

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14614

研究課題名（和文）モータータンパク質Myosin10が海綿骨量と身長を制御する機構の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of the motor protein coding gene Myo10 in mouse growth plate.

研究代表者

片岡 太郎（Kataoka, Taro）

熊本大学・生命資源研究・支援センター・特定事業研究員

研究者番号：10782419

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：非定型ミオシンの一種Myo10は破骨細胞の正常な骨吸収に必須の遺伝子であるが、Myo10-KOマウスは予想に反し骨形成の低下を示したことから、生体においては骨形成に寄与するはずだが、どのように骨形成に関与しているのか全く分かっていない。本研究では骨組織での発現と骨芽・破骨細胞の初代共培養系を用いMyo10が破骨細胞の分化・機能に与える影響を調べた。その結果、破骨細胞の機能に明確な違いは観察されなかったものの、単独で骨髄間質細胞を骨芽細胞へ分化誘導を行うと、骨芽細胞数やカルシウム沈着量が減少する傾向を示した。これはMyo10が骨芽細胞や前駆細胞の増殖に関与していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海綿骨は成長期終了前後に最大量となり、その後は加齢に伴って減少の一途をたどる。従って成長期の海綿骨形成はのちの骨粗しょう症などの骨疾患の罹患率にも影響するため、海綿骨量決定に関わる遺伝因子の同定と分子機構の解明は疾患予防・治療法開発の点で重要である。Myo10-KOマウスは若年期の海綿骨低形成を示すが、Myo10が骨芽細胞とその前駆細胞の細胞分裂への関与を通じて骨形成に関わるためであることが初代培養細胞を用いた実験で示された。今後、生体内においても同様に骨芽細胞数の減少が起きているのか、またその分子機構を解明することで骨代謝におけるMyo10の役割を明らかにしたい。

研究成果の概要（英文）：Myosin X is involved in the osteoclastic bone resorption, but Myo10-KO mice show decreased trabecular bone formation. This phenotype indicated Myo10 is rather involved in the bone formation in organisms, but the underlying mechanisms remain unknown. In this study, we revealed that osteoblasts also express MYO10 protein in mouse bone tissue and Myo10-KO mice-derived osteoblasts showed decreased proliferation and Ca deposition. These results indicated that Myo10 is involved in the bone formation via osteoblasts and/or their progenitor cells proliferation.

研究分野：マウス遺伝学、骨代謝

キーワード：MyosinX 骨芽細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

骨組織は重力下で体を支え、生命に必須なミネラルの貯蔵庫としての重要な役割を持つ、脊椎動物にとって最も特徴的な組織の一つである。その重要性から機能が損なわれた際に個体に与える影響は大きい。実際に日本では高齢化の進展に伴い骨粗しょう症を始めとした骨疾患が問題となっているが、その原因は遺伝因子と環境因子が複雑に関わるため、容易には解決することができない社会的課題である。申請者はこれまで、環境因子の影響を極力排除することができるマウス順遺伝学的手法によって、成長期の海綿骨形成に関わる遺伝子の探索を行い (Kataoka et al. G3 (2017))、新規骨関連遺伝子 *Myo10* を見出した。成長期は骨形成が最も盛んに行われる期間で、成長期の間に作られる骨量が少ないことは高齢時の骨疾患の罹患率を上げる。そのため *Myo10* は成長期の骨形成だけでなく、予防医療の観点からも重要な遺伝子である可能性が高いが、骨に関わる機能は全く知られていない。

