新規骨代謝・骨格形成制御因子としての 転写因子・キナーゼの探索に関する研究

深澤 和也

目次

序論	1頁
略語一覧	4頁
第1章 骨代謝制御機構におけるATF3の機能的役割に関する解析	7頁
 1節 緒言 2節 実験材料および実験方法 3節 実験結果 4節 考察 	
第2章 骨格形成過程におけるErk5の機能的役割に関する解析	39頁
1節 緒言 2節 実験材料および実験方法 3節 実験結果 4節 考察	
総括	76頁
結語	78頁
謝辞	79頁
参考文献	

序論

骨リモデリングは、骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細部の2種類の細胞 によって制御されていることが知られている^{1,2}。骨芽細胞と破骨細胞の機能におけ る絶妙な制御バランスの破綻は大理石骨病や骨粗鬆症といった骨代謝疾患の発症メ カニズムに寄与する³。これまでに、骨格形成や骨リモデリングにおける骨芽細胞と 破骨細胞の細胞分化において重要な役割を担う複数の転写因子が同定されている⁴。 Runt family of transcription factorの1種であるRunx2は骨芽細胞分化のマスターレギュ レーターであることが知られている^{5,8}。Osterixは、Zinc finger-containing transcription factorの1種であり、骨芽細胞分化を促進する働きがある⁹。また、Nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 (NFATc1)は、Receptor activator of nuclear factor xB (RANK) ligand (RANKL)によって、発現制御される。NFATc11は破骨細胞分化のマス ターレギュレーターであることが知られている¹⁰。

Activated transcription factor 3 (ATF3)は、ATF/cAMP-resoponsive element-binding protein (CREB)ファミリーに属しており、ATF/CREB *cis*-regulatory elementに結合することで 様々な遺伝子の転写調節に関与している^{11,12}。ATF/CREBファミリーの中でも、骨芽細 胞において発現するATF4は骨芽細胞生成と破骨細胞生成の双方を促進する働きがあ る¹³。さらにCREBは、骨芽細胞の増殖と分化を制御する¹⁴。これまでに、ATF3は遺伝 子発現のパターンを変化させることで、細胞の増殖や分化を制御する働きがあること が報告されている。さらに、代謝性疾患、免疫疾患、炎症性疾患、がんなどの多くの 疾患の発症に関与することも知られている¹⁵⁻¹⁸。しかしながら、これまでに、これま でに、破骨細胞生成制御機構を含め、骨代謝疾患の発症メカニズムに関与しているか どうかについては、ほとんど明らかになっていない。 また、骨格形成は、胎生期および生後において、膜性骨化と内軟骨性骨化の2つの 異なるプロセスによって制御される^{4,19}。頭蓋骨、鎖骨、顎骨などを含む扁平骨は、 間葉系幹細胞が直接骨芽細胞に分化することで促進される膜性骨化によって形成さ れる²⁰。前肢(上腕骨、橈骨、尺骨)、後肢(大腿骨、脛骨、腓骨)、手足(中足骨、 中手骨、基節骨)は内軟骨性骨化によって制御される²¹。内軟骨性骨化においては、 間葉系幹細胞は軟骨細胞へと分化する。軟骨細胞は静止期、増殖期、肥大化、石灰 化といった複数のステージを経由して、成熟化していく。肥大化軟骨細胞で形成さ れる軟骨原基周囲において細胞外マトリックスの石灰化が起こると、ほとんどの肥 大化軟骨細胞はアポトーシスを起こす。その後、血管、骨髄細胞、破骨細胞、骨芽 細胞が侵入してくるようになり、骨格形成を促進していく^{22,23}(Fig. 1)。



Figure.1 内軟骨骨化と膜性骨化

Extracellular signal-regulated kinase 5 (Erk5)はMitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーに属している。MAPKファミリーは、Erk1/2、c-Jun amino-teraminal kinase、p38などを含む²⁴⁻²⁶。Erk5は、特にMAPK/Erk kinase-5 (Mek5)によってリン酸 化制御を受け、活性化する²⁷。Erk5ノックアウトマウスは、複数の臓器における発生 不全により、胎生致死を示すことが明らかにされている^{28,29}。Erk1およびErk2は、ア イソフォーム特異的な差異はあるものの、機能的観点からは、ほぼ等しい分子であ るとされている²⁶。Erk5は、2つのプロリンリッチな領域や核内移行シグナルをコー ドするC末端領域を持っていることから、他のErkよりも大きな分子であることが知 られている^{30,31}。マウスの遺伝学的解析から、Erk1/2は軟骨細胞分化を調節すること で骨格形成を制御することが明らかにされている³²⁻³⁴。しかしながら、これまでに骨 格形成過程におけるErk5の機能的役割に関しては、ほとんど明らかになっていな い。

本検討では、骨リモデリングおよび骨格形成における分子メカニズムの包括的な理解を目的とし、これらの現象に関与する新規転写因子およびキナーゼの同定を試みた。

略語一覧

α -Minimum Essentiol Medium
AME: 1-acetoxy-2-methoxyethane
AP-1: Activator protein-1
APC: Allophycocyanin
APMSF: p-amidinophenyl methanesulfonyl fluoride
ATF: Activated transcription factor
ATP: adenosine triphosphate
Acan: Aggerecan
B.Pm: Bone perimeter
BFR: Bone formation rate
BMM: Bone marrow macrophage
BMP: Bone morphogenic protein
BPB: bromphenol blue
BRE: BMP-responsive element
BS: Bone surface
BV/TV: Bone volume / Tissue volume
BV: Brilliant violet
BrdU: Bromodeoxyuridine
CDK: Cyclin dependent kinase
CFC: Cardiofaciocutaneous
CKIs: Cyclin-dependent kinase inhibitors
CREB: cAMP-resoponsive element-binding protein
ChIP: Chromatin immunoprecipitation

Col: Collagen
Ctsk: Cathepsin K
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
DTT: Dithiothreitol
Dcstamp: Dendrocyte expressed seven transmembrane protein
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
Erk: Extracellular signal-regulated kinase
FBS: fetal bovine serum
FITC: Fluoresceinisothiocyanate isomer-I
FSC: Forward scatter
GPBS: Glucose-PBS
GSK3-β: Glycogen synthase kinase 3-β
HBS: HEPES buffered saline
IP: Immunoprecipitation
M-CSF: Macrophage colony stimulating factor
MAPK: Mitogen-activated protein kinase
Mek: MAPK/Erk kinase
Mmp: Matrix metallopeptidase
N.Oc/B.Pm: Number of osteoclast / Bone perimeter
NFATc1: Nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1
Ob.S/BS: Osteoblast surface / Bone surface
Ob.S: Osteoblast surface
Oc.S/BS: Osteoclast surface / Bone surface
Oc.S: Osteoclast surface
Osx: Osterix

PB: Phosphate buffer **PBS:** Phosphate buffered saline **PE-Cy: Phycoerythrin - cyanin PGE: Prostaglandin PTH:** parathyroid hormone **Prx: Paired-related homeobox** RANK: Receptor activator of nuclear factor kB RANKL: Receptor activator of nuclear factor **kB** ligand **Runx: Runt family of transcription factor SBE: Smad-binding element** SDS: sodium dodecyl sulfate SOX: sex determining region on Y-box **SSC : Standard Saline Citrate** Smurf: Smad-specific E3 ubiquitin ligase Sox9: Sex-determing region within the Y-type high mobility group box protein 9 **TBS:** Tris buffered saline TBST: 0.05% Tween 20 in TBS **TE: Tris-HCl/EDTA buffer TGFBR1:** Type I receptor of TGF-β **TNF: Tumor Necrosis Factor TRAP:** Tartrate resistant acid phosphatase Tris: 2-Amino-2-hydroxymethyl- 1,3-propanediol cAMP: Cyclic adenosine monophosphate **µCT: micro–computed tomography**

第1章 骨代謝制御機構におけるATF3の機能的役割に関する解析

第1節 緒言

骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が繰り返すことによる、骨リモデリ ングを絶えず行うことにより骨の形態や機能を維持している^{1,35}。この骨リモデリン グは組織学的にいくつかの相に分類されており、骨吸収や骨形成の活性が低い骨表 面は、Lining cell と呼ばれる扁平な骨芽細胞に覆われている。この状態を静止相と 呼ぶ。静止相における骨芽細胞に骨形成を促進するホルモンやサイトカインが作用 すると、Lining cellが活性化される。また、活性化された骨芽細胞は、破骨細胞系へ の情報伝達を行うことで、破骨細胞の分化と遊走を促進し、骨吸収活性を高める。 その後、骨吸収部位において、新たに骨芽細胞による骨形成が行われる。骨形成が 完了すると骨表面は再び Lining cell に覆われ、静止相に入る。また、骨リモデリン グは、1α,25(OH)₂D₃、PTH、 カルシトニンなどのカルシウム調節ホルモンや IL-1、 TNF-α、PGE2 などの炎症性サイトカイン、接着分子、細胞内の情報伝達機構や転写 因子、さらには、骨局所内に加わる力学負荷因子などによる調節を介して厳密に制 御されている。骨リモデリングにおいて、骨吸収と骨形成の間には動的な平衡関係 が保たれている (Fig. 2)。



Figure 2. 骨リモデリング

しかしながら、閉経や加齢などの要因から、これらのバランスが破綻すると骨粗鬆 症を代表とする様々な骨代謝性疾患が発症する³。骨粗鬆症発症時では、骨吸収が骨 形成よりも優位になることで骨密度の異常な低下が生じる。骨粗鬆症は、骨吸収が 亢進した高回転型骨粗鬆症と、骨形成が低下した低回転型骨粗鬆症の二種類に大別 することができる。女性は閉経後、エストロゲンのレベルが低下することがよく知 られている。エストロゲンは破骨細胞の骨吸収活性を抑制する機能を持つため、閉 経後の女性では、骨吸収が相対的に亢進するため高回転型骨粗鬆症を発症すること がある。一方、老人性骨粗鬆症は低回転型骨粗鬆症であり、骨芽細胞の機能低下に よる骨形成の抑制が主な病因と考えられている。現在、超高齢化社会を迎えた日本 における骨粗鬆症患者数は 1,100 万人を超えると推定されており医療費高騰の原因 の一つにもなっている。また、高齢者の骨折は、運動機能の低下に留まらず、自発 性 運動低下、寝たきり状態、さらには、鬱や痴呆状態を招く可能性がある。従来の 骨粗鬆症治療薬は骨形成促進、あるいは骨吸収抑制のどちらかを調節することをし て開発が進められてきている。しかしながら、骨芽細胞と破骨細胞の機能は相互に 共役しているため、どちらかの細胞の活性を増加あるいは減少させた際、もう一方 の細胞の活性も同様の挙動を示す場合がある。したがって、従来の治療薬では、骨 の量と質の双方を効率よく向上させることが困難とされている。したがって、今後 骨リモデリングのメカニズムを分子レベルで包括的に明らかにし、骨粗鬆症に対す る革新的治療薬の開発基盤を確立していくことが重要である³⁶。

前述したように、本研究において、骨リモデリングにおけるATF3の機能的役割に 着目している。これまでに、当研究室では軟骨細胞において発現するATF3が、定常 状態における軟骨細胞生成に影響を与えることなく、病態時、特に変形性関節症発 症時の軟骨細胞生成を制御することを独自に見出している³⁷。*in vitro*において、 ATF3は骨芽細胞分化のネガティブレギュレーターであることが知られている³⁸。ま た、ATF3は、成熟ミエロイド細胞のうちでも、特に好中球やマクロファージの細胞 機能調節に重要な役割を担っていることが明らかにされている³⁹⁻⁴¹。しかしながら、 これまでに、骨芽細胞や破骨細胞の生成制御機構を含め、骨代謝疾患の発症メカニ ズムに関与しているかどうかについては、ほとんど明らかになっていない。そこで 本研究では、*in vitroとin vivo*の双方において、骨芽細胞と破骨細胞で発現するATF3 の機能的役割を解明することで、骨リモデリングに対するATF3の詳細な役割を明ら かにすることを目的とした。

第2節 実験材料および実験方法

2-1 実験材料

Atf3 floxマウスは、北嶋博士 (東京医科歯科大学)より提供していただいた。CD11b-Creマウスは、Vacher博士 (Institut de Recherches Cliniques de Montréal)より提供してい ただいた。Collal-Creマウスは、Karsenty博士 (Columbia University)より提供してい ただいた。C57BL/6J系マウスは三協ラボサービスより購入した。FBS、N, N-dimethyl formamide、naphthol AS-MX phosphateはSigma-Aldrichより購入した。APC標識CD11b 抗体 (M1/70)、FITC標識anti-CX3CR1抗体 (SA011F11)、BV421標識anti-cfms抗体 (AFS98)、 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)はBioLegendより購入した。PE-Cy7標識 anti-Ly-6C抗体 (AL-21)、BV510標識anti-BrdU抗体 (3D4)、BrdU Flow Kit、FITC BrdU Flow Kit、FITC-Annexin V、Propidium IodideはBD Biosciencesより購入した。 anti-ATF3抗体 (#33593)、anti-Cyclin D1抗体 (#2978)、anti-Cyclin D3抗体 (#2936)、 anti-CDK4抗体 (#12790)はCell Signaling Technologiesより購入した。anti-β-actin抗体 (C4)はSanta Cruz Biotechnologyより購入した。DMEM、BrdU、ECL検出用試薬は富士 フィルム和光純薬工業株式会社より購入した。pGEX-GST-RANKLベクターは、 Teitelbaum博士 (Washington University)より提供していただいた。PLAT-Eは、北村博 士 (東京大学)より提供していただいた。B-PER Bacterial Protein Extraction Reagent は、Thermo Fisher scientificより購入した。Glutathione-beads columnはGE healthcareよ り購入した。THUNDERBIRDTM SYBR qPCR mixはTOYOBOより購入した。 Dithiothreitol (DTT), 5×First strand buffer, M-MLV Reverse transcriptase, Lipogectamine RNAiMAXおよびLipofectamineLTXはInvitrogenより購入した。その他 の化合物は市販の特級品を用いた。

