

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09830

研究課題名(和文)細胞骨格関連分子Kidによる骨・軟骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of Kid, the linesin motor protein, in growth plate formation

研究代表者

松原 琢磨 (Matsubara, Takuma)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：00423137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：キネシンファミリータンパク質Kidの一塩基変異は、低身長や顎顔面の低形成を症状とする脊椎骨端骨幹端異形成-関節弛緩2(SEMDJL2)の原因である。本研究でKidの発現局在と機能を解析した結果、Kidが成長板軟骨に多く発現していた。さらにKidの遺伝子変異による機能喪失により軟骨細胞の細胞分裂の際に形成される紡錘糸の形成に異常が認められるため成長板軟骨の伸長が妨げられることを見出した。この結果によりSEMDJL2の病因の1つが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SEMDJL2は難病であり、これまでKIF22の変異が原因である可能性が示唆されていたが、KIF22の機能およびどのようにしてSEMDJL2が発症するのかのメカニズムが不明であった。本研究ではKIF22の軟骨細胞における役割とSEMDJL2患者で認められるKIF22の変異が軟骨細胞増殖に与える影響を明らかにした。本研究はSEMDJL2の発症メカニズムの一端を明らかにしたことから、今後の治療法の開発に貢献できると期待している。

研究成果の概要(英文)：Single nucleotide mutations in the kinesin family protein Kid are the cause of spondyloepimetaphyseal dysplasia, joint laxity, leptodactylic type (SEMDJL2), which is symptomatic of short stature and maxillofacial hypoplasia. Analysis of Kid localization and function in this study revealed that Kid is highly expressed in the growth plate cartilage. Furthermore, we found that loss of function of Kid results in abnormal formation of spindle fibers, which are formed during chondrocyte cell division, and thus prevents growth plate cartilage elongation. This result reveals one of the etiologic causes of SEMDJL2.

研究分野：常態系口腔科学

キーワード：軟骨 キネシン 細胞増殖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節弛緩を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症 2 型 (SEMDJL2) は顎顔面の低成長や低身長などを症状とする。SEMDJL2 患者の全エクソーム解析によりキネシンスーパーファミリータンパク質 *KIF22* 遺伝子の変異が発見された。発見された変異のほとんどが *KIF22* のモータードメインに存在する事から *KIF22* の機能の喪失が SEMDJL2 の病態につながっているのではないかと考えられていた。しかしながら、*KIF22* の機能的役割には不明な点が多く、SEMDJL2 の病態の発症機序は不明であった。

### 2. 研究の目的

SEMDJL2 の病態解明のために *KIF22* の機能的役割を明らかにすることを目的とした。特に SEMDJL2 患者は顎顔面の低成長や低身長を呈することから成長板軟骨における機能が重要であると考えられるため、*KIF22* の軟骨における機能を検討した。

### 3. 研究の方法

- (1) 5 週齢マウスを用いて、*KIF22* がどの臓器・組織で機能しているのかを検討するために *KIF22* の発現を定量的リアルタイム PCR 法と免疫組織染色により検索した。
- (2) *Kif22* 遺伝子変異マウスを作成し、表現型を解析する。生後 1 日齢のマウスの骨格標本を複製し、軟骨および骨の表現型を解析した。また、生後 7 週齢のマウスの脛骨を採取し、マイクロ CT 解析と骨形態計測をおこなった。
- (3) *Kif22* 遺伝子変異マウス肋軟骨より軟骨細胞を採取し、細胞増殖および軟骨基質産生能を検討した。
- (4) 軟骨細胞前駆細胞株 ATDC5 を用いて、shRNA による遺伝子ノックダウンをおこない軟骨細胞の増殖および分化における *KIF22* の機能を検討した。また、SEMDJL2 患者で多くみられる *KIF22* pro 148 leu および *KIF22* arg 149 gln 変異に相当するマウス *KIF22* P143L および R144Q を発現するベクターを作成した。*KIF22* P143L および R144Q を ATDC5 に過剰発現し、軟骨細胞の増殖および分化を検討した。

### 4. 研究成果

- (1) 定量的 PCR により *Kif22* が骨端部の組織で非常に高い発現を示すことが明らかとなった。免疫染色をおこなった結果、*KIF22* は成長板の増殖層軟骨に発現していた。これらの結果より、*KIF22* は成長板軟骨の形成に関与していることが示唆された。
- (2) 当初は SEMDJL2 に相当する *Kif22* R144Q 変異マウスの作成を試みたが、仔を得られなかった。そこで、モータードメイン以降の C 末端側を欠失した *KIF22* の変異マウスを作成し、解析を行った。ホモ接合体マウスは生まれてこなかったが、ヘテロ接合体マウスを得られたので、ヘテロ接合体マウス (*KIF22* C) を解析した。骨格標本を解析したところ、*KIF22* C の脛骨長は野生型マウスに比べ短かった。また、脛骨と大腿骨間の距離は *KIF22* C の方が野生型に比べ短くなっていた。これは SEMDJL2 の四肢の短縮と関節弛緩という表現型に似ていると考えられた。次に、7 週齢マウスの成長板を HE 染色および von-kossa 染色により解析した。その結果、*KIF22* C の脛骨成長板軟骨は野生型に比べ短くなっていた。これらの結果は *KIF22* が長管骨の成長板の伸長に必須的役割を果たしていることを示唆している。