Myo10 はミオシンファミリーに属し、フィラメントを形成しない非定型ミオシンの一種である。*Myo10* は細胞内小器官やタンパク質と結合した状態でアクチンフィラメント上を移動し、仮足形成や細胞内輸送を担うことが分かっている。一方で申請者が作製した *Myo10*-K0 マウスは骨形成が落ち着く 10 週齢で野生型 (WT) マウスと比べ骨組織の一つである海綿骨が有意に細く、低海綿骨量を示した。現時点で *Myo10*-K0 マウスの海綿骨表現型は報告されておらず、骨を吸収 (破壊) する破骨細胞の機能維持に必須であるとする *in vitro* での研究が (McMichael et al. JBC (2010)) あるのみである。骨組織において *Myo10* の役割が破骨細胞の機能維持だけであれば、破骨細胞の機能が低下する K0 マウスの骨量は増加するはずである。しかし、K0 マウスの骨量は減少していた。これは *Myo10* の役割は破骨細胞の機能維持だけではなく、骨組織において未知の機能を持つことを示している。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨代謝における *Myo10* の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Myo10*-K0 マウス成長軟骨の詳細な表現型解析と発現解析

[a] 2、4、6、8 週齢の脛骨膝側の成長軟骨領域を含む脱灰パラフィン切片を作製し、アルシアンブルー染色によって成長軟骨を可視化・撮影・ImageJ による成長軟骨厚の定量と比較を行った。4 週齢以降の骨サンプルはモルルス液による脱灰を行ったのちパラフィン包埋した。成長軟骨厚の定量は軟骨の中心部分の厚みを測定した。

[b] [a] で作製したパラフィン切片を用い TUNEL 法により軟骨細胞のアポトーシスを検出・比較を行った。

[c] 免疫組織化学に使用可能な市販マウス抗 MYO10 抗体がないため、ウェスタンブロッティングに使用可能なヒト抗 MYO10 抗体 (SIGMA HPA024223) を用い、マウス MYO10 発現細胞の特定を試みた。川本法による非脱灰未固定骨切片を作製し免疫組織化学を行った。最終的に未固定切片を染色前に 4%PFA で 3 分固定、TBST (0.025% TritonX) 洗浄 5 分 3 回、0.3M グリシンを含む 1%BSA/TBS で室温 1 時間ブロッキングし、1%BSA/TBS で 100 倍希釈した抗 MYO10 抗体は 4 で一晚反応させた。TBST で洗浄 5 分 3 回ののち、二重染色する抗体に合わせて 500 から 1000 倍希釈した AlexaFluor 二次抗体を室温で 2 時間反応させ、さらに DAPI による核染色ののち退色防止剤を含む封入材で封入した。

成長軟骨における *Myo10* 発現解析は RT-PCR によって行った。結合組織をトリミングした大腿骨および脛骨をコラゲナーゼ処理し、70 マイクロメーターのセルストレーナーで細胞のみを回収した。一部細胞は軟骨細胞であることの確認のためアルシアンブルー染色を行った。軟骨細胞から AGPC 法を用いて RNA を抽出、逆転写反応ののち RT-PCR によって *Myo10* 発現の確認を行った。

(2) 骨芽-破骨細胞共培養法の樹立と *Myo10* 欠損が骨芽細胞と破骨細胞の分化・機能に与える影響の検証

Myo10-K0 マウス由来の骨芽細胞と破骨細胞の骨形成能、骨吸収能、また分化能を野生型と比較した。

[a] 骨芽細胞はマウス骨髄細胞を増殖培地 (aMEM + 10% FBS、2mM L-Glutamine) でサブコンフルエントになるまで約 1 週間培養し、骨芽細胞分化培地 (増殖培地 + 0.5mM Ascorbic acid、10mM Beta-glycerophosphate) に切り替え 1 週間培養することで得た。骨芽細胞の骨形成能は、1%アリザリンレッド S 染色によるカルシウムの沈着量で検証した。

