

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462287

研究課題名(和文) Ctdnep1遺伝子欠損による先天性多発性関節拘縮症発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenic mechanism of arthrogryposis multiplex congenita by Ctdnep1 gene deficiency

研究代表者

早田 匡芳 (Hayata, Tadayoshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40420252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Ctdnep1遺伝子の、筋骨格系・関節の発生における役割を調べるために、四肢および胸骨特異的Ctdnep1ノックアウト(Ctdnep1 cKO)マウスを作製した。Ctdnep1 cKOマウスは、関節拘縮、歩行障害を示した。組織学的解析を行うと、関節は正常に形成されていたが、筋肉繊維の発達が著しく障害され、大腿骨近位部分の軟骨が異常に増殖していた。細胞培養実験により、Ctdnep1欠損下では、TGF- β シグナルが亢進し、BMPシグナルが低下していた。Ctdnep1は、筋肉系においては、TGF- β シグナルを抑制することによってBMPシグナルを維持し、筋肉発生に重要な役割をはたすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the role of Ctdnep1 for musculoskeletal and joint development, we generated limb- and sternum-specific knockout mice (Ctdnep1 cKO). Ctdnep1 cKO mice showed joint contracture and impaired walking. Histological analysis showed that joint structure was formed normally, but development of muscle fiber was severely affected and chondrocytes of proximal femur proliferated abnormally. Cell culture experiments showed that TGF- β signaling was increased and BMP signaling was decreased in the absence of Ctdnep1. These results suggest that Ctdnep1 maintain BMP signaling by suppressing TGF- β signaling in muscle system and plays crucial role in muscle development.

研究分野：骨・軟骨代謝学

キーワード：BMP TGF- β 筋肉 軟骨

1. 研究開始当初の背景

Ctdnep1 (CTD nuclear envelope phosphatase 1) 遺伝子は、脱リン酸化酵素をコードし、アフリカツメガエル胚および哺乳類培養細胞において、骨形成因子(BMP)シグナルを抑制する因子として同定された。その後、遺伝子改変マウスを用いた研究により、Ctdnep1 は、BMP シグナルを抑制することによって、生後の腎臓の恒常性維持に関わることが示された。骨格系の発生においても、BMP シグナルとその抑制因子は、重要な役割を果たすことから、我々は、Ctdnep1 遺伝子が BMP シグナルの抑制を介して骨格形成に重要な役割を果たすのではないかと仮説を立てた。そこで、発生初期の胸骨と四肢の間葉系細胞で特異的に Ctdnep1 遺伝子を欠損するマウス (Ctdnep1 cKO) を作製した。その結果、骨格遅延等の表現型が見られたが、それ以外に関節拘縮、歩行障害という筋肉・関節に表現型を示した。この表現型は、先天性多発性関節拘縮症(AMC)という病態に近似していた。そこで、我々は、Ctdnep1 遺伝子が AMC の発症に関与するのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究においては、筋肉、関節などの運動器官を標的とした Ctdnep1 欠損による関節拘縮症発症メカニズムの解明およびさらに AMC の治療戦略の基盤開発を目的とした。

3. 研究の方法

Ctdnep1 遺伝子の筋骨格系における発現を検討するために、Ctdnep1-LacZ ノックインマウスを用いて、X-gal 染色を行った。

Ctdnep1 遺伝子を組織特異的に欠損させるために、Ctdnep1(flox)マウスと発生初期の胸骨と四肢の間葉系細胞で発現する Prx1-Cre マウスを交配し、Ctdnep1 cKO マウスを作製した。

このマウスを用いて、歩行の様子をビデオで撮影した。

このマウスの筋骨格系・関節組織を検討するために、組織標本を作成した。

筋肉細胞発生の分子メカニズムを検討するために、発生初期の Ctdnep1 cKO マウスの四肢の間葉系細胞を採取し、初代細胞培養を行い、筋分化について細胞レベル、分子レベルで検討した。

4. 研究成果

Ctdnep1 の筋骨格系における発現パターンを検討するために、Ctdnep1-LacZ ノックインマウスの四肢の凍結切片を作成し、X-gal 染色を行った。その結果、成長軟骨細胞とともに、前十字靭帯ならびに後十字靭帯に強い X-gal 染色が検出された。また、やや弱い

筋肉細胞に X-gal 染色が検出された。

次に、Ctdnep1 cKO マウスの生後の生存率を調べた。その結果、その 50%が生後 2 日以内に死亡した。また、3 週間生存したのは、全体の 20%であった(n=19)。Ctdnep1 cKO マウスは、生後 1 週間では、前肢と後肢が硬直した状態であり、常に横臥していた。肩関節はやや可動状態だった。生後 3 週間では、Ctdnep1 cKO マウスの股関節は完全に硬直していたが、肩関節は前後に動かすことが可能であった。そのため、Ctdnep1 cKO マウスは、肩関節を前後に動かすことによって、かろうじて歩行が可能な状態であった。

