

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11026

研究課題名(和文) Smad4を介した骨格制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanisms of skeletal via Smad4

研究代表者

塚本 翔 (Tsukamoto, Sho)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：20707658

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)：TGF- $\beta$ ファミリーは、転写因子Smadの活性化を介して、骨格形成を制御している。Smad4は、Smad依存的な細胞内シグナルに必須の共役因子である。我々は、タモキシフェン誘導性にSmad4を欠失できるマウス(Smad4 cKO)を樹立した。Smad4 cKOマウスは、海綿骨の骨量が増え、 $\beta$ -catenin陽性の骨芽細胞が増加していた。Wntシグナル関連分子の解析によって、Smad4 cKOマウスでは、Wnt7bの発現が亢進していることが明らかとなった。これらの結果は、Smad4依存シグナルの阻害によって、Wnt7bの発現亢進を介し、骨形成が亢進することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、出生後におけるSmad4を介したシグナルは、骨形成を抑制している可能性を見出した。さらに、TGF- $\beta$ ファミリーと骨形成を強力に亢進するWntシグナルの新たなクロストークの発見は、骨粗鬆症をはじめとした骨代謝関連の疾患の新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Members of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family regulate skeletal formation through activating Smad transcription factors. Smad4 is a critical coactivator essential for the Smad-dependent intracellular signaling. We established Smad4 conditional knockout (Smad4 cKO) mice under the control of tamoxifen. The Smad4 cKO mice showed an increase in bone mass in trabecular bone. They also showed an increase in  $\beta$ -catenin positive osteoblasts in spongiosa. The analysis of the Wnt signaling related genes revealed that expression of Wnt7b was increased in Smad4 cKO mice. These results suggest that the inhibition of Smad4-dependent signaling enhances bone formation through increased expression of Wnt7b.

研究分野：病態生理学

キーワード：骨形成 骨系統疾患 骨粗鬆症 シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

TGF- $\beta$ ファミリーは、BMP、GDF、TGF- $\beta$ 、Activinなど30種類以上の因子からなり、それぞれ骨格の形成や維持に重要な役割を果たす。骨格中の標的細胞が発現する BMP や GDF の受容体は転写因子 Smad1/5/9 を活性化するのに対し、TGF- $\beta$  や Activin の受容体は Smad2/3 を活性化することが知られている。一方、Smad4 は、活性化された Smad1/5 および Smad2/3 の両者と複合体を形成し、標的遺伝子への結合に必須の転写共役因子と考えられている。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、出生後の骨格をはじめとした運動器における Smad4 の役割は不明な点が残されている。そこで、出生後の任意のタイミングで転写共役因子 Smad4 を欠失する遺伝子改変マウス (Smad4 cKO マウス) を樹立、解析した。すると、出生後に Smad4 を欠失したマウスでは、骨量が増加することが判明した (若手研究 B、2015 年度～2016 年度 採択課題、研究代表者: 塚本翔)。

#### 2. 研究の目的

TGF- $\beta$ ファミリーのシグナルは、一般的に骨格形成を促進すると考えられている。しかし、TGF- $\beta$ ファミリーのシグナル伝達の共役因子である Smad4 を成体マウスで欠失させると、予想に反して骨量が増加することを見出した。そこで、本研究では、出生後の Smad4 を介した TGF- $\beta$ ファミリーによる骨格制御機構を明らかにする目的に、以下の解析を行った。

- (1) Smad4 cKO マウスにおける骨組織の解析
- (2) Smad4 cKO マウスによる骨量増加の機序解明
- (3) Smad4 を介したシグナルが制御している骨格形成に重要な標的分子の同定

