

氏 名（本 籍）	吉 岡 大 輝	（岐阜県）
学 位 の 種 類	博 士（医学）	
学 位 授 与 番 号	甲第 1212 号	
学 位 授 与 日 付	令和 4 年 9 月 14 日	
学 位 授 与 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学 位 論 文 題 目	Deletion of <i>Tfam</i> in <i>Prx1-Cre</i> expressing limb mesenchyme results in spontaneous bone fractures	
審 査 委 員	（主査）教授	小澤 修
	（副査）教授	長岡 仁
		教授 小倉 真治

論 文 内 容 の 要 旨

加齢に伴い細胞内のミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異は加速し、ミトコンドリア機能は低下する。高齢者の骨粗鬆症やそれに伴う脆弱性骨折の原因として、骨組織のミトコンドリア機能の低下が関与している可能性を考えられる。*Tfam* 遺伝子は mtDNA の維持に必須であり、この *Tfam* 遺伝子を欠失させることでミトコンドリア機能障害を誘導し、マウス四肢の骨形成やコラーゲンとアパタイトの微細組織化に対する影響と力学的機能変化を解析した。

【対象と方法】

肢芽間葉系細胞において特異的に *Tfam* 遺伝子を欠失させたマウス (*Tfam*-cKO マウス) を用い、形態学的、組織学的に解析し、四肢骨における遺伝子発現を *in situ* hybridization、定量的 real-time PCR (qPCR)、RNA シークエンス (RNA-seq) にて評価した。さらに、*Tfam*-cKO マウスの骨芽細胞におけるミトコンドリア機能を、ミトコンドリア膜電位測定や透過電子顕微鏡 (TEM) にて解析した。そして、骨折の自然発症の原因を明らかにするために、免疫組織化学染色、TEM、複屈折分析、マイクロビーム X 線回折装置分析、ナノインデンテーション測定を行った。

【結果】

Tfam-cKO マウスの前肢は生後より有意に短縮しており、1 週間以内に尺骨肘頭付近で骨折の自然発症を起こし、最終的に高度な四肢変形をきたした。組織学的には、*Tfam*-cKO マウスの前肢骨組織において、骨の石灰化の減少とともに骨の低形成を認め、qPCR や RNA-seq では、骨芽細胞における I 型コラーゲン (*Col1a1*) とオステオカルシン (*Oc*) の発現が低下していた。また、*Tfam*-cKO マウスの前肢骨マトリックスにおける *Col1a1* やその石灰化の減少は、著明なミトコンドリア機能障害とそれによる ATP 産生低下と相関していた。そして、*Oc* の発現低下によるアパタイト配向性の低下の結果、*Tfam*-cKO マウスの前肢骨では、骨のヤング率や硬度が有意に低下していた。骨芽細胞への分化能を持つ MC3T3-E1 細胞に si *Tfam* 及びミトコンドリア呼吸鎖複合体に対する阻害剤であるロテノンを投与した *in vitro* の解析においても、ATP の有意な低下とともに *Col1a1* や *Oc* の発現、細胞増殖能の低下を認め、*in vivo* と同様の結果が得られた。

【考察】

骨芽細胞は細胞質における解糖系からミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に代謝シフトする

ことで、間葉系幹細胞から分化し、成熟するに従って酸化リン酸の活性が増加することから、ミトコンドリアにおける ATP 産生は骨芽細胞の分化や増殖の機能において重要であると考えられている。Dobson らは、mtDNA ポリメラーゼ γ (*PolgA*) をノックアウトすることで mtDNA 変異を加速させると、ミトコンドリア呼吸鎖の低下とともに骨芽細胞の数が減少することで石灰化の低下をきたし、最終的に骨量が減少したと報告している。本研究においても Dobson らと同様、ミトコンドリア機能障害によって、骨芽細胞の分化や増殖の機能が障害され、*Colla1* や *Oc* 産生低下を認めたが、*Tfam-cKO* マウスはさらに生後の骨折の自然発症や高度な四肢変形をきたし、より重度の表現型を呈した。この違いは *Tfam* と *PolgA* が骨形成において mtDNA の維持とは別の機能を担っている可能性が示唆された。

骨はアパタイト結晶を伴うコラーゲン線維で構成されており、骨質はコラーゲン量、アパタイト結晶性、コラーゲン/アパタイト配向性など様々な組成要素で決定される。また、非コラーゲタンパクである *Oc* はアパタイト配向性を調整することで骨の微細構造や力学的性質において重要な役割を果たしている。*Tfam-cKO* マウスの上肢骨は *Colla1* の発現や基質への沈着および石灰化が減少していただけでなく、*Oc* の発現も低下していた。コラーゲン及びアパタイト配向性はともに低下していたが、重回帰分析ではコラーゲンよりもアパタイト配向性が骨のヤング率や硬度に対する寄与が高く、*Tfam-cKO* による骨脆弱性は、アパタイト配向性の低下がより大きく影響していると考えられた。

骨芽細胞内のカルシウム (Ca) の制御は骨の石灰化に重要であり、過去の知見はミトコンドリア由来の ATP は小胞体から Ca を供給することで、石灰化に寄与していると報告している。本研究の結果からは、*Tfam* が骨芽細胞内の Ca 貯蔵や石灰化に関与していることが示唆されたが、*Tfam-cKO* マウスではミトコンドリア内や小胞体内 Ca 濃度の変化は明らかではなく、ミトコンドリアや小胞体における Ca 貯蔵と骨における石灰化の関係を明らかにするために、さらなる研究が必要と考えている。

【結論】

肢芽間葉系細胞特異的に *Tfam* 欠失させたマウスは、四肢の骨折の自然発症を呈し、結果として高度な四肢変形をきたした。*Tfam* 欠失により骨芽細胞の分化と増殖の機能が障害されたことによるアパタイトの配向性低下が、骨脆弱性を引き起こすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 吉岡大輝は、ミトコンドリア機能維持に必須である *Tfam* 遺伝子を欠失したマウスにおいて、四肢の骨折の自然発症とその後の高度な四肢変形をきたすことを見出し、その骨脆弱性は *Tfam* 欠失による骨芽細胞の機能障害によることを明らかにした。本研究の成果は、高齢者の脆弱性骨折の原因究明の一助となる可能性があり、整形外科の進歩と発展に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Hiroki Yoshioka, Shingo Komura, Norishige Kuramitsu, Atsushi Goto, Tomoka Hasegawa, Norio Amizuka, Takuya Ishimoto, Ryosuke Ozasa, Takayoshi Nakano, Yuuki Imai, Haruhiko Akiyama : Deletion of *Tfam* in *Prx1-Cre* expressing limb mesenchyme results in spontaneous bone fractures J Bone Miner Metab (in press).