

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24592278
研究課題名(和文) 転写因子 Smad を介した TGF- β ファミリーによる骨格・筋組織の調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of TGF- β family and Smad signaling in musculoskeletal regulation

研究代表者
米山 克美 (Yoneyama, Katsumi)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：20571574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：Transforming Growth Factor- β (TGF- β)ファミリーは、骨格・筋組織の発生・維持・再生に重要な成長因子群である。TGF- β ファミリーによる骨格・筋の制御機構を解明する目的で、TGF- β ファミリーのシグナル伝達に重要な転写因子 Smad4 欠失マウスを樹立した。発生過程で Smad4 を骨格筋特異的に欠失させたマウスは、致死性であった。さらに、骨格筋から調製した筋芽細胞の Smad4 を欠失させると、*in vitro*での筋分化が亢進した。以上の結果より、Smad4 を介した TGF- β ファミリーのシグナルが、マウス骨格筋において筋芽細胞の分化を抑制していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Transforming Growth Factor- β (TGF- β) family cytokines play crucial role for musculoskeletal development, regeneration and homeostasis. To clarify the molecular mechanisms of TGF- β family, we developed a mouse line carrying skeletal muscle-specific knockout of Smad4, which is an essential transcriptional factor for intracellular signaling of TGF- β family. Because the muscle-specific Smad4 KO mice were lethal, we prepared mononuclear cells from the skeletal muscle tissue of the Smad4 floxed mice and cultured them *in vitro*. A deletion of Smad4 in the cells by expression of Cre DNA recombinase *in vitro* stimulated differentiation into myocytes and myotubes, suggesting that Smad4 represses myogenesis in myoblasts. These findings suggest that the Smad4-dependent intracellular signaling of the TGF- β family plays an important role during skeletal muscle development. These findings may provide new therapeutic strategies for diseases caused by dysregulation of the TGF- β family signaling.

研究分野：医歯薬学

キーワード：転写因子 細胞内伝達情報 分化 骨格筋 運動器

1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor- β (TGF- β) ファミリーのサイトカインは、特に運動器形成細胞の増殖や分化の調節に重要である。TGF- β ファミリーの Bone Morphogenetic Protein (BMP) や Myostatin の変異が、骨系統疾患や骨格筋の遺伝性疾患の原因として同定されている。しかし、TGF- β ファミリーの分子メカニズムは不明な点が多い。TGF- β ファミリーのリガンドは 20 種類以上知られており、複数の受容体が多様な組み合わせを示すため、個別の役割を解析することが難しい。転写因子 Smad4 は、TGF- β および BMP の両経路に共通のコアクチベータである。通常の Smad4 ノックアウトマウスは、個体発生のごく初期段階で死亡するため、組織特異的な Smad4 の役割を解析する目的で、floxed Smad4 マウスが樹立された。本マウスと任意の細胞で Cre リコンビナーゼを発現させたマウスで、組織特異的な Smad4 ノックアウトを作製可能となる。しかしながら、運動器における TGF- β ファミリーおよび Smad4 の生理的な役割は未だに解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、運動器の形成・維持・再生に関与すると考えられる細胞種や分化段階の異なる Cre 酵素発現マウスを用いて、シグナルの中心を担う Smad4 のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、運動器における TGF- β ファミリーの生理的役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

細胞特異的な Smad4 欠失マウスを樹立するため、間葉系細胞から骨形成細胞の一連の分化過程で、それぞれ特異的に発現するプロモーターを用いて Cre 酵素を発現させる。これらのマウスの骨格・筋組織の形成・維持・再生を解析する。また、floxed Smad4 マウスの各組織から細胞を単離、クローン化し、in vitro における分化誘導系を用い、in vivo で得られた表現系の分子メカニズムを解析する。これらの実験を通じ、本研究の目的である骨格・筋組織における TGF- β ファミリーの生理的役割の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) 骨格筋特異的な Smad4 欠損マウスの解析
骨格筋における Smad4 の役割を解析するため、骨格筋前駆細胞特異的に Cre 酵素を発現する Pax7-Cre マウスと floxed Smad4 マウスを交配し、骨格筋特異的な Smad4 欠損マウスを作成し、骨格筋における表現系を解析した。まず、骨格筋特異的な Smad4 ヘテロ欠損マウスを作成・解析した結果、このマウスは野生型マウスと同様の筋発生、および筋再生を示した。そこで、骨格筋特異的な Smad4 ホモ欠損マウスを作成したところ、予想外なことにこのマウスは生後 1 日以内に死亡することが明らかと