#### 3. 研究の方法

- (1) Smad4 floxed マウスと CAG-CreERt マウスの交配により得られた、10 週令の誘導型 Smad4 欠失マウスにタモキシフェンを投与し、大腿骨の海綿骨及び、皮質骨をマイクロ CT で解析した。また、1 年令のマウスにタモキシフェンを投与し、老年マウスにおける影響を検討した。
- (2) コントロールマウス及び、Smad4 cKO マウスの脛骨を採取し、固定、脱灰後に、パラフィン包埋による組織切片を作製し、骨代謝に重要なタンパクの免疫染色を行った。
- (3) Smad4 cKO マウスの脛骨から抽出した RNA を鋳型に cDNA を合成し、主要な骨代謝関連マーカーの発現をリアルタイム PCR 法で解析した。
- (4) 野生型マウスの骨髄細胞を分離培養し、骨髄間葉系幹細胞を調製した。骨髄間葉系幹細胞に Wnt7b を処理し、骨芽細胞分化に対する影響をアリザリンレッド S 染色で検討した。
- (5) Smad4 floxed マウス、Wnt7b floxed マウス及び、CAG-CreERt を交配し、タモキシフェン誘導性の Smad4 と Wnt7b のダブルコンディショナルノックアウトマウス (Smad4;Wnt7b dcKO) を樹立し、骨組織の組織学的解析を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) Smad4 cKO マウスは、海綿骨が著しく増加していた。一方、マイクロ CT による定量解析の結果、皮質骨の骨量に大きな変化はなかった。また、1 年令の老年マウスで Smad4 を欠失した結果、コントロールと比較して、海綿骨の骨量に変化は認められなかった。

- (2) Smad4 cKO マウスの脛骨組織切片を使用して、骨芽細胞活性の指標となるオステオカルシン及び、Wnt シグナル活性化の指標となる  $\beta$ -catenin の組織免疫染色を行った。すると、Smad4 cKO マウスでは、オステオカルシン陽性の骨芽細胞が増加し、それらは  $\beta$ -catenin 陽性であることが明らかとなった (図 1)。

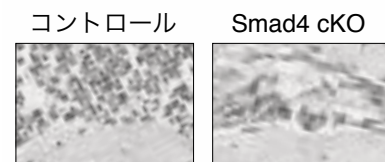


図 1. オステオカルシン免疫染色

- (3) Smad4 cKO マウスの骨組織から調製した RNA をサンプルとし、Wnt シグナルを制御するリガンド、アンタゴニスト及び、受容体の mRNA 発現を検討した。コントロールマウスと比較解析を行った結果、Smad4 cKO マウスでは、Wnt7b mRNA の発現が亢進していることが明らかとなった。

- (4) 骨髄間葉系幹細胞に Wnt7b 処理を行い、アリザリンレッド S 染色を行った。すると、コントロールと比較し、Wnt7b を処理した骨髄間葉系幹細胞では、アリザリンレッド S 染色陽性の骨様結節が多数認められた。この結果から、Wnt7b は、in vitro で骨芽細胞分化を促進する因子であることが示唆された (図 2)。

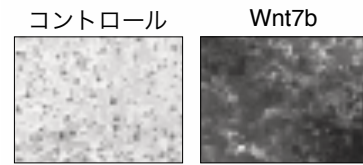


図 2. アリザリンレッド S 染色

- (5) 新たに誘導型 Smad4;Wnt7b dcKO マウスを樹立し、脛骨の骨量を解析した。Smad4;Wnt7b dcKO では、Smad4 cKO による骨量増加が認められず、コントロールマウスと同程度の骨量であることが判明した。

以上の結果から、Smad4 cKO による骨量増加は、Wnt7b を介した作用であることが明らかとなり、Wnt7b は、骨形成を制御する新たな分子であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Katagiri Takenobu, Tsukamoto Sho, Nakachi Yutaka, Kuratani Mai	4. 巻 19
2. 論文標題 Discovery of Heterotopic Bone-Inducing Activity in Hard Tissues and the TGF- Superfamily	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3586 ~ 3586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19113586	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 Katagiri Takenobu, Tsukamoto Sho, Nakachi Yutaka, Kuratani Mai	4. 巻 33
2. 論文標題 Recent Topics in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 331 ~ 331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3803/EnM.2018.33.3.331	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 Machiya Aiko, Tsukamoto Sho, Ohte Satoshi, Kuratani Mai, Fujimoto Mai, Kumagai Keigo, Osawa Kenji, Suda Naoto, Bullock Alex N., Katagiri Takenobu	4. 巻 111
2. 論文標題 Effects of FKBP12 and type II BMP receptors on signal transduction by ALK2 activating mutations associated with genetic disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 101 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2018.03.015	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 Katagiri Takenobu, Tsukamoto Sho, Kuratani Mai	4. 巻 109
2. 論文標題 Heterotopic bone induction via BMP signaling: Potential therapeutic targets for fibrodysplasia ossificans progressiva	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 241 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2017.07.024	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 Haga Nobuhiko, Nakashima Yasuharu, Kitoh Hiroshi, Kamizono Junji, Katagiri Takenobu, Saijo Hideto, Tsukamoto Sho, Shinoda Yusuke, Sawada Ryoko, Nakahara Yasuo	4. 巻 62
2. 論文標題 Fibrodysplasia ossificans progressiva: Review and research activities in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 3~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14065	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 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 16件)

