

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791574

研究課題名(和文)骨・関節発生および骨代謝におけるTGF-beta 型受容体の役割の解析

研究課題名(英文)An analysis of critical role of transforming growth factor-b (TGF-b) signaling in bone and joint development

研究代表者

松延 知哉 (Matsunobu, Tomoya)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20543416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Dermo1-Creマウスを用いて、TGF- $\beta$ 1型受容体ALK5の未分化間葉系細胞特異的ノックアウトマウス(ALK5Dermo1-CKO)の解析を行った。ALK5Dermo1-CKOでは短縮した骨形成異常が認められた。胎生18.5日ALK5Dermo1-CKO大腿骨における軟骨細胞の増殖能は減少せず、一次海綿骨における軟骨組織が残存しており、破骨細胞の減少が認められた。また、RANKLの発現が低下していた。TGF- $\beta$ シグナリングは、骨格組織発生において、幼若骨芽細胞におけるRANKL発現を促進し、間接的に破骨細胞の分化誘導を制御して、軟骨組織のリモデリングを促進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the limb development of mesenchymal-specific TGF- $\beta$  type I receptor (ALK5) mutant mice by Dermo1-Cre in order to identify the role of TGF- $\beta$  signaling in cartilage formation and matrix remodeling. Femurs of ALK5Dermo1CKO mice were significantly shorter than those of control mice. In primary spongiosa of E18.5 ALK5Dermo1CKO femurs, the cartilage matrix was remained, TRAP-positive osteoclasts were decreased, and RANKL expression by osteoblasts was substantially reduced. Since Dermo1-Cre was not expressed in hematopoietic lineage cells, the decreased number of mature osteoclasts in the primary spongiosa of ALK5Dermo1CKO femurs is likely due to reduced RANKL-mediated osteoclast differentiation. Our results suggest that TGF- $\beta$  signaling is required for cartilage matrix remodeling during endochondral ossification by promoting osteoclastogenesis in an osteoblast-dependent manner.

研究分野：整形外科

キーワード：TGF- $\beta$  骨格組織発生

1. 研究開始当初の背景

TGF- $\beta$  は、もともと正常線維芽細胞の増殖を、寒天培地中で促進する因子として同定されたため、細胞をがん化させるという意味の Transforming growth factor と命名された。その後の研究により、TGF- $\beta$  ファミリーの因子は、がん化のみならず発生過程から疾患に至るまで、様々な生命イベントに深く関与することが知られてきた。

TGF- $\beta$  ファミリーのシグナル伝達は、サイトカインである TGF- $\beta$  が、細胞膜表面に存在する膜型受容体の TGF- $\beta$  受容体に結合することから開始される。TGF- $\beta$  には、TGF- $\beta$  1/2/3 が存在している。これらのリガンドが、II 型受容体に結合すると、**I 型受容体 (ALK5)** が recruit され、複合体を形成する。次いで、恒常的活性化状態にある II 型受容体が ALK5 のセリン残基をリン酸化して活性化する。活性化した ALK5 は、細胞内エフェクターである Smad2 あるいは 3 タンパクをリン酸化し、Smad4 と三量体を形成する。この活性化型 Smad 複合体は核内移行し、標的遺伝子の発現を制御する。Canonical Smad pathway と呼ばれる。一方で Smad を介さない Smad 非依存的なシグナル伝達経路もごく最近報告され、non-canonical pathway と呼ばれる。

疾患病態解明には、疾患モデルマウスを用いた解析が重要な役割を果たすが、これまでの研究においては、TGF- $\beta$  シグナリングを構成する分子を標的とした遺伝子改変マウス間で、表現系が異なっていた。例を挙げると、リガンドである TGF- $\beta$  1 のノックアウトマウスでは、生後骨幹端の骨密度が低下したり、骨横径および長径の減少が認められたりしたが、Smad3 のノックアウトマウスでは骨に明らかな異常は認められなかった。このことは、TGF- $\beta$  シグナリングが、複数のリガンドを利用し、細胞内シグナル伝達においては Canonical および Non-canonical pathway を用いることに起因すると考えられる。