[b] 破骨細胞はマウス骨髄細胞を M-CSF (R and D Systems) を加えた増殖培地 (aMEM + 10% FBS、

2mM L-Glutamine、10ng/mL M-CSF)で一晩培養し、未接着細胞を回収、リンパ球分離溶液(ナカライ)に重層させ遠心分離(400g、30分)によって回収した骨髄マクロファージを破骨細胞分化培地(増殖培地+100ng/mL sRANKL(オリエンタル酵母)と10ng/mL M-CSF)で分化させることで得た。破骨細胞の骨吸収能は酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRACP)活性をTRACP & ALP double-stain Kit(タカラバイオ)およびBone Resorption Assay Plate 24(PG Research)を用いたピットアッセイで検証した。

[c] 共培養による破骨細胞分化法の樹立と破骨細胞の機能解析

前培養した骨髄細胞を 1×10^5 cells/cm²で24well培養プレートにまき、増殖培地で2日間培養した。リンパ球分離溶液で分離した骨髄マクロファージは 1×10^4 cells/cm²の細胞濃度になるよう共培養分化培地(増殖培地+10nM 活性型ビタミンD3、1 μ M Prostaglandin E2(いずれもCayman Chemical))で調整し、2日間培養した骨髄細胞に加えた。共培養分化培地は2日おき交換し、9日間培養ののち実験に使用した。破骨細胞の骨吸収能はTRACP活性とピットアッセイで検証した。

4. 研究成果

(1) *Myo10*-KO マウス成長軟骨の経時的な表現型解析と発現解析

Myo10-KO マウスは海綿骨の低形成と脛骨の低伸長を示す。海綿骨の形成と脛骨の伸長は、いずれも成長軟骨が硬骨へ置換する軟骨性骨化と呼ばれる様式をとることから、この軟骨性骨化に*Myo10*が関与すると考えた。そこで以下の仮説、[a]増殖軟骨細胞の枯渇によって成長軟骨が早期閉鎖(骨形成の早期終了)、[b]軟骨細胞の細胞死の増加による骨化不全の検証および[c]成長軟骨細胞での*Myo10*発現解析を行った。

[a]*Myo10*-KOの成長軟骨は野生型と比べ有意に肥厚していた。しかし、4週齢以降では野生型との間に有意差は観察されなかった。[b]上記実験で一過的な肥厚が観察された2週齢から4週齢にかけて成長軟骨におけるアポトーシスが*Myo10*-KOマウスで亢進しているかTUNEL法で検証したが、野生型との間に明らかな違いは観察されなかった。[c]成長軟骨細胞において*Myo10*の発現を

RT-PCR法で検証したが、35サイクルのRT-PCRでわずかにバンドが確認できる程度であった。この微弱な発現は成長軟骨細胞ではなく、除ききれなかった骨膜由来の発現でと考えられる。抗ヒト*MYO10*抗体を用いた免疫組織化学でも同様の結果が得られた。具体的には成長軟骨細胞では発現が全く見られず、海綿骨、皮質骨で発現する細胞が確認できた。骨芽細胞マーカーとしてSP7、破骨細胞マーカーとしてRANKをそれぞれ検出する抗体を用いた二重染色から、*Myo10*は骨芽細胞と破骨細胞で発現していることが確認できた。

実験で軟骨細胞には*Myo10*の発現がないこと、2週齢で*Myo10*-KOマウスに成長軟骨の肥大が見られたものの、4週齢以降では野生型と有意な差は観察されなかった。よって*Myo10*-KOマウスの骨形成低下の原因は成長軟骨の骨化不全ではなく、また観察された一過性の成長軟骨の肥大も骨芽細胞による軟骨性骨化の低下によって、成長軟骨から硬骨へ置き換わる量の減少が原因である可能性がある。

