

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09861

研究課題名(和文) 矯正歯科治療後の後戻りを防止する新規骨芽細胞活性化因子が担う骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism that new osteoblastic activating factors control bone metabolisms for preventing a relapse after the orthodontic treatment

研究代表者

黒石 加代子(中尾加代子)(Kuroishi, Kayoko)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60468303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Slitrk1はトゥレット症候群の原因遺伝子の一つである。Slitrk1の骨形成における役割を検討した。骨芽細胞分化に伴いSlitrk1発現は上昇した。ALP活性はSlitrk1欠損マウスより分離した骨髄由来間葉系幹細胞では減少した。対照的にC3H10T1/2細胞にRunx2を過剰発現させると、Slitrk1との共発現でALPとosteocalcinの発現量が有意に増加した。BMP-2誘導性の異所性骨は、ワイルドタイプに比べSlitrk1欠損マウスで小さく、Slitrk1欠損マウスの骨量はワイルドタイプより減少傾向にあった。Slitrk1は骨芽細胞に発現し骨形成に必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の研究成果により、矯正歯科治療時に生じる歯槽骨レベルの低下による保定時の後戻りや歯肉退縮等の歯科領域の問題解決のみならず、骨粗しょう症、変形性関節症などの運動器疾患の病態解明、新たな予防法や新規治療法の開発にも応用できる可能性がある。これまで骨粗しょう症に対する治療は骨吸収抑制薬の投与といった骨局所に対してアプローチを行う治療法が主流であったが、Slitrk1が神経分化と骨芽細胞分化を促進し、同時に促進することが解明されれば末梢の骨だけでなく中枢、すなわち脳も同時に活性化することが出来る新たな画期的な治療法に繋がる道も開かれ大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：Slit and Trk-like protein 1 (Slitrk1) is associated with Tourette syndrome. Tourette patients exhibit delayed bone formation and increased bone fracture tendency. However, the role of Slitrk1 in bone homeostasis is completely unknown. We examined the role of Slitrk1 in osteoblastogenesis. The expression levels of Slitrk1 increased with osteoblast differentiation in osteoblast lineage cells. Alkaline phosphatase (ALP) activity was decreased in BMSCs isolated from Slitrk1 null mice. In contrast, overexpression of Slitrk1 in C3H10T1/2 cells led to increased mRNA levels of ALP and osteocalcin induced by Runx2. BMP2-induced ectopic bone formed in Slitrk1 null mice was smaller than in wild-type littermates. Femoral bone volume of Slitrk1 null mice was decreased compared to control mice. These data suggest that Slitrk1 is expressed in osteoblasts where it enhances osteoblast differentiation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療では、歯槽骨がメカニカルストレス(荷重)を受けた結果、圧迫側で破骨細胞による骨吸収、牽引側で骨芽細胞による骨形成が生じる。すなわち、破骨細胞、骨芽細胞の両方とも活性化が必要があるが、一般に破骨細胞に比べて骨芽細胞は活性化しにくく、活性化機構にも不明な点が多い。また、矯正歯科治療の保定時に起こりやすい後戻りや歯肉退縮といった問題の原因の一つとして、破骨細胞の活性化により歯槽骨が吸収して歯が移動した後、骨芽細胞が活性化して骨が形成されるのが不十分であるため堅固な骨の支持が得られないことが考えられる。

トゥレット症候群は、多発性チック、自閉症・強迫性障害、注意欠陥多動性障害(ADHD)を症状とする症候群であるが、一般的に男性に多く、発症の平均年齢は7歳、発症率は0.03%から1.6%と言われている。その他の症状として、骨形成の遅延¹⁾・骨折²⁾等の症状が報告されているが、その病因の機序が不明で、治療法は確立されていない。Slit and Trk-like protein 1 (Slitrk1)はSLITRK familyの一つで、神経の樹状突起伸長の調整に関与する膜タンパクとして知られており、トゥレット症候群の原因遺伝子の一つと報告されている³⁾。