2-2 マウス

*Atf3^{nnl}*マウス⁴²は*CD11b-Cre*マウス(好中球,マクロファージ,破骨前駆細胞特異的に Creリコンビナーゼを発現するマウス)⁴³あるいは*Col1a1-Cre*マウス(骨芽細胞特異的に Creリコンビナーゼを発現するマウス)⁴⁴と交配させた。これらのマウスはC57BL/6Jマ ウスと5回以上交配させることで、バッククロスを行った。マウスは気温23±1℃、湿 度55%、明暗サイクル12時間の条件下で飼育した。得られたマウスは3-4週齢の時点 で雌雄を分けて離乳を行い、解剖日まで食餌及び水を自由に摂取できるように飼育 した。*CD11b-Cre;Atf3^{nnl}マウスは*雌性を実験に使用した。また、*Col1a1-Cre;Atf3^{nnl}マ* ウスは雄性を使用した。さらに、取り扱う実験動物に関しては、日本薬理学会実験 動物倫理規定を順守するとともに、金沢大学動物実験施設において独自に制定され た金沢大学宝町地区動物実験指針に則り実験計画を策定した。

2-3 セルソーティング

骨髄細胞は大腿骨および脛骨から採取した。0.15 M NH4Clで5分間処理すること で、赤血球を破砕した。2%FBS含有PBSで細胞を懸濁した。APC標識CD11b抗体 (M1/70) (BioLegend)、7-AADを加え、4 ℃で30分間インキュベートした。細胞を洗浄 後、FACS AriaII cell sorter (BD Biosciences)でCD11b陽性細胞をソーティングした。

2-4 細胞周期および細胞死の解析

BrdU (100 mg/kg)を腹腔内投与し、1時間後に骨髄細胞を採取した。その後、APC標 識anti-CD11b抗体 (M1/70)、FITC標識anti-CX3CR1抗体 (SA011F11)、BV421標識anticfms抗体 (AFS98) (BioLegend)、PE-Cy7標識anti-Ly-6C抗体 (AL-21)、BV510標識anti-BrdU抗体 (3D4) (BD Biosciences)を加え、インキュベートした。BrdU Flow Kit (BD Biosciences)を用いて、細胞のBrdU取り込みをFACS Verse (BD Biosciences)にて解析した。データ解析は、FACS Suite software (BD Biosciences)を用いた。初代培養破骨細胞を10µMのBrdUを加えて45分間インキュベートした。その後、FITC BrdU Flow Kit (BD Biosciences)を用いて、細胞周期の解析を行った。FITC-Annexin V (BD Biosciences)およびPropidium Iodideで細胞を染色し、FACS Verseにて細胞死を解析した。

2-5 RANKL投与骨粗鬆症モデルマウス作製

2-5-1 タンパク質精製用大腸菌株BL21調製

大腸菌株BL21をSOB培地中で、OD550=0.5になるまで培養し、3,000 rpmで10分間遠 心して集菌した。大腸菌を10 mLのRF1 buffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 15% glycerol, 30 mM CH₃COOK (pH 5.8))で懸濁して30分間処理した。その後 3,000 rpmで10分間遠心して集菌した。大腸菌を2 mLのRF2 buffer (10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% glycerol, 10 mM MOPS (pH 6.8))で懸濁し、使用直前まで-80 ℃で保存 した。使用時に4 ℃で融解し、タンパク質精製用大腸菌株として使用した。

2-5-2 リコンビナントタンパクの調製

タンパク質精製用BL21に大腸菌発現ベクターpGEX-GST-RANKLを50 ng加え、 37 ℃で1分間ヒートショック処理を行った。大腸菌をアンピシリン100µg/ml含有の LB寒天培地に播種し、12時間後コロニーをピックアップした。ピックアップした大 腸菌をアンピシリン100µg/ml含有LB培地中でOD600=0.5となるまで培養し、タンパ ク質発現誘導には50µMIPTGを加えGST-RANKLの発現を誘導した。12時間培養 後、大腸菌を100µg/mllysozymeを含むB-PER Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo) でホモジナイズし、15,000×gで10分間遠心し、不溶性画分を沈殿させ上清 をGlutathione-beads column (GE healthcare)に通し、GST-RANKLを調製した。

2-5-3 GST-RANKL投与

生後8週齢のマウスにリコンビナントGST-RANKLを2 mg/kg投与し、24時間後もう 一度同じ量を投与した。24時間後マウスを解剖し、骨を摘出した。GST-RANKL投与 後48時間目のマウスを骨粗鬆症モデルマウスとして扱った⁴⁵。

2-6 卵巢摘出術 (OVX)

8週齢の雌性マウスを、ペントバルビタールを40 mg/kgで投与し、麻酔下でマウス の腹部を切開し両側の卵巣を輸卵管ごと摘出し切除したものを卵巣摘出 (OVX)群、 腹部を切開し縫合したものを偽手術 (Sham)群とした。手術後においても通常の固形 飼料と水道水を自由に摂取させた。手術日を0日目とし、手術後28日目に骨を摘出し た。 これらのマウスを閉経後骨粗鬆症モデルマウスとして扱った⁴⁶。

2-7 脊椎切片の作製

生後8週齢の時点でマウスを解剖し、脊椎を摘出し、70%EtOHで固定した後、 70%EtOH、80%EtOH、95%EtOH、及び100%EtOHで2回脱水し、浸潤溶液に2日間浸 しmethyl methacrylate monomer (MMA)樹脂で包埋した。マイクロトームを用いて厚 さ7µmの切片を作製し、スライドグラスに貼り付けた。これらの切片をプレスし、2 日間50℃の恒温槽で、その後2日間室温に静置し乾燥させた後、染色に使用した。

2-8 von Kossa染色

1-acetoxy-2-methoxyethane (AME)中で作製した切片のMMA樹脂を除去し、アルコー ル系列で水和後(100% EtOHで2回、95%、80%、70%、蒸留水の順)1% AgNO₃水溶 液に1分間反応させた。スライドガラスを蒸留水で1回洗浄し、sodaformol水溶液に1 分間反応させた。その後、蒸留水で1回洗浄し、5% sodium thiosulfate水溶液に1分間 浸けた。蒸留水で1回洗浄後、von Gieson液に1分間反応させた。蒸留水で2回洗浄 後、アルコール系列で脱水(70% EtOH、80%、95%、100%で2回)し、キシレンに置換 して有機溶媒系封入剤エンテランニューを用いて封入した。

2-9 Toluidine blue染色

AME中で作製した切片のMMA樹脂を除去し、アルコール系列で水和後、0.01%ト ルイジンブルー溶液に20秒反応させた。蒸留水で洗浄後、アルコール系列で脱水し キシレンに置換してエンテランニューを用いて封入した。

2-10 TRAP染色

AME中で作製した切片のMMA樹脂を除去し、アルコール系列で水和後、37℃で温 めた100 mLのStock Basic Incubation Mediumに37 ℃で30分浸した。その後、Naphthol AS-BI Phosphate Substrateを1 mL混ぜ、さらに37 ℃で30分浸した。sodium nitriteに pararosaniline dyeを加えた液を常温の新しいStock Basic Incubation Mediumに混ぜ、切 片を60~90分間反応させた。蒸留水で洗浄後、Carrazi's hematoxylinで1分間反応さ せ、再度蒸留水で洗浄し、50%グリセロールin TEで封入した。

2-11 骨形態計測

Image Jを用いてvon Kossa染色後の切片で単位骨量(組織全体の体積に占める骨梁全体の体積、Bone volume / Tissue volume : BV/TV)を計測した。Osteomeasureを用いて切片のカルセイン標識した二重ラベルの間隔から骨形成率(単位骨梁面あたりの骨形成速度、Bone formation rate / Bone surface : BFR/BS)を計測した。また、7µmの切片で破骨細胞面(骨梁表面全体における破骨細胞が付着している面の割合、Osteoclast

surface / Bone surface : Oc.S/BS)、Toluidine blue染色後の切片で骨芽細胞面 (骨梁表面 全体における骨芽細胞が付着している面の割合、Osteoblast surface / Bone surface : Ob.S/BS)を計測した¹³。さらに、前述のBV/TVのバリデーションのために、大腿骨の µCTによる画像取得およびBV/TVの解析を行った。解析には、Scan Xmate-L090 (Comscan Tecno)を用いた。

2-12 M-CSF産生細胞CMG14-12培養

液体窒素で凍結保存されたCMG14-12細胞を、37 \circ Cの水浴で手早く融解させた後、 細胞懸濁液を10 mLの10% FBSを含むDMEM (containing 3.5 g/L sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin)中に懸濁した。この細胞懸濁液を、1,500 rpm で 5分間遠心を行い、上清を除去後、10 mLの10% FBSを含むDMEM中に再び懸濁を 行い、培養ディッシュ (NUNC 社製 1 well, φ 100 mm) に播種し、37 \circ C、5% CO₂条件 下にて培養した。24時間後、400 µg/mL G418を含む10% FBS-DMEMに培地交換し、 80% コンフルエントになるまで培養後、0.25%トリプシン-0.03% EDTA処理により細 胞を分散した。 37 \circ Cに温めた10% FBSを含むaMEMを加え、1,500 rpmで5分間遠心 を行い、トリプシン-EDTA の洗浄を行った。遠心したのち、上清を除去し、細胞が 1×10⁵ cells/mLの濃度になるよう 10% FBSを含むaMEM中に懸濁し、培養ディッシュ 上に10 mL/wellずつ播種した。コンフルエントになるまで培養後、培地交換し、20 mLの10%FBS-aMEMを加え、2日後メディウムを回収した。これを10回繰り返し、回 収した培養上清をM-CSFとして使用した。

2-13 マウス骨髄細胞由来マクロファージの培養

8週齢の野生型C57BL/6J系統の雌性マウスの大腿骨、脛骨を摘出し筋肉組織などを きれいに取り除き、氷上のGPBS中に浸した。クリーンベンチ内で摘出した骨組織を

ー本ずつ取り出し、滅菌シャーレ上でナイフを用いて骨の両端を切断し、26Gのシ リンジを用いて骨髄を洗い10% FBS-αMEM中に回収した。これを1,500 rpm、5分間遠 心分離し、沈渣を10% FBS-aMEMに懸濁し、10% CMG14-12 supernatantを加え、ペト リディッシュに播種し、72時間インキュベートした。これをトリプシン-EDTA 処理 により細胞を分散し、1,500 rpm、5分間遠心分離し、沈渣に10 mLの10%FBS-αMEM を加え、十分に懸濁し、10%のCMG14-12 supernatantを加え、1×10⁵ cells/mLの密度で 各プレートに播種した。細胞が接着した後、10%FBS-αMEM にメディウム交換し、 2%のCMG14-12 supernatantおよびRecombinant mouse receptor activator of NF-кB ligand (RANKL)を20 ng/mLの濃度で加えた。この時点を培養0時間とし、最大48時間まで培 養を行った。破骨細胞を同定するために、細胞をホルマリンで固定後、アセトンと エタノールの混合液 (1:1)を加え、pH 5.0の酒石酸存在下で、N, N-dimethyl formamide、naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich)を加え、さらにFast red violet LB salt (Sigma-Aldrich)で染色した (TRAP染色)。TRAP陽性多核細胞を破骨細胞として定 義した。成熟した破骨細胞はActin ringを形成する。細胞をホルマリンで固定後、ロ ーダミンファロイジンで染色することでActin ringの形成を評価した (Actin ring) assay)。また、プレート上に設置した象牙上で24時間培養した細胞をTRAP染色した 後に、酸ヘマトキシリンで吸収窩を染色した (Pit formation assay)。Pit formation assay を行うことで、骨吸収活性を評価することができる。

2-14 骨髄マクロファージへのレトロウイルスベクターの導入

2-14-1 PLAT-E細胞の継代方法

液体窒素で凍結保存されたPLAT-E細胞を、37 ℃の水浴で手早く融解させた後、細 胞懸濁液を10 mLの10% FBSを含むDMEM中に懸濁した。この細胞懸濁液を、1,500 rpmで5分間遠心を行い、上清を除去後、10 mLの10% FBSを含むDMEM中に再び懸濁 を行い、培養ディッシュ (NUNC 社製 1 well,φ100 mm)に播種し、37 ℃、5% CO₂条 件下にて培養した。必要に応じて、0.25%トリプシン-0.03% EDTA を用いて3日毎に 継代を行い、実験に必要な細胞数を得た。

2-14-2 遺伝子導入用PLAT-E細胞の調製

培養ディッシュ (NUNC 社製 1 well,φ100 mm) に 2-13-1に準じて培養した PLAT-E細胞について、トリプシン-EDTA 処理により細胞を分散した。続いて、 37 ℃に温めた10% FBSを含むDMEMを加え、1,500 rpmで5分間遠心を行い、トリプ シン-EDTAの洗浄を行った。遠心したのち、上清を除去し、細胞が3×10⁵ cells/mLの 濃度になるよう10% FBSを含む DMEM中に懸濁し、培養ディッシュ上に10 mL/dish ずつ播種した。この細胞を37 ℃、5% CO₂条件下で24時間培養後、遺伝子導入に用い た。

2-14-3 リン酸カルシウム法による遺伝子導入法

360 µL滅菌精製水に、導入するplasmid DNA10 µgのmixを加えて、2M CaCl2 40 µLを 加えて、HBS bufferを400 µL加え、室温下、30分間反応させた。その後、2-13-2に準 じて培養した細胞にDNA complexを800 µL添加し、37℃、5% CO₂条件下で24時間培 養を行い、その後培地交換をし、遺伝子導入 48時間後まで培養を行った。発現ベク ターには、pMX-GFP、pMX-Cre、pMX-Ccnd1を使用した。

2-14-4 骨髄マクロファージへのウイルス感染

2-13に準じて採取した骨髄マクロファージに、2-14-3によって作成したPLAT-E細胞 培養上清を5 mL暴露し、24時間後培地交換をした後、再びPLAT-E細胞培養上清を5 mL暴露し、さらに48時間培養した。その後、10% FBS-αMEM中にBlasticidinを1 μg/mLになるように加えた培地に交換し、さらに48時間培養した。これをトリプシン -EDTA 処理により細胞を分散し、1,500 rpm、5分間遠心分離し、沈渣に10 mLの 10%FBS-αMEMを加え、十分に懸濁し、2% CMG14-12 supernatantおよびRANKLを20 ng/mLの濃度で加えた。この時点を培養0日目とし、最大で2日間培養した。

