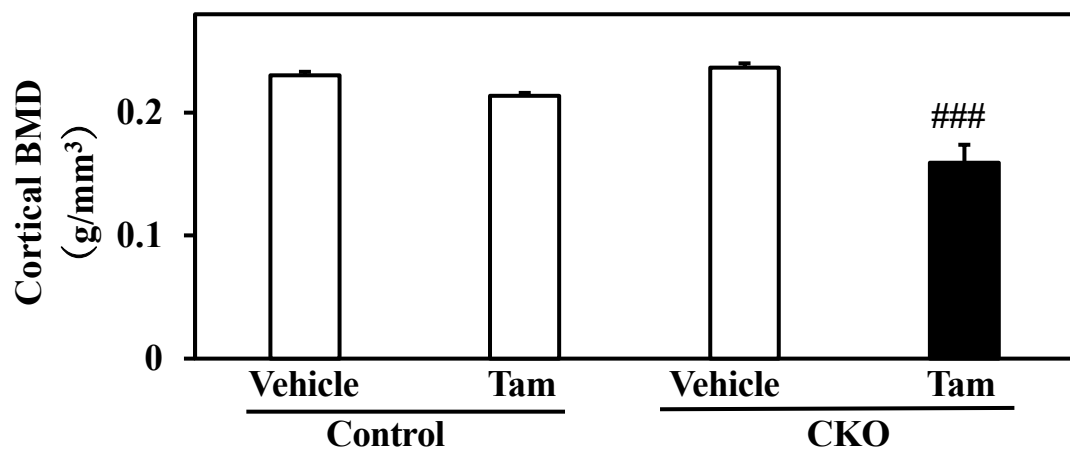


図1 5 皮質骨の骨密度

Significant difference ### $p < 0.001$ vs Control+vehicle, Control+Tam and CKO+vehicle (Tukey's-test)

第 4 項 大腿骨組織標本を用いた組織構造評価

(1) Hematoxylin-Eosin (HE 染色)

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

本章第 1 節と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

本章第 1 節と同様に調製した。

3. マウス

本章第 1 節と同様のマウスを使用した。

4. 遺伝子型の評価

本章第 1 節と同様に行った。

5. UBIAD1 欠損の誘導

本章第 1 節と同様に行った。

6. マウスの大腿骨組織標本の作製

GenoStaff 株式会社に委託した。

7. HE 染色

GenoStaff 株式会社に委託した。

— 実験結果 —

大腿骨組織標本を作製し、HE 染色により大腿骨の内部構造の変化を評価した結果を図 1 6 に示す。UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスでは、Control マウスと比べ骨端部成長板軟骨層の厚みが薄くなっていることが観察された。拡大像を見ると、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスでは、Control と比べ増殖軟骨細胞層および肥大軟骨層がいずれも薄く、特に肥大軟骨細胞の数が少ないことが観察された。

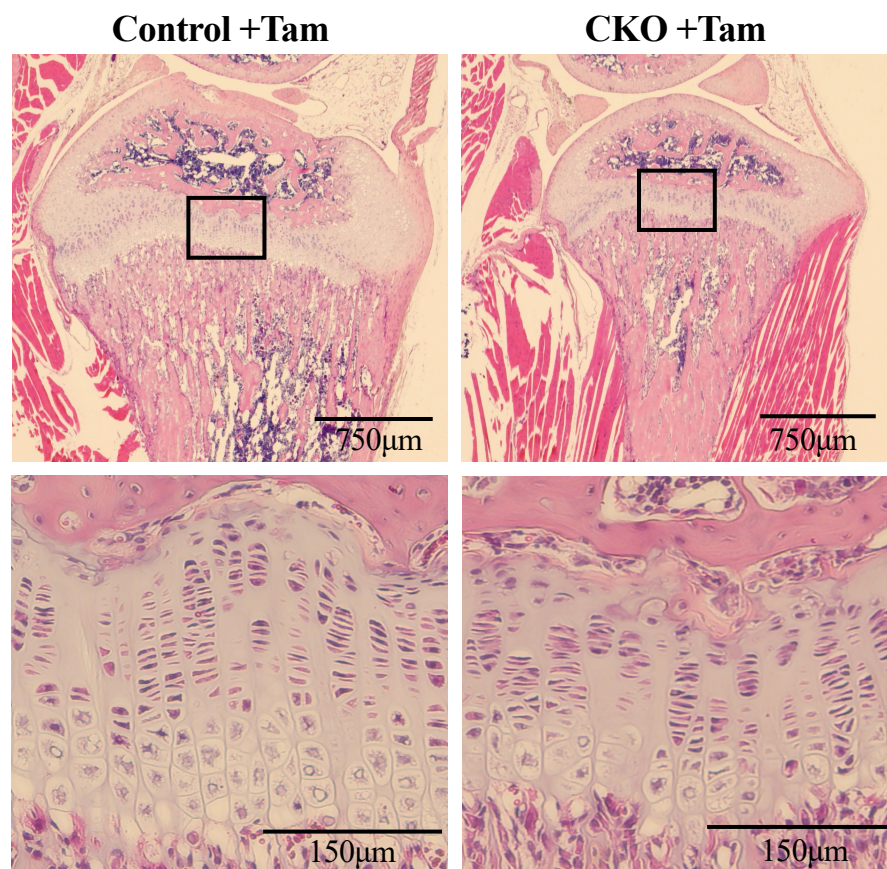


図 1 6 大腿骨組織標本の HE 染色による評価

(2) Safranin O 染色

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

本章第 1 節と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

本章第 1 節と同様に調製した。

3. マウス

本章第 1 節と同様のマウスを使用した。

4. 遺伝子型の評価

本章第 1 節と同様に行った。

5. UBIAD1 欠損の誘導

本章第 1 節と同様に行った。

6. マウスの大腿骨組織標本の作製

GenoStaff 株式会社に委託した。

7. Safranin O 染色

GenoStaff 株式会社に委託した。

— 実験結果 —

骨端部の軟骨形成状態をさらに評価するために、軟骨基質を赤く染色する Safranin O 染色を行った結果を図17に示す。Control マウスでは、増殖軟骨細胞層や肥大軟骨細胞層が厚く、赤く染色されるコラーゲン繊維が規則的に広がっていることがわかった。しかし、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスでは、増殖軟骨細胞層や肥大軟骨細胞層が薄くなっており、コラーゲン繊維が密になり、軟骨細胞が潰れていることがわかった。

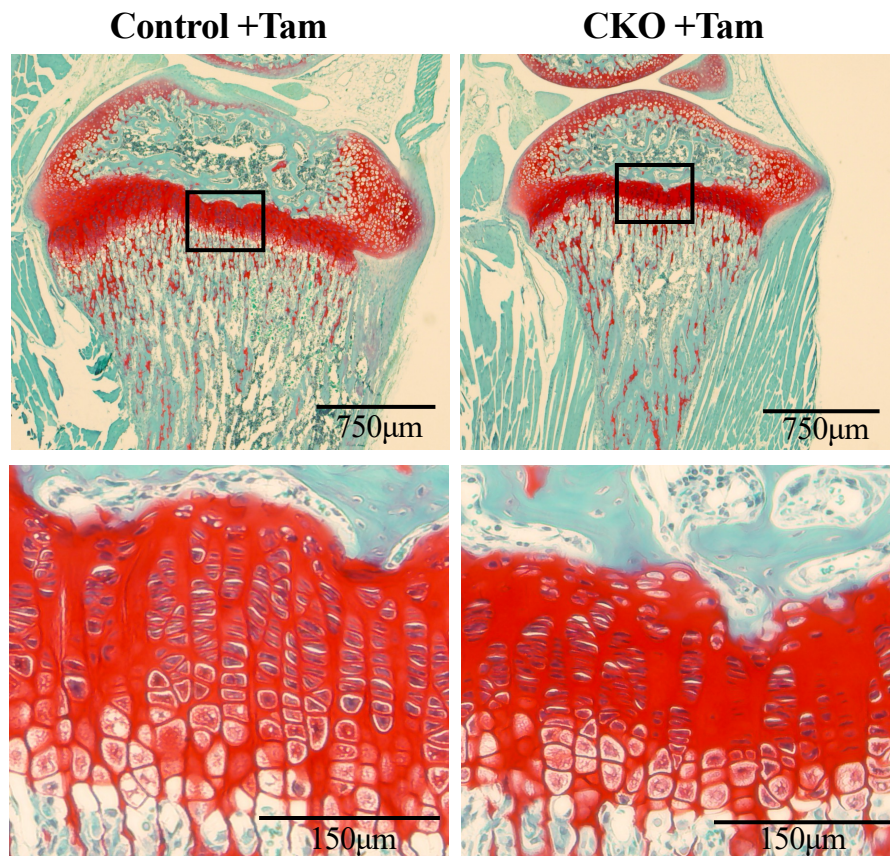


図17 大腿骨組織標本の Safranin O 染色による評価

第 5 項 軟骨組織における軟骨分化因子の mRNA 発現量

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

- 1) RNA 抽出試薬 : ISOGEN [ニッポンジーン社製]
- 2) DEPC (Diethyl pyrocarbonate) [nacalai tesque 社製]
- 3) ISOGEN [NIPPON GENE 社製]
- 4) クロロホルム [nacalai tesque 社製]
- 5) ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover [TOYOBO 社製]
- 6) TB Green[®] Premix Ex Taq[™] [TaKaRa 社製]
- 7) PCR 用プライマー : 以下に示すプライマーを TE 緩衝液で 20 μ M になるように調製した。

- (1) マウス GAPDH mRNA 増幅用プライマー [invitrogen 社に合成依頼]

(GenBank Accession Number : NM_008084)

上流プライマー (633~652) : 5'-TGCCAAGGCTGTGGGCAAGG-3'

下流プライマー (726~745) : 5'-TCTCCAGGCGGCACGTCAGA-3'

- (2) マウス Sox9 mRNA 増幅用プライマー [invitrogen 社に合成依頼]

(GenBank Accession Number : NM_011448)

上流プライマー (683~704) : 5'-GATGACCTGTCTGAGGAAGACC-3'

下流プライマー (808~829) : 5'-GCATTTCTCGGAGCCTGTCAAC-3'

- (3) マウス AggreCAN mRNA 増幅用プライマー [invitrogen 社に合成依頼]

(GenBank Accession Number : NM_007427)

上流プライマー (1973~1994) :

5'-CAGGCTATGAGCAGTGTGATGC-3'

下流プライマー (2052~2073) :

5'-GCTGCTGTCTTTGTCACCCACA-3'

- (4) マウス Collagen type 2a1 (Col2a1) mRNA 増幅用プライマー [SIGMA genosys 社に合成依頼] (GenBank Accession Number : NM_031163)

上流プライマー (4433~4453) :

5'-ACGAAGCGGCTGGCAACCTCA-3'

下流プライマー (4482~4505) :

5'-CCCTCGGCCCTCATCTCTACATCA-3'

(5) マウス Collagen type 10a1 (Col10a1) mRNA 増幅用プライマー [SIGMA genosys 社に合成依頼] (GenBank Accession Number : NM_009925)

上流プライマー (1724~1747) :

5'- TGCCCGTGTCTGCTTTTACTGTCA-3'

下流プライマー (1772~1793) :

5'- TCAAATGGGATGGGGGCACCTACT-3'

その他の試薬および化合物は、本章第 1 節と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

- 1) 0.2%DEPC 処理水 : 超純水 1 L に DEPC を 2 mL 添加し、スターラーで 1 晩攪拌させる。その後、高圧蒸気滅菌した。
- 2) 75%エタノール in DEPC 水 : Ethanol 37.5 mL と 0.2%DEPC 処理水 12.5 mL を混合した。

その他の試薬は、本章第 1 節と同様に調製した。

3. マウス

本章第 1 節と同様のマウスを使用した。

4. 遺伝子型の評価

本章第 1 節と同様に行った。

5. UBIAD1 欠損の誘導

本章第 1 節と同様に行った。

6. mRNA 発現量の測定

1) 大腿骨頭の全 RNA の抽出

マウス大腿骨から大腿骨頭を摘出し、2 mL のスクリーキャップチューブに入れ -80°C で凍結させる。凍結したまま BEADS CRUSHER μT -12 [タイテック株式会社製] で大腿骨頭を破碎し ISOGEN を 1 mL 加え再度破碎する。その後、氷上で 5 分間静置した。全 RNA の抽出まで -85°C にて保存した。細胞回収液にクロロホルム 0.2 mL を加えて混和し、 4°C 、 $15,000\times\text{rpm}$ で 15 分間遠心分離した後、水層（上清）を分取した。上清にイソプロパノール 0.7 mL を加えてよく混和し、室温にて 10 分間放置後、 4°C 、 $15,000\text{ rpm}$ で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿に 75%エタノール溶液 1 mL を加えてリンスし、 -9°C 、 $15,000\text{ rpm}$ で 5 分間遠心分離後、上清を除去して RNA の沈殿を得た。沈殿を風乾し、DEPC 処理水 $10\text{ }\mu\text{L}$ に完全に溶解させて全 RNA とした。全 RNA 濃度を NanoDrop 2000 [Thermo Fisher Scientific 社製] で 260 nm における吸光度から算出し、全 RNA 濃度が $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように DEPC 処理水で希釈して以下の実験に用いた。

2) 逆転写反応による cDNA の合成

逆転写反応は ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover [TOYOBO 社製] を用いて行った。全 RNA $1\text{ }\mu\text{g}$ に対して滅菌蒸留水を $5\text{ }\mu\text{L}$ ずつ添加し、 65°C で 5 分間インキュベートした。その後、氷上で $4\times\text{DN Master Mix with gDNA Remover}$ を $2\text{ }\mu\text{L}$ 添加し、 37°C で 5 分間インキュベートした。その後、氷上にて $5\times\text{RT Master Mix}$ を $2\text{ }\mu\text{L}$ 添加し、T100[™] Thermal Cycler [BIO-RAD 社製] にセットして 37°C 5 分、 50°C 5 分、 98°C 5 分で逆転写反応を行い、cDNA を得た。

3) リアルタイム PCR 法による目的遺伝子 cDNA の定量

cDNA 溶液 $1\text{ }\mu\text{L}$ に TB Green[®] Premix Ex Taq[™] [TaKaRa 社製] 溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$ 、各遺伝子増幅用上流プライマーおよび下流プライマー各 $0.1\text{ }\mu\text{L}$ を加え、滅菌超純水で全量を $10\text{ }\mu\text{L}$ としてよく混和した。CFX リアルタイム PCR システム [BIO-RAD 社製] にセットし、 95°C 30 秒加熱後で、 95°C 5 秒、 60°C 30 秒の PCR 反応を 1 サイクルとして、40 サイクル行い、DNA を増幅した。PCR 反応終了後、反応液 $10\text{ }\mu\text{L}$ に $10\times\text{loading dye}$ を $1\text{ }\mu\text{L}$ 加えて 2%アガロースゲルにて泳動し、DNA が増幅されていることを確認した。なお、GAPDH の増幅サイズは 113 bp 、Sox9 の増幅サイズは 147 bp 、Aggrecan の増幅サイズは 101 bp 、Collagen type 2a1 の増幅サイズは 73 bp 、Collagen type 10a1 の増幅サイズは 70 bp である。

4) データの解析

データの解析は、CFX リアルタイム PCR システム操作マニュアルに従い、CFX マネージャーソフトウェア [BIO-RAD 社製] にて行った。定量化するために大腿骨頭の全 RNA から cDNA を合成し、滅菌超純水で 2^n ($n=0\sim3$) 倍ずつ数段階に希釈したものを標準系列用テンプレートとして検量線を作成した。縦軸に TB Green の蛍光検出における threshold の各値のサイクル数 (threshold cycle : Ct)、横軸に初期濃度の対数値をとった。この検量線と未知試料の Ct から目的遺伝子の cDNA 量を算出した。GAPDH についても同様に cDNA 量を算出し、目的遺伝子の mRNA 量の補正を行った。

7. 統計処理

図中の数値は、全て平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) を表す。なお、Control + Vehicle 群の検体数は $n=9$ 、Control + Tamoxifen 群の検体数は $n=12$ 、CKO + Vehicle 群および CKO + Tamoxifen 群の検体数は $n=8$ である。有意差の検定は、Student's t-test を用いた。

— 実験結果 —

大腿骨頭における軟骨分化に関わる転写因子の Sox9、軟骨分化マーカーの Col2a1、Aggrecan、Col10a1 の mRNA 発現量を検討した結果を図 1 8 に示す。UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスでは、Control マウスと比べ、増殖軟骨関連因子の Sox9、Col2a1、Aggrecan の mRNA 発現量が有意に低下していた。さらに、肥大軟骨関連因子 Col10a1 の mRNA 発現量は、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスでは、Control マウスと比べ有意に低下していることがわかった。