そこで、本研究者が所属していた、米国国立衛生研究所 / 国立歯科・頭蓋顔面研究所では、**I 型受容体 (ALK5)** に着目した。複数のリガンドは、すべて **ALK5 を介して下流の canonical および non-canonical pathway にシグナルを伝える**ため、ALK5 の欠失は、包括的に TGF- $\beta$  シグナリングを不活性化すると予測したからである。これまでの報告によると、ALK5 ノックアウトマウス

(ALK5-KO) が作製されたが、胎生 10.5 日で血管異常のために致死であり、骨形成の解析は不可能であった。そこで、本研究代表は、早期胎生致死を回避するため **Cre/LoxP システム** を利用し、骨格組織のみで ALK5 が欠失するような **ALK5 コンディショナルノックアウトマウス (ALK5-CKO)** を作製した。Cre/LoxP システムでは、組織特異的なプロモーターの下流に Cre 遺伝子をつなぎ、LoxP

配列で挟んだ遺伝子を Cre recombinase の発現する組織のみで破壊するシステムである。本研究代表者は、発生の段階で軟骨・骨共通未分化間葉系細胞に発現する Dermo-1 のプロモーターの下流に Cre 遺伝子をつないだマウスと、ALK5 遺伝子を LoxP 配列で挟んだ Flox マウスとを交配し、骨格組織特異的に ALK5 遺伝子をノックアウトした結果、ALK5 が骨発生において、骨膜形成、幼若骨芽細胞の増殖および分化に必須であることを見いだした (Matsunobu T, et al. Dev Biol. 2009 Aug15;332(2):325-38.)

しかしながら、TGF- $\beta$  シグナリングの**軟骨組織発生**における役割や、生下後**骨代謝**における役割など、解明すべき点は多く残されている。

骨格組織の発生を、細胞レベルで見ると、軟骨系細胞、骨芽細胞系細胞は共通の幹細胞に起源をもつ。未分化間葉系細胞は軟骨系組織に分化した後、最終的には肥大軟骨細胞となる。一方、未分化間葉系細胞は、骨芽細胞となった後、骨細胞へと分化する。

骨格組織の発生は、未分化間葉系幹細胞が凝集し、中心部では軟骨細胞に、辺縁部では軟骨膜細胞に分化して骨の原基が形成される。軟骨は軟骨細胞の急速な増殖や軟骨基質の分泌に伴って成長していくが、やがて増殖を止めて肥大軟骨細胞となる。肥大軟骨は様々な物質を分泌することにより、血管侵入とそれに続く骨髄形成を誘導する。さらに、血管侵入とともに入ってきた破骨細胞は石灰化した軟骨基質を分解し、骨膜から血管とともに侵入してきた骨芽細胞が骨基質を産生して一次海綿骨が形成される。以上のように、骨格組織の発生には様々な要素が複雑に絡み合っていることがわかる。そこで、骨格組織発生における TGF- $\beta$  シグナリングの役割を解析するにあたっては、**空間(構成細胞)**を考慮した介入が重要と思われる。

更には、**時間(分化段階)**を考慮した介入も重要である。TGF- $\beta$  は、細胞に対する作用は一律ではない。例えば、**TGF- $\beta$  の腫瘍に対する二面性**は有名であり、TGF- $\beta$  は腫瘍発生の初期段階では抑制に働くが、後期には促進する。骨芽細胞培養系を用いた in vitro の研究では、TGF- $\beta$  は、未分化骨芽細胞の増殖や I 型コラーゲンの産生促進などを進めるが、分化後期においてはオステオカルシンなどの分化マーカー産生は抑制される。

以上の点を考慮すると、TGF- $\beta$  シグナリングの骨格組織発生並びに生下後の骨代謝の研究のためには、**時間(分化段階)および空間(構成細胞)を考慮した研究計画が必要不可欠**である。