2-15 Western blotting法

各標品を10% polyacrylamide gel (濃縮用ゲル濃度4.5%)を用いて室温で2時間電気泳動 (15 mA/plate)後、あらかじめ100% methanolで活性化処理を行ったタンパク質ブロッ ティング用PVDF膜に、30分間ブロッティング (1.6 mA/cm²)を行った。ブロッティ ング終了後、膜をTBST (137 mM NaClおよび0.05% Tween 20を含む20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5))で洗浄したのち、5% skim milkを含むTBST中で1時間ブロッキングを 行った。この膜を1% skim milkを含むTBSTで希釈した一次抗体と4°Cで約16 時間反 応させ、反応後TBSTで10分間3回洗浄した。次に、1% skim milkを含むTBSTで希釈 したperoxidase標識二次抗体と室温で1時間反応させ、反応後TBSTで10分間3回洗浄し た。続いて、ECL検出用試薬と反応させたのち、化学発光をLAS4000IR (富士フイル ム)を用いて、抗体陽性タンパク質を検出した。1次抗体は、anti-ATF3抗体 (1:1000, #33593)、anti-Cyclin D1抗体 (1:1000, #2978)、anti-Cyclin D3抗体 (1:1000, #2936)、 anti-CDK4抗体 (1:1000, #12790) (Cell Signaling Technologies)、anti-β-actin抗体 (1:2000, C4) (Santa Cruz Biotechnology)を用いた。

2-16 Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP assay)

2-16-1 ホルマリンによる細胞の固定

2-13に準じて、細胞を培養した。RANKL暴露24時間後まで培養した細胞の培地に
1% formaldehyde を添加し、37 ℃、5% CO₂条件下にて10分間固定を行った。その

後、1µg/mL protease inhibitors ((p-amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride (APMSF), leupeptin, antipain, benzamidine) を加えたPBSで洗浄した後に回収し、得られた細胞を SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1µg/mL protease inhibitors) に可溶化させ、氷中で10分間順化させた。その後、ソニケーターを用いて 10秒間超音波処理を行った後に20秒間氷中で静置し、合計6回超音波処理を行った。

2-16-2 Immunoprecipitation (IP)

得られたサンプルを ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA (pH 8.0), 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1), 167 mM NaCl, 1 µg/mL protease inhibitors)で 10倍希釈した後、TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1 mM EDTA (pH 8.0))で2倍希釈 した Protein A agarose (1.5 mL beads with 600 µg sonicated salmon sperm DNA, 1.5 mg BSA, 4.5 mg recombinant protein A / 1.5 mL buffer; 10 mM EDTA, 0.05% sodium azide)を 75 µL加え、4℃下で30分間反応させた。1,500 rpmで15秒間、4 ℃で遠心を行った 後、上清を回収し、ATF3抗体あるいはNormal mouse IgGを2 µg分を入れ、4 ℃で24時 間反応させた。翌日、60 µL Protein A agarose を加え、4 ℃で1時間反応させた後、 Low salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 150 mM NaCl)、High salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 500 mM NaCl)、LiCl buffer (0.25 M LiCl, 1% NP 40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.1))の順に各Bufferで洗浄を行い、さらにTE bufferで2回 洗浄を行った。

2-16-3 固定の解除とDNAの回収

洗浄終了後、250 μLのElution buffer (10 mM DTT, 1% SDS, 0.1 M NaHCO3)を用い、 常温で15分間かけて溶出した。遠心で上清を回収したのち、レジンに再び250 μL Elution bufferを加えてもう一度繰り返した。得られた上清に5 M NaClを20 μ L加え、 65 °Cで6時間処理した。その後、0.5 M EDTA 10 μ L、1 M Tris-HCl (pH 6.5) 4 μ L、10 mg/mL proteinase K 2 μ Lを加え、45 °Cで1時間処理した。その後、phenol-chloroform法 によりDNAを抽出し、30 μ Lの滅菌精製水で溶解し、使用時まで-20°Cで保存した。

2-16-4 Real-time PCR法

2-16-3の方法で得られたDNAをReal-time PCRに用いた。Real-time PCR用プレート (日本ジェネティクス; FG-1742)にTHUNDERBIRDTM SYBR qPCRmix (TOYOBO)を5 μ L、3倍希釈したDNA 2.5 μ L、2.5 μ Mのsense primerおよびantisense primer をそれぞ れ0.5 μ L加え、総量10 μ Lになるよう超純水を加えてReal-time PCRを行った。得られ たCt値からInputのCt値を減じて Δ Ctを得て、PCR産物の量を算出した。PCRに用いた プライマーはTable 1の通りである。マウスCyclin D1プロモーターのAP-1サイト、 ATF/CREBサイトを認識するプライマーを設計した。

Table 1. List of primers used for ChIP assay

Fragments	Upstream (5'-3')	Downsteam (5'-3')
Ccnd1 promoter AP-1 site	GGAGAAACACCACCACCCT CAAC	TATTAGTCGCCCTTCCAGGAA CCAG
Ccnd1 promoter CREB/ATF site	TGCATATCTACGAAGGCTGA GG	CAGAGATCAAAGCCGGGCAG

2-17 逆転写反応

回収した細胞を、ISOGEN (ニッポンジーン)を用いてtotal RNAを抽出した。細胞お よび組織から抽出したtotal RNA 1 µgに対し、DNase (1 unit/µL、Promega) 1 µL、 10×DNase buffer 1 µLを加え、全量が10 µL になるようにDEPC waterを加え、37 ℃で 20分間反応させた。その後RQ1 DNase stop solution (Promega)を1 µL加え、Oligo (dT)18 Primer (50 µM、Sigma genosys) 1 µL、10 mM dNTP mix (Takara Bio) 3.6 µL、 DEPC water 4.4 µLを加え、65 ℃、5分間加熱し、すぐに氷令した。そこに5×First-Strand Buffer (Invitrogen) 6 µL、0.1 M DTT (Invitrogen) 3 µL、M-MLV Reverse Transcriptase (200 unit/µL、Invitrogen) 0.5 µL、DEPC water 0.5 µLを加え、37 ℃、60分 間反応させた。続いて70 ℃、15分間加熱することにより、逆転写酵素を失活させ た。

2-18 Real-time PCR法

2-17の方法で得られたcDNAをReal-time PCRに用いた。Real-time PCR用プレート (日本ジェネティクス; FG-1742)にTHUNDERBIRDTM SYBR qPCRmix (TOYOBO)を5 μ L、3倍希釈したcDNA 2.5 μ L、2.5 μ Mのsense primerおよびantisense primer をそれぞ れ0.5 μ L加え、総量10 μ Lになるよう超純水を加えてReal-time PCRを行った。得られ たCt値から内部標準36b4のCt値を減じて Δ Ctを得て、PCR産物の量を算出した。使用 したプライマーはTable 2の通りである。

Table 2. List of primers used for Real-time PCR

Genes	Upstream (5'-3')	Downsteam (5'-3')
Ccnd1	TGGATGCTGGAGGTCTGTGAG	AGAGGCCACGAACATGCAG
ATF3	GAGGATTTTGCTAACCTGACACC	TTGACGGTAACTGACTCCAGC
Dcstamp	GACCTTGGGCACCAGTATTT	CAAAGCAACAGACTCCCAAA
Ctsk	GAAGAAGACTCACCAGAAGCAG	TCCAGGTTATGGGCAGAGATT
Nfatc1	CCCGTTGCTTCCAGAAAATA	CCCGTTGCTTCCAGAAAATA

2-19 統計解析

各種解析で得られた値は、平均値±標準誤差で表示した。統計学的有意差は、一元 配置分散分析(One-factor ANOVA)後の結果認められた水準間の差を、多重比較検定 のうちの Bonferroni *post-hoc* test を用いて検定した。また、独立した2群間の差の検 定には Student's *t*-test を用いた。 第3節 実験結果



Figure 3. ATF3 expressed by osteoclast precursors is implicated in RANKL-induced

boneloss.

(a) *ATF3* expression in CD11b positive cells in bone marrow of control and *CD11b*-*Cre;ATF3*^{fl/fl} male mice (*n*=4). (b)BV/TV of femurs, and (c)BV/TV and (d)Oc.S/BS of vertebrae of control and *CD11b*-*Cre;ATF3*^{fl/fl} male mice at 12week-old (control, *n*=7; *CD11b*-*Cre;ATF3*^{fl/fl}, *n*=9). (e)µCT analysis and (f)BV/TV of femurs, and (g)VonKossa staining, (h) BV/TV, (i) Oc.S/BS and (j) N.Oc/B.Pm of RANKL-injected mice (control-PBS, *n* = 7; control-RANKL, *n* = 8; *CD11b*-*Cre;ATF3*^{fl/fl}-PBS, *n* = 6; *CD11b*-*Cre;ATF3*^{fl/fl}-RANKL, *n* = 9). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, significantly different from the value obtained for (a) control mice or (f,h–j) PBS-injected mice. #P < 0.05, significantly different from the value obtained for RANKLinjected control mice.

3-1-1 破骨前駆細胞特異的Atf3欠損マウスの定常状態における骨表現型解析

*CD11b-Cre*は好中球やマクロファージ、破骨前駆細胞で発現することが分かっている。本検討では、*CD11b-Cre;Atf3^{n,n}マ*ウスを破骨前駆細胞特異的Atf3欠損マウスとして扱った。骨髄細胞からCD11b陽性細胞を採取し、Atf3の発現レベルをRT-PCR法により定量したところ、顕著な発現レベルの低下が確認された(Fig. 3a)。また、大腿骨および椎骨のBV/TV(骨量)を測定したところ、コントロールマウスとの間に有意な変化は認められなかった(Fig. 3b,c)。さらに、骨形態計測の結果から、Oc.S/BS(破骨細胞面積)にも有意な変化は認められなかった(Fig. 3d)。

3-1-2 破骨前駆細胞特異的Atf3欠損マウスの骨粗鬆症発症時における骨表現型解析

次に、破骨前駆細胞において発現するAtf3が骨粗鬆症の発症メカニズムに寄与する かどうかを検討した。RANKLを2日間連続投与し、骨粗鬆症を誘導した。その結 果、コントロールマウスにおいては、RANKL投与により、大腿骨のBV/TVが有意に 減少した。一方で*CD11b-Cre;Atf3^{fl/fl}マ*ウスにおいては、RANKL誘導性のBV/TVの減 少は認められなかった (Fig. 3e,f)。また、椎骨において骨形態計測を行ったところ、 RANKL誘導性のBV/TVの減少、Oc.S/BSの増加、N.Oc/B.Pm (破骨細胞数)の増加は、 いずれも観察されなかった (Fig. 3g-j)。以上の結果から、破骨前駆細胞のAtf3は、病 態時における破骨細胞生成や骨吸収制御メカニズムに寄与する可能性が示された。



3-2 骨芽細胞特異的ATF3欠損マウスの骨表現型解析

Figure 4. ATF3 expressed by osteoblasts is dispensable for bone formation and bone remodeling.

(a) μ CT analysis and (b) BV/TV of femurs, (c) Von Kossa staining, (d) BV/TV, (e) Oc.S/BS, (f) BFR and (g) Ob.S/BS of vertebrae of control and *Col1a1-Cre;ATF3*^{fl/fl} male mice at 12 week-old (control, n = 5; *Col1a1-Cre;ATF3*^{fl/fl}, n = 6). (h) BV/TV, (i) Oc.S/BS and (j) BFR of ovariectomized mice (control-sham, n = 7; control-OVX, n = 8; *Col1a1-Cre;ATF3*^{fl/fl}-Sham, n = 6; *Col1a1-Cre;ATF3*^{fl/fl}-OVX, n = 7). *P < 0.05, significantly different from the value obtained for sham mice.

3-2-1 骨芽細胞特異的Atf3欠損マウスの定常状態における骨表現型解析

次に、骨芽細胞のAtf3が骨代謝制御メカニズムに及ぼす影響を検討した。Collal-Creは骨芽細胞で発現することが分かっている。本検討では、Collal-Cre;Atf3^{fufl}マウ スを骨芽細胞特異的Atf3欠損マウスとして扱った。大腿骨および椎骨のBV/TVを測 定したところ、コントロールマウスとの間に有意な変化は認められなかった。さら に、骨形態計測の結果から、Oc.S/BS、BFR (骨形成速度)、Ob.S/BS (骨芽細胞面積)の いずれのパラメーターにも有意な変化は認められなかった (Fig. 4a-g)。

3-2-2 骨芽細胞特異的Atf3欠損マウスの骨粗鬆症発症時における骨表現型解析

次に、骨芽細胞において発現するAtf3が骨粗鬆症の発症メカニズムに寄与するかど うかを検討した。OVX処置 (卵巣摘出手術)を行い、骨粗鬆症を誘導した。その結 果、骨粗鬆症時のCollal-Cre;Atf3^{nyn}マウスのBV/TVはコントロールマウスと同程度に 減少した。さらに、Oc.S/BSやBFRにおいても、コントロールマウスとの間に有意な 変化は認められなかった。以上の結果から、骨芽細胞のAtf3は、定常状態および病 態時のいずれにおいても、骨芽細胞生成や骨代謝制御メカニズムに関与しないこと が示唆された (Fig. 4h-j)。

3-3 ATF3 欠損破骨前駆細胞の破骨細胞分化能の解析



Figure 5. ATF3 deficiency represses osteoclastogenesis.

BMM from *ATF3*^{*fl/fl*} mice was retrovirally infected with Cre recombinase, and subsequent stimulation with RANKL, followed by determination of (a) ATF3 expression, (b,c) TRAP stain, (b,d) Pit formation, (b,e) Actin ring, and (f) mRNA expression of osteoclast marker genes (n = 3–4). **P < 0.01, significantly different from the value obtained in cells infected with GFP.