3 週齢の Ctdnep1 cKO マウスを用いて、組織学的解析を行った。筋繊維の発達が著しく障害されていた。また、大腿骨の皮質骨が非常に薄くなっており、骨髄内には海綿骨の形成が認められなかった。さらに、興味深いことに、大腿骨近位部の軟骨が、異常に増殖し、巨大な軟骨塊を形成していた。関節は正常に形成されていた。

上記の結果から、Ctdnep1cKO マウスが四肢を動かすことができないのは、筋肉発身に異常があるからではないかと仮説を立てた。そこで、E12.5 マウス胚の四肢の間葉系細胞を採取し、マイクロマスカルチャーを行い、筋分化を検討した。その結果、筋肉発身に重要な役割を果たす転写因子 Myod1 および骨格筋アクチン Acta1 の発現は、Ctdnep1 欠損細胞では、それぞれ、野生型の 3%、6%に減少していた。また、野生型のマイクロマスカルチャーを TGF- β で処理すると、Myod1 や Acta1 の遺伝子発現は、13%、21%に減少した。一方、TGF- β 受容体阻害剤で処理すると、Ctdnep1 cKO マイクロマスカルチャーでは、Myod1 と Acta1 の遺伝子発現が、それぞれ 1.9 倍、2.1 倍に回復する傾向にあった。これらのことから、Ctdnep1 遺伝子欠損では、筋肉分化のプロセスが著しく障害されること、Ctdnep1 遺伝子欠損によって引き起こされる TGF- β シグナルの亢進と関係があると考えられた。

Ctdnep1 は、BMP シグナルの抑制因子として報告されていたが、マイクロマスカルチャー 5 日目で、ウェスタンブロット解析を行うと、TGF- β シグナルの細胞内情報伝達因子であるリン酸化 Smad2 のレベルが亢進していたが、BMP シグナルの細胞内情報伝達因子であるリン酸化 Smad1/5/8 のレベルはやや減少していた。リン酸化 Smad1/5/8 抗体で免疫染色を行うと、野生型では、リン酸化 Smad1/5/8 陽性の筋芽細胞が観察されたが、Ctdnep1 cKO では、染色の程度が減弱していた。

近年、BMP シグナルは、筋肉の発達に重要な役割をはたすことが示されている(Satori et al., Nature Genetics 2013)。また、TGF- β シグ

ナルは BMP シグナルを抑制することも知られている。これらのことから、筋骨格系の発達においては、Ctdnep1 遺伝子欠損によって、TGF- シグナルが亢進し、その亢進が BMP シグナル抑制につながり、筋肉の発達が抑制されるのではないかと推測できる。したがって、筋肉の分化、発達が不十分なために、Ctdnep1 マウスでは、筋肉が萎縮し、四肢を動かすことができなくなるのではないかと推測される。

以上のことから、Ctdnep1 遺伝子は、筋肉細胞において、TGF- シグナルを適切なシグナルレベルに抑制することによって、BMP シグナルを維持し、筋肉の発達を制御する分子であることが明らかになった。

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 14 件)

1: Aryal A C S, Miyai K, Izu Y, Hayata T, Notomi T, Noda M, Ezura Y. Nck influences preosteoblastic/osteoblastic migration and bone mass. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Dec 15;112(50):15432-7. doi: 10.1073/pnas.1518253112. 査読有

2: Nakamoto T, Izu Y, Kawasaki M, Notomi T, Hayata T, Noda M, Ezura Y. Mice Deficient in CIZ/NMP4 Develop an Attenuated Form of K/BxN-Serum Induced Arthritis. J Cell Biochem. 2016 Apr;117(4):970-7. doi: 10.1002/jcb.25382. 査読有

3: Kawasaki M, Ezura Y, Hayata T, Notomi T, Izu Y, Noda M. TGF- β Suppresses Ift88 Expression in Chondrocytic ATDC5 Cells. J Cell Physiol. 2015 Nov;230(11):2788-95. doi: 10.1002/jcp.25005. 査読有

4: Yamada T, Ezura Y, Hayata T, Moriya S, Shirakawa J, Notomi T, Arayal S, Kawasaki M, Izu Y, Harada K, Noda M. β_2 adrenergic receptor activation suppresses bone morphogenetic protein (BMP)-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells. J Cell Biochem. 2015 Jun;116(6):1144-52. doi:10.1002/jcb.25071. 査読有

5: Moriya S, Hayata T, Notomi T, Aryal S, Nakamoto T, Izu Y, Kawasaki M, Yamada T, Shirakawa J, Kaneko K, Ezura Y, Noda M. PTH regulates β_2 -adrenergic receptor expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. J Cell Biochem. 2015 Jan;116(1):142-8. doi: 10.1002/jcb.24953. 査読有

