

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670658

研究課題名(和文) BMPの骨格制御活性を司る新規因子の解析

研究課題名(英文) Novel regulators of bone-inducing activity of BMP

研究代表者

片桐 岳信 (Katagiri, Takenobu)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80245802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Bone morphogenetic protein (BMP)は、骨、軟骨等を主とした骨格組織の発生、維持、再生に重要な成長因子である。BMPの細胞内シグナルは、受容体によるリン酸化反応を介して核内へ伝達される。我々は、転写因子Smad1、Smad5、及びSmad9のリン酸化部位に変異を導入し、受容体被依存的に活性化されたSmad変異体を樹立した。Smad1とSmad5は同等の骨芽細胞分化誘導活性を示したが、Smad9の活性は低かった。Smad9の転写活性が他より低い原因は、リンカー構造の違いであり、そこに未同定のコリプレッサーが結合するためと予想された。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic proteins (BMPs) are growth factors, which play crucial role for bone formation during embryonic development and tissue regeneration. Intracellular signaling of BMPs is induced by transmembrane serine/threonine kinase receptors to nuclei via phosphorylation reactions. Smad, MAPK and PI3K pathways have been shown to be activated by the BMP receptors. We examined the role of Smad1, Smad5, and Smad9 by creating constitutively active forms (SmadDXD). Transcriptional activity of Smad9DXD was lower than that of Smad1DXD or Smad5DXD. The linker region of Smad9 was distinguished from those of Smad1 and Smad5 and sufficient to reduce transcriptional activity. The unique structure of Smad9 linker region seemed to recruit corepressors to the target DNA. These findings suggest that BMP receptors phosphorylate signaling molecules, which regulate positively and negatively transcription of a target gene.

研究分野：病態生理学、骨代謝学

キーワード：BMP Smad 分化 シグナル伝達 転写

1. 研究開始当初の背景

Bone morphogenetic protein (BMP) は、胎生期の骨格形成や、骨格筋で異所性骨化が起こる遺伝性難病 (FOP) にも重要な成長因子群である。BMP の細胞内シグナルは、細胞外で BMP を結合した膜貫通型セリンスレオニンキナーゼ受容体が、細胞内でさまざまな基質をリン酸化することで核内へ伝達される。BMP が活性化する情報伝達系として、転写因子 Smad1/5/8、p38 MAP キナーゼ、PI3 キナーゼ等が報告されている。しかし、どの細胞内情報伝達系が BMP の骨格形成作用に必要であり、その下流でどのような標的遺伝子が活性化されるのかは不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では、我々が確立した Smad を構成的活性化する変異を Smad1 だけでなく Smad5 と Smad9 にも導入し、BMP の骨格制御作用における個々の Smad の役割を明らかにする。さらに、これの Smad 変異体を用いて、骨格制御に重要な転写制御メカニズムや標的遺伝子群を解析する。

3. 研究の方法

BMP 受容体によってリン酸化されることが知られている転写因子 Smad1、Smad5、Smad9 cDNA および、BMP シグナルには関与しないと考えられている Smad2 と Smad3 cDNA を、マウス筋芽細胞 C2C12 から RT-PCR 法でクローニングした。各 Smad が共通に有する C 末端のセリン-X (バリンまたはメチオニン)-セリン (SXS) 配列の 2 つのセリン残基が、受容体によるリン酸化部位として同定されている。そこで、SXS 配列をアスパラギン酸-X-アスパラギン酸 (DXD) 配列に置換し、2 残基のリン酸化状態を模倣した Smad 変異体の発現ベクターを構築した。

各 Smad の変異体を C2C12 細胞に一過性に過剰発現させ、BMP シグナルの特異的ルシフェラーゼレポーター (Id1WT4F-luc) 活性、骨芽細胞分化の指標となるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を定量化した。また、Smad 変異体を過剰発現させた細胞から total RNA を抽出し、マイクロアレイで発現遺伝子の変動を解析した。

