

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17257

研究課題名（和文）細胞膜貫通型タンパクSlitrk1が紡ぐ骨-骨格筋-神経連関の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism that the transmembrane protein Slitrk1 controls the bone-skeletal muscle-nerve connection

研究代表者

白川 智彦（SHIRAKAWA, Tomohiko）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50908225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：Slitrk1は神経細胞の樹状突起伸長に関わる膜タンパク質である。Slitrk1はチックを主症状とするトゥレット症候群の原因遺伝子の1つと報告されている。トゥレット症候群患者は骨折が多いという報告がある一方で、Slitrk1の骨における研究はなされていない。本研究では骨におけるSlitrk1の役割を検討する事を目的とした。Slitrk1は骨に発現しており、骨分化に関与すること、Slitrk1の欠失によって体長が小さくなることが明らかになった。Slitrk1は骨芽細胞分化に重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

これまでに骨とSlitrk1の関連に着目した研究は皆無であった。また、神経系と骨に共通して発現する因子Slitrk1を基軸として神経系-骨連関の一端の解明を試みた点で学術的独自性は高い。本研究が今後さらに発展され、骨におけるSlitrk1の役割が詳細に解析されることで骨代謝における役割が明らかになれば、将来的にトゥレット症候群患者の骨折に対しても予防や治療法確立に貢献できると考える。さらに骨-神経連関の解明にも寄与できる可能性があることから社会的意義も高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Slitrk1 is a membrane protein involved in the dendritic extension of nerve cells. Slitrk1 has been reported to be one of the responsible genes for Tourette's syndrome. Tourette's syndrome is characterized by motor tics. Although it has been reported that patients with Tourette's syndrome suffer from a high incidence of bone fractures, no research has been conducted on Slitrk1 in bone. The purpose of this study was to investigate the role of Slitrk1 in bone. It was revealed that Slitrk1 is expressed in bone, and involved in bone differentiation. The mouse deleted of Slitrk1 results in reduced body length. These results suggest that Slitrk1 is important for osteoblast differentiation.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：骨代謝

## 1. 研究開始当初の背景

### 1. 顎顔面骨格の正常発育

頭蓋・顎顔面の形態的特徴（骨格）は骨格筋の影響を強く受ける。例えば、成長期に発症した顔面半側萎縮症患者では左右で筋の張力が異なることで顔面骨格の非対称を生じる。また、歯列弓形態は頬筋や口輪筋などによる外圧、舌筋による内圧、上下的に咬合力が加わることにより、そのバランスの取れたところに位置するようになる (Shirakawa T et al., 2021)。

成長発育の時期・スパートは臓器によって異なる。体幹における骨の成長はスキヤモンの成長曲線の一般型に該当するのに対し、上顎骨や下顎骨は神経型の曲線に近い発育様式を示す (図 1)。上下顎骨は脳・神経系と近接しており、脳・神経と協調して成長していると考えられる。

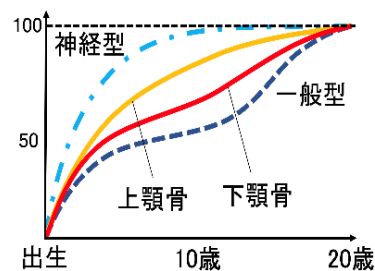


図 1: スキヤモンの成長曲線

### 2. 骨-骨格筋-神経連関

骨と骨格筋は細胞系譜的に近縁で、ともに間葉系幹細胞から分化する。骨と筋は腱を介して結合し、筋の収縮によって骨は動き、機械刺激を得る。さらに、骨と筋は相互にサイトカインを介して影響を与え合う。この骨や骨を動かす骨格筋は神経を介して脳により制御され、骨や骨格筋などの運動器の疾患は脳機能の低下や認知症などの脳神経疾患を伴うことも多い。これまでにホルモンや神経伝達因子、サイトカインなどを介して神経系と骨や骨格筋とのネットワークの構築を裏付ける多くの研究がある (Fukuda T et al., 2015)。つまりこれは、骨・骨格筋・神経系の三者は密接に関連していることを意味し、今後の骨・骨格筋代謝研究では、これら三者を包括的に解析することが求められている。

### 3. トウレット症候群の原因遺伝子 *Slitrk1* と骨組織

*Slitrk1* は神経細胞の樹状突起伸長に関わる細胞膜貫通型タンパク質である。*Slitrk1* は自閉症や運動性および言語性チックを呈するトウレット症候群の原因遺伝子の1つとして同定され、遺伝子異常により *Slitrk1* の機能喪失が起こる (Abelson JF et al., 2005)。トウレット症候群患者は骨形成の遅延 (Scheper YF et al., 2002) や骨折が多い (Lu YY et al., 2016) とされる。しかしながら、トウレット症候群患者の骨も、骨代謝における *Slitrk1* の役割も全く解析されていない。

