

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11268

研究課題名(和文) Smad制御による骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Smad4 is required to inhibit osteoclastogenesis and maintain bone mass

研究代表者

岩崎 良太郎 (Iwasaki, Ryotaro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師(非常勤)

研究者番号：30365390

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)：骨の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスにより維持されており、TGF β もその制御因子である。この因子は、シグナル促進に共有型のSmad4を介している。破骨細胞特異的にSmad4を欠失させたマウスを用い、破骨細胞におけるSmad4の役割について解析を行った。今回の解析から、TGF β /Smad4を介したシグナルは、Smad4がPrdm1の発現を低下させ、Bcl6とIrf8の発現が上昇することにより破骨細胞の分化を抑制することで、骨量減少を阻害するために必須であると考えられ、骨吸収過剰状態においては今後の新たな治療標的である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone homeostasis is maintained as a delicate balance between bone-resorption and bone-formation, which are coupled to maintain appropriate bone mass. A critical question is how bone-resorption is terminated to allow bone-formation to occur. Here, we show that TGF β s inhibit osteoclastogenesis and maintain bone-mass through Smad4 activity in osteoclasts. We found that latent-TGF β 1 was activated by osteoclasts to inhibit osteoclastogenesis. Osteoclast-specific Smad4 conditional knockout mice (Smad4-ckO) exhibited significantly reduced bone-mass and elevated osteoclast formation relative to controls. Administration of latent-TGF β 1-Fc to wild-type mice antagonized LPS-induced bone destruction in a model of activated osteoclast-mediated bone destruction. Thus, latent-TGF β 1-Fc could serve as a promising new therapeutic agent in bone diseases marked by excessive resorption.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 Smad4 TGF β 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面外科領域では癌による骨破壊、顎骨原発の腫瘍、関節破壊を伴う顎関節症など、口腔内疾患の多くに骨吸収や骨破壊、骨欠損の合併症が認められる。これらの合併症の多くが骨恒常性の破綻によって引き起こされ、患者の生活を著しく障害する。骨量は、破骨細胞の骨吸収と骨芽細胞の骨形成によりバランスが保たれている。この一連の行程の実態は解明されておらず、骨研究においてその課題が大きく残された分野だと考える。

2. 研究の目的

破骨細胞は生体内で骨吸収を行う唯一の細胞であり、そこで研究代表者は破骨細胞に存在し、TGF や BMP などの骨代謝に重要な役割を担うサイトカインの下流の転写因子である Smad4 に着目し、Smad 制御による破骨細胞および骨芽細胞を介した骨恒常性維持の研究解析をおこなうことを目的とした。この骨恒常性破綻機序の分子メカニズムを理解し、骨吸収性疾患の新たな治療方法の確立を目指したい。

3. 研究の方法

In vivo においては、破骨細胞特異的に Smad4 を欠損させたマウス (Smad4 cKO) を作製し、破骨細胞における Smad4 の役割について解析を行った。*In vitro* においては、野生型マウス由来の骨髄細胞の破骨細胞培養に TGF 1 の添加実験をおこない、採取した RNA より real time PCR の解析をし、Ctsk や NFATc1, Bcl6, Irf8 など破骨細胞分化マーカーの発現をみた。

4. 研究成果

骨の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスにより維持されており、骨組織に含まれる骨形成タンパク質 2 (Bone morphogenetic protein 2: BMP2) や トランスフォーミング増殖因子 (Transforming growth factor : TGF) などもその制御因子である。これらの因子は、シグナル促進にそれぞれ特異型の Smad2/3 もしくは Smad1/5/8 と、共有型の Smad4 を介している。骨芽細胞に発現する Smad4 は骨の恒常性に重要であるという報告がこれまでされているが、破骨細胞における役割については報告がない。そこで、破骨細胞特異的に Smad4 を欠損させたマウス (Ctskcre/+Smad4f/f) を用い、破骨細胞における Smad4 の役割について解析を行った。

Smad4 cKO マウスでは骨密度の低下が見られたことから、破骨細胞における Smad4 は、生理的な環境下では破骨細胞を抑制していると考えられた。*in vitro* において、野生型マウスの骨髄細胞を用いた破骨細胞培養系に、Smad4 の上流の因子である BMP2 および TGF 1-3 を添加したところ、BMP2 と TGF 2 では破骨細胞分化の促進、TGF 1 と 3 では

有意な抑制を認めた。そこで、破骨細胞分化の抑制は TGF 1 および 3 が主に作用していると考え、骨組織に豊富に含まれる TGF 1 に着目した。*In vitro* における TGF 1 添加実験では、real time PCR の結果、破骨細胞の分化マーカーである Ctsk や NFATc1 の mRNA の発現低下と、抑制因子である Bcl6 や Irf8 の発現上昇がみられ、Smad4 cKO マウス由来の骨髄細胞ではその作用がキャンセルされることが分かった。そこで、Bcl6 と Irf8 の上流であり、これらの因子を抑制する転写因子である Prdm1 に着目した。ChIP-seq 法を用いた結果では、TGF 1 を添加させた際、Smad2/3 の Prdm1 転写因子の転写開始点付近への結合が増加することが分かった。そこで、破骨細胞特異的に Smad4 と Prdm1 を欠損させたマウス (Ctskcre/+Smad4f/fPrdm1ff/) の骨密度を解析したところ、Smad4 による骨密度の低下がキャンセルされることが分かった。