そこで、メカニカルストレスとの関連が示唆される新規の骨芽細胞活性化因子、Slitrk1に着目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Slitrk1ノックアウトマウスを用いて、骨形成における、Slitrk1の役割について検討する。

3. 研究の方法

- (1) 動物: *Slitrk1* conventional knock out mice (KO)は長崎大学有賀教授に頂いた⁴⁾。
- (2) 細胞: 初代培養骨芽細胞(POB)、マウス前骨芽細胞株MC3T3-E1細胞、マウス骨髄間質系ST-2細胞、骨髄間質細胞(BMSCs)、線維芽細胞株C3H10T1/2細胞を用いた。初代培養骨芽細胞はマウスの頭蓋冠から採取した⁵⁾。BMSCsはマウス大腿骨から採取した。骨芽細胞への分化メディウムとして、50 µg/mL アスコルビン酸、5 mmol/L β-グリセロフォスフェート、10% ウシ胎児血清(FBS)を加えたMEM-αを用いた。
- (3) Western blotting: 抗Slitrk1抗体(Novus Biologicals)と抗b-actin抗体(FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.)、抗Cyclin D1抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)を用いた。二次抗体として抗ウサギHRPと抗マウスHRPを使用した。
- (4) 免疫細胞染色: 抗Ki67抗体(abcam)と抗Cyclin D1抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)を用いた。二次抗体はAlexa-488標識抗ウサギIgG抗体とAlexa-594標識抗マウスIgG抗体を使用した。
- (5) トランスフェクション: C3H10T1/2細胞にLipofectamine® 2000 Transfection Reagentを用いて*Slitrk1*遺伝子、*Runx2*遺伝子をトランスフェクションした。
- (6) Reverse transcription PCRとreal-time PCR: 初代培養骨芽細胞、MC3T3-E1細胞、ST-2細胞、C3H10T1/2細胞のRNAはTRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc)を用いてRNAを単離し、ReverTra Ace (Toyobo)を用いてcDNAに逆転写を行った。そのcDNAをPCRによって*Slitrk1*、*ALP*、*Osteocalcin*、*Osx*、*Runx2*、*β-actin*について特異的に増幅した。PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いてreal-time PCRをQuant Studio 3 system (Thermo Fisher Scientific Inc.)使用して行った。発現量は比較Ct法により*β-actin*を用いて標準化した。
- (7) ALP活性測定: アセトン/エタノール混合物で処理した細胞を、0.1 M ジェタノールアミン、1 mM 塩化マグネシウム、1 mg/ml p-ニトロフェニルリン酸溶液で培養した。3 M 水酸化ナトリウムを加え反応を停止させ、吸光度405 nmで測定した。
- (8) 異所性骨の誘導: Colla Cote® (Zimmer Biomet)を直径4 mmの円状に切り、20 µg/100 µLのBMP-2を吸収させた後に、凍結乾燥させた。8週齢のマウスに腹腔内麻酔を行い、下図のように広背筋筋膜下に4つBMP-2ペレットを埋入した。3週間作用させた後に形成された異所性骨を摘出し、soft X-ray撮影・体積の計測・脱灰後HE染色を行い、組織を観察した。
- (9) アリザリンレッド染色: POBを分化メディウムで14日間培養し、4%パラホルムアルデヒドで固定。1%アリザリンレッドに室温で30分間染色し、良く洗浄して観察した。その後、10%ギ酸で溶解し、その溶液を405nmの吸光度を計測した。
- (10) フォンコッサ染色: アリザリンレッド染色と同様に固定後、5%銀溶液を加え、太陽光下に曝した。その後、5%Hypoを加え、反応を止め、良く洗浄を行い、観察した。
- (11) 細胞増殖: 細胞数の測定はCCK-8を用いた。吸光度は450nmで計測した。
- (12) 統計分析: 全ての結果で標準偏差(SD)を求めた。対応のないStudent's t testを用いた。有意差は*p<0.05, **p<0.01とした。