1. 発表者名 Tsukamoto S, Kuratani M, Sekine N, Okubo M, Tanaka S, Jimi E, Oda H, Katagiri T
2. 発表標題 Wnt7b expressed by hypertrophic chondrocytes is a critical inducer of bone formation during endochondral ossification
3. 学会等名 ASBMR 2019 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukamoto S, Kuratani M, Sekine N, Okubo M, Tanaka S, Jimi E, Oda H, Katagiri T
2. 発表標題 A crosstalk between Wnt and TGF- $\beta$ /BMP families regulates endochondral bone formation
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Wnt Signaling (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本翔、倉谷麻衣、関根典子、大久保美里、田中仲裁、自見英治郎、織田弘美、片桐岳信
2. 発表標題 内軟骨性骨化におけるBMPとWntの新たなクロストーク
3. 学会等名 第5回日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本翔、倉谷麻衣、田中伸哉、自見英治郎、織田弘美、片桐岳信
2. 発表標題 Wnt7bは分化成熟した軟骨細胞が発現する内軟骨性骨化における骨形成促進因子である
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 Katagiri T, Tsukamoto S, Kuratani M, Tsuji S, Takaishi K, Kunikata T, Nakamura K, Kawaguchi Y, Hasegawa J
2. 発表標題 Identiffication of a critical amino acid residue in ALK2 for the binding and inhibition by the anti-ALK2 blocking antibody
3. 学会等名 ASBMR 2019 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片桐岳信、塚本翔、倉谷麻衣
2. 発表標題 抗ALK2阻害抗体の結合と阻害活性に重要なALK2細胞外領域アミノ酸残基の同定
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 Katagiri T, Tsukamoto S, Kuratani M, Tsuji S, Takaishi K, Kunikata T, Nakamura K, Kawaguchi Y, Hasegawa J
2. 発表標題 Identiffication of a critical amino acid residue in ALK2 for the binding and inhibition by the anti-ALK2 blocking antibody
3. 学会等名 FASEB SRC on TGF- Superfamily (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Katagiri T, Tsuji S, Tsukamoto S, Kuratani M, Ohte S, Sekine N, Kumagai K, Osawa K, Takaishi K, Nakamura K, Kawaguchi Y, Hasegawa J
2. 発表標題 A role of dimer formation of ALK2, a BMP type receptor in the activation of intracellular signaling
3. 学会等名 Gordon Research Conference on Cartilage (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsukamoto S, Kuratani M, Sekine N, Okubo M, Nakachi Y, Tanaka S, Jimi E, Oda H, Katagiri T
2. 発表標題 A novel crosstalk between TGF- /BMP and Wnt families through Smad4 in endochondral ossification
3. 学会等名 ASBMR 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukamoto S, Kuratani M, Sekine N, Okubo M, Nakachi Y, Tanaka S, Jimi E, Oda H, Katagiri T
2. 発表標題 A novel crosstalk between TGF- /BMP and Wnt families through Smad4 in endochondral ossification
3. 学会等名 Mechanistic and Therapeutic Advances in Rare Skeletal Diseases Research Meeting [A meeting in affiliation with ASBMR 2018] (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukamoto S, Kuratani M, Sekine N, Okubo M, Nakachi Y, Tanaka S, Jimi E, Oda H, Katagiri, T
2. 発表標題 A novel crosstalk between BMP and Wnt7b in postnatal endochondral ossification
3. 学会等名 12th International BMP Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukamoto S, Kuratani M, Sekine N, Okubo M, Nakachi Y, Katagiri T
2. 発表標題 A novel crosstalk between the TGF- and Wnt families in endochondral ossification
3. 学会等名 The 16th RCGM International Symposium of Academic Frontier
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本翔、倉谷麻衣、田中伸哉、自見英治郎、織田弘美、片桐岳信