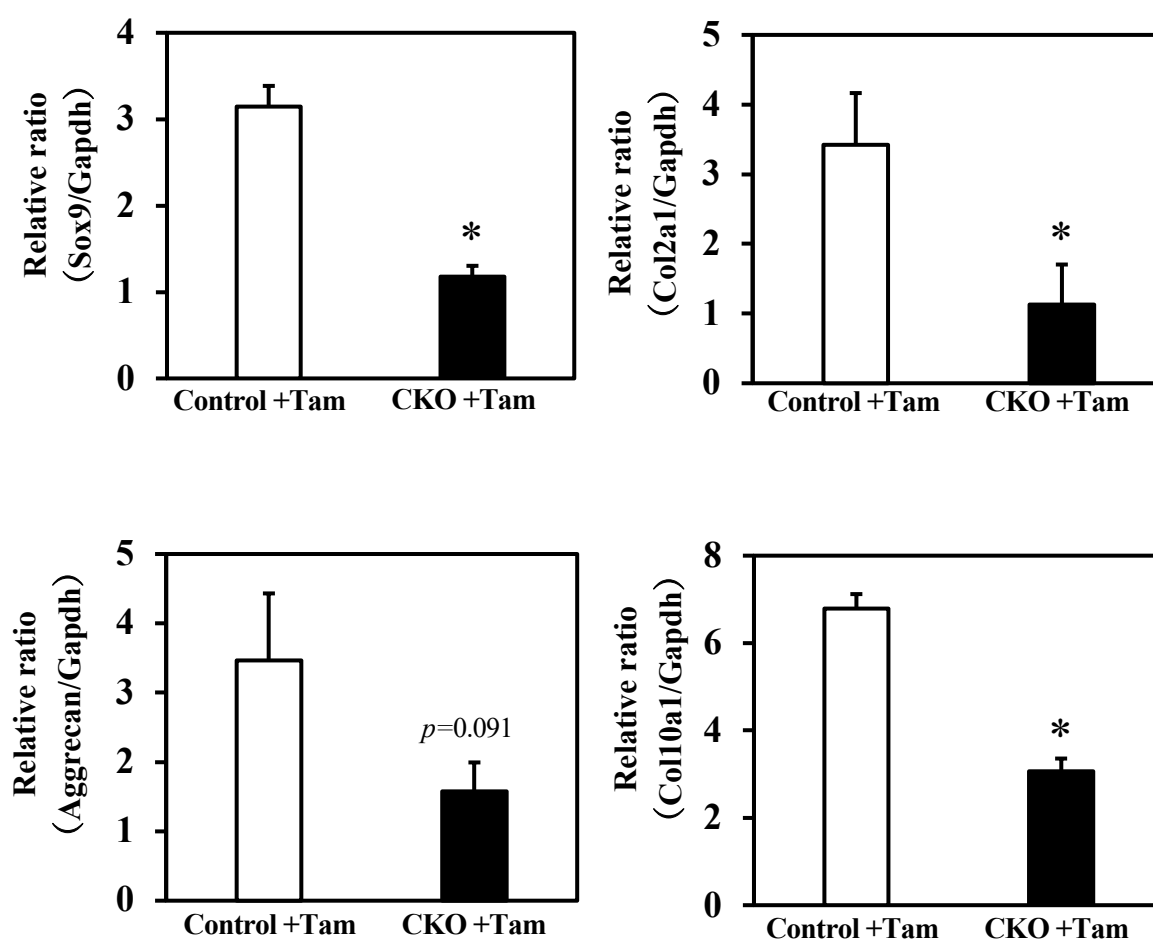


図 1 8 大腿骨頭における軟骨分化因子の mRNA 発現量

Significant difference * $p < 0.05$ (Student's t-test)

第 3 節 Tamoxifen 誘導型全身性 UBIAD1 欠損マウス由来 初代軟骨細胞を用いた解析

第 1 項 増殖能

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

- 1) PS (Penicillin-streptomycin-mixed solution) [nacalai tesque 社製]
- 2) FBS (Fetal bovine serum) [ThermoTrace 社製]
- 3) Bovine insulin [SIGUMA-ALDLICH 社製]
- 4) DMEM (Low glucose) [nacalai tesque 社製]
- 5) Collagenase type D [和光純薬社製]
- 6) (Z) - 4-Hydroxytamoxifen [abcam 社製]
- 7) クエン酸ナトリウム二水和物 [nacalai tesque 社製]
- 8) Cell Count Reagent SF (WST-8) [nacalai tesque 社製]

その他の試薬および化合物は、本章第 1 節および第 2 節第 5 項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

- 1) 細胞分散液 I: 1 % PS 含有の DMEM (Low glucose) に、Collagenase type D を 3 mg/mL 混合
- 2) 細胞分散液 II: 細胞分散液 I を DMEM (Low glucose) で 6 倍希釈
- 3) 増殖用培地 : DMEM (Low glucose) に 10 % FBS、1 % PS を混合
- 6) 1 mM 4-OH Tamoxifen : Z - 4-Hydroxytamoxifen を 3.875 mg 秤量し、10 mL のエタノールに溶解させた。
- 7) 1 M クエン酸ナトリウム : クエン酸ナトリウム二水和物 29.4 g を滅菌超純水 100 mL に溶解し、高圧蒸気滅菌した。
- 8) 0.1 M クエン酸ナトリウム : 1 M クエン酸ナトリウム 10 mL に対してエタノール 10 mL、滅菌超純水 90 mL を加えた。

その他の試薬は、本章第 1 節および第 2 節第 5 項と同様に調製した。

3. マウス

本章第 1 節と同様のマウスを使用した。

4. 遺伝子型の評価

本章第 1 節と同様に行った。

5. UBIAD1 欠損マウス由来初代培養軟骨細胞の単離

生後 1 日齢の CKO マウスから大腿骨頭、膝関節軟骨を摘出し 3 匹あたり 1.5 mL の細胞分散液 I に入れた。この細胞分散液 I をインキュベーターシェーカー [タイテック株式会社製] で 37°C、1,200 rpm で 45 分インキュベートしたのち細胞分散液 I のみを回収し、残った大腿骨頭、膝関節軟骨に新しい細胞分散液 I を 3 匹あたり 1.5 mL で加えた。この細胞分散操作を 4 回繰り返した。回収した細胞分散液 II を 1,200 rpm、10 分、4°C で遠心分離した。上清を除去し細胞分散液 II を 3 匹あたり 1.5 mL で加え懸濁した。それを 12 well plate に 1 mL ずつ播種し、5%CO₂、37°C で一晩インキュベートした。70 µm セルストレイナーに通し、細胞分散液を回収して 1,200 rpm、10 分、4°C で遠心分離した。上清を除去したのち、増殖培地に懸濁して、細胞数を数え 6well plate に 2.0×10^5 /well ずつ播種した。

6. 培養方法

播種日を 0 日目とし、1 mM の 4-OH Tamoxifen を 1 µM となるように添加した増殖培地で 5 日間培養した。

7. UBIAD1 欠損の誘導

CKO マウス由来初代軟骨細胞を播種した培地に対して、1 µM となるように 4-OH Tamoxifen を添加した。

8. UBIAD1 欠損マウス由来初代培養軟骨細胞からの DNA の抽出

培地をアスピレーターで吸引除去し、0.2%DEPC 処理 PBS (-) 1~2 mL を添加し、細胞を洗った。この操作は 2 回行った。DEPC 処理済み PBS (-) を除去し、ISOGEN を 500 µL 添加した。ISOGEN をかけて細胞を剥がし、1.5 mL チューブに回収した。この 1.5 mL チューブにクロロホルム 0.1 mL を加え、60 秒間ボルテックスでミキシングを行い、3 分静置した。静置後、4°C、15,000 rpm で 15 分遠心分離した。3 層に分離した層のうち、上層の水層のみを別の 1.5 mL チューブに移し替え、4°C、4,600 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を除去した後、0.1 M クエン酸

ナトリウム 0.5 μL を加え、時折混和しながら室温で 30 分放置する。4°C、4,600 rpm で 5 分間遠心分離した後、再度、上清を除去した後、0.1 M クエン酸ナトリウム 0.5 mL を加え、時折混和しながら室温で 30 分放置した。4°C、4,600 rpm で 5 分間遠心分離し、析出した DNA ペレットに冷却した 75%エタノール 1 mL を加え、15 分間室温で放置する。4°C、4,600 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を除去後、得られたペレットを完全に乾燥しない程度に風乾させる。風乾後、0.2%DEPC 水を 10 μL 添加し、ペレットを溶解した。ナノドロップ 2000 (Thermo Fisher 社製) を使用し、DNA 濃度を測定した。

9. WST-8 assay

対数増殖期にある細胞を 5% FBS 含有 DMEM (Low glucose) 中に 1×10^4 cells/100 μL /well となるように 96 穴プレートに播種し、5%CO₂ 存在下、37°C で培養した。Cell Count Reagent SF を各 well に 10 μL ずつ添加する。5%CO₂ 存在下、37°C で 3 時間呈色反応を行い、マイクロプレートリーダー (iMark™ [BIO-RAD 社製]) を用い、450 nm (参照波長 750 nm) の吸光度を測定した。

10. 統計処理

図中の数値は、全て平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) を表す。なお、Control + Tamoxifen 群および CKO + Tamoxifen 群の検体数は $n=8$ である。有意差の検定は、Student's t-test を用いた。

— 実験結果 —

Control および CKO マウスの大腿骨頭より初代培養軟骨細胞を単離し、播種した後に培地に 4-OH Tamoxifen を添加することで UBIAD1 欠損を誘導した。その結果、Control マウス由来初代軟骨細胞の DNA では 1.6 kbp にバンドが見られ、CKO マウス由来初代軟骨細胞では 0.4 kbp にバンドが認められたことから、初代培養細胞においても 4-OH Tamoxifen を培地に添加することで UBIAD1 欠損を誘導できることがわかった (図 1 9)。また、単離した細胞を播種後、増殖培地で培養し、WST-8 assay により増殖能を評価したところ、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウス由来軟骨細胞では、培養 3 日目以降、Control マウス由来軟骨細胞に比べ、細胞数が有意に少なく、増殖能が低下していることがわかった (図 2 0)。

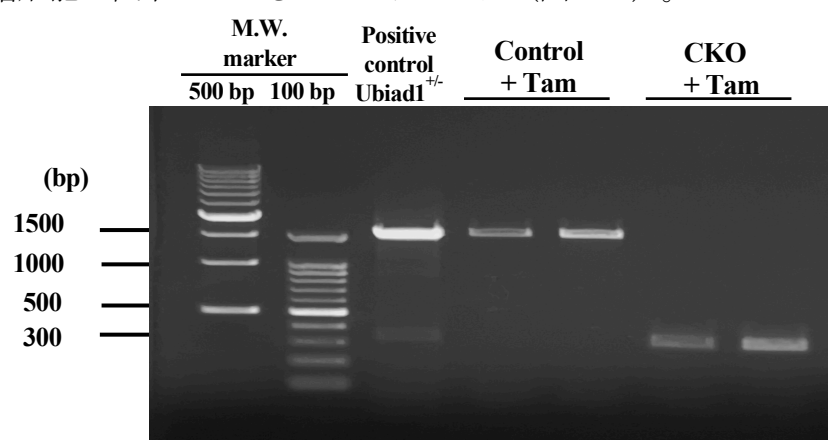


図 1 9 初代培養軟骨細胞における UBIAD1 欠損状態の評価

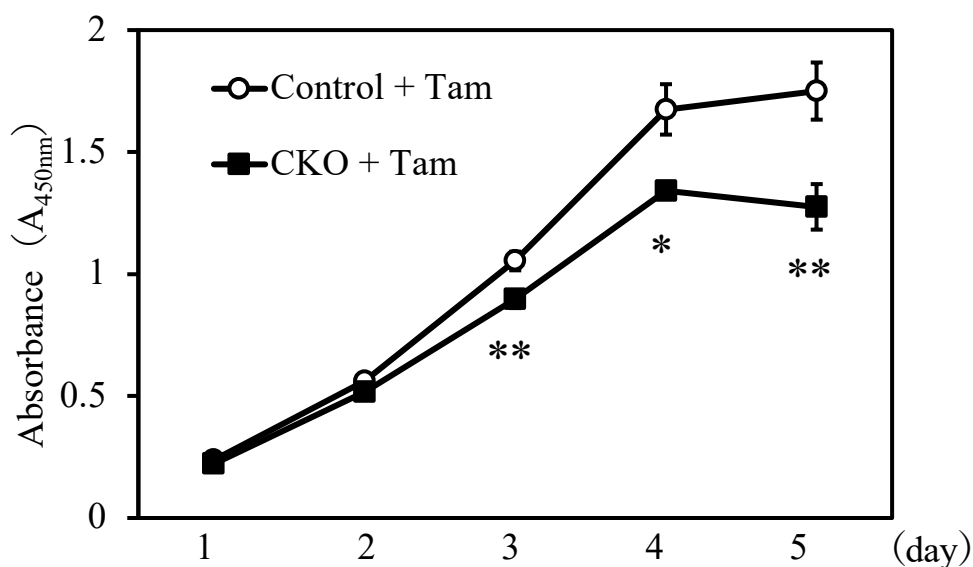


図 2 0 初代培養軟骨細胞の増殖能

Significant difference * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t-test)

第 2 項 軟骨分化因子の mRNA 発現量

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

- 1) DMEM/F12 (1:1) [nacalai tesque 社製]
- 2) Bovine insulin [SIGUMA-ALDLICH 社製]
- 3) Human transferrin [和光純薬社製]
- 4) Sodium selenite [SIGUMA-ALDLICH 社製]
- 5) PBS (Phosphate Buffered Salts) Tablets (Ca, Mg-Free) [TaKaRa 社製]
- 6) PCR 用プライマー：以下に示すプライマーを TE 緩衝液で 20 μ M になるように調製した。

マウス RPLP2 mRNA 増幅用プライマー [invitrogen 社に合成依頼]

(GenBank Accession Number : NM_026020)

上流プライマー (136~155) : 5'- TACTAGACAGCGTGGGCATC -3'

下流プライマー (218~237) : 5'- CAACACCCTGAGCGATGACA -3'

その他の試薬および化合物は、本章第 1 節、第 2 節第 5 項、第 3 節第 1 項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

- 1) 分化用培地 : DMEM/F12 (1:1) 475 mL に FBS 25 mL、Human transferrin 500 μ L、Bovine insulin 2.5 mL、Sodium selenite 50 μ L を混合したのち、NaHCO₃ を添加
- 2) 0.2 % DEPC 処理 PBS : 超純水 1 L に DEPC を 2 mL 添加し、スターラーで 1 晩攪拌させた。その後、PBS Tablets (Ca, Mg-Free) 10 錠を溶解させた後、高圧蒸気滅菌した。

その他の試薬は、本章第 1 節、第 2 節第 5 項、第 3 節第 1 項と同様に調製した。

3. マウス

本章第 1 節と同様のマウスを使用した。

4. 遺伝子型の評価

本章第 1 節と同様に行った。

5. UBIAD1 欠損マウス由来初代培養軟骨細胞の単離

本章第 3 節第 1 項と同様に行った。

6. 培養方法

播種日を 0 日目とし、1 mM の 4-OH Tamoxifen を 1 μ M となるように添加した増殖培地で 7 日間培養した。その後、分化培地に置換し、5、10、15 日間培養を行った。

7. UBIAD1 欠損の誘導

本章第 3 節第 1 項と同様に行った。

8. mRNA 発現量の測定

1) 初代培養軟骨細胞の全 RNA の抽出

培地をアスピレーターで吸引除去し、0.2%DEPC 処理 PBS (–) 1~2 mL を添加し、細胞を洗った。この操作は 2 回行った。DEPC 処理済み PBS (–) を除去し、ISOGEN を 500 mL 添加した。ISOGEN をかけて細胞を溶解し、1.5 mL チューブに回収した。この 1.5 mL チューブにクロロホルム 0.1 mL を加え、60 秒間ボルテックスでミキシングを行い、氷上で 5 分間静置した。全 RNA の抽出まで -85°C にて保存した。細胞回収液にクロロホルム 0.1 mL を加えて混和し、 4°C 、15,000 \times rpm で 15 分間遠心分離した後、水層（上清）を分取した。上清にイソプロパノール 0.35 mL を加えてよく混和し、室温にて 10 分間放置後、 4°C 、15,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、沈殿に 75%エタノール溶液 1 mL を加えてリンスし、 -9°C 、15,000 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を除去して RNA の沈殿を得た。沈殿を風乾し、DEPC 処理水 10 μ L に完全に溶解させて全 RNA とした。全 RNA 濃度を NanoDrop 2000 [Thermo Fisher Scientific 社製] で 260 nm における吸光度から算出し、全 RNA 濃度が 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ となるように DEPC 処理水で希釈して以下の実験に用いた。

2) 逆転写反応による cDNA の合成

本章第 2 節第 5 項と同様に行った。

3) リアルタイム PCR 法による目的遺伝子 cDNA の定量

本章第 2 節第 5 項と同様に行った。

4) データの解析

データの解析は、CFX リアルタイム PCR システム操作マニュアルに従い、CFX マネージャーソフトウェア [BIO-RAD 社製] にて行った。定量化するために初代培養軟骨細胞の全 RNA から cDNA を合成し、滅菌超純水で 2^n ($n=0\sim3$) 倍ずつ数段階に希釈したものを標準系列用テンプレートとして検量線を作成した。縦軸に TB Green の蛍光検出における threshold の各値のサイクル数 (threshold cycle : Ct)、横軸に初期濃度の対数値をとった。この検量線と未知試料の Ct から目的遺伝子の cDNA 量を算出した。RPLP2 についても同様に cDNA 量を算出し、目的遺伝子の mRNA 量の補正を行った。

