

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20014

研究課題名(和文) 転写共役因子Smad4による運動器制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanisms of locomotive tissues by a transcriptional co-activator, Smad4

研究代表者

塚本 翔 (TSUKAMOTO, SHO)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：20707658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Smad4は、TGF- β ファミリーの細胞内シグナル伝達に必須の転写共役因子である。我々は、タモキシフェン誘導型Smad4 cKOマウスを樹立し、出生後の骨格成長におけるTGF- β ファミリーの役割について検討した。出生後にSmad4を欠失させたマウスは、骨形成が亢進し骨量が増加した。また、Smad4 cKOマウスでは、骨端成長板における肥大軟骨細胞層が拡張していた。初代軟骨細胞をTGF- β 1を添加して培養すると、軟骨細胞分化が抑制された。これらの結果から、TGF- β ファミリーのSmad4依存的な細胞内シグナル伝達系が出生後の軟骨細胞や骨芽細胞の分化や機能を制御している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Smad4 is an essential co-activator for intracellular signaling of the TGF- β family. We examined a role of the TGF- β family in postnatal regulatory mechanisms of the locomotive tissues by establishing a tamoxifen-inducible Smad4 conditional knockout (Smad4 cKO) mice. Bone volume was increased in Smad4 cKO mice by an increase of bone formation. Hypertrophic zone in epiphyseal growth plate was expanded in Smad4 cKO mice. Treatment of primary chondrocytes cultured in vitro with TGF- β 1 suppressed chondrogenic differentiation. Taken together, our findings suggest that Smad4-dependent intracellular signaling of the TGF- β family regulates differentiation and function of osteoblasts and chondrocytes in postnatal mice.

研究分野：病態生理学

キーワード：骨・軟骨代謝学 細胞内シグナル伝達 骨系統疾患

1. 研究開始当初の背景

TGF- β ファミリーのメンバーである TGF- β , BMP, GDF, Myostatin は、骨、軟骨、骨格筋など運動器の形成や維持に重要な成長因子群である。BMP や GDF は、骨格筋組織への移植で異所性に軟骨や骨を誘導し、in vitro でも強力に骨芽細胞や軟骨細胞の分化を促進する。一方、異所性骨誘導活性のない TGF- β も、軟骨の発生や成長、骨組織の維持に重要な役割を果たす。また、骨格筋に特異的に発現する Myostatin の機能を喪失すると、ヒトを含む多くの脊椎動物で筋線維の肥大が起こり骨格筋量が増加する。BMP や GDF は、細胞内で転写因子 Smad1/5/9 を、TGF- β や Myostatin は Smad2/3 を活性化し、運動器に重要な遺伝子の転写活性を誘導すると考えられている。BMP や TGF- β はそれぞれ異なる転写因子を活性化し、多彩な生物活性を示すが、細胞内情報伝達系において、共通に転写共役因子 Smad4 を必須とする。しかし、胎生期から Smad4 を欠失したマウスは、胎生致死となるため、出生後の運動器における Smad4 の役割は未だ不明な点が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、Smad4 による運動器の制御機構を分子レベルで解明することを目的に、以下の課題に取り組んだ。

- (1) タモキシフェン誘導性に Smad4 を任意の時期に欠失できる遺伝子改変マウスの樹立。
- (2) タモキシフェン誘導性 Smad4 欠失マウスの表現型解析。
- (3) 誘導型 Smad4 欠失細胞の樹立と細胞生物学的解析。
- (4) 運動器の制御に重要な TGF- β ファミリーのリガンドの同定。

3. 研究の方法

(1) floxed Smad4 マウスとタモキシフェン投与により全身の細胞で Cre を発現する CAG-CreERT マウスを交配し、Smad4^{f/f}; CAG-CreERT^{Tg/+} の遺伝子型を持つコンディショナルノックアウトマウス (Smad4 cKO) の樹立と繁殖を行った。また、タモキシフェンの投与量及び、投与時期を検討するために CAG-Cre-ERT1 マウスと Cre 酵素の発現で蛍光タンパク質 EGFP を発現するレポーターマウスを交配した。交配によって得られたレポーターマウスを用いて、タモキシフェン投与による骨・軟骨組織における Cre の発現を最適化した。