4. 研究成果

Smad1、Smad5、Smad9 の DXD 変異体を過剰発現させると、BMP 刺激を加えなくても、BMP 特異的ルシフェラーゼ活性が誘導された。野生型 Smad には、過剰発現してもほとんど転写活性は見られなかった。しかし、Smad2 と Smad3 の DXD 変異体は、BMP 特異的レポーターを活性化しなかった。その代わりに、Smad2 と Smad3 変異体は、TGF- β シグナルに特異的ルシフェラーゼレポーターの活性を誘導することが明らかとなった。これらの結果は、Smad の DXD 変異体がリン酸化に

よって活性化された状態を模倣する可能性を示し、さらに Smad1、Smad5、Smad9 と Smad2 および Smad3 が、それぞれ BMP と TGF- β の異なるシグナル経路の伝達因子であることを示す。

Smad 変異体による BMP 様の骨誘導作用を in vitro で検討するため、筋芽細胞 C2C12 の ALP 活性の誘導能を検討した。その結果、Smad1 と Smad5 変異体の過剰発現は、BMP 刺激を加えなくても ALP 活性を誘導することが判明した。しかし、Smad9 変異体は、ほとんど ALP 活性を誘導しなかった。Smad9 変異体の活性は、BMP 特異的ルシフェラーゼ活性が低いことと関連していた。

以上の結果から、Smad9 は Smad1 や Smad5 と同様に BMP 受容体によってリン酸化を受けるにもかかわらず、BMP 作用が極めて低い転写因子であることが判明した。

この機序を解析するために、各 Smad を MH1、MH2 およびリンカードメインに分け、それぞれのキメラ Smad を構築して転写活性を検討した。その結果、Smad9 のリンカードメインを Smad1 および Smad5 のリンカーと置換すると転写活性が低下し、逆に Smad9 のリンカーを Smad1 や Smad5 のリンカーと置換すると転写活性が亢進することが明らかとなった。Smad9 のリンカーは、Smad1 と Smad5 に比べて 40 アミノ酸が欠失しており、さらに残る領域の相同性も低かった。したがって、このリンカー領域の構造の違いが、Smad9 の転写活性を低下させる原因と考えられた。Smad9 は、コリプレッサーと結合することが報告されており、リンカー構造の違いにより、転写抑制因子との親和性が高まっている可能性が考えられた。一方、転写活性を更新させるコアクチベータとの親和性が低下している可能性も考えられ、さらに解析が必要である。

Smad1、Smad5 および Smad9 の DXD 変異体を過剰した細胞で発現変動する遺伝子を、マイクロアレイ法で解析した。その結果、各 Smad 発現細胞で増減する遺伝子が異なる可能性が示された。各 Smad の標的遺伝子を同定し、骨格制御作用を解明するためには、さらに詳細な経時変化の解析等が必要であると考えられる。

BMP 受容体の遺伝的変異により、下流の細胞内情報伝達経路が活性化された疾患として、進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia ossificans progressiva; FOP) が知られている。FOP では、成長に伴い骨格筋組織内で異所性骨化が起こる。本研究の結果から、FOP の異所性骨化は、変異した BMP 受容体で活性化される Smad1 と Smad5 によって誘導されると考えられた。したがって、Smad1 および Smad5 の活性化を抑制するような方法を開発することで、FOP の異所性骨化を抑制する有効な治療法に応用できる可能性が考えられる。

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 8 件)

(1) Katagiri T, Osawa K, Tsukamoto, Fujimoto M, Miyamoto A, Mizuta T. (2015) Bone morphogenetic protein-induced heterotopic bone formation: What have we learned from the history of a half century? *Jpn Dent Sci Rev* 51: 42-50. 査読有り

(2) Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Machiya A, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T. (2014) Smad9 is a novel type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. *Sci Rep*, 4:7596. 査読有り

(3) Kokabu S, Sato T, Ohte S, Enoki Y, Okubo M, Katagiri T, Rosen V, Yoda T. (2014) Expression of TLE3 by bone marrow stromal cells is regulated by canonical Wnt signaling. *FEBES Lett* 588: 614-619. 査読有り

(4) Nakahara Y, Katagiri T, Ogata N, Haga N. (2014) ACVR1 (587T>C) mutation in a variant form of fibrodysplasia ossificans progressiva: second report. *Am J Med Genet* 164A: 220-224. 査読有り

(5) 片桐岳信、塚本翔、大澤賢次 (2014) . TGF- β ファミリーから見える骨と筋の新しい接点. *実験医学別冊* 32: 1010-1016. 査読無し