なり、出生後の成長に伴う骨格筋組織の解析が不可能であることが判明した。そこで、出生 0 日齢マウス骨格筋の組織切片を作成し、HE 染色にて組織像の解析を行った。しかしながら、Smad4 ホモ欠損マウスと野生型マウス骨格筋の間に顕著な表現系の変化は認められなかった。また、Smad4 ホモ欠損マウスの死因探索のため、各種臓器の鏡検を行ったが直接の死因を同定することはできなかった。Pax7 は骨格筋前駆細胞のみならず、発生過程における一部の神経系細胞にも発現することが報告されていることから、Smad4 ホモ欠損マウスは発生過程における神経系細胞になんらかの異常をきたし、出生直後に死亡する可能性が考えられた。

(2) 骨格筋前駆細胞における Smad4 の in vitro 機能解析

骨格筋特異的な Smad4 ホモ欠損マウスが致死性であったことから、Smad4 の骨格筋における役割を in vitro で検討することとした。そのため、floxed Smad4 マウスの骨格筋組織から骨格筋前駆細胞を分取し、Smad4 を in vitro で欠失させることができる細胞株の構築を試みた。Floxed Smad4 マウス骨格筋を酵素処理し、得られた細胞集団から Integrin alpha7 を発現する骨格筋前駆細胞を flow cytometer を用いて分離し、継代を繰り返して不死化細胞を樹立した。この不死化細胞から単一細胞をクローン化し、筋分化能を有する 2 クローン (S4FxSAT-C1B3, C1G5) を得た。

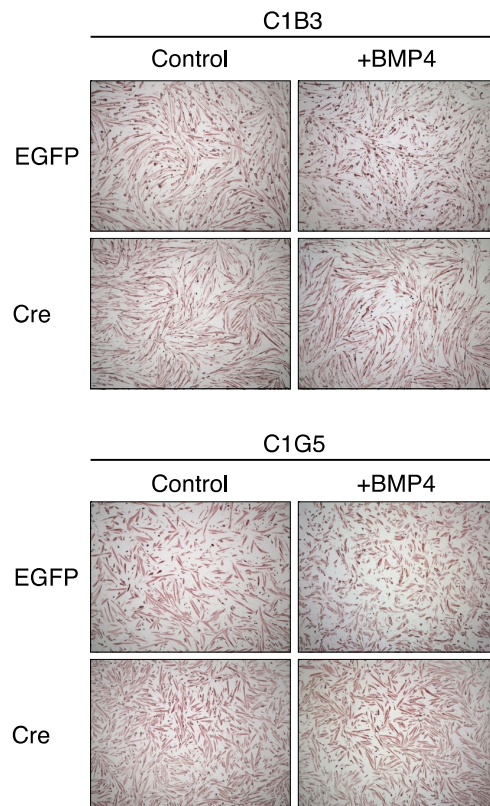


図 1 Smad4 の筋分化への影響

得られた2クローンについて、アデノウイルスベクターを用いて Cre を発現させ、Smad4 を欠損させた場合の筋分化能を比較した。その結果、どちらのクローンにおいても筋分化能が更新した(図 1)。さらに、これらのクローンは BMP 刺激による筋分化抑制や、骨芽細胞様細胞への分化誘導に対して抵抗性を示した。

(3)Smad9 の機能解析

TGF-βファミリーの中で BMP の細胞内情報伝達系で Smad4 と協調的に作用する転写因子である Smad1/5/9 の解析を行った。その結果、Smad9 が特に Smad4 との親和性が高い分子であることを見出した。しかし、Smad9 は Smad1/5 よりも転写活性が低く、むしろ抑制的 Smad として機能する可能性が示唆された。

これらの結果より、マウス骨格筋の発生・成長過程では Smad4 を介した TGF-βファミリーのシグナルが抑制的に働くことが生理的に重要な可能性が示唆された。これは、Smad4 を介したシグナル制御の異常によって引き起こされる疾患に対して新たな治療標的を提供す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 4 件)

(1) Smad9 is a novel type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Machiya A, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T. Scientific Reports, 4:7596. (2014) 査読有り . DOI:10.1038/srep07596

(2) Establishment of a novel model of chondrogenesis using murine embryonic stem cells carrying mutant ALK2 associated with fibrodysplasia ossificans progressiva. Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Machiya A, Okuda A, Suda N, Katagiri T. Biochem Biophys Res Commun, 455: 347-352, (2014) 査読有り. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.11.012.

(3) Identification of a novel BMP-inducible transcript, BIT-1, by utilizing the conserved BMP-responsive elements in the Id genes. Shin M, Ohte S, Fukuda T, Sasanuma H, Yoneyama K, Kokabu S, Miyamoto A, Tsukamoto S, Hohjoh H, Jimi E, Katagiri T. J Bone Miner Metab, 31: 34-43 (2013) 査読有り.