次に、*in vitro*解析により破骨前駆細胞におけるAtf3の機能的役割を検討することを 試みた。本検討では、*Atf3^{n/n}マ*ウスから骨髄マクロファージを採取し、レトロウイル スによりCreリコンビナーゼを導入することで、より高いAtf3ノックダウン効率を示 す細胞を用いた。RANKLを最大12時間曝露したところ、コントロール群では、曝露 後2時間で一過的にAtf3の発現が上昇することが観察された。一方で、Atf3ノックダ ウン細胞では、いずれの時間においても、コントロール群と比較して、Atf3の発現 レベルは減少していた(Fig. 5a)。このことから、Creリコンビナーゼの導入により、 Atf3がノックダウンされていることが確認された。

次に、破骨細胞分化のレベルを評価するために、Atf3ノックダウン細胞を用いて、 TRAP染色、Pit formationアッセイ、Actin ring formationアッセイを行った (Fig. 5b)。 その結果、Atf3ノックダウン細胞において、TRAP陽性の多核化細胞の減少 (Fig. 5c) や、Pit formation面積やActin ringの数の有意な減少 (Fig. 5d,e)が認められた。また、 破骨細胞分化や細胞融合のマーカーである、DcstampやCtsk、Nfatc1のmRNAレベル を測定したところ、いずれのマーカーにおいても、Atf3ノックダウン細胞におい て、有意な低下が認められた (Fig. 3f)。以上の結果から、Atf3は破骨細胞の分化や骨 吸収能を亢進させる働きがあることが示唆された。

3-4 ATF3欠損破骨前駆細胞の増殖能および生存能の解析 (in vitro)



Figure 6. ATF3 deficiency blunts RANKL-induced cell proliferation in vitro.

BMM from *ATF3^{fl/fl}* mice was retrovirally infected with Cre recombinase, and subsequent stimulation with RANKL, followed by treatment with BrdU. Cells were then analyzed for (a,c) BrdU incorporation assay or (b,d) cell death assay by flow cytometry (n = 5-8). **P < 0.01, significantly different from the value obtained in cells treated with PBS. ^{##}P < 0.01, significantly different from the value obtained in RANKL-stimulated cells infected with GFP.

Figure 5 の結果から、RANKL が破骨前駆細胞の分化を増加させることが示唆された。さらに、RANKL 曝露によって、Atf3 の発現が一過的に上昇することが観察された。そこで、次にRANKL が破骨前駆細胞の増殖能や生存能にどのような影響を与えるのか、また、そのメカニズムにAtf3 が関与しているのかについて検討した。 まず、最初にRANKL 曝露時の細胞周期の評価を行った。RANKL を 24 時間曝露した骨髄マクロファージにおいて、フローサイトメーターを用いた BrdU assay を行った。野生型細胞においては、RANKL 曝露により、S 期の細胞の存在割合が有意に増加した。一方で、Atf3 ノックダウン細胞においては、RANKL 誘導性の S 期の細胞の存在割合の増加は確認されなかった (Fig. 6a.b)。

次に、アポトーシス細胞の存在割合を解析したところ、コントロール細胞および Atf3 ノックダウン細胞において、RANKL の有無に関わらず、アポトーシスのレベル に有意な変化は認められなかった (Fig. 6c.d)。



3-5 ATF3 欠損破骨前駆細胞の増殖能の解析 (in vivo)

Figure 7. ATF3 deficiency blunts RANKL-induced cell proliferation in vivo.

Control mice and *CD11b-Cre;ATF3*^{fl/fl} male mice were i.p. injected with RANKL, and subsequent treatment with BrdU (control-PBS, n = 5; control-RANKL, n = 6; *CD11b-Cre;ATF3*^{fl/fl}-PBS, n = 5; *CD11b-Cre;ATF3*^{fl/fl}-RANKL, n = 7). Bone marrow cells were isolated 24 h after RANKL administration and then analyzed for (a,c) the ratio of CD11b^{lo/-} Ly6C^{hi}CX3CR1⁺ cells and (b,d) BrdU incorporation in CD11b^{lo/-}Ly6C^{hi}CX3CR1⁺ cells by flow cytometry. *P < 0.05, **P < 0.01, significantly different from the value obtained in mice treated with PBS. ^{##}P < 0.01, significantly different from the value obtained in RANKL-injected control mice.

次に、*in vivo* においても、RANKL 誘導性の破骨前駆細胞の増殖能の亢進に Atf3 が 関与しているかどうかを検討した。破骨前駆細胞の解析には、CD11b^{lo/-} Ly6C^{hi}CX3CR1⁺細胞を用いた (Fig. 7a)。この画分において、RANKL 投与 24 時間後 の細胞周期の解析を行った。その結果、*in vitro* の解析結果と一致して、RANKL 投 与により、破骨前駆細胞の存在割合および S 期の細胞の存在割合はコントロール細 胞において、有意に増加した。一方で、Atf3 ノックアウト細胞においては、RANKL 誘導性の増殖能の亢進は認められなかった (Fig. 7b-d)。以上の結果から、Atf3 は RANKL 誘導性の破骨前駆細胞の増殖能を正に制御することが *in vitro、in vivo* の双 方の解析から明らかとなった。



3-6 ATF3による破骨細胞分化制御メカニズムの解析
Figure 8. ATF3 positively regulates Ccnd1 expression in osteoclast precursors.

BMM from *ATF3*^{*fl*/*fl*} mice was retrovirally infected with Cre recombinase, and subsequent treatment with RANKL, followed by determination of (a) Cyclin-related proteins expression, (b) *Ccnd1* expression (n = 4). (c) BMM from WT mice were treated with RANKL and examined by ChIP assay using anti-ATF3 antibody (n = 3). (d,e) BMM from *ATF3*^{*fl*/*fl*} mice was retrovirally infected with Cre recombinase and CyclinD1, and subsequent treatment with RANKL, followed by determination of TRAP stain (n = 4). (f) Schematic model of this study. *P < 0.05, **P < 0.01, significantly different from control values obtained in cells (c) treated with PBS or (b,e) infected with GFP.

次にAtf3が、どのようにRANKL誘導性の破骨前駆細胞の増殖能を制御しているのか を培養細胞を用いて検討した。まず、細胞周期制御因子であるCyclin D1、Cyclin D3、Cdk4の発現解析を行った。その結果、Cyclin D1の発現レベルがAtf3ノックダウ ン細胞において、顕著に減少することが明らかとなった (Fig. 8a)。さらにRT-PCR法 により、Ccnd1のmRNAレベルを測定したところ、Atf3ノックダウン細胞において有 意に、そのレベルが減少することが確認された (Fig. 8b)。

Atf3が転写レベルでCyclin D1の発現制御に寄与することが明らかになったため、続 く解析では、Atf3がCcnd1プロモーター上のどの部位に結合し、転写調節するのかを 検討した。Ccnd1プロモーター上には、転写因子結合サイトとして、AP-1サイトと ATF/CREBサイトが同定されている。ChIP assayを行ったところ、RANKL曝露時に、 Atf3のATF/CREBサイトへのリクルートは変化が見られなかったものの、AP-1サイト へのリクルートは有意に亢進した (Fig. 8c)。

最後に、Cyclin D1過剰発現細胞のTRAP染色を行うことで、Atf3ノックダウン細胞の破骨細胞分化能の抑制がレスキューされるかどうかを検討した。TRAP染色によ

り、Cyclin D1導入群では有意に破骨細胞分化の抑制がレスキューされることが観察 された (Fig. 8d,e)。以上の結果から、Atf3はCyclin D1依存的な調節機構を介して、破 骨細胞分化を制御していることが示唆された。

第4節 考察

本検討において、破骨前駆細胞におけるATF3は病態時において、骨吸収や骨リモ デリングを制御することが明らかにされた。これまでに、ATF3は様々な疾患の発症 メカニズムに関与することが示されてきている^{15,17,18,47}。本検討から、ATF3が破骨細 胞の分化異常を伴う骨疾患の発症メカニズムに関与することが示唆された。骨芽細 胞におけるATF3は定常状態および病態時の双方において、骨量や骨形成に関するパ ラメーターに対し、影響を及ぼさなかった。骨芽細胞におけるATF3が骨形成や骨リ モデリングを制御するという可能性を完全に排除するには、さらに詳細な*in vivo*解析 が必要ではあるが、少なくとも破骨前駆細胞におけるATF3は病態時における骨吸収 や骨リモデリングを制御する重要な転写因子であることが示された。

*CD11b-Cre;Atf3ⁿⁿマ*ウスは、RANKL誘導性の骨量の減少や破骨細胞数の増加に対し て、抵抗性を持つことが示された。Atf3欠損破骨前駆細胞において、RANKL誘導性 の細胞増殖の亢進が抑制されること、また、Cyclin D1発現が抑制されることが観察 された。さらに、Atf3欠損破骨前駆細胞において、Cyclin D1を導入したところ、破 骨細胞生成の抑制は完全にレスキューされた。破骨前駆細胞特異的Cyclin D1欠損マ ウスにおいて、RANKL誘導性の破骨細胞生成にはCdk6やp21、p27といった、Cyclindependent protein kinases (CDKs)やCyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)が関与する ことが報告されている^{48,49}。本検討では、これらの因子がATF3依存的な破骨前駆細 胞の増殖や破骨細胞生成に関与する可能性は排除できなかった。RANKL誘導性の骨 量低下に対して抵抗性を示すかどうかについて、さらに解析が必要であるものの、 ATF3による破骨細胞生成や骨吸収制御メカニズムには、Cyclin D1依存的な破骨前駆 細胞の増殖制御が、少なくともその一端を担っていることが本検討から示唆され た。

ATF3は細胞種、結合配列、共役する複合体などの様々な要因によって、転写を促進あるいは抑制することが報告されている。実際、ATF3は軟骨細胞において ATF/CREBサイトに結合することでCyclin D1プロモーターの活性を亢進させるが、 肝細胞においては、AP-1 bindingサイトに結合することでCyclin D1プロモーターの活性を抑制することが明らかになっている^{50,51}。また、c-Fos/c-Jun複合体は栄養因子シ グナルに反応して、AP-1 bindingサイトに結合することで、Cyclin D1プロモーターの 活性を亢進させる^{52,53}。これは、c-Fos/c-JunとATF3の複合体がAP-1 bindingサイトに 結合することでCyclin D1プロモーターの活性を亢進させる可能性を示唆する。ATF3 によるCyclin D1の転写制御に関して詳細なメカニズムは未だ不明な点が残るが、本 検討により、ATF3は破骨前駆細胞において、ATF/CREBサイトよりもAP-1 bindingサ イトに結合することで、Cyclin D1の転写を促すことが示された。

本検討から、転写因子ATF3は破骨前駆細胞において発現し、病態時における骨吸 収や骨リモデリングに重要な細胞増殖を制御することが示唆された。新規骨リモデ リング・骨吸収制御因子としてのATF3およびRANK-ATF3-Cyclin D1経路の発見 (Fig. 7)は、破骨前駆細胞の増殖異常に基づく様々な骨代謝疾患に対する新規治療薬 の開発基盤の確立に寄与することが期待される。



Figure.9 破骨前駆細胞におけるRANK-ATF3-Cyclin D1経路

第2章 骨格形成過程におけるErk5の機能的役割に関する解析

第1節 緒言

骨格形成は、膜性骨化と内軟骨性骨化の2種類の様式によって駆動される。膜性骨 化では、間葉系幹細胞が骨芽細胞へと分化することで、骨化が進んでいく。この過 程においては、Runx2やOsxが重要な役割を担うことが明らかにされている。また、 内軟骨性骨化では、Sox9が間葉系幹細胞の前期分化を促進し、後期分化を抑制する ことが知られている。さらに、後期分化を促進する因子としてRunx2が同定されてい る。これらの過程を制御するシグナルとして、BMPシグナルやSmadシグナルなどが 重要であるとの報告があるものの、下流のシグナル伝達メカニズムに関しては、い まだ不明な点が多く残されている。

MAPKファミリーは、Erk1/2、c-Jun amino-teraminal kinase、p38などを含んでいる²⁴ ²⁶。MAPKファミリーは、BMPシグナルやSmadシグナルの下流で活性化することが 知られている。MAPKファミリーのうちで、骨格形成における機能に関して研究が 進んでいるものとしてErk1/2が存在する。Erk1/2 MAPK経路における遺伝子変異は、 ヌーナン症候群、コステロ症候群、Cardiofaciocutaneous (CFC)症候群などの骨格形成 障害を誘導することが報告されている⁵⁴⁻⁵⁶。一方で、Erk5は血管形成、血管新生、神 経発生に関連した様々な細胞機能において重要な役割を担っていることが明らかに されているものの^{28,57,58}、Erk1/2と比較して、骨格形成における機能的役割に関して はほとんど知られていない。Erk5欠損マウスは、複数の臓器における発生不全により、胎生致死を示すため、骨格形成に関する研究が進んでいないのが現状である^{28,29}

Paired-related homeobox 1 (Prx1)は、肢芽や頭蓋顔面間葉組織における間葉系細胞において発現することが知られている⁵⁹。遺伝学的解析から、Prx1陽性細胞における Erk1/2が骨格形成制御に重要であることが明らかにされている⁵⁹。本検討では、細胞 特異的遺伝子欠損マウスを用いることで、骨格形成におけるPrx1陽性細胞における Erk5の機能的役割を明らかにすることを試みた。

第2節 実験材料および実験方法

2-1 実験材料

Erk5 floxマウスは、Snider博士 (University of North Carolina)より提供していただい た。Prx1-Creマウスは、Tabin博士 (Harvard Medical School)より提供していただい た。Sox9 floxマウスは、秋山博士 (岐阜大学)より提供していただいた。アルシアン ブルー、アリザリンレッド、Proteinase K、RNaseA、コラゲナーゼ、ディスパーゼ、 アスコルビン酸、DMEM/F12、Phos-tag、anti-Flag抗体、anti-HA抗体、ECL検出用試 薬は富士フィルム和光純薬工業株式会社より購入した。Col2a1 cRNAプローブ、 Col10a1 cRNAプローブ、Mmp13 cRNAプローブ、Runx2-lucベクター、6×OSE2-lucベ クターはDucy博士 (Columbia Unversity)より提供していただいた。Primestar mutagenesis basal kitはタカラバイオより購入した。PLAT-Eは北村博士 (東京大学)よ り提供していただいた。anti-Runx2抗体 (#8486)、anti-Erk5抗体 (#3372)、anti-Smad1 抗体 (#9743)、anti-Smad2抗体 (#5339)、anti-Smad3抗体 (#9523)、phospho-Smad1/5/8 抗体 (#13820)、anti-phospho-Smad2/3抗体 (#8828)、anti-phospho-Erk5抗体 (#3371) は Cell Signaling Technologiesより購入した。anti-β-actin抗体 (C4)、anti-Smad5抗体 (D-20)、anti-Smad8抗体 (R-64)、anti-Smurf2抗体 (H-50) はSanta Cruz Biotechnologyより 購入した。anti-Sox9抗体 (#AB5535)は EMD Milliporeより購入した。anti-Osx抗体 (#ab94744)、E2-Ubiquitin Conjugation Kit はAbcamより購入した。Lipofectamin