9. 統計処理

図中の数値は、全て平均値±標準誤差 (mean±SE) を表す。なお、Control + Tamoxifen 群および CKO + Tamoxifen 群の検体数は $n=6$ である。有意差の検定は、Student's t-test および Tukey's-test を用いた。

— 実験結果 —

初代培養軟骨細胞における UBIAD1 および軟骨分化マーカーの mRNA 発現量を評価した結果を図 2 1 に示す。CKO マウス由来軟骨細胞では、UBIAD1 欠損により UBIAD1 の mRNA 発現が有意に低下していることが確認された。しかし、Control および CKO のいずれの細胞でも分化が進むとともに、UBIAD1 の mRNA 発現量が増加することがわかった。増殖軟骨細胞の分化マーカーである Col2a1 の mRNA 発現量は、分化に伴い増加したが、Control と CKO の間で差は見られなかった。しかし、肥大軟骨細胞の分化マーカーである Col10a1 は、分化とともに増加したが、CKO の方が Control よりも有意に低値であった。

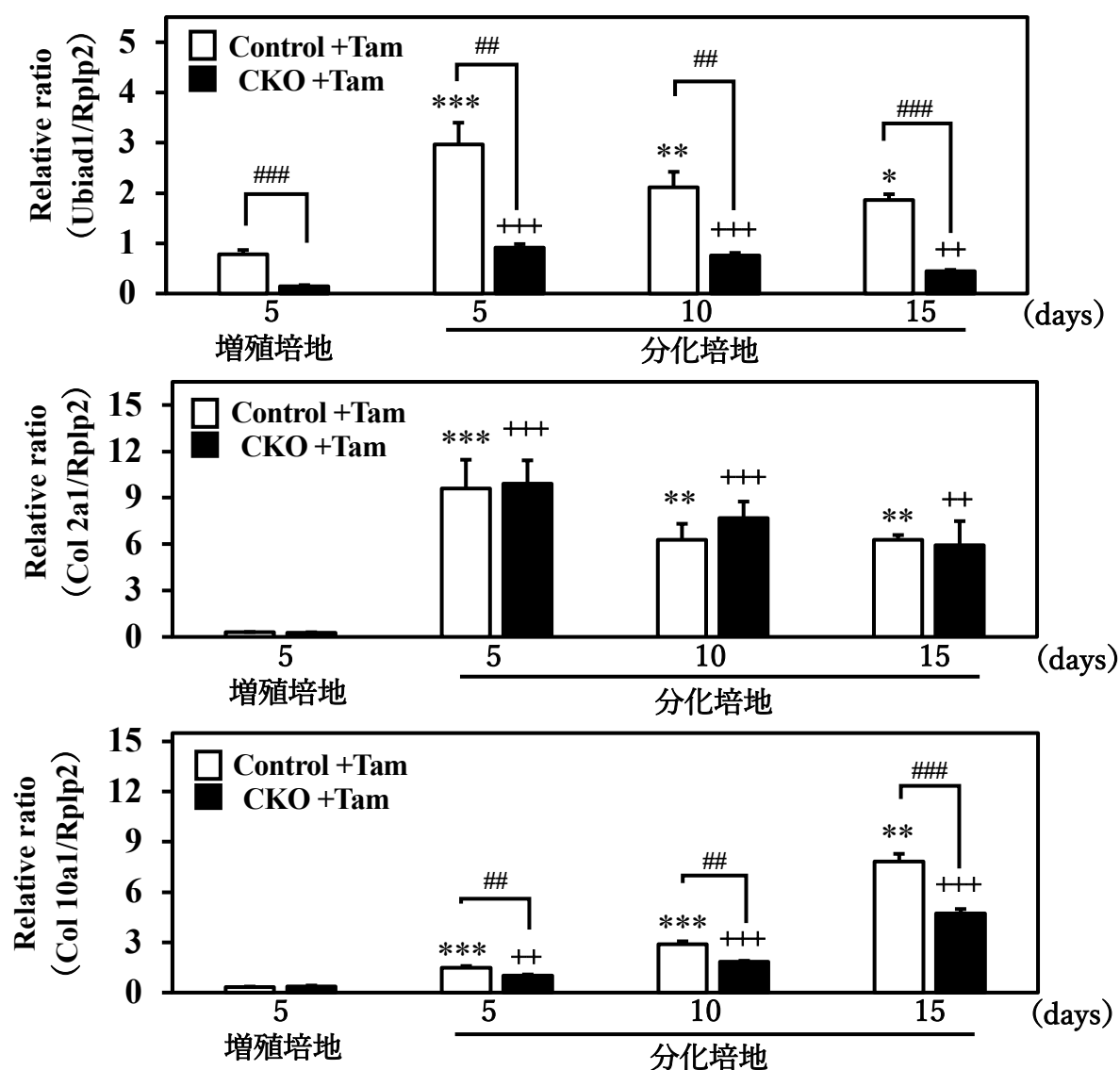


図 2 1 初代軟骨細胞における増殖能

Significant difference
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Control + Tam cultured in growth medium for 5 days (Dunnett's-test)
 ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs CKO + Tam cultured in growth medium for 5 days (Dunnett's-test)
 ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs Control + Tam (Student's t-test)

第4節 考 察

本研究では、時期特異的遺伝子欠損マウスを用いて、骨形成および軟骨形成における UBIAD1 の機能を検討した。その結果、UBIAD1 は骨形成において、特に軟骨細胞の増殖や分化に必須の因子であることが明らかとなった。

MK-4 は、骨芽細胞の分化や骨の石灰化を促進する作用があるため、骨粗鬆症治療薬として臨床応用されている。最近では、ビタミン K 摂取が軟骨の異常により生じる変形性関節症の発症予防に有効であることが報告され、ビタミン K が軟骨形成にも重要であると示唆されている⁴⁴⁾。しかし、骨や軟骨形成に対する UBIAD1 の役割は明らかではない。そこで私は、Tamoxifen 誘導型全身性 UBIAD1 欠損マウスに骨成長が著しい生後 1 週齢から Tamoxifen を 4 日間連続で腹腔内投与することで UBIAD1 欠損を誘導し、4 週齢における骨組織を解析した。UBIAD1 欠損を誘導した 4 週齢における CKO マウスは Control マウスと比べ、体長が著しく低下し、大腿骨の顕著な短縮が認められた。UBIAD1 欠損を誘導したマウス的大腿骨中 MK-4 濃度が有意に低下し、骨密度の減少が認められた。以上のことから、UBIAD1 が欠損することで骨形成が低下することが分かった。1960 年に Bouckaert らによりビタミン K の骨に対する作用として、MK-4 が骨折治癒および骨形成促進作用を有することが初めて報告された⁴⁵⁾。MK-n のうち MK-7 は納豆に多く含まれるが、閉経後女性における納豆の摂取量と骨折の関連についての検討により、納豆の摂取量と血清中の MK-7 の濃度は相関しており、地域における納豆の消費量と大腿骨骨折患者数が逆相関することが報告された⁴⁶⁾。ビタミン K は、GGCX の捕因子として働き、骨に分布するビタミン K 依存性タンパク質である OC や MGP を活性化することで骨形成を促進され⁴⁷⁾、OC ノックアウトマウスでは、骨吸収は阻害されないが骨形成能が亢進するため、骨のリモデリングバランスが崩れ、骨の脆弱性が増すことが知られている⁴⁸⁾。MGP ノックアウトマウスでは、全身の軟骨や動脈壁に異所性の石灰化が認められ、UBIAD1 または MK-4 は、血管細胞内のコレステロール濃度を制御し、血管細胞の分化や石灰化を抑制することが報告されている⁴⁹⁾。また、Inoue らは、MK-4 が SXR のリガンドとして働き、破骨細胞分化因子である RANKL 分子のデコイ受容体として破骨細胞の分化と骨吸収機能を抑制する osteoprotegerin (OPG) や骨の石灰化に関わる alkaline phosphatase (ALP) や細胞外マトリックスでありコラーゲンの蓄積に関与する TSK と MATN2 の遺伝子発現誘導を行うことを明らかにした^{14,50-52)}。また、MK-4 が protein kinase A のリン酸化を介して骨芽細胞分化誘導因子である GDF15 や STC2 の遺伝子発現を誘導することを報告した¹⁵⁾。破骨細胞は cyclooxygenase-2 (COX-2) により産生される prostaglandin E2 (PGE2) により分化誘導されることが知られているが⁵³⁾、MK-4 は COX-2 および PGE2 を阻害することで破骨細胞の分化抑制作用を示し⁵⁴⁻⁵⁹⁾、さらに破骨細胞のアポトーシス誘導作用があることが報告されている^{55,60)}。以上のことから、UBIAD1 は、MD から MK-4 へ変換する唯一の酵素であるので、UBIAD1 欠損の誘導により MK-4 が不足することで、MK-4 の多岐にわたる機能が低下し、CKO マウスの骨成長不全や骨密

度の低下に繋がっていると考えられる。また、Nakagawa らにより、全身性 UBIAD1 ノックアウトマウスが胎生致死となることや⁴²⁾、成熟後のマウスにおける UBIAD1 欠損によって、膵腺房細胞において酸化ストレスの蓄積や異常なオートファジーやアポトーシスが起こり、膵臓が萎縮することが報告されている⁴³⁾。このことは、UBIAD1 が細胞の増殖、分化、生存能の維持に重要な役割を果たしていることを示しており、本研究において骨の増殖と分化が UBIAD1 欠損によって影響を受ける可能性を示唆している。

骨組織標本の Safranin O 染色では、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスにおいて、増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層の減少、コラーゲン繊維の形態的变化が観察された。また、骨組織において、軟骨細胞分化関連遺伝子である Sox9 や Col2a1、Col10a1 の mRNA 発現の有意な減少が見られ、軟骨分化の低下が認められた。

一般的に、四肢や体幹の骨は内軟骨性骨化によって形成される。内軟骨性骨化は、間葉系細胞が凝集し軟骨原基が形成されることから始まる。軟骨細胞は中心部に向かって増殖・成熟し、静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層から成る成長板を形成する。肥大軟骨細胞はさらに成熟すると基質の石灰化が起こる。石灰化軟骨部位に血管が侵入するとともに、周辺の骨芽細胞や間葉系細胞が軟骨内に侵入し、骨髄が形成されて行く⁶¹⁾。このように、骨の長軸方向への成長は、骨芽細胞や破骨細胞、軟骨細胞のうち軟骨細胞の成熟が重要であると言える。本研究では、大腿骨骨端軟骨部の層構造及びカラム構造に異常をきたしていることが確認され、骨成長の著しい低下は、増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層の減少が原因であると考えられる。肝細胞癌由来 HuH7 細胞に SXR を過剰発現させると、細胞の増殖阻害が観察され、さらに MK-4 処理すると阻害効果が増強することが明らかとなった⁶²⁾。他の肝癌細胞においても、NFκB の活性化を阻害すると細胞増殖能が低下する。MK-4 により活性化された SXR の増殖阻害機序は明らかになっていないが、SXR は NFκB と相互作用し、コリプレッサーとして働き、NFκB の活性を阻害することが示唆されている⁶³⁾。MK-4 は、骨芽細胞のアポトーシス抑制作用や分化促進作用があることが報告されている^{56, 57, 64)}。さらに、MK-4 は SXR を介して、細胞外マトリックスをコードする TSK と MATN2 の発現誘導を行い、コラーゲン蓄積を増加することが報告されている¹⁴⁾。本研究において、UBIAD1 が欠損したマウスでは TSK や MATN2 の発現が低下し、骨端軟骨細胞層のコラーゲン繊維が密となり、圧縮された状態になった可能性が高い。また、軟骨分化や性分化に必須の因子である Sox9 に対する肋軟骨部位に特異的なエンハンサー (Rib Cage Specific Enhancer: RCSE) を CRISPR/Cas9 を用いて欠失させたノックアウトマウスにおいて、増殖軟骨細胞層の狭小化が認められた⁶⁵⁾。Aggrecan ノックアウトマウスの解析においても、長管骨の長軸方向の成長および海綿骨の形成は、ほぼ完全に抑制され、成長板のカラム構造に乱れが生じており、増殖軟骨細胞数の減少やアポトーシスの亢進が生じていることが報告されている⁶⁶⁾。これまでに、全身性 UBIAD1 欠損マウスが 7.5 日で卵割が停止し、胎生致死となり、細胞増殖が起こらないことが明らかにされている⁴²⁾。さらに、膵臓における UBIAD1 の欠損では、酸化ストレスの増加やオートファジーの亢進により、膵腺房細胞の消失と空洞化による膵臓組織の萎縮が起こり、MK-4 で

の回復が観られないことを明らかにしている⁴³⁾。以上のことから、骨組織標本や大腿骨頭軟骨組織における UBIAD1 の機能を評価した結果、UBIAD1 の欠損は骨形成、特に軟骨細胞の増殖・分化を抑制しており、UBIAD1 が軟骨細胞の機能を制御し、骨形成および軟骨形成を促進する役割を担っていることが示唆された。

しかし、本研究では、Tamoxifen 誘導型全身性 UBIAD1 欠損マウスを使用しており、UBIAD1 欠損の影響が軟骨細胞特異的であるとは言えない。そのため、軟骨での UBIAD1 欠損の影響を細胞レベルで検討するために、初代培養軟骨細胞を単離し、増殖能および分化能を評価した。UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウス由来軟骨細胞では、増殖能の低下が認められた。軟骨分化を誘導した場合には、X 型コラーゲンの mRNA 発現量が減少しており、肥大軟骨への分化能が低下していた。細胞レベルでの研究においても、マウス個体レベルと同様の結果が得られたことから、UBIAD1 は骨形成において、特に軟骨細胞の増殖・分化を促進することが明らかとなった。しかし、軟骨細胞に対する MK-4 の生理作用や UBIAD1 の作用機序は明らかとなっておらず、軟骨細胞の増殖能および分化能の低下が UBIAD1 の欠損由来か MK-4 不足由来であるのか検討する必要があると考えている。

第 5 節 小 括

遺伝子欠損マウスを用いて UBIAD1 の骨形成における機能解析を試み、以下の結果を得た。

- (1) UBIAD1 欠損により、体重および大腿骨長が低値となった。
- (2) UBIAD1 欠損により、大腿骨中の MK-4 濃度は低下した。
- (3) UBIAD1 欠損により、大腿骨における海面骨の骨梁が著しく低下し、皮質骨が薄くなる。さらに、海面骨、皮質骨の骨密度が低下した。
- (4) UBIAD1 欠損により、増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層の厚みが薄くなり、コラーゲン繊維が密で軟骨細胞が潰れていた。
- (5) UBIAD1 欠損により、大腿骨頭における軟骨分化関連因子の mRNA 発現量が低下した。
- (6) UBIAD1 欠損により、軟骨細胞レベルで増殖能が低下することがわかった。
- (7) UBIAD1 欠損により、軟骨細胞レベルで軟骨分化関連因子の mRNA 発現量が低下しており、特に肥大軟骨細胞への分化が抑制されることが明らかとなった。

第2章 マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いた

UBIAD1 の機能解析

第1章では、骨の成長が著しい幼若期における UBIAD1 欠損により大腿骨の顕著な短縮や骨密度が低下し、骨および軟骨形成が有意に低下することが明らかとなった。また、内軟骨性骨化に重要な軟骨細胞において、UBIAD1 の欠損は、増殖能および肥大軟骨細胞への分化能を低下させることも明らかとなった。以上のことから、UBIAD1 が骨・軟骨形成において UBIAD1 が重要な役割を担っていることが示唆された。しかし、軟骨形成の低下が、UBIAD1 の消失そのものによるものか、UBIAD1 による MK-4 の生合成が消失し、MK-4 が不足したことによるものかは明らかではない。

そこで著者は、ATDC5 細胞を用いて、骨形成に対する UBIAD1 のノックダウンの影響を評価した（第1節）。また、ATDC5 細胞に対し MK-4 を添加することで、軟骨細胞に対する MK-4 の直接的な作用について評価した（第2節）。さらに、UBIAD1 発現プラスミドを導入し、UBIAD1 過剰発現が ATDC5 細胞に与える影響について評価した（第3節）。

第1節 siRNAによるUBIAD1ノックダウンの影響

第1項 増殖能

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

- 1) Lipofectamine™ RNAiMAX [Invitrogen 社製]
- 2) Opti-MEM® I Reduced Serum Medium [Invitrogen 社製]
- 3) HiLyte Fluor™488 修飾ユニバーサルネガティブコントロール siRNA (siControl) [ニッポン・ジーン社製]
- 4) マウス UBIAD1 mRNA に対する siRNA (siUBIAD1) オリゴヌクレオチド [Invitrogen 社製]
siUBIAD1 [GenBank Accession Number : NM_027873 (921~945)]
センス鎖 : 5'-CCCUGGCCAUCUCCCCUCUAAUCUA-3'
アンチセンス鎖 : 5'-UAGAUUAGAGGGAAGAUGGCCAGGG-3'
- 5) PCR 用プライマー : 以下に示すプライマーを TE 緩衝液で 20 μM になるように調製した。

マウス UBIAD1 mRNA 増幅用プライマー [invitrogen 社に合成依頼
(GenBank Accession Number : NM_027873)]
上流プライマー (52~73) : 5'- TGAGGCGGGTTATTGAGTTGTG -3'
下流プライマー (159~180) : 5'- GGGAAACTGAAGACAGCAACC -3'