すなわち、組織特異的、時間特異的な ALK5 ノックアウトマウスの作製および解析は、ある特定の時点で TGF- $\beta$  シグナリングを阻害しても、別の分化時期に阻害をするのでは、表現系が異なり、解釈が異なる可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨格組織発生において、分化段階特異的に、かつ軟骨細胞、骨芽細胞特異的に ALK5 を阻害することにより、骨格組織発生における TGF- $\beta$  シグナリングの役割を明らかにすることを目的とする。また、生後長期間骨組織を観察することにより、骨代謝における TGF- $\beta$  シグナルの果たす役割を明らかにすることも目的とする。

## 3. 研究の方法

材料：マウス：ALK5-flox マウスは Sweden, Lund 大学 Stefan Karlsson 博士より、Col1a1-Cre マウスは米国 Baylor 医科大学 Gerard Karsenty 博士より、Dermo1-Cre マウスは米国 Washington 大学 David M. Ornitz 博士より、Col2a1-Cre マウスは米国テキサス大学 Richard R. Behringer 博士より、それぞれ米国国立衛生研究所 / 国立歯科・頭蓋顔面研究所 / Laboratory of Cell and Developmental Biology, Yamada 研究室に供与され、国立歯科・頭蓋顔面研究所動物倫理委員会の規定に従い施行された。

1) 骨格組織発生過程において、組織特異的に発現する Cre recombinase を用いることにより、ALK5 コンディショナルノックアウトマウス (ALK5-CKO) を作製し、骨格組織形成を観察、解析する。

A) Col1a1-Cre による分化骨芽特異的 ALK5-CKO の作製 (ALK5<sup>Col1-CKO</sup>)

B) Col2a1-Cre による軟骨細胞特異的 ALK5-CKO の作製 (ALK5<sup>Col2-CKO</sup>)

C) Dermo1-Cre による未分化間葉系細胞特異的 ALK5-CKO の作製 (ALK5<sup>Dermo1-CKO</sup>)

2) 骨格標本作成：胎生 18.5 日の組織特異的 ALK5-CKO それぞれのマウスの骨格標本を、アルシアンブルー、アリザリンレッドを用いて染色、作成した。

3) 免疫染色：胎生 18.5 日の組織特異的 ALK5-CKO の大腿骨を以下の抗体をもちいて、免疫染色を行った。Mouse monoclonal anti-aggrecan (University of Iowa Hybridoma Bank), mouse monoclonal anti-MMP-9 (Chemicon), rabbit polyclonal anti-collagen type X (Dr. Gregory P. Lunstrum, Research Center, Shriners Hospital for Children, Portland, OR), mouse monoclonal anti-RANKL (R&D systems)

4) TRAP 染色：基質として naphthol AS-B1 phosphoric acid を用いて染色後、methyl green で核染色を行い、3 つ以上の核を含む TRAP 陽性細胞を破骨細胞として算定した。

## 4. 研究成果

### 1) 骨芽細胞特異的 ALK5 コンディショナルノックアウトマウス (ALK5<sup>Col1-CKO</sup>) における骨変異

分化骨芽細胞特異的に Cre recombinase を発現する Col1a1-Cre マウスを用い、骨芽細胞特異的 ALK5 コンディショナルノックアウトマウス (ALK5<sup>Col1-CKO</sup>) を作成した。ALK5<sup>Col1-CKO</sup> マウスは胎生致死を回避し、生後半まで、明らかな骨形成異常 / 骨代謝異常を呈さず発育した。