LTX 、AlexaFluor633抗ウサギIgG抗体、Dithiothreitol (DTT)、5×First strand buffer、 M-MLV Reverse transcriptase 、Lipogectamine RNAiMAX、LipofectamineLTX Invitrogenより購入した。BRE-lucベクター (#45126)、SBE4-lucベクター (#16495)は Addgeneより購入した。4×48-lucベクターはCrombrugghe博士 (M.D. Anderson)から提 供していただいた。Passive Lysis Buffer、Dual Luciferase Reporter Assay Systemは Promegaより購入した。FBS、リコンビナントGST-Smad1、リコンビナントGST-Smad2 、リコンビナントGST-Smad3 、リコンビナントErk5 (active)はSigma-Aldrich より購入した。リコンビナントErk5 (inactive) はCarna Biosciencesより購入した。 anti-β-actin抗体 (C4)はSanta Cruz Biotechnologyより購入した。B-PER Bacterial Protein Extraction Reagentは、Thermo Fisher scientificより購入した。Glutathione-beads column はGE healthcareより購入した。THUNDERBIRDTM SYBR qPCR mixはTOYOBOより 購入した。その他の化合物は市販の特級品を用いた。

2-2 マウス

*Erk5^{ftfll}マ*ウス⁴²は*Prx1-Cre*マウス⁴³と交配させた。これらのマウスはC57BL/6Jマウ スと5回以上交配させることで、バッククロスを行った。マウスは気温23±1 ℃、湿 度55%、明暗サイクル12時間の条件下で飼育した。さらに、取り扱う実験動物に関 しては、日本薬理学会実験動物倫理規定を順守するとともに、金沢大学動物実験施 設において独自に制定された金沢大学宝町地区動物実験指針に則り実験計画を策定 した。

2-3 骨格標本

胎生18.5日目の胎児の皮膚や軟組織を除き、95%EtOH中で12-14時間処理した。その後、0.1%アルシアンブルー染色液で12-14時間処理した。さらに2%KOHで12-14時間

処理する。その後、0.3%アリザリンレッド染色液で12-14時間処理した。 1%KOH/20%Glycerolで1週間処理することで標本を洗浄し、最後に 50%EtOH/50%Glycerol中で保存した。

2-4µCTによる骨形態計測

3週齢の中足骨の画像取得には、Scan Xmate-L090 (Comscan Tecno)を用いた。

2-5 骨組織の化学染色

マウスの頸骨、大腿骨を4% paraformaldehydeで12-14時間処理した。その後、パラフ ィン包埋し、5µmの切片厚で切片を作成した。その後、H&E染色、Safranin O染色 (軟骨細胞基質を染色)、von Kossa染色 (石灰化部位を染色)を行った。

2-6 in situ hybridization法

2-6-1 骨組織の凍結切片の作製

胎生18.5日齢のマウスから採取した脛骨を4% paraformaldehydeで1-2日間固定し、 20% EDTAにより2日間脱灰した後、30% sucroseに2日間浸した。30% sucroseで置換 した骨標本は、ドライアイスで凍結した後、Tissue-Tek O.C.T. Compoundで包埋し、-20℃に設定したクライオスタットを用いて厚さ10µmの凍結切片を作製し、スライ ドグラスに貼り付けた。これら切片は、よく乾燥させた後、in situ hybridizationに使 用した。

2-6-2 骨組織切片のin situ hybridization法

2-6-1の方法で作製した骨組織凍結切片を4% paraformaldehydeで20分間後固定した後、0.1 M phosphate buffer (PB) (pH 7.4)で10分間、3回洗浄した。次いて0.2 M HClで10分間処理した後PBで10分間、3回洗浄した。その後、proteinase K溶液 (10 µg/mL

proK in PB)で5分間処理し、PBで5分間、3回洗浄した。続いて0.25% 無水酢酸/0.1 M Triethanolamineで10分間処理し、PBで5分間1回洗浄後、70% EtOHおよび95% EtOHで それぞれ5分間洗浄した後、切片を室温で20分間風乾した。Pre-hybridization (65 ℃、 60分)後、DIG標識cRNAプローブをHybridization buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 5× SSC, 10% dextran sulfate, 2% Denhardt's, 50% de-ionized formamide, 0.2 mg/mL yeast tRNA)に適当な濃度に希釈し、使用直前に85 ℃で5分間熱変性させた 後、急冷した。変性後のプローブを切片に滴下し、2×SSCで湿らせた湿箱中に置 き、65 ℃で一晩反応させた。翌日、切片を4×SSC (65 ℃、20分)、High stringency (2×SSC/50% de-ionized formamide) (65 °C、 30分)、 TNE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)) (37 ℃、10分 3回)、RNaseA溶液 (8 µg/mL RNaseA in TNE buffer) (37 ℃、30 分)、TNE buffer (37 ℃、10分)、2×SSC (65 ℃、30分)、0.2×SSC (65 ℃、30分)、Buffer 1 (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl) (室温、10分)、 blocking reagent (1.5% blocking reagent in Buffer1) (室温、1時間)、Buffer1 (室温、2分)の順に反応させた。そ の後、0.5% blocking reagentで500倍希釈したalkaline phosphatase標識抗DIG抗体と4℃ で16時間抗体反応させた。反応後の切片をbuffer1 (0.2% Tween) で、室温で15分間、 4回洗浄後、Buffer3 (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl₂)に室温で 10分間浸し、Buffer3で50倍に希釈したNBT/BCIPを切片上に滴下して、適当な発色が 得られるまで室温で遮光して反応させた。発色後、Buffer3に室温で5分浸し反応を止 めた後、TEで5分洗浄後、50%グリセロールで封入した後、落斜型倒立蛍光顕微鏡 (KEYENCE: BZ-8100)により観察した。Col2a1 cRNAプローブ、Col10a1 cRNAプロー ブ、Mmp13 cRNAプローブはDucy博士 (Columbia University)より提供していただい た。

2-7 レトロウイルスベクターの作製

マウスSmurf2 cDNAが組み込まれた、pMX-Smurf2を鋳型としてPrimestar mutagenesis basal kit (タカラバイオ)を使用し、pMX-Smurf2 (T249A), pMX-Smurf2 (T249E)を作製した。使用したプライマーはTable 3の通りである。pMX-Erk5 (WT)と pMX-Erk5 (DN)は、pcDNA3-Erk5 (WT)ベクターおよびpcDNA3-Erk5 AEFベクターか ら、cDNAをpMXベクターにサブクローニングすることで作製した。さらに、マウス Smad1cDNAが組み込まれた、pMX-Smad1を鋳型としてPrimestar mutagenesis basal kit を使用することで、各種変異型SMAD1コンストラクトを作製した。使用したプライ マーはTable 4の通りである。

Table 3. List of primers used for generating Smurf2 mutant constructs

Genes	Upstream (5'-3')	Downsteam (5'-3')
Smurf2	TTACATGCTCCTCCAGACCTACCAGA	TGGAGGAGCATGTAAATGTGTTCTGC
T249A	A	T
Smurf2	TTACATGAACCTCCAGACCTA	TGGAGGTTCATGTAAATGTGTT
T249E	CCAGAA	CTGCT

Table 4. List of	primers used for	r generating Smad1	mutant constructs
------------------	------------------	--------------------	-------------------

Genes	Upstream (5'-3')	Downsteam (5'-3')
Smad1	TTTACAGCTCCAGCTGTGAAG	AGCTGGAGCTGTAAAGGAAAA
S11A	AGACTT	TAAACT
Smad1	GTAGAAGCTCCTGTACTTCCT	TACAGGAGCTTCTACTCTCTTA
S132A	CCTGTG	TAGTG
Smad1	CCTCACGCTCCCAATAGCAGT	ATTGGGAGCGTGAGGAAACG
S187A	TACCCA	GGTGGCT
Smad1	CCAAACGCTCCTGGGAGCAGC	CCCAGGAGCGTTTGGGTAACT
S195A	AGCAGC	GCTATT
Smad1	CCTCACGCTCCCACCAGCTCA	GGTGGGAGCGTGAGGGTAGG
S206A	GACCCA	TGCTGCT
Smad1	CCAGGAGCTCCTTTCCAGATG	ACCAGCTCAGACCCAGGAGCT
S214A	CCAGCT	CCTTTC
Smad1	ATGGGTGCTCCTCATAATCCTA	ATGAGGAGCACCCATTTGAGT
S456A	TTTCA	AAGAAC

2-8 マイクロマスカルチャー法

間葉系幹細胞の培養は、マウス肢芽をマイクロマスカルチャー法で培養することで 行った。胎生12.5日目のマウスの肢芽を0.1%コラゲナーゼ/0.1%ディスパーゼで37℃ で1.5時間処理した。10%FBS/DMEM/F12で1.5x10⁷ cells/mlに懸濁した。4ウェルプレ ートに10µlずつ播種した。37℃で1.5時間インキュベートした後に、50µg/mlアスコ ルビン酸含有の10%FBS/DMEM/F12を加えた。2日に1回メディウムチェンジを行 い、6日目および12日目に、それぞれアルシアンブルー染色 (軟骨細胞基質を染色)と アリザリンレッド染色 (石灰化部位を染色)を行った。アルシアンブルー染色とアリ ザリンレッド染色により、間葉系幹細胞の前期分化と後期分化をそれぞれ評価し た。

2-9 間葉系幹細胞へのレトロウイルスベクター導入

2-9-1 PLAT-E細胞の継代方法

第1章2-14-1に準じて行った。

2-9-2 遺伝子導入用PLAT-E細胞の調製

第1章2-14-2に準じて行った。

2-9-3 リン酸カルシウム法による遺伝子導入法

第1章2-14-3に準じて行った。

2-9-4 間葉系幹細胞へのウイルス感染

第1章2-14-4に準じて行った。

2-10 Real-time PCR法

第1章2-18に準じて行った。使用したプライマーはTable 5の通りである。

Table 5. List of primers used for Real-time PCR

Genes	Upstream (5'-3')	Downsteam (5'-3')
Acan	GAGGAGCTCCAGCACAATATCGA	GGTAGATCTGCAGGGTCGAT

Col2a1	TGGTGGAGCAGCAAGAGCAA	CAGTGGACAGTAGACGGAGGA AA
Col10a1	TGCCCGTGTCTGCTTTTACTGTCA	TCAAATGGGATGGGGGGCACCTA CT
Mmp13	AGGCCTTCAGAAAAGCCTTC	TCCTTGGAGTGATCCAGACC
Runx2	CCTAGTTAGAGTGGTAGCAGAA GC	ACAGACAACGAAGAAAGTTCC CAC
Smad1	GCTGCCTTAAACAGACAAGCTGG	CCGTGGAGCGGATAAGACAGA AG
Smad2	TGCAACAGTGTGTAAGATCCCA CC	GGTTGACAGACTGAGCCAGAA G
Smad3	CACGCAGAACGTGAACACC	GGCAGTAGATAACGTGAGGGA
Smad4	ACACCAACAAGTAACGATGCC	GCAAAGGTTTCACTTTCCCCA
Smad5	ATGAGCTTTGTCAAGGGCTGG	GGAGAGCCCATCTGAGTAAGG AC
Smad6	ATCACCTCCTGCCCCTGT	CTGGGGTGGTGTCTCTGG
Smad7	AAGATCGGCTGTGGCATC	CCAACAGCGTCCTGGAGT
Smad8	ACCAGGACACACAACTCAAAC C	GTTCCTTGATGGACGTGGCTG
Smad9	TTTGGGTCTGCCTGGACTGTAT GTG	AAGGTCTGTCCGATGTCTCTCT GC

2-11 Western blotting法 2次抗体

第1章2-15に準じて行った。

1次抗体は、anti-Runx2抗体 (1:1000, #8486)、anti-Erk5抗体 (1:1000, #3372)、anti-Smad1抗体 (1:1000, #9743)、anti-Smad2抗体 (1:1000, #5339)、anti-Smad3抗体 (1:1000, #9523)、phospho-Smad1/5/8抗体 (1:1000, #13820)、anti-phospho-Smad2/3抗体 (1:1000, #8828)、anti-phospho-Erk5抗体 (1:1000, #3371) (Cell Signaling Technologies)、anti-β-actin抗体 (1:2000, C4)、anti-Smad5抗体 (1:1000, D-20)、anti-Smad8抗体 (1:1000, R-64)、anti-Smurf2抗体 (1:1000, H-50) (Santa Cruz Biotechnology)、anti-Sox9抗体 (1:2000, #AB5535, EMD Millipore)、anti-Osx抗体 (1:1000, #ab94744, Abcam)を用いた。

2-12 Luciferase reporter assay

2-12-1 リポフェクション法による遺伝子導入

40 µL Opti-MEMに、導入するplasmid DNA0.34 µgのmix を加えて、Lipofectamin LTX 1 µL を加えて室温下、30分間反応させた。その後、培養細胞にDNA-lipofectamin complex を40 µL 添加し、37℃、5% CO2 条件下で48時間培養した。BRE-lucベクタ - (#45126)、SBE4-lucベクター (#16495)はAddgeneから購入した。Runx2-lucベクタ -、6×OSE2-lucベクターはDucy博士 (Columbia University)から提供していただいた。 4×48-lucベクターはCrombrugghe博士 (M.D. Anderson)から提供していただいた。

2-12-2 Reporter assay

2-12-1に準じて遺伝子導入を行った細胞をPBSで2回洗浄後、Passive Lysis Buffer (Promega)を用いて回収し、測定まで -80 ℃で保存した。ルシフェラーゼ活性は、 Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて測定した。アッセイシステム では、遺伝子発現の測定値 (ホタルルシフェラーゼの値)を内部コントロール(β-ガラ クトシダーゼの値)で補正して定量した。

2-13 ChIPアッセイ

第1章2-16に準じて行った。抗体は、anti-Smad1抗体 (1:50)、anti-Smad2抗体 (1:50)、anti-Smad3抗体 (1:50) (Cell Signaling Technologies)を用いた。PCRに用いたプ ライマーはTable 6の通りである。