(2) 上記(1)の実験から最適化した条件で、Smad4 cKO マウスにタモキシフェン投与を行った。タモキシフェン投与群と溶媒投与群の、

脛骨と大腿骨を摘出しマイクロ CT で骨量を解析した。また、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及びアルシアンブルー染色による組織学的な検討も行った。さらに、骨標識剤 (蛍光カルシウムキレート剤) を Smad4 cKO マウスに投与し、非脱灰凍結切片を用いた骨形態計測も合わせて実施した。

(3) Smad4 cKO マウスの肋軟骨をコラゲナーゼで酵素処理し軟骨細胞を調整した。Smad4 cKO マウス由来の軟骨細胞に、in vitro で活性型タモキシフェンを添加し、軟骨細胞分化マーカーの発現をリアルタイム PCR 法で検討した。

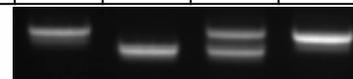
(4) 上記(3)と同様の方法で、野生型マウスから軟骨細胞を調整し、無血清条件下で BMP-4、TGF- β 1 及び TGF- β 受容体阻害剤処理し細胞凝集塊として2週間培養し分化誘導を行った。軟骨細胞の分化は、凝集塊のパラフィン切片を作製し評価した。

4. 研究成果

(1) floxed Smad4 マウス と CAG-CreERT マウスの交配によって、Smad4 cKO マウスを樹立することに成功した (図 1)。また、レポーターマウスを用いて、投与回数及び投与頻度を検討した結果、タモキシフェンを 40 mg/kg/day で5日間連続投与することにより、全身の主要な組織で EGFP の発現を確認することができた

Smad4	f/f	+/+	f/+	f/f
Tam-Cre	+/+	Tg/+	Tg/+	Tg/+

• floxed Smad4



• CAG-CreERT



図 1. Smad4 cKO マウスの樹立

(2) タモキシフェン投与により Smad4 が欠失したマウスは、一次海綿骨領域の骨量が増加した。また、アルシアンブルー染色で軟骨基質を染色すると、Smad4 cKO マウスは、骨端成長板が拡張していた。さらに、骨形態計測によって、肥大軟骨細胞が増加骨成長が亢進していることが判明した。

(3) Smad4 cKO マウスから調整した軟骨細胞に、活性型タモキシフェン処理を行うことで、Smad4 の発現が消失した (図 2)。コントロール及び Smad4 欠失軟骨細胞から RNA を抽出し、分化マーカーの発現を検討すると、Smad4 欠失細胞では、コントロールに比べ、アグリカン等の発現が亢進した。この結果から、Smad4 が軟骨細胞分化を抑制していると考えられた。

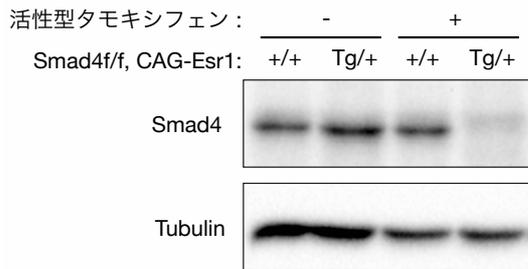


図 2. Smad4 欠失軟骨細胞の樹立

(4) 野生型マウスから調整した軟骨細胞に TGF- β 1 及び BMP-4 を添加し、細胞凝集塊として培養すると、TGF- β 1 添加群では、アルシアンブルーに染色される細胞外基質が減少した。さらに、無血清条件下で、TGF- β 受容体阻害剤を添加すると、アルシアンブルー染色陽性の軟骨基質が増加し、大型の肥大軟骨様細胞が出現した (図 3)。この結果は、軟骨細胞自身が TGF- β を産生し、自己の細胞分化を抑制している可能性を示す。