以上の結果から、骨形成過程において分化骨芽細胞における ALK5 を介した TGF- $\beta$  シグナル伝達は、重要ではないということが明らかとなった。

2) 軟骨組織特異的 ALK5 コンディショナルノックアウトマウス (ALK5<sup>Col2-CKO</sup>) における骨変異

### 軟骨細胞特異的 ALK5 コンディショナルノックアウトマウス (ALK5<sup>Col2-CKO</sup>) における骨変異

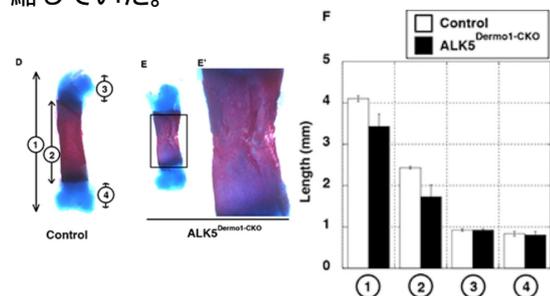
軟骨細胞特異的に Cre recombinase を発現する Col2a1-Cre マウスを用い、軟骨組織特異的 ALK5 コンディショナルノックアウトマウス (ALK5<sup>Col2-CKO</sup>) を作成した。ALK5<sup>Col2-CKO</sup> は胎生致死であり、出生直前に致死性となった。脊柱には顕著な変形を認めしたが、大腿骨の観察では明らかな異常所見を認めなかった。パラフィン切片を作成し、HE 染色、アルシアンブルー染色、TRAP 染色では、明らかな染色の差は認めなかった。

以上の結果より、骨形成過程において、成熟軟骨細胞における ALK5 を介した TGF- $\beta$  シグナル伝達は、重要ではないということが明らかとなった。

### 3) 未分化間葉系細胞特異的 ALK5 コンディショナルノックアウトマウス (ALK5<sup>Dermo1-CKO</sup>) における骨変異

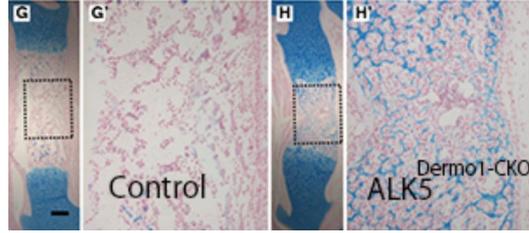
前述の通り、本研究代表者は、発生の段階で軟骨・骨共通未分化間葉系細胞特異的に ALK5 をノックアウトする ALK5<sup>Dermo1-CKO</sup> を作成し、出産直前の胎生致死であり、四肢短縮型の骨形成異常を呈し、幼若骨芽細胞における ALK5 が重要な役割と果たすことを報告しているが (Matsunobu T, et al. Dev Biol. 2009 Aug 15;332(2):325-38.) 軟骨細胞における詳細な検討はなされていなかった。そこで、本研究において、軟骨細胞の増殖能を、BrdU を用いて検討した。軟骨細胞の増殖は、休止域 (resting zone) および増殖域 (proliferating zone) において、コントロールと変異マウスの間に差は認めなかった。

次に、胎生 18.5 日の大腿骨を用いて骨格標本作成し、軟骨組織、石灰化 / 骨化組織の長さを測定した。近位軟骨、遠位軟骨は差がないが、石灰化 / 骨化した骨幹は有意に短く、結果として大腿骨全長が短縮していた。



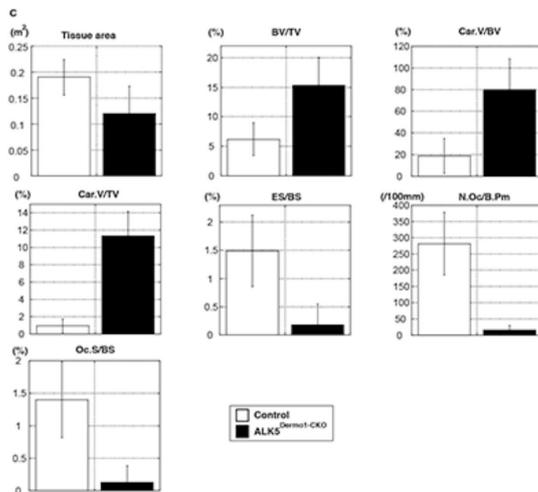
骨格標本を詳細に観察すると、ALK5<sup>Dermo1-CKO</sup> 大腿骨骨幹部に青く染まる軟骨組織が残存していることが確認され、