Genes	Upstream (5'-3')	Downsteam (5'-3')
Sox9 promoter BRE (a-b)	CCAGCTCCGCTTTGACGAGC	CACTTTTCGATGCTGTCTCCGTGG
Sox9 promoter SBE (c-d)	ACCACGGAGACAGCATCGA AAAGT	TTCACACGGAGACCGTTCCA AAACTG

Table 6. List of primers used for ChIP assay

2-14 Immunoprecipitation

培養した細胞を、冷GPBSで1回洗浄後、各種phosphatase inhibitorsを含む 1% NP-40 を含むNP-40 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.5 mM EDTA)を 加え、ボルテックスして懸濁後、ソニケーター (Taitec社、VP-5S)を用いて細胞を 超音波破砕し、15,000×g、5分間遠心して上清を細胞抽出液とした。抽出液の一部を inputとして回収し、Protein A agarose 25 μ Lを加え、4 °C、30 分間反応させた。1,500 rpmで15秒間、4 °Cで遠心を行った後、上清を回収し、anti-Smad1抗体、anti-Smad2抗 体、anti-Smad3抗体、anti-Flag抗体、anti-HA抗体、normal mouse IgGを5 μ g分を入 れ、4 °Cで24時間反応させた。翌日、50 μ L Protein A agarose を加え、4 °Cで3時間反 応させた後、NP-40 lysis bufferで3回洗浄を行い、沈殿を5倍希釈したsodium dodecyl sulfate (SDS)処理液 (10% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromphenol blue (BPB), 5% 2mercaptoethanolを含む10 mM Tris-HCl 緩衝溶液(pH 6.8))で懸濁し、これを95 °Cで5 分間煮沸し変性させ、使用直前まで-20 °Cで凍結保存した。実験当日に凍結した標品 を室温にて融解し、Western blotting法に用いた。

2-15 リコンビナントタンパクの調製 ベクター

第1章2-5-2に準じて行った。

2-16 in vitro kinaseアッセイ

0.3 µMのリコンビナントErk5 (active)あるいはリコンビナントErk5 (inactive)を1 µM のGST-Smad1 (WTおよび変異型)、GST-Smad2 (WT)、GST-Smad3 (WT)、GST-Smurf2 (WTおよび変異型)、0.5 mM ATPを30 µLのkinase buffer (2.5 mM MOPS, pH 7.2, 2.5 mM MgCl₂, 1.25 mM glycerol 2-phosphate, 0.25 mM DTT, 0.05% BSA)中で30 ℃で30分間 インキュベートした。反応はSDS sample bufferを加えることで停止した。標品は使用 直前まで-20 ℃で凍結保存した。実験当日に凍結した標品を室温にて融解し、 Western blotting法に用いた。Western blotting法には、Phos-tag(Wako)を最終濃度5.0 mMで加えたゲルを用いた。

2-17 in vitro ubiquitinationアッセイ

E2-Ubiquitin Conjugation Kit (Abcam)を用いて行った。1µMのGST-Smad1、GST-Smad2、GST-Smad3を0.1µMのGST-Smurf2 (WTおよび変異型)、0.05µMのGST-Erk5 (active)を1xUbiquinylation Buffer (0.1µM E1, 0.5µM UbcH5c (E2), 5 mM Mg-ATP, 1 mM DTT, 2.5µM Biotinylated Ubiquitin)中で37℃で1時間インキュベートした。反応は2xNon-reducing gel loading bufferを加えることで停止した。標品は使用直前まで-20℃で凍結保存した。実験当日に凍結した標品を室温にて融解し、Western blotting法に用いた。

2-18 免疫細胞染色

培養細胞の培地を除去し、PBSで1回洗浄したのち、4% PFA/PBS中で15分間固定した。PBSで3回洗浄後、0.1% Triton X-100を含むPBS中で15分間処理した。PBSで3回洗浄後、0.1% Triton X-100を含むPBSをブロッキングとして室温で1時間反応させた。その後、0.1% Triton X-100を含む2% NGS/PBSでそれぞれ400倍希釈した anti-Smad1抗体、anti-Smad2抗体、anti-Smad3抗体、anti-Sox9抗体を室温で2時間反応させたのち、PBSで3回洗浄した。次に、Alexa-633で標識されたヤギ抗ウサギIgG 抗体をPBSで400 倍に希釈したものを2次抗体として室温で2時間反応させたのち、PBS を用いて3回洗浄した。その後、10 µg/mL のHoechst33342を添加したPBS中で室温 下、5分間インキュベートし、PBSで1回洗浄後、PBSで置換した。共焦点レーザー顕 微鏡 (Carl Zeiss 社LSM710)を用いて観察を行った。

2-19 統計解析

各種解析で得られた値は、平均値±標準誤差で表示した。統計学的有意差は、一元 配置分散分析(One-factor ANOVA)後の結果認められた水準間の差を、多重比較検定 のうちの Bonferroni *post-hoc* test を用いて検定した。また、独立した2群間の差の検 定には Student's *t*-test を用いた。

第3節 実験結果



3-1 間葉系幹細胞特異的Erk5欠損マウスの骨格形成の解析

Figure 10. Erk5 is essential for skeletogenesis in vivo.

(A) The whole skeleton and parts of the skeleton at E18.5. Embryos were double stained with Alizarin Red and Alcian Blue. (B) Quantitative data of width (double-headed white arrows in Ad) and length of femur and tibia at E18.5 (n=3). (C,D) Histological analyses of the femur (C) and tibia (D) at E18.5. Femur and tibia were stained with H&E, Safranin O and von Kossa. (E) Histological and in situ hybridization analyses of the metatarsal at E18.5. Representative images of skeletal preparations and histological analyses derived from more than three embryos from different litters are shown. **P<0.01 (significantly different from the value obtained in control embryos; two-tailed, unpaired Student's t-test). N.S., not significant. Error bars represent s.e.m. Scale bars: 10 mm (Aa,Ab); 1 mm (Ac-Aj); 500 μm (C,D); 150 μm (E).

Prx1-Cre は間葉系幹細胞で発現することが分かっている。本検討では、*Prx1-Cre;Erk5^{fl,fl}* マウスを間葉系幹細胞特異的 Erk5 欠損マウスとして扱った。まず、最初 に骨格形成における Erk5 の生理学的役割を明らかにするために、胎生 18.5 日目の *Prx1-Cre;Erk5^{fl,fl}* マウスの骨格標本を作成した。その結果、*Prx1-Cre;Erk5^{fl,fl}* マウスに おいて長管骨がコントロールマウスと比較して有意に太くなっていることが明らか となった。さらに *Prx1-Cre;Erk5^{fl,fl}* マウスにおいて、頭蓋骨の大泉門の拡大、指の骨 の石灰化の顕著な抑制が観察された (Fig 10A,B)。以上の結果から、間葉系幹細胞に おける Erk5 は胎児の適切な骨格形成の制御メカニズムに寄与することが示唆され た。

次に大腿骨と頸骨における組織学的解析を行った。その結果、HE染色、Safranin O 染色、von Kossa染色によって、長管骨が*Prx1-Cre;Erk5^{fl/fl}* マウスにおいて、より太く なっていることが明らかとなった (Fig. 10C,D)。 さらに、*in situ hybridization*法により、*Prx1-Cre;Erk5^{fl/fl} マウスにおいて、*軟骨細胞 前期分化マーカーである*Col2a1*の発現減少、肥大化マーカーである*Col10a1*、肥大化 および石灰化マーカーである*Mmp13*の発現減少が認められた (Fig. 10E)。さらに、こ れらの軟骨細胞分化の異常は、H&E染色、Safranin O染色、von Kossa染色によっても 裏付けられた。



3-2 Erk5 欠損間葉系幹細胞の軟骨細胞分化における解析

Figure 11. Erk5 is essential for chondrogenesis in vitro.

(A) Forelimb bud mesenchymal cells of $Erk5^{fl/fl}$ (control) and Prx1- $Cre; Erk5^{fl/fl}$ ($Erk5^{-r/-}$) embryos at E12.5 were cultured, followed by Alcian Blue staining at day 6 (Aa,Ab) and Alizarin Red staining at day 12 (Ac,Ad) (n=5). (B-D) Primary mesenchymal cells were isolated from $Erk5^{fl/fl}$ and Prx1- $Cre; Erk5^{fl/fl}$ embryos at E12.5, and subsequently mRNA levels were determined by real-time quantitative PCR at day 6 (B) or day 12 (C) (n=5), and protein levels at day 6 (D) (n=3). (E,F) Primary mesenchymal cells were retrovirally infected with Erk5(WT) and Erk5(DN) expression vectors, followed by micromass culture, and subsequent Alcian Blue (Ea-Ef) and Alizarin Red (Eg-El) staining (n=5), and determination of protein levels (F) (n=3). (G) Primary mesenchymal cells were retrovirally infected with Mek5D expression vector, followed by micromass culture, and subsequent Alcian Blue staining at day 6 (Ga-Gd) and Alizarin Red staining at day 12 (Ge-Gh) (n=5). N.S., not significant. Error bars represent s.e.m. Scale bars: 500 µm (A,E,G).

次に*in vivo*解析で明らかとなった骨格形成異常が間葉系幹細胞の軟骨細胞分化の異 常に基づいているかどうかを検討するために、*Prx1-Cre;Erk5^{fl/fl}*マウスから採取した 間葉系幹細胞のマイクロマスカルチャーを行った。その結果、アルシアンブルー染 色性の増加、アリザリンレッド染色性の低下が観察された (Fig. 11A)。さらにRT-PCR法により、軟骨細胞前期分化マーカーである*Col2a1、Acan、Sox*9の有意な発現 上昇、肥大化マーカーである*Col10a1、*石灰化マーカーである*Mmp13*の有意な発現減 少が認められた (Fig. 11B,C)。これらの結果は、Erk5欠損細胞では、間葉系幹細胞の 軟骨細胞分化が促進される一方で、成熟化が阻害されることを示唆する。また、 Sox9のタンパク発現レベルの増加が観察された。一方でRunx2やOsxには変化は認め られなかった (Fig. 11D)。

次にMek5-Erk5経路の、間葉系幹細胞の軟骨細胞分化における役割を検討すること を試みた。野生型Erk5あるいはドミナントネガティブ型Erk5を野生型細胞および Erk5欠損細胞に過剰発現させた。その後、アルシアンブルー染色およびアリザリン レッド染色により軟骨細胞分化を評価した。その結果、野生型Erk5の導入により、 野生型細胞とErk5欠損細胞において、軟骨細胞の前期分化および後期分化が顕著に 抑制されることが明らかとなった。一方で、ドミナントネガティブ型Erk5の導入に より、野生型細胞の軟骨細胞前期分化はErk5欠損細胞と同程度になるまで亢進し た。一方で、軟骨細胞後期分化はErk5欠損細胞と同程度になるまで抑制された (Fig. 11E,F)。さらに、Mek5を過剰発現させたところ、野生型細胞の軟骨細胞前期および 後期分化は抑制された。一方で、Erk5欠損細胞では、Mek5過剰発現による影響は観 察されなかった (Fig. 11G)。



3-3 Erk5 欠損間葉系幹細胞の軟骨細胞分化における責任因子の探索

Figure 12. Erk5 regulates ubiquitin-dependent degradation of Smad proteins.

(A) Primary mesenchymal cells from $Erk5^{n/n}$ (control) and Prx1- $Cre; Erk5^{n/n}$ ($Erk5^{-/-}$) embryos at E12.5 were cultured for 1 day, and transiently transfected with various luciferase vectors (BRE-luc, SBE4-luc, Sox9-luc, 4x48-luc, Runx2-luc and 6xOSE2-luc) for determination of reporter activities (n=5). RLU, relative light unit. (B-D) Primary mesenchymal cells were isolated from $Erk5^{n/n}$ and Prx1- $Cre; Erk5^{n/n}$ embryos at E12.5, and subsequently mRNA levels were determined by qPCR (B) (n=5) and protein levels were determined by immunoblotting and immunocytochemistry (C,D) (n=3). (E) Primary mesenchymal cells from $Erk5^{n/n}$ and Prx1- $Cre; Erk5^{n/n}$ embryos were treated with cycloheximide at 50 µg/ml for the indicated number of hours, followed by immunoblotting (n=4). (F) HEK293 cells were transfected with HA-Ub and Flag-Smads in either the presence or absence of Mek5 and Erk5(WT) expression vectors. Subsequently, IP was performed with an anti-Flag antibody, followed by immunoblotting with anti-HA antibody (n=4). **P<0.01 (significantly different from the value obtained in control cells; two-tailed, unpaired Student's t-test). N.S., not significant. Error bars represent s.e.m. Scale bars: 10 μ m.

次に、Erk5欠損細胞で観察される軟骨細胞分化の異常やSox9の発現上昇における責 任因子の探索を行った。ルシフェラーゼベクターを用いて、骨格形成に関与するシ グナルについて、レポーターアッセイを行った。その結果、Bone morphogenic protein responsive element-luc (Smad1/5/8依存的)、Smad binding element×4-luc (Smad2/3依存的) の有意な発現増加が観察された (Fig. 12A)。また、この時、各種SmadのmRNAレベ ルには変化は認められなかった (Fig. 12B)。一方で、p-Smad1/5/8、p-Smad2/3の発現 上昇、Smad1、Smad2、Smad3の発現上昇が認められた (Fig. 12C)。これらの結果か ら、Erk5はSmadsをmRNAレベルではなく、タンパクレベルで制御することが示唆された。さらに、これらの結果と一致して、Erk5欠損細胞においてSmadsやSox9の核内移行の亢進が認められた (Fig. 12D)。

次に、Erk5がSmadの分解を制御するかどうかを検討するために、タンパク合成阻害 剤であるサイクロヘキシミドを50µg/mLで処理し、最大12時間までタンパクレベル の観察を行った。Erk5欠損細胞におけるSmadsの発現レベルを解析したところ、サイ クロヘキシミド処理により、コントロール細胞においてはSmad1、Smad2、Smad3の 分解が進んでいくのに対し、Erk5欠損細胞においては、Smadsの発現レベルは、いず れの時間においてもコントロール細胞と比較して高いレベルで維持されていた (Fig. 12E)。

次に、Mek5-Erk5経路がユビキチン化修飾を介してSmad1、Smad2、Smad3のターン オーバーを促進しているのかどうかを検討した。HEK293T細胞に、HAタグを付加し たユビキチン、Flagタグを付加したSmad1、Smad2、Smad3を導入した。さらに、 Mek5DやErk5を導入した。Mek5やErk5を導入していない場合では、Smadsのユビキ チン化は認められなかった。一方で、Mek5やErk5を導入している場合では、顕著な Smadsのユビキチン化が認められた (Fig. 12F)。これらの結果から、Mek5-Erk5経路 は、ユビキチン-プロテアソーム系を介したSmadsの分解を制御することでSmad1/5/8 およびSmad2/3依存的な転写活性を調節していることが示唆された。



3-4 Erk5によるSmadsのリン酸化メカニズムにおける解析

Figure 13. Erk5 phosphorylates Smad1 at Ser206 residue in the linker region.