## 2. 研究の目的

*Slitrk1* null マウスは抑うつ傾向を示すことからトウレット症候群モデルマウスと言われている。このトウレット症候群モデルマウスを野生型マウスと比較し、*Slitrk1* null マウスの骨におけるフェノタイプを明らかにすること、骨芽細胞系細胞に発現する *Slitrk1* の骨代謝における役割を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 初代培養細胞を用いた実験

*Slitrk1* null または野生型同腹子から得られる、胎児線維芽細胞 (MEF)、新生仔頭蓋骨骨芽細胞、および長管骨由来骨髄間質細胞を用いる。 $\beta$ -glycerophosphate とアスコルビン酸、および BMP-2 処理で骨芽細胞分化を誘導し、Real-time PCR 法や Western blotting 法で骨芽細胞分化マーカーの発現、ならびに ALP 活性を測定する。また長期間培養し石灰化状態を Alizarin Red 染色や Von Kossa 染色で評価する。細胞増殖は WST-8 法による生細胞数の定量や細胞周期関連マーカーの発現量を同定する。以上から、骨芽細胞系細胞の増殖や分化における *Slitrk1* の役割を同定する。

## 2. Slitrk1 null マウスの骨代謝解析

### i) 定常状態の解析

10 週齢オス *Slitrk1* null および野生型同腹子 (n=6) の大腿骨の形態計測,  $\mu$ CT 撮影, 骨密度測定を行う。また脛骨を採取し, 分子生物学的に各種マーカー遺伝子等の解析を行う。

### ii) 骨の力学的解析

10 週齢オス *Slitrk1* null および野生型同腹子 (n=6) の大腿骨に対して, 物理 3 点曲げ試験, 圧縮試験, 動的粘弾性試験を行うことで, 最大荷重, 破断変異, 剛性 (stiffness), 破断エネルギーなどの力学パラメーター算出する。なお, 解析は株式会社クレハ分析センターに委託する。

## 4. 研究成果

野生型マウスと *Slitrk1* null マウスの体長を比較したところ, *Slitrk1* null マウスの方が小さかった (図 2)。大腿骨の長さも同様に *Slitrk1* null マウスで小さく, 骨格的なフェノタイプを有することが明らかになった。

生後 3 日齢の野生型マウスと *Slitrk1* null マウスから頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞を採取し, 骨芽細胞分化誘導を  $\beta$ -glycerophosphate とアスコルビン酸を用いて行った。野生型由来の骨芽細胞に比べて *Slitrk1* null マウス由来骨芽細胞の方が ALP 活性が低かった (図 3A)。また, リアルタイム qPCR を行ったところ, 骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシンの遺伝子発現も上昇していた。10T1/2 細胞に骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである *Runx2* と *Slitrk1* を共発現させる実験を行ったところ, 顕著に ALP 活性が上昇した (図 3B)。

一方で, 野生型マウスと *Slitrk1* null マウスの骨芽細胞の増殖を WST-8 法で比較したところ, 細胞増殖には有意差を認めなかった。

また 3 点曲げ試験を 8 週齢オスの大腿骨を用いて比較検討したが, 各力学的パラメーターに有意な差を認めなかった。



図 2: 体長の比較 (8 週齢)

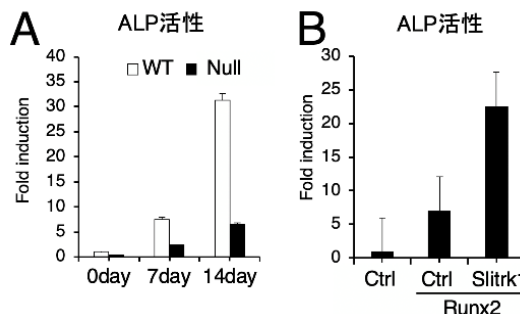


図 3: *Slitrk1* の有無による ALP 活性の変動

以上の結果から, *Slitrk1* null マウスは骨格的には小さいというフェノタイプを有し, *Slitrk1* は骨芽細胞の増殖には影響を与えない一方, 骨芽細胞分化を制御することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内（山下）紗智子、白川智彦、松原琢磨、古株彰一郎、川元龍夫
2. 発表標題 ローヤルゼリーは骨格筋幹細胞の増殖・分化の制御を介して骨格筋の再生を促進する
3. 学会等名 第82回九州歯科学会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 巧、白川智彦、松原琢磨、黒石加代子、郡司掛香織、水原正博、川元龍夫、古株彰一郎
2. 発表標題 Slitrk1 nullマウスが形成する筋管は小さい
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------