(2) 骨芽-破骨細胞共培養法の樹立と*Myo10*欠損が骨芽細胞と破骨細胞の分化・機能に与える影響の検証

*Myo10*は破骨細胞の分化・骨吸収に関わる遺伝子であると報告されている。一方で骨量の低下を示す*Myo10*-KOマウスの表現型はむしろ*Myo10*が骨形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。この相反する実験結果を検証するため、破骨細胞における*Myo10*の機能解析を行うにあたり、より生体内の状態に近い実験系を構築した。従来の*in vitro*系では破骨細胞に分化可能なRAW264.7培養細胞やマウスから採取した骨髄マクロファージをM-CSFとRANKLを用いて分化刺激し、分化能・骨吸収能を検討していた。対して本研究では骨髄間質細胞と骨髄マクロファージの共培養による破骨細胞分化誘導系を構築し、破骨細胞分化に*Myo10*欠損が与える影響を検証した。

共培養による破骨細胞分化誘導系は高効率に骨髄マクロファージを成熟した多核の破骨細胞に分化させることができた。また、骨基質に見立てたハイドロキシアパタイトを塗布した培養プレートにおいても同様に破骨細胞分化を誘導し、ハイドロキシアパタイトを吸収する骨吸収能も持つことも確認できた。

この共培養系を用いた破骨細胞の分化能・骨吸収能に*Myo10*の有無は明確な違いは観察されなかった。本期間中ではマーカー遺伝子の発現量などによる検証を行うまでには至らず追加の検証は必要であると考えている。

また、骨髄から間質細胞を前培養ののち共培養実験のため細胞数をカウントすると、*Myo10*-KOマウス由来の間質細胞数が少ない傾向が見られた。そのため、間質細胞を骨芽細胞分化培地で培養

し、骨形成能・細胞増殖速度を調べた。本結果は十分な回数の検証を行うには時間が足りず統計学的検証は実施できなかったが、*Myo10*-KO で細胞数、カルシウム沈着量が少ない傾向が見られた。

この結果が生体内においても起こりうるのか、また、そうだとした場合骨芽細胞の数減少・機能低下が破骨細胞の分化成熟・機能に与える影響を調べるため骨芽細胞特異的 *Myo10*-KO マウスの作製を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 片岡 太郎, 田村 勝, 前野 哲輝, 城石 俊彦, 荒木 喜美
2. 発表標題 モータータンパク質Myosin10は軟骨内骨化で何をしているのか？
3. 学会等名 モロシヌス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡 太郎, 田村 勝, 前野 哲輝, 城石 俊彦, 荒木 喜美
2. 発表標題 ミオシンファミリーMyosinXが成長期の骨形成で果たす役割の解明
3. 学会等名 日本遺伝学会 第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡 太郎, 田村 勝, 前野 哲輝, 城石 俊彦, 荒木 喜美
2. 発表標題 ミオシンファミリーMyosinXの骨形成における機能解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡太郎、田村勝、前野哲輝、城石俊彦、荒木喜美
2. 発表標題 長管骨における新規軟骨性骨化制御因子Myo10の機能解析
3. 学会等名 第31回モロシヌス研究会
4. 発表年 2018年

1．発表者名 片岡太郎
2．発表標題 モータータンパク質Myosin10が海綿骨量と身長を制御する機構の解明
3．学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム2018年度 若手支援技術講習会
4．発表年 2018年

1．発表者名 片岡太郎、田村勝、前野哲輝、城石俊彦、荒木喜美
2．発表標題 海綿骨構造と身長を制御するモータータンパク質Myosin10の機能解析
3．学会等名 日本遺伝学会第90回大会
4．発表年 2018年

1．発表者名 Taro Kataoka, Masaru Tamura, Akiteru Maeno, Toshihiko Shiroishi, Kimi Araki
2．発表標題 Motor protein MyosinX is a novel regulatory factor for longitudinal bone growth and trabecular bone microstructures via the normal endochondral ossification in the growth plate
3．学会等名 2019 AMMRA Meeting (国際学会)
4．発表年 2019年

1．発表者名 片岡太郎、田村勝、澁谷仁寿、前野哲輝、阿部幸一郎、鈴木雄祐、城石俊彦、荒木喜美
2．発表標題 Myo10が骨形成に果たす役割の解明
3．学会等名 日本遺伝学会第91回大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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