DOI:10.1007/s00774-012-0381-1.

(4) Identification and functional analysis of Zranb2 as a novel Smad-binding protein that suppresses BMP signaling. Ohte S, Kokabu S, Iemura S, Sasanuma H, Yoneyama K, Shin M, Suzuki S, Fukuda T, Nakamura Y, Jimi E, Natsume T, Katagiri T. J Cell Biochem, 113:808-814 (2012) 査読有り . DOI:10.1002/jcb.23408.

〔学会発表〕(計 23 件)

(1) 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 10 月 31 日~11 月 1 日, 埼玉医科大学 30 周年記念講堂, 埼玉県日高市)

(2) 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 10 月 31 日~11 月 1 日, 埼玉医科大学 30 周年記念講堂, 埼玉県日高市)

(3) 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 16~20 日, ベルリン, ドイツ)

(4) 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 12~15 日, ヒューストン, アメリカ)

(5) 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 20~25 日, スティームボート・スプリングズ, アメリカ)

(6) 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 27 日, 大阪大学)

中之島センターメモリアルホール, 大阪府大阪市)

(7) Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Katsumi Yoneyama, Mai Fujimoto, Hiroki Sasanuma, Arei Miyamoto, Takenobu Katagiri : Analysis of intracellular signaling pathway important for heterotopic bone-induction by BMPs. 第10回RCGMフロンティアシンポジウム (2012年11月2~3日, 埼玉医科大学 30周年記念講堂, 埼玉県日高市)

(8) Katsumi Yoneyama, Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Hiroki Sasanuma, Mai Fujimoto, Arei Miyamoto, Takenobu Katagiri : Establishment and analysis of Dox-inducible ALK2-expressing C2C12 cell lines. 第10回RCGMフロンティアシンポジウム (2012年11月2~3日, 埼玉医科大学 30周年記念講堂, 埼玉県日高市)

(9) Hiroki Sasanuma, Katsumi Yoneyama, Satoshi Ohte, Sho Tsukamoto, Mai Fujimoto, Arei Miyamoto, Takenobu Katagiri : A role of satellite cells in heterotopic bone formation in skeletal muscle induced by BMP signaling. 第10回RCGMフロンティアシンポジウム (2012年11月2~3日, 埼玉医科大学 30周年記念講堂, 埼玉県日高市)

(10) Satoshi Ohte, Mai Fujimoto, Katsumi Yoneyama, Hiroki Sasanuma, Sho Tsukamoto, Arei Miyamoto, Shoichiro Kokabu, Takenobu Katagiri : Thr203 in ALK2 is a critical residue for activation by BMP type II receptors. 第10回RCGMフロンティアシンポジウム (2012年11月2~3日, 埼玉医科大学 30周年記念講堂, 埼玉県日高市)

(11) Mai Fujimoto, Satoshi Ohte, Katsumi Yoneyama, Hiroki Sasanuma, Sho Tsukamoto, Arei Miyamoto, Naoto Suda, Takenobu Katagiri : Functional analysis of novel ALK2 mutant identified in fibrodysplasia ossificans progressiva. 第10回RCGMフロンティアシンポジウム (2012年11月2~3日, 埼玉医科大学 30周年記念講堂, 埼玉県日高市)

(12) Arei Miyamoto, Masashi Shin, Satoshi Ohte, Hiroki Sasanuma, Katsumi Yoneyama, Shoichiro Kokabu, Sho Tsukamoto, Takenobu Katagiri : Identification of novel BMP-inducible transcript, BIT-1, by utilizing the conserved BMP-responsive elements in the id genes. 第10回RCGMフロンティアシンポジウム (2012年11月2~3日, 埼玉医科大学30周年記念講堂, 埼玉県日高市)

(13) Satoshi Ohte, Mai Fujimoto, Katsumi Yoneyama, Hiroki Sasanuma, Masashi Shin, Sho Tsukamoto, Arei Miyamoto, Toru Fukuda, Shoichiro Kokabu, Takenobu Katagiri : Critical Role of ALK2 Phosphorylation at Thr203 in Activation by BMP type II Receptors. 2012 ASBMR Annual Meeting (2012年10月12~15日, ミネアポリス, アメリカ)