(6) Katagiri T, Tsukamoto S (2013) The unique activity of bone morphogenetic proteins in bone: a critical role of the Smad signaling pathway. *Biol Chem* 394: 703-714. 査読有り

(7) Kokabu S, Nguyen T, Ohte S, Sato T, Katagiri T, Yoda T, Rosen V. (2013) TLE3, transducing-like enhancer of split 3, suppresses osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 438: 205-210. 査読有り

(8) 片桐岳信 (2013) 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) . *Bone Joint Nerve* 3: 53-60. 査読無し

[学会発表] (計 26 件)

(1) Katagiri T: Musculoskeletal system and the TGF- β family. 12th RCGM

International Symposium of Academic Frontier (2014 年 11 月、日高市、埼玉県)

(2) Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T: Smad9 is a new type of transcriptional repressor in BMP signaling. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2014 年 11 月、日高市、埼玉県)

(3) Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Mizuta T, Osawa K, Tsukamoto S, Miyamoto A, Okuda A, Suda N, Katagiri T: Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells carrying an active form of ALK2. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier (2014 年 11 月、日高市、埼玉県)

(4) 片桐岳信、藤本舞、大澤賢次、自見英治郎、古株彰一郎: Smad8 は BMP シグナルの新しいタイプの制御因子である. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (2014 年 9 月 27 日、福岡市、福岡県)

(5) Katagiri T: Establishment of a novel model of chondrogenesis using murine ES cells carrying mutant ALK2 and more... 10th International Conference on BMPs. (2014 年 9 月 19 日、ベルリン、ドイツ)

(6) Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T: Smad8 is a novel regulator of BMP signaling. 10th International BMP Conference (2014 年 9 月、ベルリン、ドイツ)

(7) Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T: Smad8 negatively regulates BMP signaling in a dominant negative fashion. 2014 ASBMR Annual Meeting (2014 年 9 月、ヒューストン、アメリカ)

(8) Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T: A novel regulation of BMP signaling by Smad8. FASEB Science Research Conferences Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells (2014 年 7 月、ステイームボート・スプリングズ、アメリカ)

(9) 塚本翔、水田誉人、藤本舞、大手聡、大澤賢次、宮本阿礼、米山克美、村田栄子、自見英治郎、古株彰一郎、片桐岳信: Smad8 による新たな BMP シグナルの制御機構。第 21 回 BMP 研究会 (2014 年 7 月、大阪市、大阪府)

(10) 藤本舞、大手聡、塚本翔、宮本阿礼、古株彰一郎、須田直人、片桐岳信: 進行性骨化性線維異形成症の典型症例および亜型症例から同定された ALK2 受容体は II 型受容体に対する感受性が異なる。第 31 回日本骨代謝学会学術集会 (2013 年 5 月 28 日-6 月 1 日、神戸市、兵庫県)

(11) Mai Fujimoto, Satoshi Ohte, Sho Tsukamoto, Arei Miyamoto, Naoto Suda, Takenobu Katagiri: Mutant ALK2 receptors identified in patients with a typical and a variant fibrodysplasia ossificans progressiva show different sensitivities to type II receptors. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research (2013 年 5 月 28 日-6 月 1 日、神戸市、兵庫県)

(12) 藤本舞、大手聡、塚本翔、宮本阿礼、古株彰一郎、大澤賢次、須田直人、片桐岳信: 非典型的な進行性骨化性線維異形成症で見出された ALK2 変異体の解析。第 20 回 BMP 研究会 (2013 年 7 月 5 日、浜松市、静岡県)

(13) 古株彰一郎、佐藤毅、依田哲也、片桐岳信、Vicki Rosen: 骨芽細胞における BMP3 の発現は Wnt シグナルにより制御される。第 20 回 BMP 研究会 (2013 年 7 月 5 日、浜松市、静岡県)

(14) 片桐岳信、藤本舞、古株彰一郎、自見英治郎、大澤賢次: Smad8 は BMP シグナルを抑制的に調節する。第 55 回歯科基礎医学学会学術大会・総会 (2013 年 9 月 21 日、岡山市、岡山県)