(A-C) IP assays were performed in a cell-free system with recombinant Smad1 (A), Smad2
(B) and Smad3 (C) proteins (n=3). (D-F) In vitro kinase assay. Recombinant Smad1(WT) (D), Smad2(WT) (E) and Smad3(WT) (F) proteins were incubated with active Erk5, followed by Phos-tag SDS-PAGE and subsequent immunoblotting (n=3). (G) In vitro kinase assay.
Recombinant Smad1 proteins (WT and mutants) were incubated with active Erk5, followed by Phos-tag SDS-PAGE and subsequent immunoblotting (n=3).

次に、Mek5-Erk5経路がどのように、Smadsのユビキチン化やプロテアソーム系を介 した分解を制御しているのかについて検討した。免疫沈降法による解析から、Erk5 はSmad1と直接的に相互作用することが明らかとなった。一方で、Smad2やSmad3と の相互作用は認められなかった (Fig. 13A-C)。さらに、*in vitro* kinaseアッセイから、 Erk5はSmad1だけを選択的にリン酸化することが明らかとなった (Fig. 13D-F)。ま た、7種類のセリン残基をそれぞれアラニンに変異させたSmad1を用いて、*in vitro* kinaseアッセイを行った。その結果、Erk5はSmad1のS206を選択的にリン酸化するこ とが明らかとなった (Fig. 13G)。Smad1のS206はErk2により、リン酸化されることが 分かっている。さらに、Smad1のS206のリン酸化はSmurf1依存的な分解を促進する ことが報告されている⁶⁰。したがって、Erk5によるSmad1の安定性調節機構には、少 なくとも部分的にはSmurf1依存的なメカニズムに依存することが示唆された。 3-5 Erk5によるSmurf2のリン酸化メカニズムにおける解析



Figure 14. Erk5 phosphorylates Smurf2 at Thr249 residue to accelerate Smad ubiquitylation.

(A-C) IP assay in HEK293 cells (A), a cell-free system with recombinant proteins (B), and primary mesenchymal cells (C) (n=3). (D) Schematic of Smurf2 protein structure with the predicted phosphorylation sites and their conservation among vertebrates. (E) In vitro kinase assay. Recombinant Smuf2 proteins were incubated with active or inactive Erk5, followed by Phos-tag SDS- PAGE and subsequent immunoblotting (n=4). (F) In vitro ubiquitylation assay. Recombinant Smurf2 proteins and Smad proteins were incubated with active Erk5 in the presence of E1 and UbcH5c, followed by SDS-PAGE (n=4). (G) Primary mesenchymal cells from Erk5^{fl/fl} (control) and Prx1-Cre;Erk5^{fl/fl} (Erk5^{-/-})embryos were retrovirally infected with Smurf2(WT), Smurf2(T249A) and Smurf2(T249E) vectors, followed by micromass culture and subsequent Alcian Blue staining at day 6 (n=5). (H) Primary mesenchymal cells were transiently co-transfected with BRE-luc vector and Smurf2(WT), Smurf2(T249A) or Smurf2(T249E) expression vectors, and subsequently luciferase activity was determined (n=5). **P<0.01 (significantly different from the value obtained in empty vector-transfected cells); #P<0.05 [significantly different from the value obtained in cells transfected with Smurf2(WT) vector] (one-way analysis of variance with Bonferroni post-hoc test). Error bars represent s.e.m. E.V., empty vector. Scale bar: 500 µm.

次に、Mek5-Erk5経路によるSmadsのプロテアソーム系依存的な分解に、別のメカニ ズムが関与しているかどうかを検討した。そこで、E3ユビキチンリガーゼの1種であ るSmurf2に着目した。HEK293T細胞を用いた免疫沈降法の結果から、Erk5はSmurf2 と直接相互作用することが明らかとなった (Fig. 14A)。さらにcell freeの系や初代培 養間葉系細胞の系においても、同様の結果が観察された (Fig.14B,C)。 PhosphoSitePlus (https://www.phosphosite.org/homeAction.action)を用いて、Smurf2のア ミノ酸残基のうちで、Erk5によるリン酸化を最も受ける可能性が高い箇所を解析し たところ、Smurf2のT249が候補として挙げられた (Fig. 14D)。次に実際に、Erk5が Smurf2^{T249}をリン酸化するかどうかを検討するために、Smurf2の249番目のスレオニ ン残基をアラニンに置換した変異型のコンストラクトを作成した。この変異型 Smurf2では、249番目のアミノ酸残基のリン酸化は起こらないことが予想される。*in vitro* kinaseアッセイの結果から、Smurf2 (WT)はErk5 (active)によってはリン酸化され るが、Erk5 (inactive)によっては、リン酸化されないことが観察された。一方で、 Smurf2^{T249A}のErk5によるリン酸化は全く観察されなかった (Fig. 14E)。これらの結果 から、Erk5はSmurf2の249番目のスレオニン残基を直接リン酸化することが示唆され た。

次に、Smurf2^{T249}のリン酸化が実際にSmadsの分解を誘導するかどうかを検討するた めに、*in vitro* ubiquitinationアッセイを行った。Smurf2 (WT)、Smurf2^{T249A}(Smurf2不活 性化体)、Smurf2^{T249E} (Smurf2活性化体)、Erk5、Smadsを用いた。Erk5存在下では、 Smurf2 (WT)はSmadのユビキチン化を誘導した。一方で、Smurf2^{T249A}は、Erk5の存在 の有無に関わらず、Smadsの顕著なユビキチン化は誘導しなかった。また、 Smurf2^{T249E}は、Erk5非存在下においても、Smadsの顕著なユビキチン化を誘導した (Fig. 14F)。

さらに、Smurf2^{T249}のリン酸化が、Erk5依存的な軟骨分化制御メカニズムに必要で あるかどうかを検討した。Smurf2(WT)とSmurf2^{T249E}の導入により、コントロール細 胞およびErk5欠損細胞において、軟骨分化の著明な抑制が観察された。一方で Smurf2^{T249A}の導入により、コントロール細胞においてのみ、軟骨細胞分化の亢進が 認められた (Fig. 14G)。

最後に、BRE-lucによるレポーターアッセイを行ったところ、Smurf2^{T249A}の導入に より、有意な活性上昇が認められた。また、Smurf2 (WT)の導入では有意な活性減 少、Smurf2^{T249E}の導入ではさらに著明な活性減少が観察された (Fig. 14H)。以上の結 果から、Mek5-Erk5経路は、Smurf2^{T249}のリン酸化レベルを亢進させることでSmadsの 安定性を調節することが明らかとなった。



3-6 SmadによるSox9の転写調節メカニズムの解析

Figure 15. Smad proteins directly activate Sox9 expression in mesenchymal cells.

(A,B) Primary mesenchymal cells from wild-type embryos were transiently transfected with various Smad expression vectors, followed by determination of protein level (A) (n=3) and mRNA level (B) of Sox9 (n=5). (C) Schematic of the alignment of mouse Sox9 promoter region with putative BRE and SBE in addition to primers (a-d) used for ChIP assays. Highly conserved regions between mouse and human were identified and colored orange in the graph below using VISTA tools (http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml). (D) Primary mesenchymal cells from wild-type embryos were transiently co-transfected with Sox9-luc and various Smad expression vectors, followed by determination of luciferase activity (n=5). (E,F) Primary mesenchymal cells from $Erk5^{fl/fl}$ (control) and Prx1- $Cre;Erk5^{fl/fl}$ ($Erk5^{-/-}$) embryos were subjected to ChIP assay using anti-Smad1, anti-Smad2 and anti-Smad3 antibodies along with specific primers (a-d) to recognize Sox9 promoter regions containing BRE (E) and SBE (F) (shown in the C) (n=6). *P<0.05, **P<0.01 [significantly different from the value obtained in control cells (E,F)]; two-tailed, unpaired Student's t-test. N.S., not significant. E.V., empty vector.

これまでの結果から、Erk5欠損細胞では、Sox9のmRNAレベルが亢進することや、 Erk5がSmurf2を介してSmadのプロテアソーム系依存的な分解を制御することが示唆 された。そこで、次にSmadがSox9の発現を転写レベルで制御しているかどうかを検 討した。間葉系細胞において、Smad1、Smad2、Smad3をそれぞれSmad4と共に、導 入した。Smad4は、共役型Smadとて知られており、Smadsの転写を促進する機能を持 つ⁶¹。解析を行ったところ、Sox9の発現がタンパクレベル (Fig. 15A)、mRNAレベル (Fig. 15B)で上昇することが観察された。 さらに、Vista tool

(http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml)を用いた解析により、マウスSox9プロモーター 上にBone morphogenic protein responsive element、Smad-binding elementが存在すること が明らかとなった (Fig. 15C)。レポーターアッセイを行ったところ、Smadsの導入に よりSox9プロモーター活性の有意な上昇が認められた (Fig. 15D)。さらに、クロマチ ン免疫沈降法による解析から、Erk5欠損細胞において、Smad1のSox9プロモーター上 のBRE領域への有意なリクルートの亢進 (Fig. 15E)および、Smad2、Smad3のSBE領 域への有意なリクルートの亢進がそれぞれ認められた (Fig. 15F)。


3-7 間葉系幹細胞特異的Erk5, Sox9欠損マウスの解析

Figure 16. Erk5 regulates skeletogenesis through Sox9.

(A) The whole skeleton and parts of the skeleton of $Erk5^{fl/fl}$, PrxI- $Cre; Erk5^{fl/fl}$, PrxI- $Cre; Erk5^{fl/fl}$; $Sox9^{fl/+}$ and PrxI- $Cre; Sox9^{fl/+}$ embryos at E18.5 (Aa-Ap) and µCT 3D images of the foot of mutant mice at 3 weeks (Aq-At). Embryos were double stained with Alizarin Red and Alcian Blue. Representative images of skeletal preparations derived from more than three mice from different litters are shown. (B-D) Micromass culture of dissociated mesenchymal cells of $Erk5^{fl/fl}$ (control), PrxI- $Cre; Erk5^{fl/fl}$ ($Erk5^{-\gamma}$), PrxI- $Cre; Erk5^{fl/fl}$; $Sox9^{fl/+}$ ($Erk5^{-\gamma}$) and PrxI- $Cre; Sox9^{fl/+}$ ($Sox9^{+/-}$) embryos at E12.5 was performed, followed by determination of Alcian Blue staining at day 6 (Ba-Bd,C) and Alizarin Red staining at day 12 (Be-Bh,D) (n=5). (E) Schematic model of the findings of this study. Erk5 phosphorylates Smad1 and Smurf2. These functions enhance ubiquitylation of Smad proteins to inhibit Sox9 expression. **P<0.01 (significantly different from the value obtained in control cells); ##P<0.01 (significantly different from the value obtained in Erk5-deficent cells); one-way analysis of variance with Bonferroni post-hoc test. N.S., not significant. Error bars represent s.e.m. Scale bars: 10 mm (Aa-Ad); 1 mm (Ae-Ap); 500 µm (B).

これまでの結果から、Erk5欠損がSox9の活性化を介して骨格形成や軟骨細胞分化に 影響を及ぼしていることが*in vitro*および*in vivo*の双方の解析から示唆された。これを *in vivo*において、さらに実証するために*Prx1-Cre;Erk5^{fl/f};Sox9^{fl/+}マウス*(間葉系幹細胞 特異的Erk5, Sox9欠損マウス)を作製した。胎生18.5日目の骨格標本を作製したとこ ろ、*Prx1-Cre;Erk5^{fl/fl}マウス*で観察された指の骨の石灰化の抑制や大泉門の拡大が顕 著にレスキューされた。さらに3週齢のマウスの解析を行ったところ、足の骨形成の 異常についてもレスキューされることが明らかとなった(Fig. 16A)。さらに、マイ クロマスカルチャー法を用いたアルシアンブルー染色やアリザリンレッド染色の結果から、Erk5欠損細胞における軟骨細胞の分化や成熟における異常は*Sox9^{fU+}の*導入により、顕著にレスキューされることが示された (Fig.16B-D)。以上の結果から、 Erk5は間葉系細胞において、Sox9の発現や機能を阻害することで、骨格形成を制御 することが示唆された。

第4節 考察

これまでに、培養細胞を用いた解析から、Erk5が軟骨細胞分化のネガティブレギュ レーターであることが示されている^{62,63}。しかしながら、Erk5欠損マウスは胎生9.5日 目から10.5日目の間に胎生致死を示すことから^{28,29}、これまでに骨格形成における Erk5の生理学的役割に関して生体レベルでの解析は行われていなかった。本検討か ら、間葉系幹細胞におけるErk5の欠損は骨格形成異常を引き起こすことが示され た。さらに、Mek5-Erk5シグナルは、少なくとも2つの経路を介してSmadsタンパクの 安定性を調節し、Sox9の転写調節を促進することで軟骨細胞分化を制御することを 実証した。Erk5はSmad1^{\$206}をリン酸化することで、Smurf1依存的なプロテオソーム 系を介した分解を制御する。また、Erk5はSmurf2^{T249}をリン酸化することで、E3ユビ キチンリガーゼ活性を促進することで、Smadsタンパクの分解を制御する。これらの カスケードが、全ての骨部位で活性化されているわけではなく、また、in vitroの実 験系において観察されたこれらのカスケードが、in vivoの表現型に実際に寄与してい るかどうかを本検討では実証していない。しかしながら、Mek5-Erk5経路がSmurf2-Smads-Sox9カスケードを介して、軟骨細胞分化を調節することで骨格形成を制御す ることを本検討において、in vivoレベルで初めて実証することができた。