その他の試薬および化合物は、第1章第2節5項、第3節第1、2項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

- 1) PBS (-) : 超純水 1L に PBS Tablets (Ca, Mg-Free) 10 錠を溶解させた後、高圧蒸気滅菌した。

第1章第2節5項、第3節第1、2項と同様に調製した。

3. 細胞

マウス前駆軟骨細胞株 (ATDC5 細胞) [Riken Cell Bank から購入] : 5%FBS、1%PS を含むDMEM/Ham's F-12 培地 (5%FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 培地) で、5%CO₂ 存在下、37°Cで培養した。継代を 3 日毎に行い細胞を維持した。分化培養は、増殖培地 (5%FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 培地) で 3 日培養後、分化培地 (10 µg/mL Bovine insulin, 10 µg/mL human Transferrin, 3×10⁻⁸ M Sodium selenite, 5%FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 培地) に置換し、5%CO₂ 存在下、37°Cで培養を行った。

4. siRNA リバーストランスフェクション

1) 6 穴プレート

6 穴プレートに 1 穴あたり Opti-MEM® I Reduced Serum Medium 500 µL を加え、各種 siRNA または siControl 1.5 µL および Lipofectamine™ RNAiMAX 5 µL を加え、混合した。室温で 15 分インキュベートした後、ATDC5 細胞を 5 %FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 培地 (PS-free) 中に 2×10⁵ cells/2 mL/well となるように播種し、5%CO₂ 存在下、37°Cで培養した。

2) 96 穴プレート

1 サンプルあたり Opti-MEM® I Reduced Serum Medium 20 µL、各種 siRNA または siControl 0.06 µL および Lipofectamine™ RNAiMAX 0.2 µL を混合した。室温で 15 分インキュベートした後、96 穴プレートに混和した Transfection 溶液を 20 µL ずつ分注する。ATDC5 細胞を 5 %FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 培地 (PS-free) 中に 1×10⁴ cells/100 µL/well となるように播種し、5%CO₂ 存在下、37°Cで培養した。

5. mRNA 発現量の測定

1) 細胞からの全 RNA の抽出

第1章第3節第2項と同様に行った。

2) 逆転写反応による cDNA の合成

第1章第2節第5項と同様に行った。

3) リアルタイム PCR 法による目的遺伝子 cDNA の定量

第1章第2節第5項と同様に行った。なお、マウス UBIAD1 の増幅サイズは 129 bp である。

4) データの解析

データの解析は、CFX リアルタイム PCR システム操作マニュアルに従い、CFX マネージャーソフトウェア [BIO-RAD 社製] にて行った。定量化するために ATDC5 細胞の全 RNA から cDNA を合成し、滅菌超純水で 2^n ($n=0\sim3$) 倍ずつ数段階に希釈したものを標準系列用テンプレートとして検量線を作成した。縦軸に SYBR Green の蛍光検出における threshold の各値のサイクル数 (threshold cycle : Ct) 、横軸に初期濃度の対数値をとった。この検量線と未知試料の Ct から目的遺伝子の cDNA 量を算出した。RPLP2 についても同様に cDNA 量を算出し、目的遺伝子の mRNA 量の補正を行った。

6. WST-8 assay

第1章第3節第1項と同様に行った。

7. 統計処理

図中の数値は、全て平均値±標準誤差 (mean±SE) を表す。なお、siControl 群および siUbiad1 群の検体数は $n=6$ である。有意差の検定は、Student's t-test を用いた。

— 実験結果 —

siControl または siUbiad1 を導入した ATDC5 細胞における UBIAD1 mRNA 発現量を測定した結果を図 2 2 に示す。siControl を導入した細胞と比較して、siUbiad1 を導入した細胞では、UBIAD1 mRNA 発現量が有意に低下した。siUbiad1 を導入した ATDC5 細胞では siControl 導入細胞と比べ、増殖能が有意に低下した（図 2 3）。

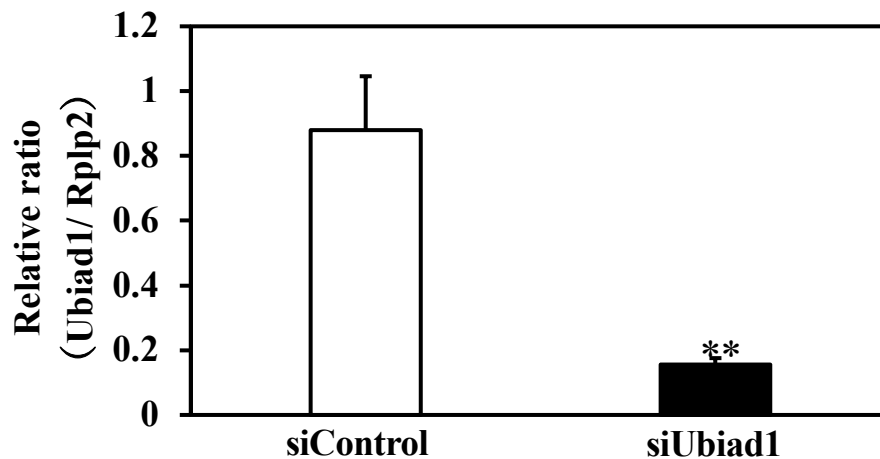


図 2 2 siUbiad1 導入 ATDC5 細胞の UBIAD1 mRNA 発現量

Significant difference ** $p < 0.01$ vs siControl (Student's t-test)

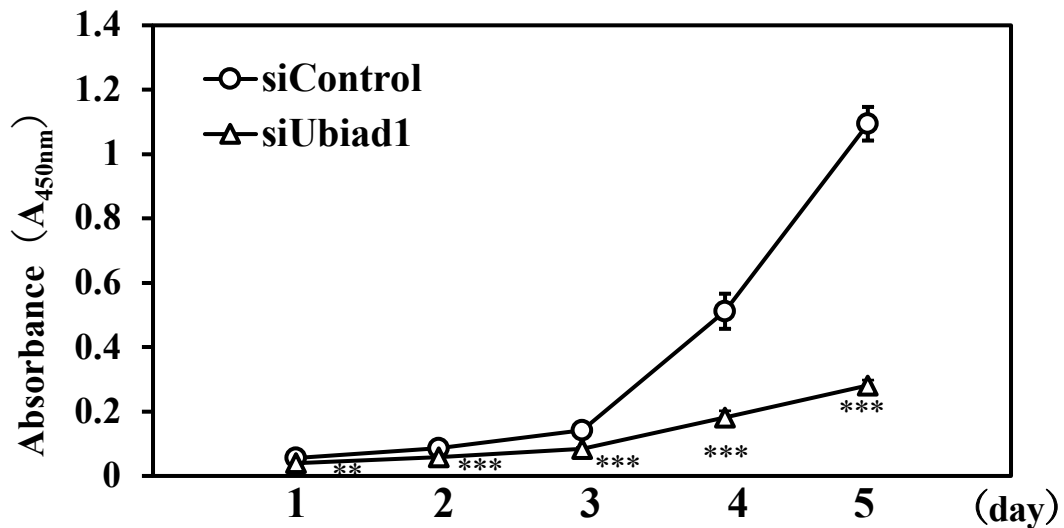


図 2 3 siUbiad1 導入 ATDC5 細胞の増殖能

Significant difference ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs siControl (Student's t-test)

第2項 分化能

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

- 1) アルシアンブルー染色液 [nacalai tesque 社製]
- 2) グアニジン塩酸塩 [nacalai tesque 社製]

その他の試薬および化合物は、第1章第2節5項、第3節第1、2項、本章第1節第1項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

- 1) 6 M Guanidine-HCl: グアニジン塩酸塩 57.318 g を滅菌超純水 100 mL に溶解した。

そのほかの試薬は、第1章第2節5項、第3節第1、2項と同様に調製した。

3. 細胞

本章第1節第1項と同様のものを使用した。

4. siRNA リバーストランスフェクション

本章第1節第1項と同様に行った。

5. Alcian Blue 染色

細胞を PBS (–) で2回洗浄後、100%MeOH を12穴プレートに入れ、20分置くことで細胞を固定した。MeOH を除去後、アルシアンブルー染色液を入れ、一晩置いた。染色液を除去し、超純水で2回洗浄後、観察を行った。また、定量する場合は、6 M Guanidine-HCl 225 μ L を12穴プレートに入れ6時間置いた後に、200 μ L を96穴に移し、マイクロプレートリーダー (SH-1200Lab [CORONA ELECTRIC 社製]) を用い、620 nm にて吸光度を測定した。

6. 統計処理

本章第1節第1項と同様に行った。

— 実験結果 —

UBIAD1 をノックダウンした ATDC5 細胞の分化能を評価した結果を図 2 4 に示す。siControl を導入した細胞では分化に伴い Alcian blue の強い染色が認められた。これに対し、siUbiad1 を導入した ATDC5 細胞において軟骨細胞分化能の低下が認められた。さらに、染色されたアルシアンブルー色素を定量したところ、siUbiad1 を導入した細胞は、siControl 導入細胞に比べ、アルシアンブルーによる染色が有意に低下していることがわかった (図 2 5)。

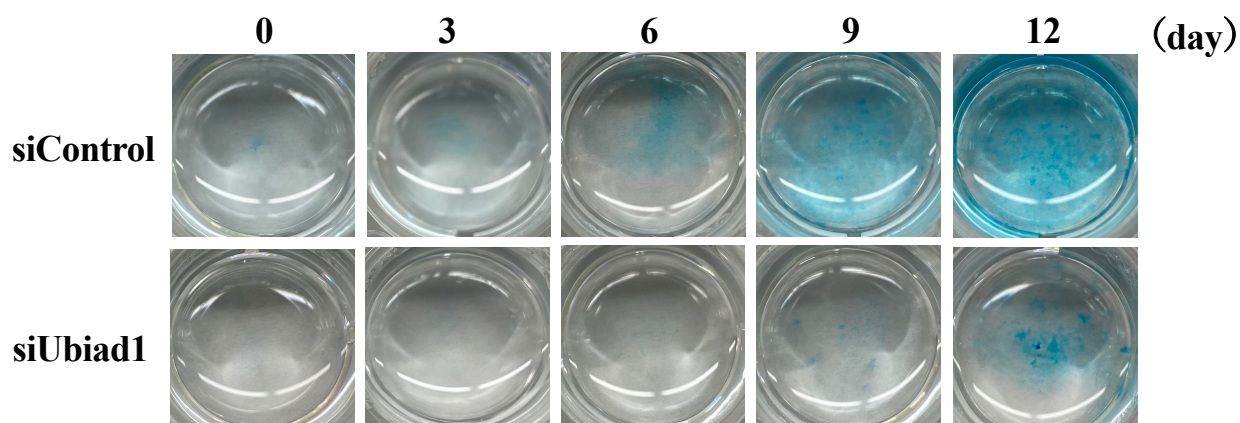


図 2 4 siUbiad1 導入 ATDC5 細胞の分化能 (アルシアンブルー染色)

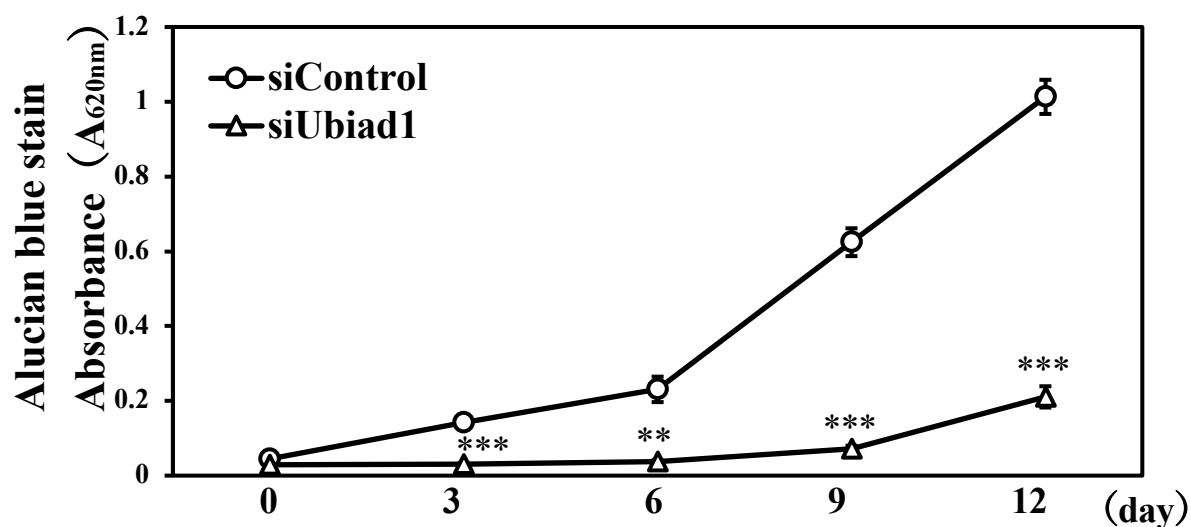


図 2 5 siUbiad1 導入 ATDC5 細胞の分化能 (アルシアンブルー染色量)

Significant difference ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs siControl (Student's t-test)

第3項 軟骨分化因子の mRNA 発現量

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

第1章第2節5項、第3節第1、2項、本章第1節第1項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

第1章第2節5項、第3節第1、2項と同様に調製した。

3. 細胞

本章第1節第1項と同様のものを使用した。

4. siRNA リバーstransフェクション

本章第1節第1項と同様に行った。

5. mRNA 発現量の測定

1) ATDC5 細胞の全 RNA の抽出

第1章第3節第2項と同様に行った。

2) 逆転写反応による cDNA の合成

第1章第2節第5項と同様に行った。

3) リアルタイム PCR 法による目的遺伝子 cDNA の定量

第1章第2節第5項と同様に行った。

4) データの解析

第1章第3節第2項と同様に行った。

6. 統計処理

本章第1節第1項と同様に行った。

— 実験結果 —

軟骨分化マーカーである Col2a1 は軟骨細胞の分化が始まる初期に発現が増加し、Col10a1 はそれよりも遅れて分化の後期に発現が増加する因子である。そこで分化培養 3 日目における Col2a1 の mRNA 発現量を、分化培養 6 日目における Col10a1 の mRNA 発現量を評価した (図 2 6)。その結果、siUBIAD1 導入細胞では、siControl 導入細胞に比べ、Col2a1 および Col10a1 の mRNA 発現量が有意に低下した。

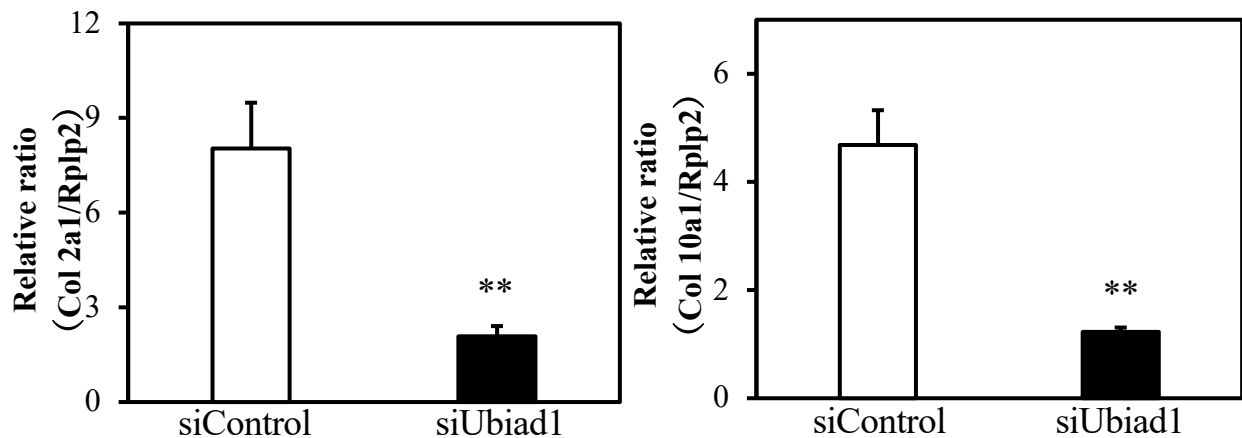


図 2 6 siUbiad1 導入 ATDC5 細胞の軟骨分化因子の mRNA 発現量

Significant difference ** $p < 0.01$ vs siControl (Student's t-test)

第2節 MK-4 処理による影響

第1項 増殖能

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

1) MK-4 [和光純薬社製]

その他の試薬および化合物は、第1章第2節5項、第3節第1、2項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

1) MK-4 濃度が 0.05 mM、0.1 mM、0.5 mM、1 mM となるように MK-4 [和光純薬社製] をエタノールに溶解した。

その他の試薬は、第1章第2節5項、第3節第1、2項と同様に調製した。

3. 細胞

本章第1節第1項と同様のものを使用した。

4. siRNA リバーストランスフェクション

本章第1節第1項と同様に行った。

5. 培地中への MK-4 の添加

siControl または siUbiad1 が導入された ATDC5 細胞に、最終濃度が 0.05 μ M、0.1 μ M、0.5 μ M、1 μ M となるように培地 2 mL に対し 2 μ L の各濃度の MK-4 を添加し、MK-4 が処理された状態で 5%CO₂ 存在下、37°C で培養した。なお、コントロールには、エタノールを添加した。（いずれも培地中のエタノール含量は 0.1% になるようにした。）