組織切片で、変異マウス一次海綿骨に軟骨組織が残存していることが明らかになった。

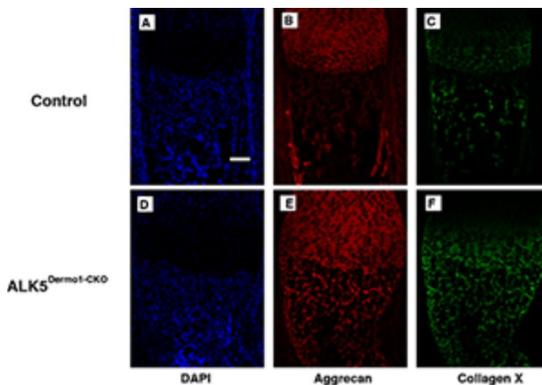


以上の結果から、 $ALK5^{Dermo1-CKO}$  大腿骨においては、軟骨細胞の増殖や軟骨組織形成に関しては明らかな異常を認めないものの、軟骨組織が分解されずに残存していることが示唆された。

次に、胎生 18.5 日の大腿骨の HE 標本を作成し、骨形態計測を行った。骨量 (BV/TV)、石灰化軟骨量 (相対的) (Car.V/BV)、石灰化軟骨量 (絶対的) (Car.V/TV)、浸食面 (ES/BS)、海綿骨・破骨細胞数 (N.Oc/B.Pm)、破骨細胞数 (OcS/BS) を計測したところ、骨量、石灰化軟骨量は明らかに変異マウスで高く、浸食面、破骨細胞数は変異マウスで低かった。

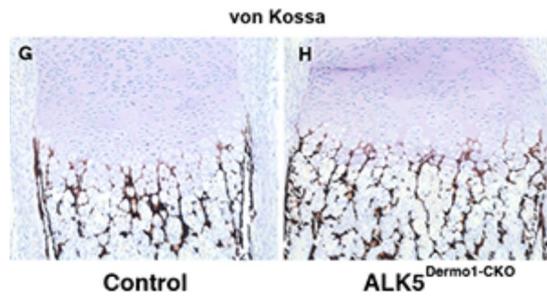


免疫染色では、アグリカン、X 型コラーゲンの軟骨組織における発現は差がないものの、変異マウスにおいては一次海綿骨に残存していることが明らかとなった。

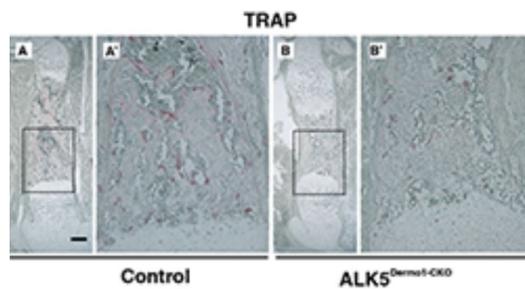


Von Kossa 染色により、軟骨柱の石灰化を調べたところ、コントロールマウス、変

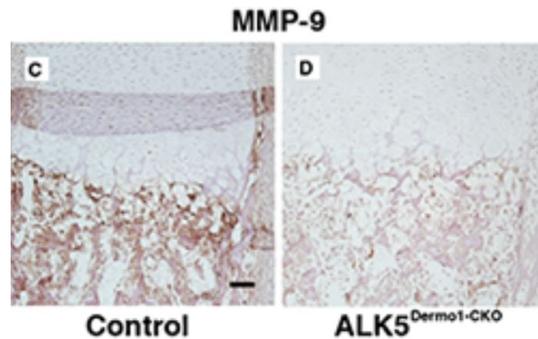
異マウスともに、軟骨の石灰化は肥大軟骨層から始まっていた。



TRAP 染色を用いて、破骨細胞を染色したところ、変異マウスにおいては一次海綿骨の破骨細胞数が減少していた。



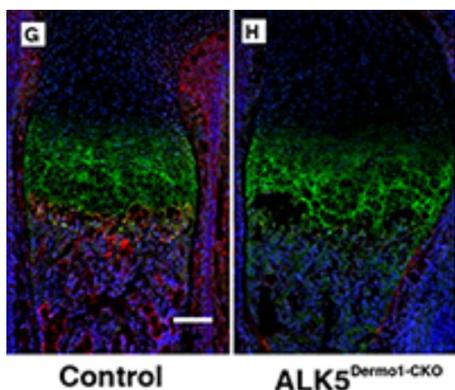
MMP-9 は破骨細胞が強く発現することが知られているが、MMP-9 に対する免疫染色では、変異マウスにおいて明らかに MMP-9 の発現が低下していた。