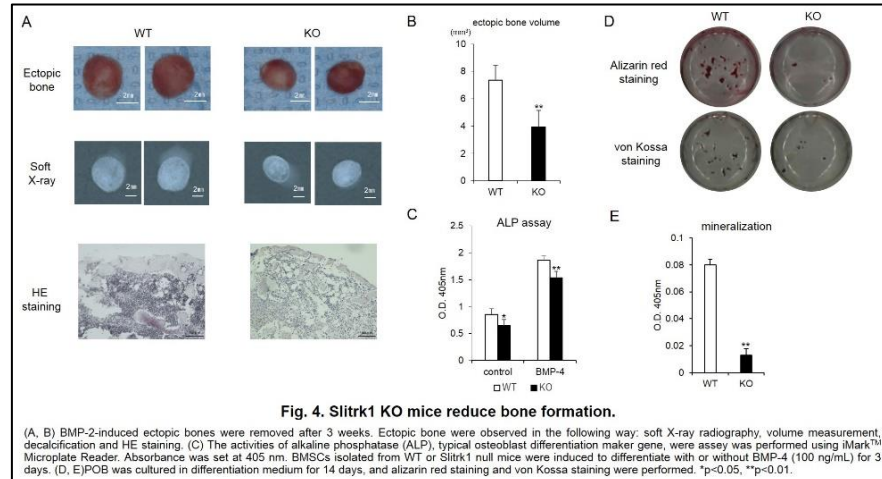
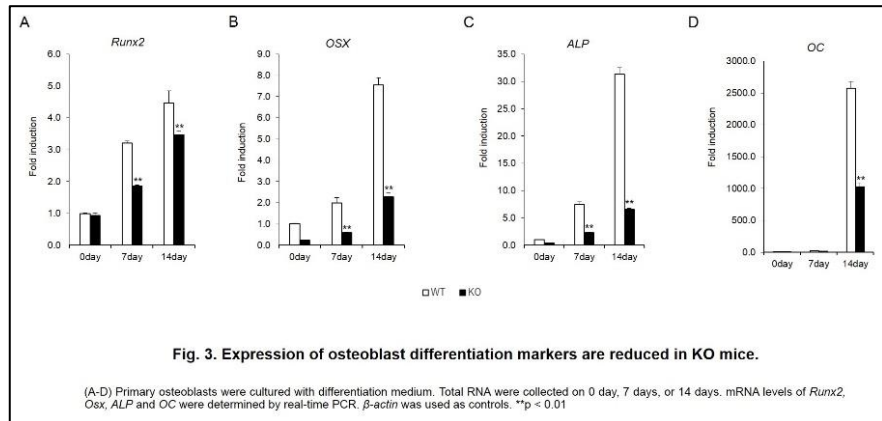
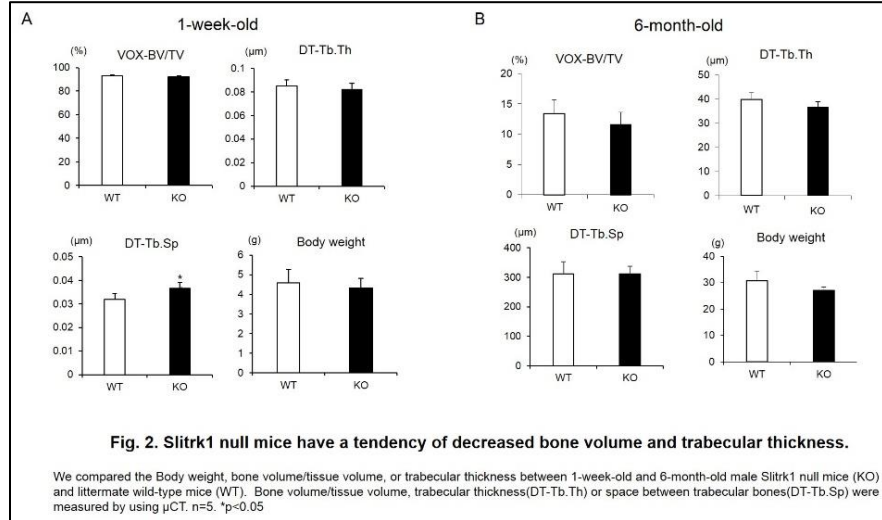
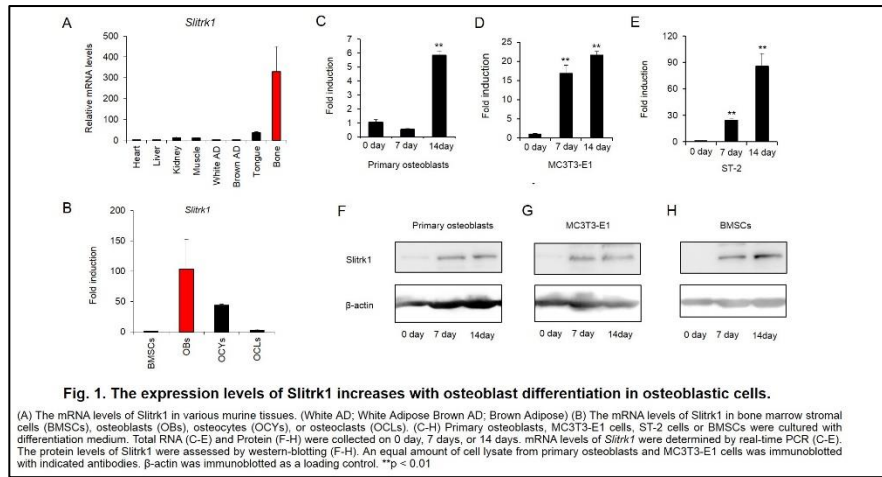
4. 研究成果