6: Hayata T, Ezura Y, Asashima M,

Nishinakamura R, Noda M. Dullard/Ctdnep1 regulates endochondral ossification via suppression of TGF- β signaling. J Bone Miner Res. 2015 Feb;30(2):318-29. doi: 10.1002/jbmr.2343. 査読有

7: Ezura Y, Nagata J, Nagao M, Hemmi H, Hayata T, Rittling S, Denhardt DT, Noda M. Hindlimb-unloading suppresses B cell population in the bone marrow and peripheral circulation associated with OPN expression in circulating blood cells. J Bone Miner Metab. 2015 Jan;33(1):48-54. doi: 10.1007/s00774-014-0568-8. 査読有

8: Shirakawa J, Ezura Y, Moriya S, Kawasaki M, Yamada T, Notomi T, Nakamoto T, Hayata T, Miyawaki A, Omura K, Noda M. Migration linked to Fucci-indicated cell cycle is controlled by PTH and mechanical stress. J Cell Physiol. 2014 Oct;229(10):1353-8. doi: 10.1002/jcp.24605. 査読有

9: Watanabe C, Morita M, Hayata T, Nakamoto T, Kikuguchi C, Li X, Kobayashi Y, Takahashi N, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Ezura Y, Noda M. Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via CNOT3. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Feb 18;111(7):2692-7. doi: 10.1073/pnas.1316932111. 査読有

10: Suzuki T, Notomi T, Miyajima D, Mizoguchi F, Hayata T, Nakamoto T, Hanyu R, Kamolratanakul P, Mizuno A, Suzuki M, Ezura Y, Izumi Y, Noda M. Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical force. Bone. 2013 May;54(1):172-8. doi:10.1016/j.bone.2013.01.001. 査読有

11: Aryal AC, Miyai K, Hayata T, Notomi T, Nakamoto T, Pawson T, Ezura Y, Noda M. Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss. J Cell Physiol. 2013 Jul;228(7):1397-403. doi: 10.1002/jcp.24317. 査読有

12: 早田匡芳、浅島誠。(2015). 「再生医療と幹細胞」再生医療、日本臨牀、1080 巻、40-46. http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7306saisei.html 査読無。

13: 野田政樹、早田匡芳、渡辺千穂、白川純平、守屋秀一、山田峻之、江面陽一。(2014) 「骨におけるメッセンジャーRNA の安定性と生体制御について」生物の科学 遺伝 68(5): 458-460. <http://ci.nii.ac.jp/naid/40020212295> 査読無。

14: 野田政樹、江面陽一、早田匡芳、守屋秀一、白川純平、Smriti Aryal、納富拓也、渡辺千穂、長尾雅史、羽生亮 「III. 骨研究フロン

ティア-基礎から臨床まで- 骨形成・骨吸収における関連因子の働き PTH」最新の骨粗鬆症学、日本臨牀、1038 巻、161-166 頁、2013。
http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7104kotoso.html 査読無