(14) Masashi Shin, Satoshi Ohte, Toru Fukuda, Hiroki Sasanuma, Katsumi Yoneyama, Shoichiro Kokabu, Sho Tsukamoto, Hirohiko Hohjoh, Eijiro Jimi, Takenobu Katagiri : Identification of Novel BMP-inducible Transcript, BIT-1, by Utilizing the Conserved BMP-Responsive Elements in the Id Genes. 2012 ASBMR Annual Meeting (2012年10月12~15日, ミネアポリス, アメリカ)

(15) Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Katsumi Yoneyama, Mai Fujimoto, Arei Miyamoto, Eiko Murata, Eijiro Jimi, Takenobu Katagiri : Linker regions of Smad1/5/8 regulate bone-inducing activity of BMPs. 2012 ASBMR Annual Meeting (2012年10月12~15日, ミネアポリス, アメリカ)

(16) Satoshi Ohte, Mai Fujimoto, Sho Tsukamoto, Arei Miyamoto, Hiroki Sasanuma, Masashi Shin, Katsumi Yoneyama, Toru Fukuda, Shoichiro Kokabu, Takenobu Katagiri : Activation mechanisms of mutant ALK2 found in fibrodysplasia ossificans progressiva by type II BMP receptor. 1st asia-pacific bone and mineral research meeting (2012年9月2~5日, パース, オーストラリア)

(17) 塚本翔、大手聡、米山克美、笹沼寛樹、藤本舞、宮本阿礼、片桐岳信 : リガンド特異的シグナル伝達をする構成的活性型 Smad の解析。第19回BMP研究会 (2012年7月22日, 慶應義塾大学医学部総合医科学研究棟, 東京都新宿区)

(18) 大手聡、藤本舞、米山克美、笹沼寛樹、進正史、塚本翔、宮本阿礼、福田亨、古株彰一郎、片桐岳信 : 進行性骨化性線維異形成症における変異型 BMP 受容体 ALK2 の活性化機構。第19回BMP研究会 (2012年7月22日, 慶應義塾大学医学部総合医科学研究棟, 東京都新宿区)

(19) 塚本翔、大手聡、米山克美、藤本舞、進正史、笹沼寛樹、自見英治郎、片桐岳信 : BMP および TGF- β 特異的シグナルを伝達する構成的活性型 Smad の解析。第30回日本骨代謝学会学術集会 (2012年7月20日, 京王プラザホテル, 東京都新宿区)

(20) 大手聡、藤本舞、米山克美、笹沼寛樹、進正史、塚本翔、福田亨、古株彰一郎、片桐岳信：I 型 BMP 受容体 ALK2 の活性化には II 型 BMP 受容体による GS ドメイン内 Thr203 のリン酸化が必須である。第 30 回日本骨代謝学会学術集会 (2012 年 7 月 20 日, 京王プラザホテル, 東京都新宿区)

(21) 片桐岳信、進正史、大手聡、福田亨、笹沼寛樹、米山克美、古株彰一郎、宮本阿礼、塚本翔、自見英治郎：Id 遺伝子の BMP 応答領域の解析に基づく新規 BMP 応答性転写産物の同定。第30回日本骨代謝学会学術集会 (2012年7月21日, 京王プラザホテル, 東京都新宿区)

(22) 米山克美、塚本翔、大手聡、笹沼寛樹、進正史、藤本舞、片桐岳信：BMP 受容体 ALK2 の Tet-ON 誘導システムによる発現細胞の樹立。第30回日本骨代謝学会学術集会 (2012年7月21日, 京王プラザホテル, 東京都新宿区)

(23) Satoshi Ohte, Mai Fujimoto, Sho Tsukamoto, Arei Miyamoto, Hiroki Sasanuma, Masashi Shin, Katsumi Yoneyama, Toru Fukuda, Shoichiro Kokabu, Takenobu Katagiri :Molecular Mechanisms of Activation of Mutant ALK2 in FOP. International conference on bone morphogenetic protein (2012 年 6 月 19 日～23 日, カリフォルニア, アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

埼玉医科大学 FOP 診療・研究プロジェクト HP
http://www.saitama-med.ac.jp/medlinks/saitama_univ_fop/

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

米山 克美 (YONEYAMA Katsumi)
埼玉医科大学・医学部・助手
研究者番号：20571574

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

大手 聡 (Ohte Satoshi)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：00547979

笹沼 寛樹 (SASANUMA Hiroki)
埼玉医科大学・医学部・研究員
研究者番号：30571707

宮本 阿礼 (MIYAMOTO Arei)
埼玉医科大学・医学部・研究員
研究者番号：70634591

大澤 賢次 (OSAWA Kenji)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：70638238

(4) 研究協力者

塚本 翔 (TSUKAMOTO Sho)
埼玉医科大学・医学部・大学院生
研究者番号：20707658