(1) *Slitrkl* は、骨組織に発現が高く (Fig1 A)、特に骨芽細胞で発現が高かった (Fig1 B)。骨芽細胞分化に伴い、*Slitrkl* 発現は上昇した (Fig2 C-H)。

(2) *Slitrkl* ノックアウトマウスは、ワイルドタイプと比較して、骨密度、骨梁幅、骨梁間幅、体重が、減少傾向にあった (Fig2 A, B)。

(3) ワイルドタイプと *Slitrkl* ノックアウトマウスの初代培養骨芽細胞 (POB) における、骨芽細胞分化マーカー、*Runx2*、*Osterix*、*ALP*、*Osteocalcin* 発現について調べたところ、ワイルドタイプと比較して、*Slitrkl* ノックアウトマウスの初代培養骨芽細胞 (POB) で、それらの発現が有意に低下していた (Fig 3A-D)。

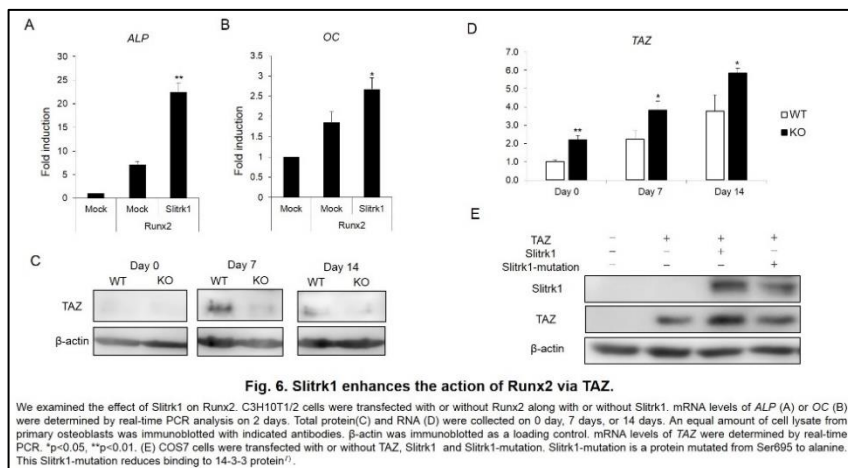
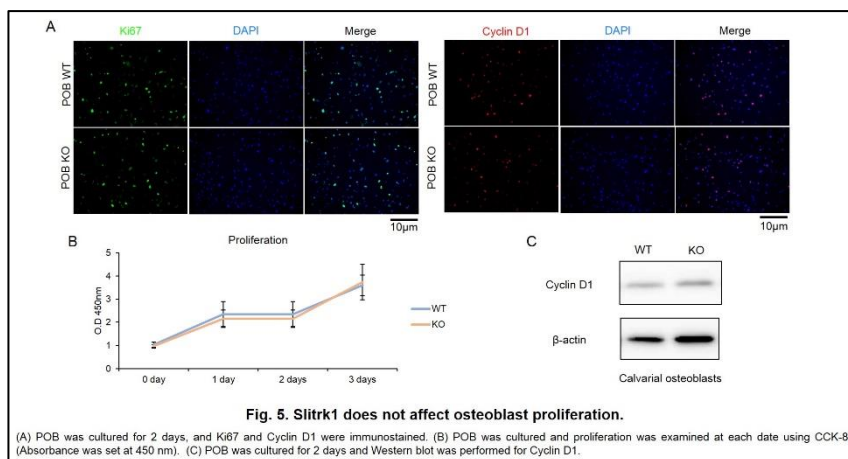
(4) BMP-2 誘導性の異所性骨の体積は、ワイルドタイプに比べ *Slitrkl* ノックアウトマウスで小さかった (Fig 4A, B)。また、骨髄間質細胞 (BMSCs) を BMP-2 で骨芽細胞分化を誘導した時の *ALP* 活性、初代培養骨芽細胞 (POB) の石灰化度はワイルドタイプに比べ *Slitrkl* ノックアウトマウスで小さかった (Fig 4C-E)。



(5) ワイルドタイプと Slitrk1 ノックアウトマウスの初代培養骨芽細胞 (POB) において、増殖のマーカーや細胞数に差を認めず、細胞増殖に差を認めなかった (Fig 5A-C)。