以上から、軟骨組織が一次海綿骨に残存しているのは、軟骨組織の組成の異常ではなく、破骨細胞が少ないためであると考えられた。

$Dermo1-cre$  recombinase は未分化間葉系組織に発現しており、破骨細胞の起源である単球系には発現していない。そこで、 $ALK5$  は、破骨細胞の分化、誘導を、未分化間葉系細胞における TGF- $\beta$  シグナリングを介して間接的に行っているのではないかと推測した。

破骨細胞の分化、誘導には、RANK-RANKL の相互作用が重要である。RANKL は幼若骨芽細胞に発現していることが報告されているため、胎生 18.5 日の大腿骨における RANKL の発現を検討した。変異マウスにおいては、RANKL の発現 (赤) は明らかに減弱していた (X 型コラーゲン; 緑)。



以上の結果より、TGF- $\beta$ シグナリングは、幼若（未分化）骨芽細胞においてRANKLの発現を制御することにより、破骨細胞の分化誘導を促進し、石灰化軟骨細胞の分解を促進することで、骨格組織発生を制御していることが推測された。

#### 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 6 件)

・Ishijima M, Suzuki N, Hozumi K, Matsunobu T, Kosaki K, Kaneko H, Hassell JR, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. Perlecan modulates VEGF signaling and is essential for vascularization in enchondral bone formation. *Matrix Biol* 31(4):234-45, 2012

・Kataoka K, Tanaka K, Mizusawa J, Kimura A, Hiraga H, Kawai A, Matsunobu T, Matsumine A, Araki N, Oda Y, Fukuda H, Iwamoto Y; Bone and Soft Tissue Tumor Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. A Randomized Phase II/III Trial of Perioperative Chemotherapy with Adriamycin Plus Ifosfamide Versus Gemcitabine Plus Docetaxel for High-grade Soft Tissue Sarcoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1306. *Jpn J Clin Oncol*. 2014 Aug;44(8):765-9.

・Nabeshima A, Matsumoto Y, Fukushi J-I, Iura K, Matsumobu T, Endo M, Fujiwara T, Iida K, Fujiwara Y, Hatano M, Yokoyama N, Fukushima S, Oda Y, Iwamoto Y. Tumour-associated macrophages correlate with poor prognosis in myxoid liposarcoma and promote cell motility and invasion via the HB-EGF-EGFR-PI3K/Akt pathways. *Br J Cancer* 2015 Feb 3;112(3):547-55.

・Hatano M, Matsumoto Y, Fukushi J, Matsunobu T, Endo M, Okada S, Iura K, Kamura S, Fujiwara T, Iida K, Fujiwara Y, Nabeshima A, Yokoyama N, Fukushima S, Oda Y, Iwamoto Y. Cadherin-11 regulates the metastasis of Ewing sarcoma cells to bone. *Clin Exp Metastasis*. 2015 Aug;32(6):579-91.

・Maekawa A, Kohashi K, Nokitaka S, Kuda M, Iura K, Ishii T, Matsunobu T, Nakatsura T,

Iwamoto Y, Oda Y. Expression of Forkhead Box M1 in soft tissue leiomyosarcoma:

Clinicopathological and in vitro study using a newly established cell line. *Cancer Sci*. 2016 Jan;107(1):95-102.

・Matsunobu T, Bekki H, Harimaya K, Matsumoto Y, Endo M, Yoshitake K, Oda Y, Iwamoto Y. Osteosarcoma of the middle and distal phalanges of the little toe with a cancerous ulcer. *International Journal of Case Reports and Images*. In press

〔学会発表〕(計 11 件)

・第 86 回日本整形外科学会学術総会 (2013. 5. 23-26, 広島)

Ewing 肉腫における cadherin-11 の発現と臨床成績の相関

畑野美穂子、松本嘉寛、福士純一、播広谷勝三、松延知哉、飯田圭一郎、藤原悠子、鍋島央、横山信彦、小田義直、岩本幸英

・第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会 合同学術集会 (2013.6.28-29 和歌山)