6. WST-8 assay

第1章第3節第1項と同様に行った。

7. 統計処理

図中の数値は、全て平均値±標準誤差（mean±SE）を表す。なお、すべての群の検体数はそれぞれ $n=6$ である。有意差の検定は、Student's t-test または Dunnett's t-test を用いた。

— 実験結果 —

siControl または siUbiad1 を導入した ATDC5 細胞に 0.1 μM の MK-4 処理を行い、増殖能を評価した結果を図 2 7 に示す。EtOH を添加した siControl 導入細胞では、MK-4 を処理することにより、増殖能が有意に低下した。一方、siUbiad1 導入細胞では、MK-4 処理による影響は見られなかった。MK-4 処理による影響について用量依存性を検討した結果を図 2 8 に示す。siControl 導入細胞では、MK-4 濃度が増加するとともに増殖能が有意に低下した。

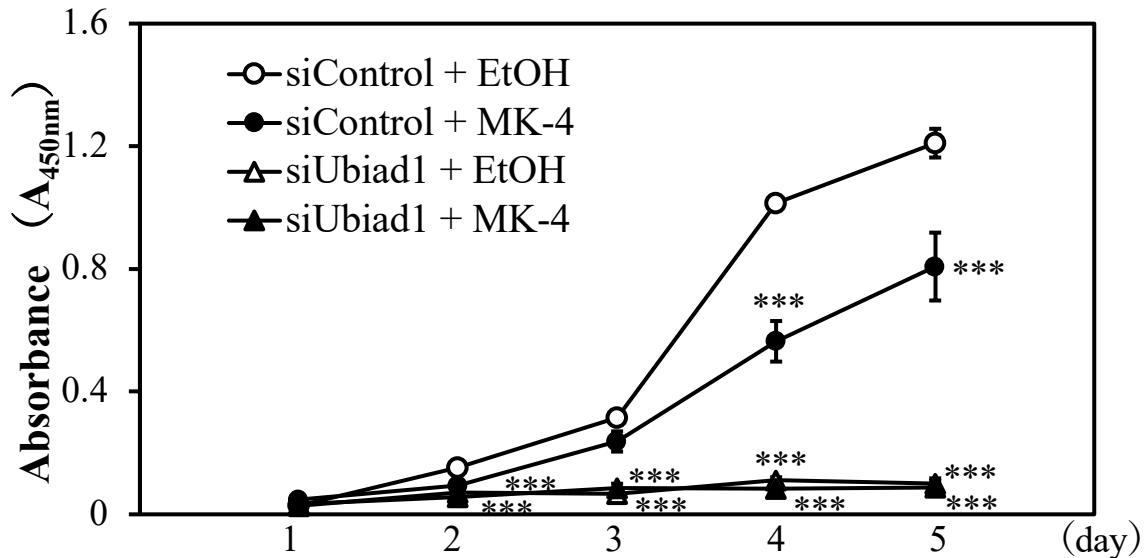


図 2 7 ATDC5 細胞の増殖能に対する MK-4 の影響

Significant difference ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ siControl+EtOH vs siControl+MK-4 (Student's t-test),
$p < 0.05$ siUbiad1+EtOH vs siUbiad1+MK-4 (Student's t-test)

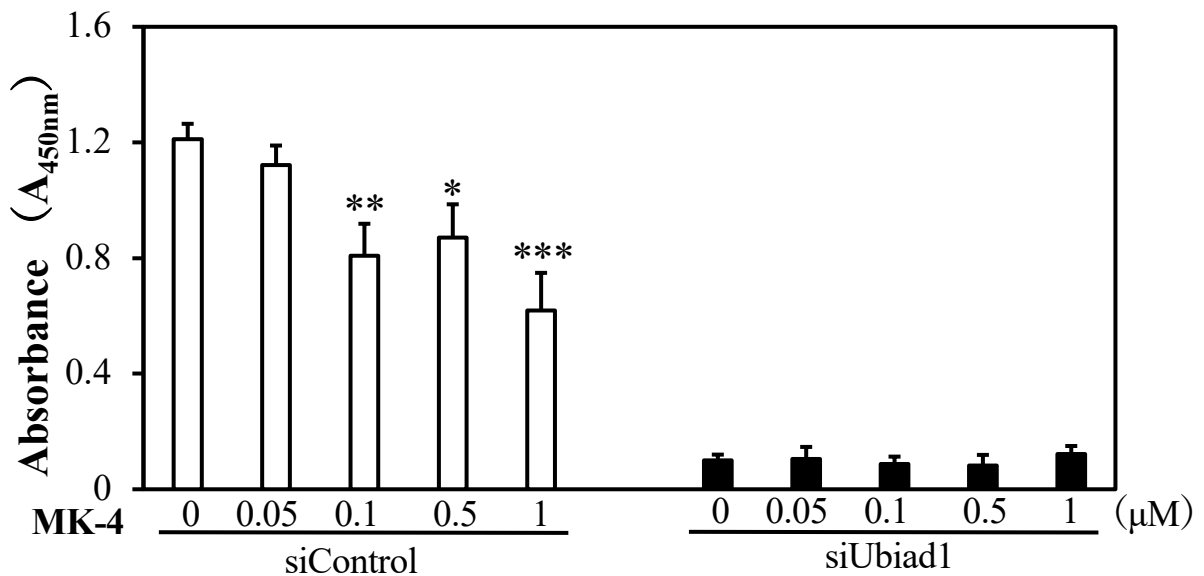


図 2 8 ATDC5 細胞の増殖能に対する MK-4 の影響の用量依存的な影響

Significant difference * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs 0 μM (Dunnett's t-test)

第2項 分化能

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

第1章第2節5項、第3節第1、2項、本章第1節第1、2項、第2節第1項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

第1章第2節5項、第3節第1、2項、本章第1節第1、2項、第2節第1項と同様に調製した。

3. 細胞

本章第1節第1項と同様のものを使用した。

4. siRNA リバーストランスフェクション

本章第1節第1項と同様に行った。

5. Alcian Blue 染色

本章第1節第2項と同様に行った。

6. 統計処理

本章第2節第1項と同様に行った。

— 実験結果 —

siControl または siUbiad1 を導入した ATDC5 細胞に 0.1 μM の MK-4 処理を行い、分化能を評価した結果を図 2 9、図 3 0 に示す。siControl 導入細胞では、分化培養 12 日目において、EtOH 処理細胞に比べ、アルシアンブルーによる染色が僅かに薄くなっていることが観察された (図 2 9)。さらに、染色されたアルシアンブルー色素を定量した結果、EtOH 処理に比べ、MK-4 を処理した場合において、siControl 導入細胞および siUbiad1 導入細胞のいずれにおいてもアルシアンブルーによる染色が有意に低下していることがわかった (図 3 0)。

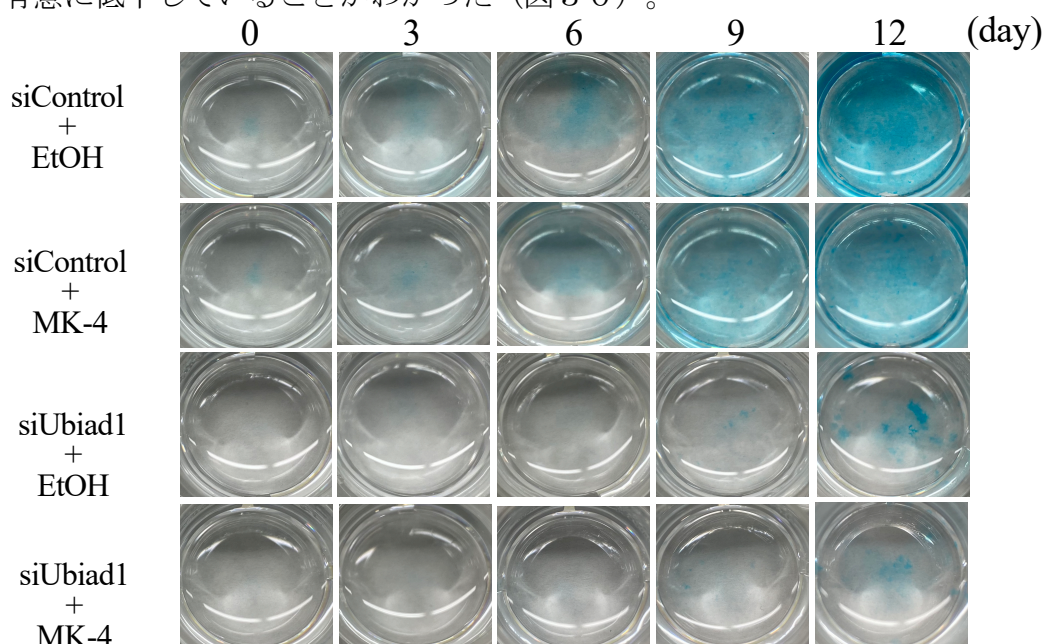


図 2 9 MK-4 処理 ATDC5 細胞の分化能 (アルシアンブルー染色)

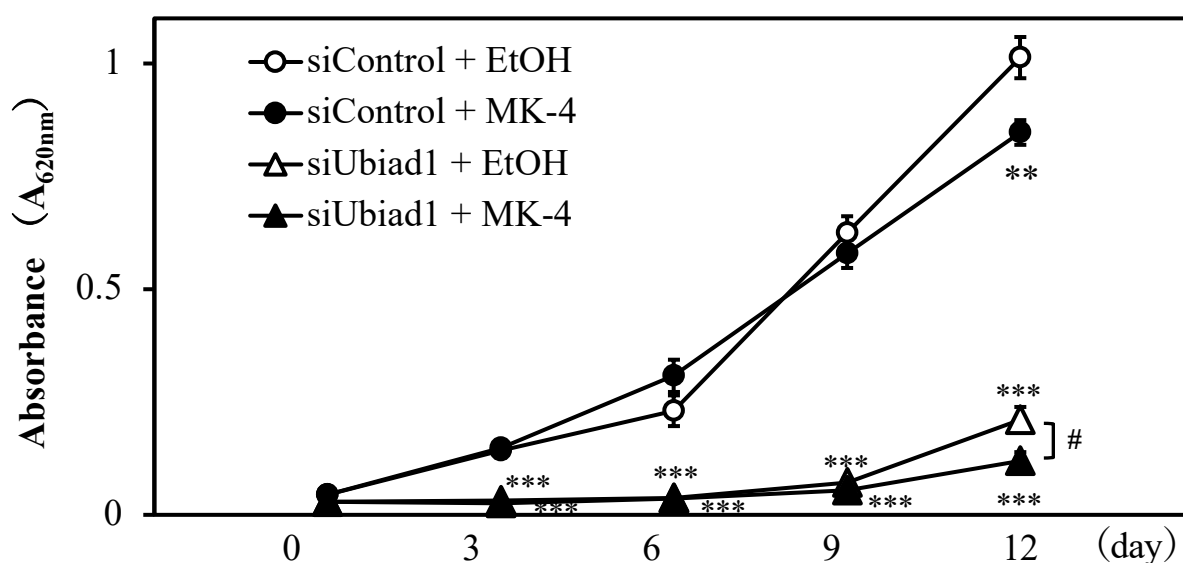


図 3 0 MK-4 処理 ATDC5 細胞の分化能 (アルシアンブルー染色量)

Significant difference ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs siControl+EtOH (Dunnett's test),

$p < 0.05$ siUbiad1+EtOH vs siUbiad1+MK-4 (Student's t-test)

第3節 UBIAD1 発現プラスミド導入の影響

第1項 UBIAD1 発現量および MK-4 合成活性

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

1) Lipofectamine™ 2000 [Invitrogen 社製]

2) プラスミド

(1) pcDNA™3.1 vector (pcDNA 3.1) [Invitrogen 社製] : Cytomegalo virus (CMV) プロモーターを含む発現プラスミド (インサート DNA は組み込まれていない)

(2) pcDNA™3.3-UBIAD1 vector (pcDNA3.3-UBIAD1) [Invitrogen 社に作製依頼] : CMV プロモーターを含む pcDNA™3.3 vector にヒト UBIAD1 遺伝子を組み込んだ UBIAD1 過剰発現プラスミド (図 3 1)

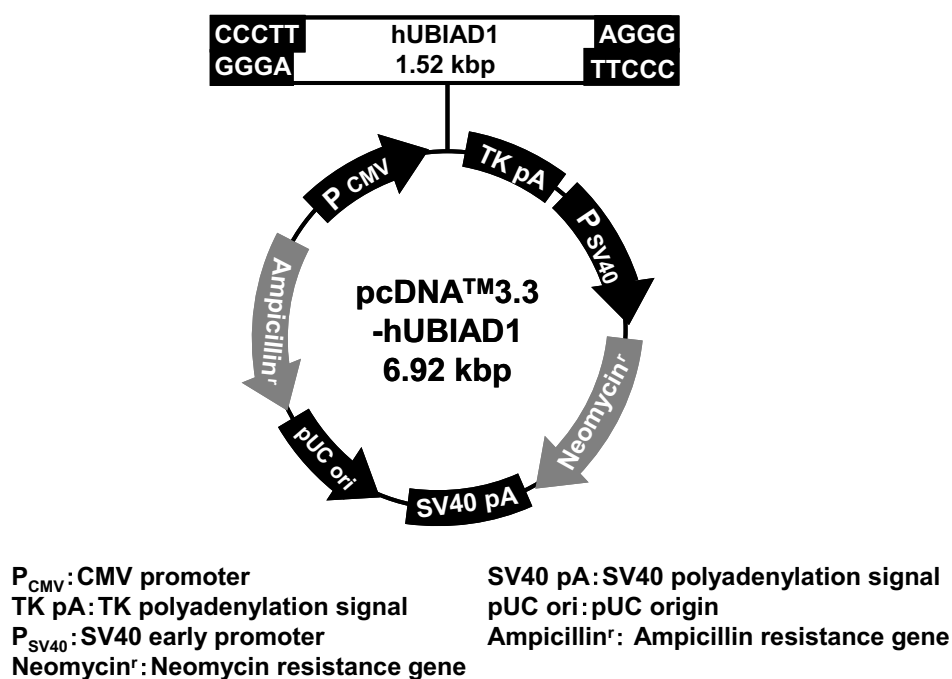


図 3 1 ヒト UBIAD1 発現プラスミド (pcDNA™3.3-hUBIAD1 vector)

3) PCR 用プライマー：以下に示すプライマーを TE 緩衝液で 20 μ M になるように調製した。

- (1) ヒト UBIAD1 mRNA 増幅用プライマー [invitrogen 社に合成依頼]
(GenBank Accession Number : NM_013319)
上流プライマー (840~861) : 5'- CTGGCTCCTTTCTCTACACAGG-3'
下流プライマー (923~944) : 5'- CGTAGGCGAACATCACAGCCAG-3'

4) タンパク質定量キット：BCA protein assay kit [PIERCE 社製]

その他の試薬および化合物は、第1章第2節5項、第3節第2項、本章第1節第1項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

試薬は第1章第2節5項、第3節第2項、本章第1節1項と同様に調製した。

3. 細胞

本章第1節第2項と同様のものを用いた。

4. siRNA リバーストランスフェクション

本章第1節第1項と同様に操作した。

5. 発現プラスミドの導入

1) 6 穴プレート

ATDC5 細胞を 2×10^5 cells/2 mL/well となるように 6 穴プレートに播き、5 %FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 培地で 5%CO₂ 存在下、37°C で 24 時間培養後、プラスミドをリポフェクション法により細胞に導入した。1 穴あたり、pcDNA3.3-UBIAD1 または pcDNA 3.1 を 1 μ g および Lipofectamine™ 2000 を 2.5 μ L、無血清 L-DMEM 培地 600 μ L に溶解してトランスフェクション溶液を作製し、20 分間放置した。細胞の培地を除き、PBS (-) で 2 回洗浄後、トランスフェクション溶液を 1 穴につき 600 μ L ずつ滴下し、5% CO₂ 存在下、37°C で 3 時間培養した。トランスフェクション溶液を除き、5% FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 培地を 1 穴につき 2 mL 加え、5%CO₂ 存在下、37°C で培養した。

2) 96 穴プレート

ATDC5 細胞を 1×10^4 cells/100 μ L/well となるように 96 穴プレートに播き、5%FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 培地で 5%CO₂ 存在下、37°C で 24 時間培養後、プラスミドをリポフェクション法により細胞に導入した。1 サンプルあたり Opti-MEM® I Reduced Serum Medium 30 μ L、pcDNA3.3-UBIAD1 または pcDNA 3.1 を 0.025 μ g、Lipofectamine™ 2000 を 0.125 μ L 混合した。室温で 20 分インキュベートした後、96 穴プレートに混和した Transfection 溶液を 30 μ L ずつ滴下し、5%CO₂ 存在下、37°C で 3 時間培養した。トランスフェクション溶液を除き、5%FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 培地を 1 穴につき 2 mL 加え、5%CO₂ 存在下、37°C で培養した。