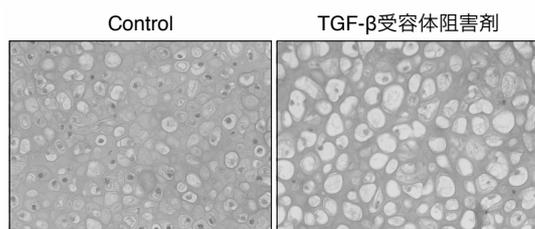


図 3. 初代軟骨細胞の細胞凝集塊

以上の結果から、下記の点が明らかとなり、現在、論文投稿準備中である。

(1) Smad4 を介した細胞内シグナルは、出生後の運動器における骨芽細胞や軟骨細胞の分化や機能制御に重要である。

(2) 軟骨細胞自身が TGF- β を産生し、自己の細胞分化を抑制する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 片桐岳信、大手聡、塚本翔、倉谷麻衣、町谷亜位子 (2015). 進行性骨化性線維異形成症. The BONE 29: 309-316. 査読無
http://www.m-review.co.jp/files/tachihiyomi_J0002_2903_0099-0106.pdf

[学会発表] (計 16 件)

- ① Aiko Machiya, Satoshi Ohte, Sho Tsukamoto, Noriko Sekine, Eijiro Jimi, Naoto Suda, Takenobu Katagiri: Role of TGF- β super family signaling in the mechanism of tooth formation in adult mice. International Symposium 2016 Oral and Craniofacial Development and Diseases (2016 年 12 月 12 日 大阪大学 弓倉記念ホール 大阪府 大阪市)
- ② Sho Tsukamoto, Keigo Kumagai, Satoshi Ohte, Noriko Sekine, Takenobu Katagiri: TGF- β signaling regulates chondrocyte differentiation. The 14th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2016 年 11 月 11 日 ~12 日 埼玉医科大学 30 周年記念講堂 埼玉県 日高市)
- ③ Keigo Kumagai, Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Aiko Machiya, Mai Kuratani, Takenobu Katagiri: Functional analysis of mutant ALK2 associated with a novel skeletal dysplasia and diffuse intrinsic pontine glioma. The 14th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2016 年 11 月 11 日 ~12 日 埼玉医科大学 30 周年記念講堂 埼玉県 日高市)
- ④ Aiko Machiya, Satoshi Ohte, Sho Tsukamoto, Noriko Sekine, Eijiro Jimi, Naoto Suda, Takenobu Katagiri: The TGF- β family signaling is involved in regulation of incisor formation of adult mice. The 14th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2016 年 11 月 11 日 ~12 日 埼玉医科大学 30 周年記念講堂 埼玉県 日高市)
- ⑤ Satoshi Ohte, Aiko Machiya, Sho Tsukamoto, Takenobu Katagiri: Functional analysis of the role of cytoplasmic tail domain of BMP type II receptor, BMPR-II. The 14th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2016 年 11 月 11 日 ~12 日 埼玉医科大学 30 周年記念講堂 埼玉県 日高市)
- ⑥ Mai Kuratani, Satoshi Ohte, Sho Tsukamoto, Aiko Machiya, Keigo Kumagai, Takenobu Katagiri: Expression of the TGF- β family ligands in the injured skeletal muscle. The 14th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2016 年 11 月 11 日 ~12 日 埼玉医科大学 30 周年記念講堂 埼玉県 日高市)