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Negative regulation of TGF- β signaling by Dullard is required for endochondral ossification. 12th Bone Biology Forum, クロス・ウェーブ幕張、Makuhari, Chiba, JAPAN, Aug 21-22, 2015 (oral & poster presentation). OUTSTANDING POSTER AWARD.
2. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Dullard/Ctdnep1 regulates endochondral ossification via suppression of TGF- β signaling. 13th Congress of the International Society of Bone Morphometry, ホテル東京ガーデンパレス、Bunkyo-ku, Tokyo, JAPAN, April 27-29, 2015. (Poster presentation)
3. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Dullard/Ctdnep1 gene deficiency causes skeletal dysplasia via upregulation of TGF- β signaling in mice. The 2nd Morocco-Japan Symposium: Innovation based on Bio-Environment-Energy Sciences, Rabat, Morocco, March 2-3, 2015. (Oral presentation).
4. Hayata T, Satow R, Ezura Y, Asashima M, Noda M. Dullard/Ctdnep1 is a Smad1-interacting protein to suppress BMP signaling. Joint International Symposium on TGF- β Family and Cancer : Signal Network in Tumor Microenvironment. つくば国際会議場、Tsukuba, Ibaraki, JAPAN, Jan 12-13, 2015 (Poster presentation).
5. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. *Dullard/Ctdnep1* regulates endochondral ossification via suppression of TGF- β signaling. American Society for Bone Mineral and Research annual meeting, Houston, TX, USA, Sep 12-15, 2014. Plenary Poster 賞受賞。
6. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Dullard prevents excessive TGF- β signaling in skeleton. The 3rd international symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- β Family Signaling” Oct 28-29, 2013, 大和屋本店、Matsuyama, Ehime, JAPAN. (Selected for Oral presentation; Poster award 受賞).
7. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Dullard/Ctdnep1 regulates endochondral bone formation through limiting TGF- β signaling (Poster Sessions). American Society for Bone Mineral and Research annual meeting, Baltimore, MD, USA, Oct 4-7, 2013.
8. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Dullard gene regulates endochondral bone formation via suppression of TGF- β signaling during skeletal development (Poster Sessions). The 8th International Symposium of the Institute Network & The Symposium of the Research Core for Transdisciplinary Collaboration on Tissue Engineering and Regenerative Medicine“Frontier in Medical Science and Engineering for Regenerative Medicine”. Kyoto University, Kyoto, Kyoto, JAPAN, June 27-28, 2013.
9. Hayata T, Ezura Y, Nishinakamura R, Asashima M, Noda M. Dullard gene regulates endochondral bone formation via suppression of TGF- β signaling during skeletal development. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, 神戸ポートピアホテル、Kobe, Hyogo, JAPAN. May 28-June 1, 2013 (Selected for Oral presentation).
10. 早田匡芳、江面陽一、浅島誠、西中村隆一、野田政樹：第 21 回日本軟骨代謝学会受賞講演「Dullard/Ctdnep1 遺伝子は、TGF- β シグナルの抑制を介して、内軟骨性骨化を制御する」。第 29 回日本軟骨代謝学会、広島大学広仁会館、広島県広島市、2016 年 2 月 19-20 日。
11. 早田匡芳、江面陽一、浅島誠、西中村隆一、野田政樹。脱リン酸化酵素 Dullard/Ctdnep1 は、TGF- β シグナルの抑制を介してマウス内軟骨性骨化を制御する。第 1 回日本骨免疫学会、2015 年 6 月 30 日-7 月 2 日、ホテルブリーズベイマリーナ、宮古市、沖縄(ポスター発表)。
12. 早田匡芳、江面陽一、浅島誠、西中村隆一、野田政樹。低分子脱リン酸化酵素 Dullard は TGF- β シグナルの抑制を介して内軟骨性骨化を制御する。第 28 回日本軟骨代謝学会、2015 年 3 月 6 日、東京医科歯科大学、東京都文京区(口頭発表)。
13. 早田匡芳、江面陽一、西中村隆一、浅島誠、野田政樹。低分子脱リン酸化酵素 Dullard/Ctdnep1 は、卵巣の恒常性維持を制御する。第 36 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市。(ポスター発表)。
14. 早田匡芳、江面陽一、浅島誠、西中村隆一、野田政樹。Dullard/Ctdnep1 は、TGF- β シグナルの抑制を介して内軟骨性骨化を制御する。第 21 回 BMP 研究会、2014 年 7 月 27 日、大阪大学中之島センター、大阪府大阪市。(口頭発表)。
15. 早田匡芳、江面陽一、野田政樹。低分子脱リン酸化酵素 Dullard は、TGF- β シグナル

の抑制を介してマウス内軟骨性骨化を制御する。第32回日本骨代謝学会学術集会、2014年7月24-26日、大阪国際会議場、大阪府大阪市。(口頭発表)

16. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Dullard prevents excessive TGF- β signaling during endochondral ossification in mice. 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 2014年5月27-30日、ウインクあいち、愛知県名古屋市(英語による口頭発表)。
17. 早田匡芳、江面陽一、浅島誠、西中村隆一、野田政樹。Dullard/Ctdnep1は、TGF- β シグナルの抑制を介して内軟骨性骨化を制御する。第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市。(ポスター発表)

〔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〕

受賞歴

1. 第21回日本軟骨代謝学会賞受賞。第29回日本軟骨代謝学会。2016年2月。
2. OUTSTANDING POSTER AWARD. 12th Bone Biology Forum. 2015年8月。
3. Plenary Poster Presentation. Annual meeting of American Society for Bone and Mineral Research. 2014年9月。
4. Poster Award. The 3rd international symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF- β Family Signaling. 2013年10月。

プレスリリース

1. 「早田匡芳准教授(生命医科学域・生体シグナル制御学)が第21回日本軟骨代謝学会賞を受賞しました」
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/top/topics/160127.html>
2. 「骨粗鬆症の要因となる新しい骨代謝制御の仕組みの解明」
<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmd/kouhou/20151201.pdf>
3. 「骨粗鬆症を抑制する新しい分子機能の発見」
<http://www.tmd.ac.jp/press-release/20140204/index.html>

研究室 Facebook ページ

<https://www.facebook.com/biological.signaling.regulation/>

筑波大学研究者総覧

<http://www.trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003594>

6. 研究組織

(1)研究代表者

早田 匡芳 (Hayata, Tadayoshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40420252