(15) 古株彰一郎、佐藤毅、榎木祐一郎、大久保正彦、片桐岳信、依田哲也: コリプレッサー TLE3 は HDAC を介して骨芽細胞分化を抑制する。第 55 回歯科基礎医学学会学術大会・総会 (2013 年 9 月 21 日、岡山市、岡山県)

(16) 藤本舞、大澤賢次、古株彰一郎、須田直人、片桐岳信: 進行性骨化性線維異形成症から同定された 2 種類の ALK2 変異体は II 型受容体に対する感受性が異なる。第 55 回歯科基礎医学学会学術大会・総会 (2013 年 9 月 22 日、岡山市、岡山県)

(17) Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Mai Fujimoto, Takato Mizuta, Arei Miyamoto, Kenji Osawa, Shoichiro Kokabu, Eiko Murata, Eijiro Jimi, Takenobu Katagiri: Smad8 is a Novel Type Regulator of BMP Signaling. 2013 ASBMR Symposium: Cutting Edge Discoveries in Muscle Biology, Disease and Therapeutics (2013 年 10 月 3 日、ボルチモア、アメリカ)

(18) Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Mai Fujimoto, Takato Mizuta, Arei Miyamoto, Kenji Osawa, Shoichiro Kokabu, Eiko Murata, Eijiro Jimi, Takenobu Katagiri: Smad8 is a Novel Type Regulator of BMP Signaling. 2013 ASBMR Annual Meeting (2013 年 10 月 7 日、ボルチモア、アメリカ)

(19) Mai Fujimoto, Satoshi Ohte, Arei Miyamoto, Sho Tsukamoto, Kenji Osawa, Takato Mizuta, Shoichiro Kokabu, Naoto Suda, Takenobu Katagiri: Mutant ALK2 receptors identified in patients with typical and variant cases of fibrodysplasia ossificans progressiva are activated through phosphorylation at Thr203 by different BMP type II receptors. 2013 ASBMR Annual Meeting (2013 年 10 月 7 日、ボルチモア、アメリカ)

(20) Shoichiro Kokabu, Laura Gamer, Jonathan Lowery, Tsuyoshi Sato, Tetsuya Yoda, Takenobu Katagiri, Vicki Rosen: BMP3 Expression by Osteoblasts Is Regulated by Canonical Wnt Signaling. 2013 ASBMR Annual Meeting (2013 年 10 月 7 日、ボルチモア、アメリカ)

(21) 藤本舞、片桐岳信、須田直人: 典型的および非典型的な進行性骨化性線維異形成症例から同定された変異 ALK2 の機能解析。第 72 回日本矯正歯科学会大会 (2013 年 10 月 9 日、松本市、長野県)

(22) 塚本翔、水田誉人、大澤賢次、藤本舞、宮本阿礼、片桐岳信: 転写因子 Smad8 による BMP シグナル調節機構の解明。第 11 回 RCGM フロンティアシンポジウム (2013 年 11 月 3 日、日高市、埼玉県)

(23) 水田誉人、塚本翔、藤本舞、宮本阿礼、大澤賢次、片桐岳信: TGF- β の I 型受容体における活性化機序の解析。第 11 回 RCGM フロンティアシンポジウム (2013 年 11 月、日高市、埼玉県)

(24) 藤本舞、塚本翔、大澤賢次、宮本阿礼、水田誉人、須田直人、片桐岳信: 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) における ALK2 変異

体の活性化メカニズムの解析. 第 11 回 RCGM フロンティアシンポジウム (2013 年 11 月、日高市、埼玉県)

埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：80245802

(25) 大澤賢次、宮本阿礼、塚本翔、藤本舞、水田誉人、片桐岳信: FOP の変異 ALK2 は異所性骨化を誘導する. 第 11 回 RCGM フロンティアシンポジウム (2013 年 11 月、日高市、埼玉県)

(26) 宮本阿礼、大澤賢次、塚本翔、藤本舞、水田誉人、片桐岳信: マウス骨格筋由来細胞による ALK2 (R206H) の新しい解析法の樹立. 第 11 回 RCGM フロンティアシンポジウム (2013 年 11 月、日高市、埼玉県)

[図書] (計 1 件)

(1) Katagiri T, Tsukamoto S, Osawa K, 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.

[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：
出願年月日：
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

片桐 岳信 (Katagiri Takenobu)