また、マイクロ CT および骨形態計測により 7 週齢マウス脛骨を解析したが、KIF22 C の骨密度が少ない傾向にあったが、骨密度およびその他のパラメーターに KIF22 C と野生型との有意な差は認められなかった。成長過程において骨量などの差が縮まる可能性が考えられるので、今後の研究によって他の週齢のマウスを解析し、骨における KIF22 の役割を検討したい。

(3) KIF22 C 由来の軟骨細胞は野生型に比べ、細胞の増殖能が減少していた。詳しく解析した結果、KIF22 C 由来の軟骨細胞では細胞分裂の分裂期において形成される紡錘体の形成が異常であった。そのため、正常な細胞分裂ができなかったと考えている。また、KIF22 C 由来の軟骨細胞の軟骨基質産生は著しく低下していた。

(4) shRNA を用いて ATDC5 細胞にて KIF22 をノックダウンした結果、細胞分裂時の紡錘体が形成されず、細胞増殖能が低下していた。ATDC5 細胞に KIF22 P143L あるいは R144Q を過剰発現すると、細胞分裂期における紡錘体が非対称など異常な形態を示した。細胞増殖を検討すると、KIF22 P143L あるいは R144Q の過剰発現により細胞増殖能も低下していた。また、KIF22 のノックダウン、変異体の過剰発現ともに軟骨細胞分化が低下していた。