最後に、マウスの頭部に LPS を投与した骨破壊モデルを作製し、latent TGF Fc タンパクを投与したところ、control 群の CD4Fc タンパク群と比べ、マウス calvaria の骨破壊像の抑制がみられた。

今回の解析から、TGF /Smad4 を介したシグナルは、Smad4 が Prdm1 の発現を低下させ、Bcl6 と Irf8 の発現が上昇することにより破骨細胞の分化を抑制することで、骨量減少を阻害するために必須であると考えられ、骨吸収過剰状態においては今後の新たな治療標的である可能性が示唆された。

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 3件)

Morita M, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Nakamura S, Keneko Y, Miyamoto K, Ishihara K, Iwakura Y, Ishii K, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T.

Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. *Sci Rep.* 2017 Apr 7;7:46322. (査読有り)

Morita M, Sato Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Miyamoto K, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T.

Selective Estrogen Receptor Modulators

Suppress Hif1 Protein Accumulation in Mouse Osteoclasts. *PLoS One*. 2016 Nov 1;11(11): (査読有り)

Morita M, Yoshida S, Iwasaki R, Yasui T, Sato Y, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, Miyamoto K, Takami M, Ozato K, Deng CX, Aburatani H, Tanaka S, Yoshimura A, Toyama Y, Matsumoto M, Nakamura M, Kawana H, Nakagawa T, Miyamoto T

Smad4 is required to inhibit osteoclastogenesis and maintain bone mass. *Sci Rep*. 2016 Oct 12;6:35221. (査読有り)
(Equally Contributed first author.)

[学会発表](計 11件)

森田麻友, 岩崎良太郎, 相馬智也, 中川種昭, 河奈裕正, 宮本健史. Osteonecrosis due to bacterial infection following bisphosphonate treatment is required an elevation of pro-inflammatory cytokine levels. 第62回(公社)日本口腔外科学会総会; 2017.

Ryotaro Iwasaki, Mayu Morita, Shigeyuki Yoshida, Taneaki Nakagawa, Takeshi Miyamoto, Hiromasa Kawana, Smad4 in Osteoclasts reduce bone mass by inhibiting osteoclast differentiation, 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, 2017

Mayu Morita, Ryotaro Iwasaki, Hiromasa Kawana, Taneaki Nakagawa, and Takeshi Miyamoto, Smad4 in Osteoclasts reduce bone mass by inhibiting osteoclast differentiation, The 38th The American Society for Bone and Mineral Research, 2016

森田麻友, 岩崎良太郎, 吉田重之, 宮本健史, 河奈裕正, 中川種昭 : ビスホスホネート治療における細菌感染はTNFの発現上昇によって骨壊死を誘発する. 第61回公益社団法人日本口腔外科学会総

会・学術大会, 千葉県, 2016年, 11月. (区分:口頭)

森田麻友, 岩崎良太郎, 河奈裕正, 中川種昭, 宮本健史 : 破骨細胞に発現する Smad4 は破骨細胞の分化抑制および骨量維持に必須である. 第7回 Orthopedic Research Club, 千葉県木更津市, 2016

森田麻友, 岩崎良太郎, 河奈裕正, 中川種昭, 宮本健史, 破骨細胞に発現する Smad4 は破骨細胞の分化抑制および骨量維持に必須である第34回日本骨代謝学会学術集会/第3回アジア太平洋骨代謝学会議 2016

Mayu Morita, Shigeyuki Yoshida, Ryotaro Iwasaki, Hiromasa Kawana, Takeshi Miyamoto, Taneaki Nakagawa : Smad4 In Osteoclasts Reduce Bone Mass by Inhibiting Osteoclast Differentiation. 第20回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会, 2016

森田麻友, 岩崎良太郎, 河奈裕正, 吉田重之, 中川種昭, 宮本健史 : 破骨細胞に発現する Smad4 は破骨細胞の分化抑制および骨量維持に必須である. 第2回日本骨免疫学会 2016

森田麻友, 岩崎良太郎, 河奈裕正, 吉田重之, 中川種昭, 宮本健史 : 破骨細胞に発現する Smad4 は破骨細胞の分化抑制および骨量維持に必須である. 第3回ベーシックリサーチカンファレンス 2016

Mayu Morita, Ryotaro Iwasaki, Hiromasa Kawana, Taneaki Nakagawa, and Takeshi Miyamoto, Smad4 in Osteoclasts reduce bone mass by inhibiting osteoclast differentiation, The 37th The American Society for Bone and Mineral Research, 2015

森田麻友, 岩崎良太郎, 河奈裕正, 中川

種昭, 宮本健史, 破骨細胞に発現する
Smad4 は破骨細胞の分化抑制および骨量
維持に必須である第 33 回日本骨代謝学
会学術集会/第 2 回アジア太平洋骨代謝学
会議 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 良太郎 (IWASAKI, Ryotaro)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・講師(非
常勤)

研究者番号: 30365390