- ⑦ Takenobu Katagiri, Satoshi Ohte, Sho Tsukamoto, Mai Kuratani, Aiko Machiya, Keigo Kumagai: Establishment of Tet-On C2C12 cells express ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressiva and diffuse intrinsic pontine glioma. 2016 ASBMR Annual Meeting (2016年9月16日～19日 Georgia world congress center アメリカ アトランタ)
- ⑧ Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Noriko Sekine, Mai Kuratani, Aiko Machiya, Takenobu Katagiri: TGF- β signaling suppresses chondrocyte differentiation. 2016 Bones & Teeth Gordon Research Conference (2016年02月15日～17日 HotelGalvez アメリカ ガルベストン)
- ⑨ Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Noriko Sekine, Mai Kuratani, Aiko Machiya, Takenobu Katagiri: TGF- β signaling suppresses chondrocyte differentiation. 2016 Bones & Teeth Gordon Research Seminar (2016年02月13日～14日 HotelGalvez アメリカ ガルベストン)
- ⑩ Aiko Machiya, Mai Fujimoto, Satoshi Ohte, Sho Tsukamoto, Mai Kuratani, Naoto Suda, Takenobu Katagiri: A role of FKBP12 in activation of mutant ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). 2015 Australian New Zealand Bone & Mineral Society Annual Meeting (2015年11月1日～4日 Hotel Grand Chancellor オーストラリア タスマニア)
- ⑪ Satoshi Ohte, Katsumi Yoneyama, Sho Tsukamoto, Mai Kuratani, Aiko Machiya, Takenobu Katagiri: Establishment and characterization of C2C12 cells expressing human ALK2 under control of Tet-On system. 2015 Australian New Zealand Bone & Mineral Society Annual Meeting (2015年11月1日～4日 Hotel Grand Chancellor オーストラリア タスマニア)
- ⑫ 塚本翔、大手聡、関根典子、倉谷麻衣、町谷亜位子、片桐岳信: TGF- β シグナルによる軟骨細胞の分化調節機構の解析。第13回RCGMフロンティアシンポジウム (2015年10月30日～31日 埼玉医科大学 30周年記念講堂 埼玉県 日高市)
- ⑬ 町谷亜位子、藤本舞、大手聡、塚本翔、

倉谷麻衣、須田直人、片桐岳信: 進行性骨化性線維異形成症(FOP)の骨化シグナル活性化機構における FKBP12 と II 型 BMP 受容体の役割。 (2015年10月30日～31日 埼玉医科大学 30周年記念講堂 埼玉県 日高市)

- ⑭ 倉谷麻衣、町谷亜位子、塚本翔、大手聡、片桐岳信: 筋分化における TGF- β ファミリーシグナル分子の発現。 (2015年10月30日～31日 埼玉医科大学 30周年記念講堂 埼玉県 日高市)
- ⑮ Aiko Machiya, Mai Fujimoto, Sho Tsukamoto, Mai Kuratani, Satoshi Ohte, Naoto Suda, Takenobu Katagiri: Role of FKBP12 in Signal Transduction by Mutant ALK2 Responsible for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. 2015 ASBMR Annual Meeting (2015年10月09日～12日 Washington State Convention Center アメリカ シアトル)
- ⑯ Takenobu Katagiri, Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Aiko Machiya, Mai Kuratani: Establishment of a novel model of heterotopic ossification in skeletal muscle in fibrodysplasia ossificans progressive. 2015 Myogenesis Gordon Research Conference (2015年06月21日～26日 Renaissance Tuscany Il Ciocco イタリア アルッカ)

〔図書〕 (計1件)

- ① Takenobu Katagiri, Sho Tsukamoto, Kenji Osawa, and Kokabu S (2015) Ligand-Receptor Interactions and Their Implications in Delivering Certain Signaling for Bone Regeneration. In A Tissue Regeneration Approach to Bone and Cartilage Repair, Mechanical Engineering Series, Zreiqat H, Rosen V and Dunstan C, editors. Springer, London, pp1-15. 査読有 doi 10.1007/978-3-319-13266-2_1

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

埼玉医科大学ゲノム医学研究センターHP
http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div04_PPhysiol/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 翔 (TSUKAMOTO SHO)
埼玉医科大学・医学部・助手
研究者番号：20707658

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

片桐 岳信 (KATAGIRI TAKENOBU)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：80245802