以上の結果は KIF22 が軟骨細胞の正常な細胞分裂に必須であり、長管骨では成長板の伸長を促進していることが示唆された。SEMDJL2 における KIF22 変異体は軟骨の正常な細胞分裂を阻害するために、成長板が伸長せず、四肢の短縮が起こると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Dusadeemelap Chirada, Rojasawasthien Thira, Matsubara Takuma, Kokabu Shoichiro, Addison William N.	4. 巻 36
2. 論文標題 Inhibition of TET mediated DNA demethylation suppresses osteoblast differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101402R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirakawa Tomohiko, Toyono Takashi, Inoue Asako, Matsubara Takuma, Kawamoto Tatsuo, Kokabu Shoichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Factors Regulating or Regulated by Myogenic Regulatory Factors in Skeletal Muscle Stem Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1493~1493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11091493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsubara Takuma, Yasuda Kazuma, Mizuta Kana, Kawaue Hiroka, Kokabu Shoichiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Tyrosine Kinase Src Is a Regulatory Factor of Bone Homeostasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5508~5508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23105508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Goto A., Kokabu S., Dusadeemelap C., Kawaue H., Matsubara T., Tominaga K., Addison W.N.	4. 巻 101
2. 論文標題 Tongue Muscle for the Analysis of Head Muscle Regeneration Dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 962~971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345221075966	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuta Kana, Matsubara Takuma, Goto Akino, Addison William N., Nakatomi Mitsushiro, Matsuo Kou, Tada-Shigeyama Yukiyo, Yaginuma Tatsuki, Honda Hiromi, Yoshioka Izumi, Kokabu Shoichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Plectin promotes tumor formation by B16 mouse melanoma cells via regulation of Rous sarcoma oncogene activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-10033-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rojasawasthien Thira, Usui Michihiko, Addison William N., Matsubara Takuma, Shirakawa Tomohiko, Tsujisawa Toshiyuki, Nakashima Keisuke, Kokabu Shoichiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Nobiletin, a <sc>NF B</sc> signaling antagonist, promotes <sc>BMP</sc> induced bone formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 62~70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fba.2022-00093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda Kazuma, Matsubara Takuma, Shirakawa Tomohiko, Kawamoto Tatsuo, Kokabu Shoichiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Protein phosphatase 1 regulatory subunit 18 suppresses the transcriptional activity of NFATc1 via regulation of c-fos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone Reports	6. 最初と最後の頁 101114 ~ 101114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2021.101114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirakawa Tomohiko, Rojasawasthien Thira, Inoue Asako, Matsubara Takuma, Kawamoto Tatsuo, Kokabu Shoichiro	4. 巻 580
2. 論文標題 Tumor necrosis factor alpha regulates myogenesis to inhibit differentiation and promote proliferation in satellite cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 35~40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.09.067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsubara Takuma, Addison William N., Kokabu Shoichiro, Neff Lynn, Horne William, Gori Francesca, Baron Roland	4. 巻 296
2. 論文標題 Characterization of unique functionalities in c-Src domains required for osteoclast podosome belt formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100790 ~ 100790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 ROJASAWASTHIEN THIRA, SHIRAKAWA TOMOHIKO, WASHIO AYAKO, TSUJISAWA TOSHIYUKI, MATSUBARA TAKUMA, INOUE ASAKO, TAKAHAMA UMEQ, NAKASHIMA KEISUKE, KOKABU SHOICHIRO	4. 巻 35
2. 論文標題 Vignacyanidin Polyphenols Isolated from Vigna Angularis Bean Promote Osteoblast Differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 883 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Takumi, Rojasawasthien Thira, Takeuchi Sachiko Yamashita, Okamoto Hideto, Okumura Nobuaki, Shirakawa Tomohiko, Matsubara Takuma, Kawamoto Tatsuo, Kokabu Shoichiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Royal Jelly Enhances the Ability of Myoblast C2C12 Cells to Differentiate into Multilineage Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1449 ~ 1449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules29071449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawaue Hiroka, Rojasawasthien Thira, Dusadeemeelap Chirada, Matsubara Takuma, Kokabu Shoichiro, Addison William N.	4. 巻 -
2. 論文標題 PI15, a novel secreted WNT-signaling antagonist, regulates chondrocyte differentiation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Connective Tissue Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/03008207.2024.2349818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroka Kawaue, Takuma Matsubara, Kenichi Nagano, Aoi Ikedo, Thira Rojasawasthien, Anna Yoshimura, Chihiro Nakatomi, Yuuki Imai, Yoshimitsu Kakuta, William N. Addison, Shoichiro Kokabu	4. 巻 -
2. 論文標題 KIF22 regulates mitosis and proliferation of chondrocyte cells.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Kawaue H, Matsubara T, Addison W, Kokabu S
2. 発表標題 KIF22, a Kinesin-like Protein, is Essential for Cell Proliferation and Differentiation in ATDC5 Chondrocytes
3. 学会等名 ASBMR 2022 Annual Meeting, Austin (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mizuta K, Matsubara T, Addison W, Yaginuma T, Yoshioka I, Kokabu S
2. 発表標題 PLECTIN promotes the proliferation, aggregation and adhesion of malignant melanoma via regulation of SRC signaling activity.
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference 2022 in Fukuoka (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawaue H, Matsubara T, Addison W, Fujita Y, Saeki K, Watanabe K, Nishida I, Kokabu S
2. 発表標題 KIF22, the gene responsible for SEMDJL2, is Essential for Cell Proliferation and Differentiation in ATDC5 Chondrocytes like cells
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference 2022 in Fukuoka (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上 紘佳,松原 琢磨,William N. Addison,渡辺 幸嗣,古株 彰一郎,牧 憲司,
2. 発表標題 SEMDJL2の責任遺伝子KIF22は軟骨前駆細胞様細胞株ATDC5の増殖と軟骨分化に必須である
3. 学会等名 第81回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水田 奏,松原 琢磨,William N. Addison,柳沼 樹,富永 和宏,吉岡 泉,古株 彰一郎
2. 発表標題 Plectinはがん遺伝子Srcを活性化を介して悪性黒色腫の細胞増殖と接着を制御する
3. 学会等名 第81回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上 紘佳,松原 琢磨,William.N.Addison,古株 彰一郎
2. 発表標題 脊椎骨端骨幹端異形成 関節弛緩症2型の責任遺伝子KIF22は軟骨前駆細胞様細胞株ATDC5の増殖と軟骨細胞分化に必須である
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上 紘佳,松原 琢磨,Addison William,渡辺 幸嗣,牧 憲司,古株彰一郎
2. 発表標題 脊椎骨端骨幹端異形成-関節弛緩症の原因遺伝子KIF22は骨・軟骨に発現し細胞増殖を制御する.
3. 学会等名 第80回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawaue, H., Matsubara, T., Addison, W., Saeki, K., Watanabe, K., Maki, K., Kokabu, S.
2. 発表標題 KIF22, a kinesin-like protein, is essential for cell proliferation in ATDC5 chondrocyte-like cells.
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawaue, H., Matsubara, T., Addison, W., Kokabu, S
2. 発表標題 KIF22, a gene associated with skeletal abnormalities in SEMDJL2 disease, is required for chondrocyte proliferation and differentiation
3. 学会等名 29th IAPD congress, Maastricht (国際学会)
4. 発表年 2023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	角田 佳充 (Kakuta Yoshimitsu) (00314360)	九州大学・農学研究院・教授  (17102)	
研究分担者	永野 健一 (Nagano Kenichi) (60834348)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教  (17301)	
研究分担者	中富 千尋 (Nakatomi Chihiro) (80878273)	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
---------	---------