(6) C3H10T1/2 細胞に Runx2 を過剰発現させると、Slitrk1 との共発現で ALP と osteocalcin (OC) の発現量が有意に増加した (Fig 6A, B)。

TAZ の発現は骨芽細胞分化に伴ってワイルドタイプと、Slitrk1 ノックアウトマウスで差が生じた (Fig 6C)。遺伝子レベルでの TAZ の発現は、Slitrk1 ノックアウトマウスで高いため (Fig 6D)、TAZ タンパクの分解が示唆される。Slitrk1 過剰発現によって、TAZ のタンパク量は上昇するが、Slitrk1 の 14-3-3 タンパク結合部位に mutation を生じさせると、TAZ のタンパク量は減少した (Fig 6E)。これらのことより、Slitrk1 は TAZ を通じて骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである Runx2 の作用を増強し、ALP や osteocalcin (OC) の発現を上昇させることが考えられた。



(7) 以上のことから、Slitrk1 は骨芽細胞に発現を認めること、骨芽細胞分化に伴い Slitrk1 の発現は上昇すること、Slitrk1 ノックアウトマウスでは骨芽細胞分化能と骨形成が低下すること、Slitrk1 が Taz を介して Runx2 の作用を増強することが分かった。Slitrk1 と TAZ はそれぞれ 14-3-3 タンパクと結合すると報告があり^{6, 7)}、今後 Slitrk1 と TAZ が 14-3-3 タンパクを奪い合うことで骨芽細胞分化を調整するのではないかと考え、今後検討していく必要がある。