6. mRNA 発現量の測定

1) 細胞からの全 RNA の抽出

第 1 章第 3 節第 2 項と同様に行った。

2) 逆転写反応による cDNA の合成

第 1 章第 2 節第 5 項と同様に行った。

3) リアルタイム PCR 法による目的遺伝子 cDNA の定量

第 1 章第 2 節第 5 項と同様に行った。なお、ヒト UBIAD1 の増幅サイズは 105 bp である。

4) データの解析

第 1 章第 3 節第 2 項と同様に行った。

7. 培地中への MD-d₈ の添加

UBIAD1 過剰発現プラスミドが導入された日を 0 日目とし、増殖培養 5 日目の ATDC5 細胞に、最終濃度が 0.1 μ M となるように培地 2 mL に対し 2 μ L の 0.1 mM の MD-d₈ を添加し、5%CO₂ 存在下、37°C で 24 時間培養した。

8. 細胞からのビタミンK化合物の抽出

ATDC5 細胞を PBS (–) で 2 回洗浄後、1 well あたり PBS (–) 1 mL を添加してラバーポリスマンにて剥離し回収した。タンパク質量を測定するため、このうち 20 μ L を分取した後、残りの溶液 980 μ L を褐色遠沈管に取り、エタノール 1 mL、内部標準物質として [18 O]-MK-4 を 3.6 ng/mL となるように溶解したエタノール溶液 1 mL (1 サンプルあたりの内部標準物質量は 3.6 ng である)、ヘキサン 3 mL を加え、5 分間混和した。この溶液を 4°C、2,500 rpm で 5 分間遠心分離し、上清 3 mL を分取してロータリーエバポレーターにて減圧留去した。ヘキサン 2 mL による共沸を行なった後、得られた残渣をメタノール 120 μ L に溶解し、LC-APCI-MS/MS の測定に供した。

9. タンパク質量の測定

細胞のタンパク質量は、BCA protein assay kit を用いて BCA 法により測定した。吸光度 (吸収波長 570 nm) の測定は、MICROPLATE READER (Benchmark [BIO-RAD 社製]) を用いた。

10. LC-APCI-MS/MS 測定

第1章第2節第2項と同様に行った。

11. 統計処理

図中の数値は、全て平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) を表す。なお、すべての群の検体数は n=6 である。有意差の検定は、Student's t-test を用いた。

— 実験結果 —

マウスの UBIAD1 mRNA に対する siUbiad1 を導入した ATDC5 細胞に対して、ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドを導入し、ヒト UBIAD1 を発現させた ATDC5 細胞では、ヒト UBIAD1 mRNA 発現が有意に増加した (図 3 2)。ヒト UBIAD1 を過剰発現させた ATDC5 細胞の MK-4 合成活性を測定した結果、空ベクター導入 (Mock) に比べ、MK-4-d₇ の生成量が有意に増加した (図 3 3)。これにより、発現させたヒト UBIAD1 がビタミン K 変換酵素として機能していることを確認した (図 3 3)。

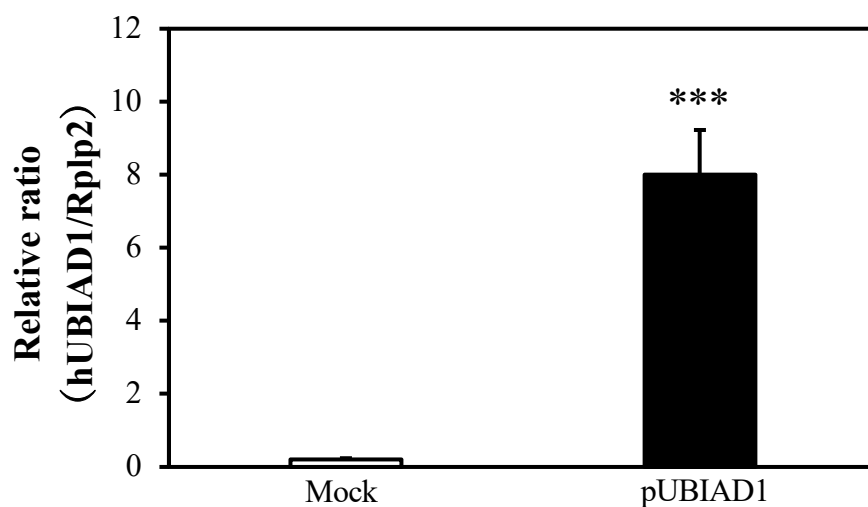


図 3 2 ヒト UBIAD1 過剰発現 ATDC5 細胞におけるヒト UBIAD1 (hUBIAD1) の mRNA 発現量

Significant difference *** $p < 0.001$ (Student's t-test)

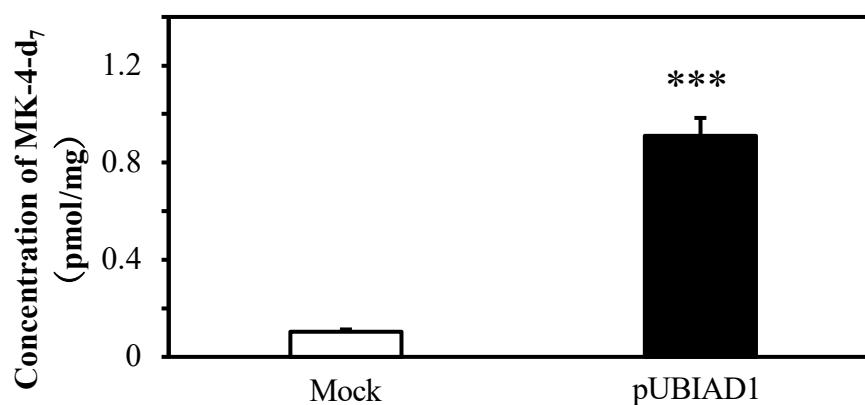


図 3 3 ヒト UBIAD1 過剰発現 ATDC5 細胞における MK-4 合成活性

Significant difference *** $p < 0.001$ (Student's t-test)

第2項 増殖能

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

第1章第2節5項、第3節第1、2項、本章第3節1項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

第1章第2節5項、第3節第1、2項と同様に調製した。

3. 細胞

本章第1節第1項と同様のものを使用した。

4. siRNA リバーストランスフェクション

本章第1節第1項と同様に行った。

5. 発現プラスミドの導入

本章第3節第1項と同様に行った。

6. WST-8 assay

第1章第3節第1項と同様に行った。

7. 統計処理

図中の数値は、全て平均値±標準誤差 (mean±SE) を表す。なお、すべての群の検体数はそれぞれ n=8 である。有意差の検定は、Student's t-test または Dunnett's t-test を用いた。

— 実験結果 —

ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドを siControl 導入 ATDC5 細胞にトランスフェクションした結果、Mock に比べ、増殖能が有意に増加した。ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドを siUbiad1 導入 ATDC5 細胞にトランスフェクションした場合においても同様に、Mock に比べ増殖能が有意に増加した（図34）。増殖培養6日目では、ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドの導入により、siControl+Mock の細胞と同程度にまで増殖能が回復した。

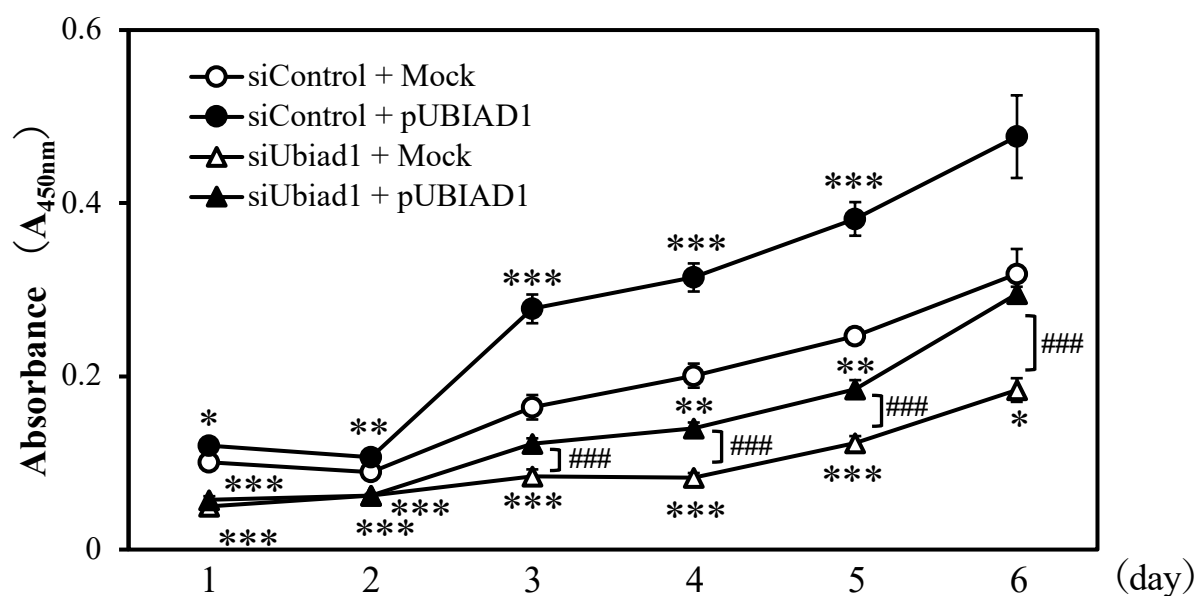


図34 ヒト UBIAD1 過剰発現 ATDC5 細胞における増殖能

Significant difference * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs siControl + Mock (Dunnett's-test)
 ### $p < 0.001$ (Student's t-test)

第3項 分化能

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

第1章第2節5項、第3節第1、2項、本章第1節第1、2項、第2節第1項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

第1章第2節5項、第3節第1、2項、本章第1節第1、2項、第2節第1項と同様に調製した。

3. 細胞

本章第1節第1項と同様のものを使用した。

4. siRNA リバーストランスフェクション

本章第1節第1項と同様に行った。

5. 発現プラスミドの導入

本章第3節第1項と同様に行った。

6. Alcian Blue 染色

本章第1節第2項と同様に行った。

7. 統計処理

本章第2節第1項と同様に行った。

— 実験結果 —

ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドを siControl 導入 ATDC5 細胞にトランスフェクションした結果、Mock に比べアルシアンブルーによる染色が濃くなり、分化能が増加した。ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドを siUBIAD1 導入 ATDC5 細胞にトランスフェクションした場合においても同様に、Mock に比べアルシアンブルーによる染色が増加した（図3 5）。染色されたアルシアンブルー色素を定量した結果、Mock に比べヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドを導入した ATDC5 細胞では、吸光度が有意に増加した（図3 6）。

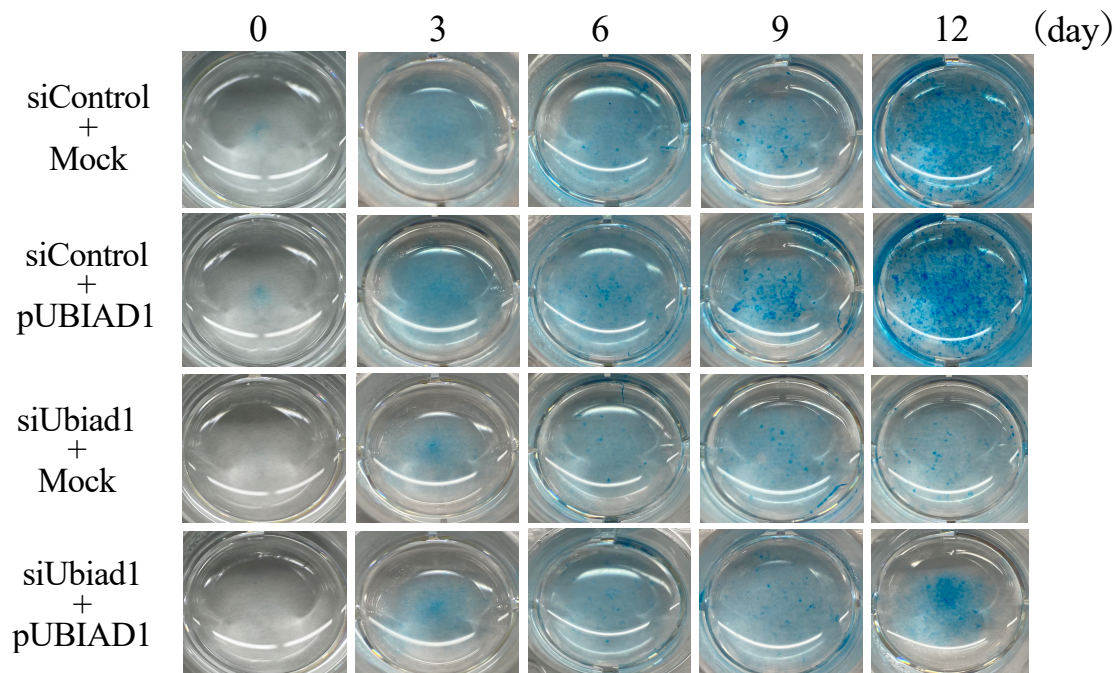


図3 5 ヒト UBIAD1 過剰発現 ATDC5 細胞の分化能（アルシアンブルー染色）

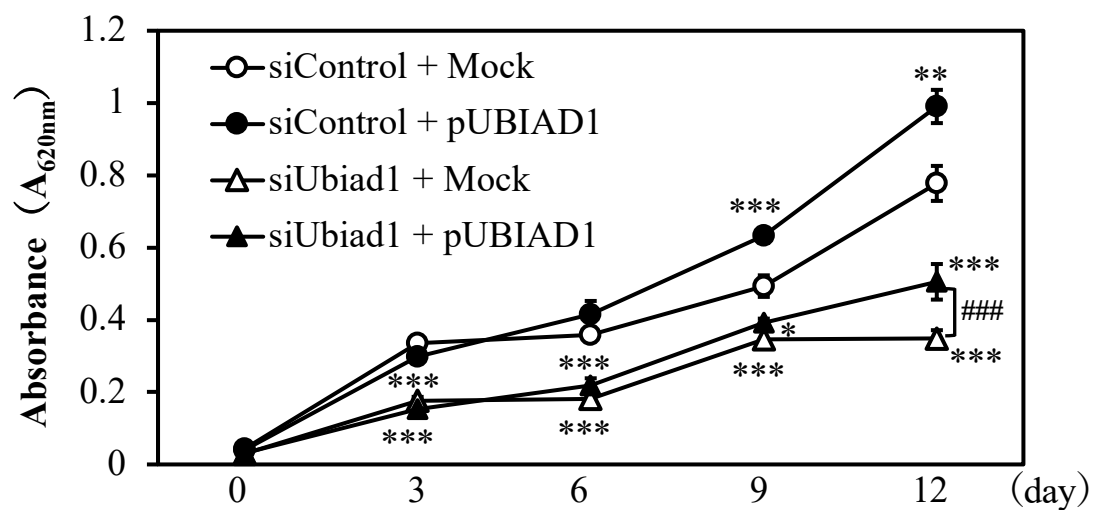


図3 6 ヒト UBIAD1 過剰発現 ATDC5 細胞の分化能 (アルシアンブルー染色量)

Significant difference * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs siControl + Mock (Dunnett's-test)
 ### $p < 0.001$ (Student's t-test)

第4項 軟骨分化因子の mRNA 発現量

— 実験方法 —

1. 試薬および化合物

1) PCR 用プライマー：以下に示すプライマーを TE 緩衝液で 20 μ M になるように調製した。

(1) マウス 18s mRNA 増幅用プライマー [SIGMA genosys 社に合成依頼]

(GenBank Accession Number : NR_003278)

上流プライマー (437~454) : 5'-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3'

下流プライマー (485~504) : 5'-GGGTCGGGAGTGGGTAATTT-3'

その他の試薬および化合物は、第1章第2節5項、第3節第1、2項、本章第1節第1項と同様のものを使用した。

2. 試薬の調製

第1章第2節5項、第3節第1、2項と同様に調製した。

3. 細胞

本章第1節第1項と同様のものを使用した。

4. siRNA リバーストランスフェクション

本章第1節第1項と同様に行った。

5. 発現プラスミドの導入

本章第3節第1項と同様に行った。

6. mRNA 発現量の測定

1) ATDC5 細胞の全 RNA の抽出

第1章第3節第2項と同様に行った。

2) 逆転写反応による cDNA の合成

第1章第2節第5項と同様に行った。

3) リアルタイム PCR 法による目的遺伝子 cDNA の定量

第1第2節第5項と同様に行った。

4) データの解析

第1章第3節第2項と同様に行った。

7. 統計処理

本章第1節第1項と同様に行った。

— 実験結果 —

siControl を導入した ATDC5 細胞では、ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドを導入することで Mock と比べ、軟骨分化因子である Col2a1 および Col10a1 の mRNA 発現量が増加傾向となった。siUBIAD1 導入 ATDC5 細胞では、ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドを導入することにより、Col2a1 および Col10a1 の mRNA 発現量が有意に増加した (図 3 7)。

