

学位論文の要旨

No...1...

論文題名	
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
学籍番号若しくは 所 属 機 関 名	9420104
主 論 文	
<ol style="list-style-type: none">1. <u>Shunsuke Hirashima</u>, Yukino Kiyooka, Shinichiro Kaetsu, Kimie Nakagawa, Vitamin K converting enzyme UBIAD1 plays an important role in osteogenesis and chondrogenesis in mice, <i>Biochem Biophys Res Commun</i>, 702, 149635 (2024).2. <u>Shunsuke Hirashima</u>, Shinichiro Kaetsu, Yukino Kiyooka, Kimie Nakagawa, Vitamin K converting enzyme UBIAD1 promotes proliferation and differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells, <i>BPB Reports</i>, 6(6), 176-182 (2023).	
要 旨	
<p>【目的】脂溶性ビタミンの1つであるビタミン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⁾。ヒトが食事から摂取するビタミンKの大部分は、緑色野菜に含まれる3位にフィチル基を持つビタミンK₁ (phyllloquinone: PK) である²⁾。また、納豆などの発酵食品からは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、肉類や卵などの動物性食品からは、ビタミンK₂ (menaquinone-4: MK-4) を摂取しているが、その量はPKに比べると非常に少ない。摂取したビタミンK同族体は、いずれも小腸上皮からリンパ管を介して吸収されるが、組織中に最も多く存在するビタミンKはMK-4であり、その濃度はPKに比べ数倍~数百倍高い³⁻⁷⁾。これは、PKやMK-nが生体内でMK-4に変換されているからである。この変換反応を担う酵素が、UbiA prenyltransferase domain containing protein 1 (UBIAD1) である⁸⁾。いずれのビタミンK同族体も翻訳後修飾酵素の一つであるγ-グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) の補因子として働き、ビタミンK依存性タンパク質を活性化する⁹⁾。この活性はPKやMK-nに比べMK-4が数倍強い。また、MK-4は核内受容体SXR (steroid and xenobiotic receptor) を介した骨形成因子の発現誘導作用やPKA活性化作用も持ち、ビタミンK同族体の中で最も生理活性が高い^{10, 11, 12)}。そのため、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摂取が変形性関節症の発症予防にも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¹³⁾。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。そこで本研究では、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。</p> <p>【方法】Tamoxifen誘導型全身性UBIAD1欠損 (CKO) マウスに、骨成長の著しい1週齢よりTamoxifenを投与してUBIAD1欠損を誘導し、4週齢における骨形成状態を評価した。大腿骨長や形態の評価、μCTによる骨密度解析および骨組織切片標本による組織学的解析を行った。骨組織における骨形成関連因子のmRNA発現量はReal time RT-PCRにより評価し、ビタミンK濃度はLC-APCI-MS/MSにより測定した。さらに、CKOマウスより軟骨細胞を初代培養し、軟骨分化因子のmRNA発現量をReal time RT-PCRで評価した。また、株化細胞におけるUBIAD1の機能を解明するために、UBIAD1を発現するマウス前駆軟骨細胞 (ATDC5細胞) に、UBIAD1に対するsiRNAを導入したノックダウン細胞を作製し、増殖能をWST-8法により、分化能をAlcian Blue染色により評価した。軟骨形成・分化関連因子のmRNA発現量は、Real time RT-PCRにより評価した。ATDC5細胞に対するMK-4添加処理や</p>	

UBIAD1発現プラスミド導入の影響については、増殖能や分化能、軟骨分化因子のmRNA発現量の解析により評価した。

【結果および考察】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II型コラーゲン、X型コラーゲンの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、増殖能を評価したところ、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。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。

軟骨細胞への分化能を有するATDC5細胞は、軟骨分化に伴い、II型コラーゲンのmRNA発現が上昇し、Alcian blueにより軟骨基質が強く染色される。UBIAD1をノックダウンしたATDC5細胞では、II型コラーゲンの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処理を行ったところ、MK-4濃度が上昇するにつれて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ところ、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、II型コラーゲンおよびX型コラーゲンの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。

出生後骨形成が急速に進む時期である幼若期における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。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の有用性を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。

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) Thijssen H.H. and Drikk-Reijnders M.J., *Br. J. Nutr.*, **75**, 121-127 (1996).
- 4) Goncalves A., Margier M., Roi S., Collet X., Niot I., Goupy P., Veyrat C.C., Reboul E., *J. Biol. Chem.*, **289**, 30743-30752 (2014).
- 5) Takada T., Suzuki H., *Mol. Nutr. Food. Res.*, **54**, 616-622 (2010).
- 6) Takada T., Yamanashi Y., Konishi K., Yamamoto T., Toyoda Y., Masuo Y., Yamamoto H., Suzuki H., *Sci. Transl. Med.*, **7**, 275ra23 (2015).
- 7) Hirota Y., Tsugawa N., Nakagawa K., Suhara Y., Tanaka K., Uchino Y., Takeuchi A., Sawada N., Kamao M., Wada A., Okitsu T. and Okano T., *J. Biol. Chem.* **288**, 33071-33080 (2013).
- 8) 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).
- 9) Stafford D.W., *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 1873-1878 (2005).
- 10) 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. and Moore J.T., *Mol. Endocrinol.*, **14**, 27-39 (2000).

- 11) 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. and Kliewer S.A., *J. Biol. Chem.*, **275**, 15122-15127 (2000).
- 12) Suhara Y., *Yakugaku Zasshi*, **132**, 881-886 (2012).
- 13) Oka H., Okune 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).