2. 発表標題 TGF- ファミリーはWntシグナルを介して内軟骨性骨化を制御する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katagiri T, Tsuji S, Tsukamoto S, Kuratani M, Ohte S, Takaishi K, Nakamura K, Kawaguchi Y, Hasegawa J
2. 発表標題 An antibody against ALK2 extracellular domain reveals a role of dimer formation for signal activation
3. 学会等名 ASBMR 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuratani M, Tsukamoto S, Sekine N, Okubo M, Nakachi Y, Katagiri, T
2. 発表標題 Expression levels of BMP ligands are increased by muscle trauma
3. 学会等名 12th International BMP Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 片桐岳信、辻真之介、塚本翔、倉谷麻衣、大手聡、高石巨澄
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症（FOP）モデルマウスを用いた抗ALK2抗体の解析
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukamoto S, Sekine N, Kuratani M, Kumagai K, Tanaka S, Jimi E, Oda H, Katagiri T
2. 発表標題 Analysis of skeletal growth in Smad4 knockout mice
3. 学会等名 2017 FASEB Science Research Conferences on The TGF- Superfamily (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katagiri T, Tsuji S, Tsukamoto S, Ohte S, Kumagai K, Osawa K, Takaishi K, Nakamura K, Kawaguchi Y, Hasegawa J
2. 発表標題 Development of blocking monoclonal antibodies against ALK2, which is a type I receptor for BMPs
3. 学会等名 2017 FASEB Science Research Conferences on The TGF- Superfamily (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsukamoto S, Sekine N, Kuratani M, Kumagai K, Tanaka S, Jimi E, Oda H, Katagiri T
2. 発表標題 Postnatal ablation of Smad4 enhances endochondral ossification in epiphyseal growth plate
3. 学会等名 2017 ASBMR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Katagiri T, Tsuji S, Tsukamoto S, Ohte S, Kumagai K, Osawa K, Takaishi K, Nakamura K, Kawaguchi Y, Hasegawa J
2. 発表標題 Development of blocking monoclonal antibodies against ALK2, which is a type I receptor for BMPs
3. 学会等名 2017 ASBMR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsukamoto S, Sekine N, Kuratani M, Kumagai K, Jimi E, Katagiri T
2. 発表標題 Analysis of skeletal phenotypes in Smad4 conditional knockout mice
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kuratani M, Tsukamoto S, Katagiri T
2. 発表標題 Analysis of the TGF- family ligands that are increased in regenerating skeletal muscle and induce BMP signaling via a mutant ALK2 associated with fibrodysplasia ossificans progressiva
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本翔、関根典子、倉谷麻衣、熊谷桂吾、大久保美里、片桐岳信
2. 発表標題 転写共役因子Smad4は軟骨細胞分化を介して骨形成を制御する
3. 学会等名 第15回RCGMフロンティアシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 倉谷麻衣、塚本翔、関根典子、片桐岳信
2. 発表標題 BMP受容体ALK2を介した異所性骨化モデルの構築
3. 学会等名 第15回RCGMフロンティアシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本翔
2. 発表標題 TGF-ファミリーの軟骨細胞分化を介した骨形成への役割
3. 学会等名 第14回彩の国骨フォーラム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

埼玉医科大学 医学部 ゲノム基礎医学 <a href="http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biomedsci/index.html">http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biomedsci/index.html</a> 埼玉医科大学 FOP診療・研究プロジェクト <a href="http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biomedsci/index.html">http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biomedsci/index.html</a>
---

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