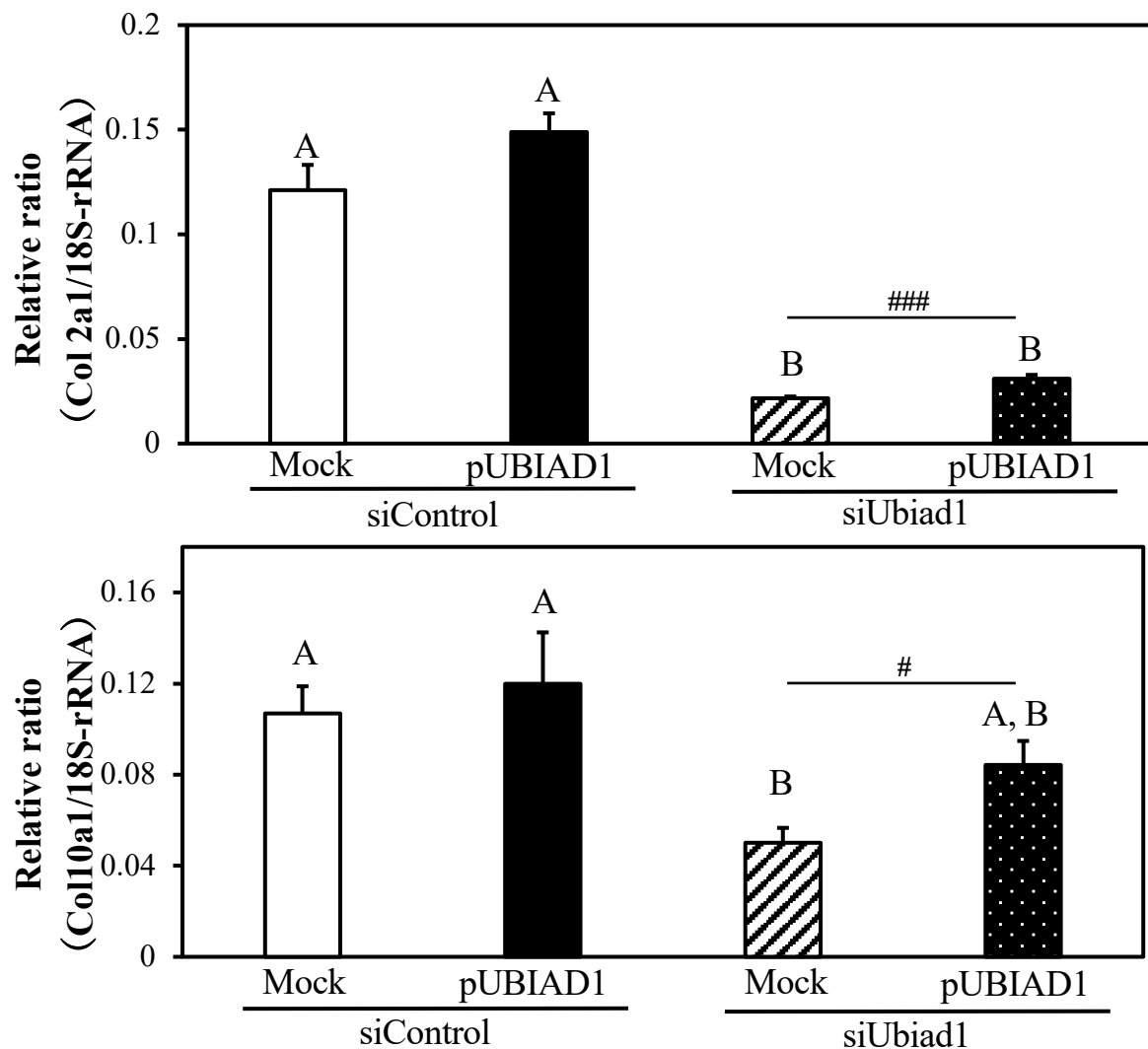


図 3 7 ヒト UBIAD1 過剰発現 ATDC5 細胞における
軟骨分化因子の mRNA 発現量

Significant difference different symbols (A and B) ; $p < 0.05$ (Turkey's HSD test)

$p < 0.05$, ### $p < 0.001$ (Student's t-test)

第4節 考 察

本研究では、UBIAD1 の発現が ATDC5 細胞の軟骨分化に関与していることを見出した。UBIAD1 の siRNA によるノックダウンは ATDC5 細胞の増殖と分化を有意に低下させ、ヒト UBIAD1 の発現プラスミド導入による過剰発現は増殖と分化を回復させた。これらの結果は、UBIAD1 の存在そのものが軟骨細胞の分化に必須な役割を果たしていることを示唆している。

UBIAD1 は MK-4 の生合成だけでなく、脂質やコレステロールの代謝、ミトコンドリア機能の維持にも関与していることが報告されている。全身組織や臓器における UBIAD1 欠損の影響は解析されているが、軟骨細胞における UBIAD1 の重要性は明らかにされていなかった。しかし、第1章において、個体レベルの研究により、UBIAD1 が軟骨細胞の機能に関与することが示唆された。そこで著者は、UBIAD1 の軟骨における役割を明らかにするために ATDC5 細胞を用いた細胞レベルでの研究を行った。ATDC5 細胞では、UBIAD1 発現をノックダウンすることにより、ATDC5 細胞の増殖と分化が顕著に抑制された。UBIAD1 は、がん細胞における機能解析において、transition epithelial response protein 1 (TERE1) として、移行細胞がんや前立腺がん細胞株の増殖を抑制することが知られている⁷¹⁻⁷⁵⁾。しかし、本研究では、軟骨細胞の性質を持つ ATDC5 細胞において、UBIAD1 をノックダウンすると細胞増殖と軟骨分化が抑制され、一方、強制発現させると増殖と分化が促進された。Schumacher らは、UBIAD1 の機能について、GGPP が UBIAD1 の小胞体とゴルジ体間の輸送を制御しており、コレステロール代謝を制御していることを報告している⁷⁶⁾。さらに、Xu らは、UBIAD1 が小胞体とゴルジ体の間で平衡状態にあり、細胞増殖を制御していることを報告している⁷⁷⁾。がん細胞では、メバロン酸代謝経路から産生される GGPP が RhoA や Rac1 などのゲラニルゲラニル化に利用され、GGPP を合成する酵素 GGPPase の発現量が増加するとがん細胞の増殖が促進されることが報告されている⁷⁸⁾。UBIAD1 は MK-4 合成の重要な調節因子であることから、がん細胞で UBIAD1 の発現が増加すると、GGPP が MK-4 合成の材料として利用され、結果的に増殖が抑制されることが考えられる。一方、正常細胞では、UBIAD1 の発現自体が細胞の生存維持に寄与している可能性が高い。ゼブラフィッシュの UBIAD1 変異体では心臓や血管内皮細胞に異常が生じるが、ヒト UBIAD1 の発現により改善されることが報告されている⁷⁹⁾。このように、UBIAD1 は正常細胞とがん細胞で異なる機能を示し、軟骨細胞では増殖や分化を促進することで軟骨細胞の機能を制御し、軟骨形成を促進する役割を担っていると考えられる。

今回、MK-4 の作用についても検討したところ、UBIAD1 の発現がノックダウンされた ATDC5 細胞では、MK-4 添加による増殖能や分化能の改善は認められなかった。このことは、UBIAD1 の存在自体が軟骨細胞の機能に重要であることを示唆している。一方、MK-4 は ATDC5 細胞の増殖と分化を抑制した。MK-4 は骨芽細胞において SXR/PXR を介して骨基質タンパク質の発現を誘導すること⁸⁰⁾、神経幹細胞において神経分化を促進すること⁸¹⁾、神経細胞において酸化ストレスから保護す

ることが報告されている⁸²⁾。また、ラットにおいて、MK-4 がその抗炎症作用と酸化ストレス作用により、一過性の全脳虚血/再灌流の結果を救済することが報告されている⁸³⁾。このように、MK-4 の作用は正常細胞とがん細胞など細胞種によって異なる。今回、MK-4 は 0.1 μ M 以上の濃度で ATDC5 細胞の増殖・分化を抑制したことから、高濃度の MK-4 は軟骨細胞の増殖・分化を抑制する作用があることが示唆された。すなわち、軟骨細胞の増殖・分化には UBIAD1 自体の存在が必須であり、UBIAD1 によって生合成される MK-4 は軟骨細胞の過剰な増殖・分化を抑制する負の制御的役割を担っていると考えられる。

近年、ビタミン K の摂取量が多い人ほど変形性関節症の発症リスクが低く、ビタミン K が変形性関節症に有効であることが報告されている⁸⁴⁾。変形性関節症では、肥大軟骨の増加により関節軟骨組織における Col10a1 の発現量が増加することが報告されている⁸⁵⁻⁸⁷⁾。本研究は、ビタミン K の摂取が、軟骨組織における UBIAD1 による MK-4 の生合成と、MK-4 による軟骨細胞の分化の適切な制御を通じて、変形性関節症の発症抑制に寄与している可能性を示唆した。MK-4 や UBIAD1 と変形性関節症との直接的な関係やその作用機序は明らかではないため、今後、変形性関節症モデルマウスなどを用いたビタミン K や UBIAD1 の作用解析が必要であるといえる。

第5節 小 括

マウス前駆軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いて軟骨形成における UBIAD1 の機能解析を行い、以下の結果を得た。

- (1) UBIAD1 をノックダウンした ATDC5 細胞では、増殖能が顕著に低下した。
- (2) UBIAD1 をノックダウンした ATDC5 細胞では、アルシアンブルーによる染色が薄く、分化能が低下した。
- (3) UBIAD1 をノックダウンした ATDC5 細胞では、軟骨分化因子である Col2a1 および Col10a1 の mRNA 発現量が低下した。
- (4) MK-4 は ATDC5 細胞の増殖能を有意に低下させた。
- (5) MK-4 は ATDC5 細胞の分化能を有意に低下させた。
- (6) ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドの導入により、UBIAD1 をノックダウンした ATDC5 細胞の MK-4 合成活性は有意に増加した。
- (7) ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドの導入により、ATDC5 細胞の増殖能が亢進した。
- (8) ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドの導入により、ATDC5 細胞の分化能が亢進した。
- (9) ヒト UBIAD1 過剰発現プラスミドの導入により、UBIAD1 をノックダウンした ATDC5 細胞では、Col2a1 および Col10a1 の mRNA 発現量が有意に増加した。

結 論

ビタミン K は、血液凝固や骨の石灰化に働く必須の栄養素である^{21,41-43)}。ビタミン K のうち、側鎖の不飽和度のみが異なるビタミン K 同族体の PK と MK-4 は、いずれも標的組織においてビタミン K サイクルにより代謝され^{6,44)}、翻訳後修飾酵素である GGCX の補因子として働く。MK-4 は、PK に比べ標的細胞への取り込み速度やビタミン K サイクルにおける代謝変換が速く¹⁶⁾、GGCX に対する補酵素活性が高い¹⁷⁾。また、MK-4 には肝がん細胞や白血病細胞に対するアポトーシス誘導作用があり^{18,19)}、さらに SXR を介した転写調節作用により、骨形成やコラーゲンの沈着を担う因子の発現を促進するなど様々な生理活性があることが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。したがって、生体内では MK-4 が活性型として作用していると考えられる。MK-4 はビタミン K 同族体の中で、最も生理活性が強いことが知られており、長年にわたり MK-4 合成酵素の探索は行われてきたが、その同定には至らなかった。2010 年に Nakagawa らは、ヒトゲノムデータベースからプレニル化ドメインを有するタンパク質のうち大腸菌でメナキノン類を合成する酵素 MenA のプレニル化ドメインと相同性の高い UBIAD1 に着目した。ヒト骨芽細胞様 MG-63 細胞および昆虫細胞 Sf9 で UBIAD1 を強制発現させ、RNA 干渉条件および高発現下で MD-d₈ から MK-4-d₇ への変換活性を検討したところ、変換を担う酵素が UBIAD1 であることを突き止めた³³⁾。

その UBIAD1 が生体内で MK-4 が変換生成する意義を明らかにする目的で著者の研究室では UBIAD1 欠損マウスを作製し、解析を進めている。これまでに、全身性 UBIAD1 欠損は 7.5 日で胎生致死となり、脾臓における欠損では、脾腺房細胞の消失と空洞化による萎縮が起こることを明らかにしている^{38,39)}。これらのことから、UBIAD1 は生命および組織の機能維持に重要な因子であると考えられる。ビタミン K は、骨粗鬆症治療や予防に臨床応用されているが、最近では、ビタミン K 摂取が軟骨の異常により生じる変形性関節症の発症予防に有効であることが報告され、ビタミン K が軟骨形成にも重要であると示唆されているが、UBIAD1 による MK-4 の生成が骨や軟骨形成に関与するのかは明らかではない。そこで著者はビタミン K 変換酵素 UBIAD1 と MK-4 の骨形成に対する役割を明らかにすること目的に、時期特異的 UBIAD1 欠損マウスおよびマウス前駆軟骨株化細胞を用い、骨・軟骨における UBIAD1 の機能解析を行った。

第 1 章において骨および軟骨形成に対する UBIAD1 の生理機能を個体レベルで検討した。CKO マウスに生後 1 週齢から UBIAD1 欠損を誘導することにより、大腿骨の顕著な短縮や MK-4 濃度の低下、骨密度の減少が認められ、骨形成が低下することが分かった。骨組織標本の Safranin O 染色では、UBIAD1 欠損を誘導した CKO マウスにおいて、増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層の減少、コラーゲン繊維の形態的变化が観察された。また、骨組織において、軟骨細胞分化関連遺伝子である Sox9 や Col2a1、Col10a1 の mRNA 発現の有意な減少が見られ、軟骨分化の低下が認められた。初代培養軟骨細胞を単離し、増殖能を評価した結果、UBIAD1 欠損を誘導

したCKOマウス由来軟骨細胞では、増殖能の低下が認められた。軟骨分化を誘導した場合では、Col10a1のmRNA発現量が減少しており、肥大軟骨への分化能が低下していた。このことから、UBIAD1は骨形成において、特に軟骨細胞の増殖や分化に重要であることが示唆された。

第2章において、軟骨細胞への分化能を有するATDC5細胞を用いてUBIAD1の軟骨細胞に対する生理機能を細胞レベルで検討した。ATDC5細胞は軟骨分化に伴い、Col2a1のmRNA発現が上昇し、Alcian blueにより軟骨基質が強く染色された。UBIAD1をノックダウンしたATDC5細胞では、Col2a1のmRNA発現量は有意に低下し、軟骨細胞分化も顕著に低下した。ATDC5細胞にMK-4処理を行った結果、MK-4濃度が高いほどATDC5の増殖能が有意に低下し、分化能も有意に低下した。一方、ATDC5にUBIAD1発現プラスミドを導入した結果、UBIAD1過剰発現細胞において増殖能が有意に増加し、UBIAD1発現をノックダウンした細胞に対して、UBIAD1を過剰発現させることで正常細胞と同等レベルまで増殖能が回復した。さらに、UBIAD1発現プラスミド導入細胞は、分化能が有意に増加し、Col2a1およびCol10a1のmRNA発現量も増加した。このことから、UBIAD1は軟骨細胞の増殖や分化を調節する役割を担っていると示唆された。

本研究で、出生後骨形成が急速に進む時期である幼若期のマウスにおけるUBIAD1の欠損は、大腿骨の顕著な短縮や骨密度が低下し、骨形成が有意に低下することが明らかとなった。また、内軟骨性骨化に重要な軟骨細胞において、UBIAD1の欠損は、増殖能および肥大軟骨細胞への分化能を低下させることも明らかとなった。マウス前駆軟骨株化細胞の研究においても、UBIAD1発現のノックダウンにより、増殖能および分化能が有意に低下し、UBIAD1発現プラスミドの導入により、増殖能および分化能が有意に増加したことから、UBIAD1は軟骨細胞の増殖・分化誘導に必須の因子であることが明らかとなった。したがって、UBIAD1は軟骨細胞の増殖・分化を促進し、MK-4を生成することで軟骨の過分化を抑制していると推察される。

結論として、UBIAD1は軟骨細胞の増殖と分化を制御しており、軟骨細胞の重要な因子として機能している可能性が高い。一方で、MK-4は軟骨細胞の増殖と分化を抑制する方向に制御する因子であると考えられる。本研究成果は、UBIAD1とMK-4が正常な軟骨形成の維持に寄与し、変形性関節症などの疾患の発症予防に働いている可能性を示唆している。しかし、軟骨細胞分化におけるUBIAD1およびMK-4機能の作用機序については、まだ検討が必要である。そこで、今後は疾患モデルマウスやUBIAD1欠損マウスを用いた研究を展開し、変形性関節症などの軟骨疾患におけるUBIAD1やMK-4の役割を解明していきたいと考えている。今後さらに、骨におけるUBIAD1およびMK-4の機能解明を進め、骨疾患予防・治療におけるビタミンKの有用性と骨におけるMK-4への変換の意義を明らかにしていきたいと考えている。

謝 辞

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対して終始御懇切な御指導を頂き、また研究者としての模範となり研究の愉しさをご教示下さいました衛生化学研究室 中川公恵教授に深謝の意を表します。

本研究論文審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました神戸学院大学薬学部生化学研究室 岡本正志教授、毒性学研究室 糟谷史代教授、臨床代謝栄養学研究室 辻本貴江准教授に心より感謝致します。

本研究に対し、幾多の御協力を賜りました神戸学院大学衛生化学研究室 清岡恭乃学士、嘉悦慎一郎学士、卒業生および学部生の諸氏に深謝致します。

ビタミン K 重水素標識体を合成して下さい、本研究に対しご協力を賜りました芝浦工業大学システム理工学部生命科学科 須原義智教授に深謝致します。

μ CT 解析の実施にあたり御指導を頂きました神戸学院大学薬学部臨床薬剤学研究室 岸本修一教授に深謝致します。

主論文

1. Shunsuke Hirashima, Yukino Kiyooka, Shinichiro Kaetsu, Kimie Nakagawa, Vitamin K converting enzyme UBIAD1 plays an important role in osteogenesis and chondrogenesis in mice, *Biochem Biophys Res Commun*, **702**, 149635 (2024).
2. Shunsuke Hirashima, Shinichiro Kaetsu, Yukino Kiyooka, Kimie Nakagawa, Vitamin K converting enzyme UBIAD1 promotes proliferation and differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells, *BPB Reports*, **6**(6), 176-182 (2023).