脂肪肉腫における腫瘍関連マクロファージの役割の検討

鍋島央、松本嘉寛、福士純一、松延知哉、飯田圭一郎、藤原悠子、畑野美穂子、横山信彦、播広谷勝三、岩本幸英

・第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会 合同学術集会 (2013.6.28-29 和歌山)

TGF- $\beta$  I 型受容体 ALK5 欠損マウスに認められた脊椎形成異常に関する解析

松延知哉、鳥越清之、岩本幸英、山田吉彦

・第 20 回 BMP 研究会 (2013.7.5 浜松)

骨格形成における TGF- $\beta$  シグナルの果たす役割に関する研究

松延知哉、松本嘉寛、大石正信、岩本幸英、山田吉彦

・第 46 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2013.7.11-12 東京)

Ewing 肉腫の発がん、悪性形質維持における p53 pathway の役割

中谷文彦、田仲和宏、李岩、松本嘉寛、松延知哉、山口洋、川井章、中馬広一、別府保男、Katia Scottlandi、Piero Picci、岩本幸英

・第 46 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2013.7.11-12 東京)

多発性遺伝性外骨腫症における脊柱変形の検討

松本嘉寛、松本和、播広谷勝三、松延知哉、山口悠、岩本幸英

・第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2013.10.17-18 千葉)

骨格形成における TGF- $\beta$  シグナルの果たす役割に関する研究

松延知哉、鳥越清之、岩本幸英、山田吉彦

・第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2013.10.17-18 千葉)

miR-125b は Ewing 肉腫の多剤薬剤耐性に関

与する

飯田圭一郎、福土純一、松本嘉寛、松延知哉、  
畑野美穂子、鍋島央、横山信彦、岩本幸英  
・第 48 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学  
術集会 (2015.7.9~10 高松)

滑膜肉腫細胞株におけるアドリアマイシン  
耐性株およびパゾパニブ耐性株の樹立と耐  
性メカニズムの検討

横山信彦 松延知哉 福島俊 鍋島央 畑  
野美穂子 遠藤誠 松本嘉寛 福土純一  
播広谷勝三 岩本幸英

・ The 34th Annual Meeting of the American  
Society of Bone and Mineral Research (Oct.  
12-15, 2012, Minneapolis, USA)

Role of ALK5, a TGF-beta type  $\square$  Receptor, in  
preventing abnormal lateral expansion of growth  
plate cartilage.

Matsunobu T, Torigoe K, Muneaki I, Kulkarni  
AB, Yamada Y

・ The 18th Annual Meeting of the  
Musculoskeletal Tumor Society and International  
Society of Limb Salvage (Oct. 6-10, 2015,  
Orlando, FL, USA)

Resuming Adjuvant Chemotherapy After  
One-Stage Revision For The Infected Knee  
Megaprosthesis.

Matsunobu T, Harimaya K, Iwamoto Y

〔図書〕(計 4 件)

・ 松延知哉、岩本幸英．骨腫瘍の病理診断と  
治療．癌診療指針のための病理診断プラク  
ティス 骨軟部腫瘍．青笹克之、小田義直  
(編) 中山書店 pp40-51. 2013 (分担執筆)

・ 松延知哉、岩本幸英．しこり(腫瘍)の診  
察．小児運動器疾患のプライマリケア．藤  
井敏男、高村和幸、柳田晴久(編) 南江堂．  
pp49-55. 2015 (分担執筆)

・ 松延知哉、岩本幸英．腫瘍(良性腫瘍)．  
小児運動器疾患のプライマリケア．藤井敏  
男、高村和幸、柳田晴久(編) 南江堂  
pp118-123. 2015 (分担執筆)

・ 松延知哉．手術適応のある肉腫．新臨．床  
腫瘍学(改訂第4版)：がん薬物療法専門医の  
ために．日本臨床腫瘍学会(編集) 南江堂  
pp.480-482 2015 (分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松延知哉 (MATSUNOBU TOMOYA)

九州大学病院整形外科 助教

研究者番号：20543416

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：