【参考文献】

- 1) Schepers FY, *et al.*, Clin Dysmorphol, 2002
- 2) Fusco C, *et al.*, Brain Dev, 2006
- 3) Jesse F. Abelson. *et al.*, Science, 2005
- 4) J Aruga. *et al.*, Mol Cell Neurosci, 2003
- 5) M Komaki. *et al.*, Cell Tissue Res, 1996
- 6) Y Kajiwar. *et al.*, Biol Psychiatry, 2009
- 7) F Kanai. *et al.*, EMBO J, 2000

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Shirakawa T, Matsubara T, William N Addison, Urata M, Kuroishi K, Gunjigake K, Kawamoto T, Kokabu S
2. 発表標題 Slitrk1, an integral membrane protein, regulates osteoblastogenesis
3. 学会等名 The 2nd Asian Symposium on Cutting-edge Biotechnology and Chemistry(2ndASCBC) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川智彦、松原琢磨、黒石加代子、郡司掛香織、川元龍夫、古株彰一郎
2. 発表標題 トゥレット症候群原因遺伝子の1つSlitrk1は十分な骨芽細胞分化に必須である
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川智彦、松原琢磨、William N Addison、黒石加代子、郡司掛香織、佐藤毅、川元龍夫、古株彰一郎
2. 発表標題 膜タンパク質Slitrk1は骨芽細胞分化を促進する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shirakawa T, Matsubara T, William N Addison, Urata M, Kuroishi K, Gunjigake K, Sato T, Kawamoto T, Kokabu S
2. 発表標題 Slitrk1, an integral membrane protein, controls osteoblast differentiation
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shirakawa T, Matsubara T, William N Addison, Kuroishi K, Gunjigake K, Kokabu S, Kawamoto T
2. 発表標題 Slitrk1, an integral membrane protein, regulates osteoblast differentiation
3. 学会等名 第7回アジア太平洋国際カンファレンス(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川智彦、松原琢磨、黒石加代子、郡司掛香織、川元龍夫、古株彰一郎
2. 発表標題 膜タンパク質であるSlitrk1は骨芽細胞分化を調整する
3. 学会等名 第79回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川智彦、松原琢磨、中富千尋、黒石加代子、郡司掛香織、川元龍夫、佐藤毅、古株彰一郎
2. 発表標題 細胞膜貫通型タンパク質Slitrk1は骨芽細胞分化を促進する
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白川智彦、古株彰一郎、松原琢磨、黒石加代子、郡司掛香織、川元龍夫
2. 発表標題 トゥレット症候群原因遺伝子の1つSlitrk1は骨芽細胞分化を促進する
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白川智彦、古株彰一郎、松原琢磨、黒石加代子、郡司掛香織、川元龍夫
2. 発表標題 トゥレット症候群原因遺伝子の1つSlitrk1は骨芽細胞分化に関与する
3. 学会等名 第14回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 2. Shirakawa T, Matsubara T, Addison N W, Urata M, Kuroishi N K, Gunjigake K, Sato T, Kawamoto T, Kokabu S.
2. 発表標題 Slitrk1, an integral membrane protein, controls osteoblast differentiation
3. 学会等名 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白川智彦、松原琢磨、黒石加代子、郡司掛香織、川元龍夫、古株彰一郎
2. 発表標題 トゥレット症候群原因遺伝子の1つSlitrk1は骨芽細胞分化を調整する
3. 学会等名 第15回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 4. Shirakawa T, Matsubara T, Addison N W, Kuroishi N K, Gunjigake K, Kawamoto T, Kokabu S
2. 発表標題 Slitrk1, an integral membrane protein, promotes osteoblastogenesis.
3. 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松原 琢磨 (Matsubara Takuma) (00423137)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (27102)	
研究分担者	川元 龍夫 (Kawamoto Tatsuo) (50323704)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	佐藤 毅 (Sato Tsuyoshi) (60406494)	埼玉医科大学・医学部・准教授 (32409)	
研究分担者	松尾 拡 (Matsuo Kou) (70238971)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	郡司掛 香織 (Gunjigake Kaori) (90448811)	九州歯科大学・歯学部・助教 (27102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------