文 献

- 1) 日本ビタミン学会（編），ビタミン学Ⅰ，東京化学同人, pp. 237-267 (1980).
- 2) Shearer M.J., *Lancet*, **345**, 229-234 (1995).
- 3) Suttie J.W., *Annu. Rev. Nutr.*, **15**, 399-417 (1995).
- 4) Thijssen H.H., Vervoort L.M., Schurgers L.J., Shearer M.J., *Br. J. Nutr.*, **95**, 260-266 (2006).
- 5) Stafford D.W., *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 1873-1878 (2005).
- 6) Wajih N., Sane D.C., Hutson S.M., Wallin R., *J. Biol. Chem.*, **279**, 25276-25283 (2004).
- 7) Mishima E., Ito J., Wu Z., Nakamura T., Wahida A., Doll S., Tonnus W., Nepachalovich P., Eggenhofer E., Aldrovandi M., Henkelmann B., Yamada K., Wanninger J., Zilka O., Sato E., Feederle R., Hass D., Maida A., Mourão A.S.D., Linkermann A., Geissler E.K., Nakagawa K., Abe T., Fedorova M., Proneth B., Pratt D.A., Conrad M., *Nature*, **608**, 778-783 (2022).
- 8) Jones S.A., Moore L.B., Shenk J.L., Wisely G.B., Hamilton G.A., McKee D.D., Tomkinson N.C., LeCluyse E.L., Lambert M.H., Willson T.M., Kliewer S.A., Moore J.T., *Mol. Endocrinol.*, **14**, 27-39 (2000).
- 9) Moore L.B., Parks D.J., Jones S.A., Bledsoe R.K., Consler T.G., Stimmel J.B., Goodwin B., Liddle C., Blanchard S.G., Willson T.M., Collins J.L., Kliewer S.A., *J. Biol. Chem.*, **275**, 15122-15127 (2000).
- 10) Suhara Y., Motoyoshi S., Hirota Y., Sawada N., Nakagawa K., Tokiwa H., Okano T., *Yakugaku Zasshi*, **132**, 881-886 (2012).
- 11) Synold T.W., Dussault I., Forman B.M., *Nat. Med.*, **7**, 584-590 (2001).
- 12) Xie W., Barwick J.L., Downes M., Blumberg B., Simon C.M., Nelson M.C., Neuschwander-Tetri B.A., Brunt E.M., Guzelian P.S., Evans R.M., *Nature*, **406**, 435-439 (2000).
- 13) Tabb M.M., Sun A., Zhou C., Grün F., Errandi J., Romero K., Pham H., Inoue S., Mallick S., Lin M., Forman B.M., Blumberg B., *J. Biol. Chem.*, **278**, 43919-43927 (2003).
- 14) Ichikawa T., Horie-Inoue K., Ikeda K., Blumberg B., Inoue S., *J. Biol. Chem.*, **281**, 16927-16934 (2006).
- 15) Ichikawa T., Horie-Inoue K., Ikeda K., Blumberg B., Inoue S., *J. Mol. Endocrinol.*, **39**, 239-247 (2007).
- 16) Suhara Y., Murakami A., Nakagawa K., Mizuguchi Y., Okano T., *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 6601-6607 (2006).
- 17) Buitenhuis H.C., Soute A.M., Vermeer C., *Biochem. Biophys. Acta.*, **1034**, 170-175 (1990).

- 18) Otsuka M., Kato N., Shao R.X., Hoshida Y., Ijichi H., Koike Y., Taniguchi H., Moriyama M., Shiratori Y., Kawabe T., Omata M., *Hepatology*, **40**, 243-251 (2004).
- 19) Hitomi M., Yokoyama F., Kita Y., Nonomura T., Masaki T., Yoshiji H., Inoue H., Kinekawa F., Kurokohchi K., Uchida N., Watanabe S., Kuriyama S., *Int. J. Oncol.*, **26**, 713-720 (2005).
- 20) Tsujioka T., Miura Y., Otsuki T., Nishimura Y., Hyodoh F., Wada H., Sugihara T., *Haematologica*, **91**, 613-619 (2006).
- 21) ビタミン学会 (編) , ビタミン研究のブレークスルー, 学進出版, pp. 85-101 (2002).
- 22) Goncalves A., Margier M, Roi S., Collet X, Niot I., Goupy P., Caris-Veyrat C., Reboul E., *J. Biol. Chem.*, **289**, 30743-30752 (2014).
- 23) Takada T, Suzuki H., *Mol. Nutr. Food Res.*, **54**, 616-622 (2010).
- 24) Takada T., Yamanashi Y., Konishi K., Yamamoto T., Toyoda Y., Masuo Y., Yamamoto H., Suzuki H., *Sci. Transl. Med.*, **7** (275) (2015).
- 25) Okano T., Shimomura Y., Yamane M., Suhara Y., Kamao M., Sugiura M., Nakagawa K., *J. Biol. Chem.*, **283**, 11270-11279 (2008).
- 26) Thijssen H.H., Drikkij-Reijnders M.J., *Br. J. Nutr.*, **75**, 121-127 (1996).
- 27) Thijssen H.H., Drikkij-Reijnders M.J., *Br. J. Nutr.*, **72**, 415-425 (1994).
- 28) Martius C., Esser H.O., *Biochem. Z.*, **331**, 1-9 (1958).
- 29) Ronden J.E., Drikkij-Reijnders M.J., Vermeer C., Thijssen H.H., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1379**, 69-75 (1998).
- 30) Davidson R.T., Foley A.L., Engelke J.A., Suttie J.W., *J. Nutr.*, **128**, 220-223 (1998).
- 31) 第 10 回 Vitamin K&Aging 研究会記録集, エーザイ株式会社, pp.53-60, (2007).
- 32) Hirota Y., Tsugawa N., Nakagawa K., Suhara Y., Tanaka K., Uchino Y., Takeuchi A., Sawada N., Wada A., Okitsu T., Okano T., *J. Biol. Chem.*, **288**, 33071-33080 (2013).
- 33) Nakagawa K., Hirota Y., Sawada N., Yuge N., Watanabe M., Uchino Y., Okuda N., Shimomura Y., Suhara Y., Okano T., *Nature*, **468**, 117-121 (2010).
- 34) Weiss J. S., *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, **105**, 616-648 (2007).
- 35) Orr A., Dube M. P., Marcadier J., Jian H., Federico A., George S., Seamone C., Andrews D., Dubord P., Holland S., Provost S., Mongram V., Evans S., Higgins B., Bowman S., Guernsey D., Samuels M., *PLoS One*, **2**, e685Ro (2007).
- 36) Wang X., Wang D., Jing P., Wu Y., Xia Y., Chen M., Hong L., *PLoS One*, **8**, e72015 (2013).
- 37) Hirota Y., Nakagawa K., Sawada N., Okuda N., Suhara Y., Uchino Y., Kimoto T., Funahashi N., Kamao M., Tsugawa N., Okano T., *PLoS One*, **10**, e0125737 (2015).
- 38) Nickerson ML., Bosley AD., Weiss JS., Kostih BN., Hirota Y., Brandt W., Esposito D., Kinoshita S., Wessjohann L., Morham SG., Andresson T., Kruth HS., Okano T., Dean M., *Hum. Mutat.*, **34**, 317-329 (2013).
- 39) Schumacher M.M., Elsabrouty R., Seemann J., Jo Y., DeBose- Boyd R.A., *eLife*, **4**, e05560 (2015).

- 40) Sever N., Song B.L., Yabe D., Goldstein J.L., Brown M.S., DeBose- Boyd R.A., *J. Biol. Chem.*, **278**, 52479–52490 (2003).
- 41) Elsabrouty R., Jo Y., Dinh T.T., DeBose-Boyd R.A., *Mol. Biol. Cell.*, **24**, 3300-3308 (2013).
- 42) Nakagawa, K., Sawada, N., Hirota, Y., Uchino, Y., Suhara, Y., Hasegawa T., Amizuka, N., Okamoto, T., Tsugawa, N., Kamao, M., Funahashi N., Okano T., *PLoS One*, **9**, e104078 (2014).
- 43) Nakagawa K., Fujiwara K., Nishimura A., Murakami C., Kawamoto K., Ichinose C., Kunitou Y., Suhara Y., Okano T., Hasegawa H., *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(8) (2019).
- 44) Oka H, Akune T, Muraki S, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Sasaki S, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N., *J. Orthop. Sci.*, **14**, 687-692 (2009).
- 45) Bouckaert J. H., Sald A. H., *Nature*, **185**, 849 (1960).
- 46) Kaneki M., Hedges S.J., Hosoi T., Fujiwara S., Lyons A., Crean S.J., Ishida N., Nakagawa M., Takechi M., Sano Y., Mizuno Y., Hoshino S., Miyao M., Inoue S., Horiki K., Shiraki M., Ouchi Y., Orimo H., *Nutrition*, **17**, 315- 321 (2001).
- 47) Hauschka P.V., Lian J.B., Gallop P.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 3925- 3929 (1975).
- 48) Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C., Smith E., Bonadio J., Goldstein S., Gundberg C., Bradley A., Karsenty G., *Nature*, **382**, 448- 452 (1996).
- 49) Liu S., Guo W., Han X., Dai W., Diao Z., Liu W., *PLoS One*, **11**, e0149639 (2016).
- 50) Tsukasaki M., Asano T., Muro R., Huynh N.C.N., Komatsu N., Okamoto K., Nakano K., Okamura T., Nitta T., Takayanagi H., *Cell. Rep.*, **32**, 108124 (2020).
- 51) Tabb M.M., Sun A., Zhou C., Grun F., Errandi J., Romero K., Pham H., Inoue S., Mallick S., Lin M., Forman B.M., Blumberg B., *J. Biol. Chem.*, **278**, 43919-43927 (2003).
- 52) Ohta K., Lupo G., Kuriyama S., Keynes R., Holt C.E., Harris W.A., Tanaka H., Ohnuma S., *Dev. Cell.*, **7**, 347-358 (2004).
- 53) Fujita D., Yamashita N., Iita S., Amano H., Yamada S., Sakamoto K., *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty. Acids.*, **68**, 351-358 (2003).
- 54) Akiyama Y., Hara K., Tajima T., Murota S., Morita I., *Eur. J. Pharmacol.*, **263**, 181-185, (1994).
- 55) Kawata T., Zernik J.H., Fujita T., Tokimasa C., Tanne K., *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **45**, 501-507 (1999).
- 56) Takeuchi Y., Suzawa M., Fukumoto S., Fujita T., *Bone*, **27**, 769- 776 (2000).
- 57) Koshihara Y., Hoshi K., Okawara R., Ishibashi H., Yamamoto S., *J. Endocrinol.*, **176**, 339-348 (2003).
- 58) Taira H., Fujikawa Y., Kudo O., Itonaga I., Torisu T., *Calcif. Tissue. Int.*, **73**, 78-85 (2003).
- 59) Hiruma Y., Nakahama K., Fujita H., Morita I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 24-30(2004).

- 60) Kameda T., Miyazawa K., Mori Y., Yuasa T., Shiokawa M., Nakamaru Y., Mano H., Hakeda Y., Kameda A., Kumegawa M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**, 515-519 (1996).
- 61) 松本俊夫(編), 骨・軟骨代謝と注目の骨疾患, 洋土社, pp27-29 (2002).
- 62) Azuma K., Urano T., Ouchi Y., Inoue A., *Endocr. J.*, **56**, 843-849 (2009).
- 63) Ozaki I., Zhang H., Mizuta T., Ide Y., Eguchi Y., Yasutake T., Sakamaki T., Pestell R.G., Yamamoto K., *Cancer. Res.*, **13**, 2236-2245 (2007).
- 64) Urayama S., Kawakami A., Nakashima T., Tsuboi M., Yamasaki S., Hida A., Ichinose Y., Nakamura H., Ejima E., Aoyagi T., Nakamura T., Migita K., Kawabe Y., Eguchi K., *J. Lab. Clin. Med.*, **136**, 181-193 (2000).
- 65) Mochizuki Y., Chiba T., Kataoka K., Yamashita S., Sato T., Kato T., Takahashi K., Miyamoto T., Kitazawa M., Hatta T., Natsume T., Takai S., Asahara H., *Dev. Cell.*, **46**, 794-806 (2018).
- 66) 鳥原秀美, 出生後のマウス長管骨成長板の内軟骨性骨化における aggrecan の in vivo 機能解析, 岡山大学, 博士(歯学), 甲第 5937 号, (2019).
- 67) Shirahata S., *検査と技術*, **29**, 1426-1431 (2001).
- 68) Binkley N.C., Krueger D.C., Kawahara T.N., Engelke J.A., Chappell R.J., Suttie J.W., *Am. J. Clin. Nutr.*, **76**, 1055-1060 (2002).
- 69) Kaneki M., *Clin. Calcium.*, **15**, 605-609 (2005).
- 70) Suhara Y., Hirota Y., Nakagawa K., Kamao M., Tsugawa N., Okano T., *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 3108-3117 (2008).
- 71) McGarvey T.W., Nguyen T., Puthiyaveetil R., Tomaszewski J.E., Malkowicz S.B., *Prostate*, **54**, 144-155 (2003).
- 72) Fredericks W.J., McGarvey T., Wang H., Lal P., Puthiyaveetil R., Tomaszewski J., Sepulveda J., Labelle E., Weiss J.S., Nickerson M.L., Kruth H.S., Brandt W., Weissjohann L.A., Malkowicz S.B., *DNA. Cell. Biol.*, **30**, 851-864 (2011).
- 73) Fredericks W.J., McGarvey T., Wang H., Zheng Y., Fredericks N.J., Yin H., Wang L., Hsiao W., Lee R., Weiss J.S., Nickerson M.L., Kruth H.S., Rauscher 3rd F.J., Malkowicz S.B., *J. Cell. Biochem.*, **114**, 2170-2187 (2013).
- 74) Fredericks W.J., Sepulveda J., Lai P., Tomaszewski J.E., Lin M.F., McGarvey T., Rauscher 3rd F.J., Malkowicz S.B., *Oncotarget*, **4**, 1075-1092 (2013).
- 75) Fredericks W.J., Yin H., Lal P., Puthiyaveetil R., Malkowicz S.B., Fredericks N.J., Tomaszewski J., Rauscher 3rd F.J., Malkowicz S.B., *Int. J. Oncol.*, **43**, 638-652 (2013).
- 76) Schumacher M., Jun D., Jo Y., Seemann J., DeBose-Boyd R., *J. Lipid. Res.*, **57**, 1286-1299 (2016).
- 77) Xu Z., Duan F., Lu H., Abdulkadhim D.M., Xia Y., Liang H., Hong L., *Cell. Death. Dis.*, **9**, 1170-1170 (2018).
- 78) Wang X., Xu W., Zhan P., Xu T., Jin J., Miu Y., Zhou Z., Zhu Q., Wan B., Xi G., Ye L., Liu Y., Gao J., Li H., Lv T., Song Y., *J. Cell. Mol. Med.*, **22**, 2177-2189 (2018).
- 79) Hegarty J.M., Yang H., Chi N.C., *Development*, **140**, 1713-1719 (2013).

- 80) Azuma K., Casey SC., Urano T., Horie-Inoue K., Ouchi Y., Blumberg B., Inoue S., *PLoS One*, **10**, e0119177 (2015).
- 81) Suhara Y., Hirota Y., Hanada N., Nishina S., Eguchi S., Sakane R., Nakagawa K., Wada A., Takahashi K., Tokiwa H., Okano T., *J. Med. Chem.* **58**, 7088-7092 (2015).
- 82) Li J., Lin J.C., Wang H., Peterson J.W., Furie B.C., Furie B., Booth S.L., Volpe J.J., Rosenberg P.A., *J. Neurosci.*, **23**, 5816-5826 (2003).
- 83) Farhadi M.B., Fereidoni M., *PLoS One*, **15**, e0229769 (2020).
- 84) Chin K.Y., *Nutrients*, **12**, 1208 (2020).
- 85) Van der Kraan P.M., Van den Berg W.B., *Osteoarthritis. Cartilag*, **20**, 223-232 (2012).
- 86) Pullig O., Weseloh G., Ronneberger D., Käkönen S., Swoboda B., *Calcif. Tissue. Int.*, **67**, 230-240 (2000).
- 87) Lamas J.R., Rodríguez-Rodríguez L., Vigo A.G., Alvarez-Lafuente R., López-Romero P., Marco F., Camafeita E., Dopazo A., Callejas S., Villafuertes E., Hoyas J.A., *Ann. Rheum. Dis.*, **69**, 1880-1885 (2010).