*Prx1-Cre;Erk5^{fufl}マ*ウスの胎生期における解析から、"骨の短軸方向への肥大化"と "石灰化の遅延"という、大別して2つの表現型が観察された。そして、これら2つの 表現型は、それぞれ異なる骨格形成過程に起因していることを考慮する必要があ る。*Prx1-Cre;Erk5^{fufl}マ*ウスの胎生期において、脛骨や大腿骨といった長管骨ではな く、中足骨において、顕著な石灰化の遅延が観察された。これらは、*Prx1-* *Cre;Erk5^{0,q}マ*ウスで観察された石灰化遅延が生体の中心部から、より離れた骨部位に 特異的な現象であることが示唆される。短指症に関する遺伝学的解析から、 BMP/TGFβシグナルやヘッジホッグシグナルの先天性異常が、指骨における軟骨分化 異常を誘導し、石灰化の遅延や指骨の短小化を引き起こすことが報告されている ^{64,65}。したがって、胎生期の*Prx1-Cre;Erk5^{0,q}マ*ウスにおける石灰化の遅延が遠位骨に 特異的である原因を探索するために、間葉系細胞におけるMek5-Erk5経路が BMP/TGFβシグナルやヘッジホッグシグナルの上流あるいは下流のどちらに存在して いるのかを今後検討する必要がある。

また、本検討において、Smurf2のアミノ酸残基T249がE3ユビキチンリガーゼ活性に 必要であることを実証した。このアミノ酸残基をアラニンに変異させると、Smadsタ ンパクの分解能は抑制され、一方でグルミタン酸に変異させるとSmadsタンパクの分 解能は亢進した。これまでにAktがSmurf2における未知のアミノ酸残基をリン酸化す ることで、Smurf2の分解を誘導することが報告されている⁶⁶。一方で本検討では Smurf2のE3ユビキチンリガーゼ活性を促進するのに重要なアミノ酸残基 (T249)を同 定した。Smurf2の基質には数多くのタンパクが存在することが知られている⁶⁷⁻⁶⁹。 Erk5欠損細胞ではSmadsのmRNAレベルは変化させず、タンパクレベルを変化させる ことから、本検討では、Smurf2の基質としてSmadsに着目した。Smurf2は、Smad2や Smad3の上流因子であるType I receptor of TGF-β (TGFBR1)、Glycogen synthase kinase 3-β (GSK3-β)、β-cateninなどの軟骨細胞分化に関与する複数のタンパクを直接的ある いは間接的に、ユビキチン化および分解を誘導することが知られている⁷⁰⁻⁷²。また、 Erk5はアセチル化を介して、TGF-β(依存的なSmad3の転写を促進することが報告され ている⁷³。したがって、本検討において、Erk5依存的な骨格形成制御メカニズムにおいて、代替経路が存在する可能性について完全に排除することは出来なかった。

さらに、本検討においてSmadsが間葉系細胞において直接Sox9の転写を促進するこ とを初めて実証した。Smad2およびSmad3がSox9と直接的に相互作用し、Sox9の転写 機能を促進することが報告されているので、SmadsがSox9と直接的に相互作用するこ とでErk5依存的な軟骨細胞制御に寄与している可能性も考えられる^{74,75}。また、Sox9 は軟骨細胞特異的遺伝子である*Col2a1やAcan*のプロモーター上に結合することがで きる^{76,77}。したがって、Smadsは間葉系細胞において、Sox9のプロモーター上に結合 し、Sox9の転写レベルを促進させることに加え、Sox9と直接相互作用することで軟 骨細胞特異的遺伝子を活性化させるメカニズムが存在する可能性を想定することも 出来る。

本検討から、間葉系細胞におけるMek5-Erk5経路がSmurf2を介して、Smadsタンパク の安定性を制御することで適切な骨格形成を促すのに必須であることが示された。 この知見は、骨格形成に関する分子メカニズムの理解を深めるとともに、軟骨細胞 分化の異常を伴う骨格形成異常に関する疾患に対する新規創薬開発の基盤確立に寄 与することが期待される。実際、Smurfs-Smads経路はヒトにおいて、がんや加齢性 疾患を含む様々な疾患に関与することが報告されている⁷⁸⁻⁸⁰。したがって、Mek5-Erk5-Smurfs-Smads-Sox9経路 (Fig. 15)の構成要素も様々な疾患の新規創薬標的となり 得ることが想定される。



Figure. 17 間葉系幹細胞におけるMek5-Erk5-Smurf2-Smads-Sox9経路

総括

第1章における検討では、骨代謝調節におけるATF3の機能的役割を明らかにするために、骨芽細胞特異的、あるいは破骨前駆細胞特異的にATF3を欠損させたマウスを 作製した。その結果、*in vitro、in vivo*の双方において、ATF3が破骨細胞生成および 骨吸収を制御することが明らかとなった。また、ATF3は破骨前駆細胞のRANKL誘 導性の細胞増殖を調節することが観察された。さらに、ATF3が破骨前駆細胞におい て、AP-1依存的な転写調節を介した、Cyclin D1の発現制御を行うことが認められ た。

新規骨リモデリング・骨吸収制御因子としてのATF3およびRANK-ATF3-Cyclin D1 経路は、破骨前駆細胞の増殖異常に基づく様々な骨代謝疾患に対する新規治療標的となることが期待される。

第2章における検討では、骨格形成における間葉系幹細胞のErk5の機能的役割を明 らかにするために、間葉系幹細胞特異的にErk5を欠損させたマウスを作製した。そ の結果、Erk5は生体の複数の部位における骨格形成を制御することが明らかになっ た。Smad1^{S206}は、Smad-specific E3 ubiquitin ligase 1 (Smurf1)依存的なプロテオソーム 系による分解制御に必要なリンカー部位である。Erk5はSmad1^{S206}を直接リン酸化す ることが明らかになった。さらに、Erk5がSmurf2^{T249}を直接リン酸化することも明ら かとなった。また、このSmurf2^{T249}のリン酸化はSmadsの分解を促進する働きがある ことが認められた。さらに、Smadsが軟骨細胞分化におけるマスターレギュレーター であるSox9の転写を活性化することを明らかにした。マウス遺伝学的レスキュー実 験から、Erk5依存的な骨格形成にSox9が大きく関与していることが示された。

Mek5-Erk5シグナルはSmurf2-Smad2-Sox9経路を介して、骨格形成を制御することが 明らかとなった。Smurfs-Smads経路はヒトにおいて、がんや加齢性疾患を含む様々 な疾患に関与することが報告されているため、Mek5-Erk5-Smurfs-Smads-Sox9経路は 様々な疾患の新規創薬標的となり得ることが想定される。

結語

第1章

- 1. Atf3は破骨細胞生成および骨吸収を制御する (in vitro, in vivo)。
- 2. Atf3はRANKL誘導性の破骨細胞の増殖能の亢進を促進する。
- Atf3はRANKL刺激時にCyclin D1プロモーター上のAP-1 bindingサイトに結合し、 転写活性を亢進させる。
- 4. RANK-Atf3-Cyclin D1経路は、破骨前駆細胞の増殖異常に基づく様々な骨代謝疾 患に対する新規治療標的となる可能性が想定される。

第2章

- 1. Erk5は骨格形成制御および軟骨細胞分化制御に関与する (in vitro, in vivo)。
- 2. Erk5はSmad1^{S206}をリン酸化する。
- 3. Erk5はSmurf2^{T249}をリン酸化する。
- 4. 2,3のメカニズムを介して、Erk5はSmadsのタンパク分解を促進する。
- 5. SmadsはSox9の転写を直接活性化する。
- Mek5-Erk5-Smurfs-Smads-Sox9経路は骨疾患を含む様々な疾患の新規創薬標的と なる可能性が想定される。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を遂行する上で終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜 りました、岐阜薬科大学薬理学研究室、檜井栄一教授、家崎高志助教に厚くお礼申 し上げます。

また、多大なる御協力と御援助を頂きました岐阜薬科大学薬理学研究室の皆様に 深く感謝いたします。

参考文献

- Harada, S. & Rodan, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349-355, doi:10.1038/nature01660 (2003).
- Teitelbaum, S. L. & Ross, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function.
 Nat Rev Genet 4, 638-649, doi:10.1038/nrg1122 (2003).
- Feng, X. & McDonald, J. M. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 6, 121-145, doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130203 (2011).
- 4 Karsenty, G., Kronenberg, H. M. & Settembre, C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 629-648, doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113308 (2009).
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. & Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747-754, doi:10.1016/s0092-8674(00)80257-3 (1997).
- Komori, T. *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764, doi:10.1016/s0092-8674(00)80258-5 (1997).
- 7 Mundlos, S. *et al.* Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* **89**, 773-779, doi:10.1016/s0092-8674(00)80260-3 (1997).
- 8 Otto, F. *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765-771, doi:10.1016/s0092-8674(00)80259-7 (1997).

- 9 Nakashima, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108, 17-29, doi:10.1016/s0092-8674(01)00622-5 (2002).
- Takayanagi, H. *et al.* Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3, 889-901, doi:10.1016/s1534-5807(02)00369-6 (2002).
- Chen, B. P., Liang, G., Whelan, J. & Hai, T. ATF3 and ATF3 delta Zip. Transcriptional repression versus activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* 269, 15819-15826 (1994).
- Liang, G., Wolfgang, C. D., Chen, B. P., Chen, T. H. & Hai, T. ATF3 gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *J Biol Chem* 271, 1695-1701, doi:10.1074/jbc.271.3.1695 (1996).
- 13 Kajimura, D. *et al.* Genetic determination of the cellular basis of the sympathetic regulation of bone mass accrual. *J Exp Med* **208**, 841-851, doi:10.1084/jem.20102608 (2011).
- 14 Fu, L., Patel, M. S., Bradley, A., Wagner, E. F. & Karsenty, G. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* **122**, 803-815, doi:10.1016/j.cell.2005.06.028 (2005).
- Gilchrist, M. *et al.* Activating transcription factor 3 is a negative regulator of allergic
 pulmonary inflammation. *J Exp Med* 205, 2349-2357, doi:10.1084/jem.20072254 (2008).
- 16 Hai, T., Wolford, C. C. & Chang, Y. S. ATF3, a hub of the cellular adaptive-response network, in the pathogenesis of diseases: is modulation of inflammation a unifying component? *Gene Expr* 15, 1-11, doi:10.3727/105221610x12819686555015 (2010).
- 17 Lee, Y. S. *et al.* Hypothalamic ATF3 is involved in regulating glucose and energy metabolism in mice. *Diabetologia* **56**, 1383-1393, doi:10.1007/s00125-013-2879-z (2013).
- Thompson, M. R., Xu, D. & Williams, B. R. ATF3 transcription factor and its emerging roles in immunity and cancer. *J Mol Med (Berl)* 87, 1053-1060, doi:10.1007/s00109-009-0520-x (2009).

- 19 Long, F. & Ornitz, D. M. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008334, doi:10.1101/cshperspect.a008334 (2013).
- Long, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 27-38, doi:10.1038/nrm3254 (2011).
- Johnson, R. L. & Tabin, C. J. Molecular models for vertebrate limb development. *Cell* 90, 979-990, doi:10.1016/s0092-8674(00)80364-5 (1997).
- Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423, 332-336, doi:10.1038/nature01657 (2003).
- Maes, C. Role and regulation of vascularization processes in endochondral bones. *Calcif Tissue Int* 92, 307-323, doi:10.1007/s00223-012-9689-z (2013).
- Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40, doi:10.1038/35065000 (2001).
- Raman, M., Chen, W. & Cobb, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs.
 Oncogene 26, 3100-3112, doi:10.1038/sj.onc.1210392 (2007).
- Robinson, M. J. & Cobb, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9, 180-186, doi:10.1016/s0955-0674(97)80061-0 (1997).
- Zhou, G., Bao, Z. Q. & Dixon, J. E. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270, 12665-12669, doi:10.1074/jbc.270.21.12665 (1995).
- Regan, C. P. *et al.* Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9248-9253, doi:10.1073/pnas.142293999 (2002).
- 29 Yan, L. *et al.* Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol* 3, 11, doi:10.1186/1471-213x-3-11 (2003).
- Buschbeck, M. & Ullrich, A. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* 280, 2659-2667, doi:10.1074/jbc.M412599200 (2005).

- Nishimoto, S. & Nishida, E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* 7, 782-786,
 doi:10.1038/sj.embor.7400755 (2006).
- Chen, Z., Yue, S. X., Zhou, G., Greenfield, E. M. & Murakami, S. ERK1 and ERK2 regulate chondrocyte terminal differentiation during endochondral bone formation. *J Bone Miner Res* 30, 765-774, doi:10.1002/jbmr.2409 (2015).
- Matsushita, T. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 play essential roles in osteoblast differentiation and in supporting osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol* 29, 5843-5857, doi:10.1128/mcb.01549-08 (2009).
- Nithianandarajah-Jones, G. N., Wilm, B., Goldring, C. E., Müller, J. & Cross, M. J. The role of ERK5 in endothelial cell function. *Biochem Soc Trans* 42, 1584-1589, doi:10.1042/bst20140276 (2014).
- 35 Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508, doi:10.1126/science.289.5484.1504 (2000).
- Rachner, T. D., Khosla, S. & Hofbauer, L. C. Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 377, 1276-1287, doi:10.1016/s0140-6736(10)62349-5 (2011).
- 37 Iezaki, T. *et al.* ATF3 deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development. J
 Pathol 239, 426-437, doi:10.1002/path.4739 (2016).
- Park, J. K. *et al.* ER stress-inducible ATF3 suppresses BMP2-induced ALP expression and activation in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 443, 333-338, doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.121 (2014).
- Boespflug, N. D. *et al.* ATF3 is a novel regulator of mouse neutrophil migration. *Blood* 123, 2084-2093, doi:10.1182/blood-2013-06-510909 (2014).
- 40 Labzin, L. I. *et al.* ATF3 Is a Key Regulator of Macrophage IFN Responses. *J Immunol* 195, 4446-4455, doi:10.4049/jimmunol.1500204 (2015).
- Maruyama, K. *et al.* The transcription factor Jdp2 controls bone homeostasis and antibacterial immunity by regulating osteoclast and neutrophil differentiation. *Immunity* 37, 1024-1036, doi:10.1016/j.immuni.2012.08.022 (2012).

- 42 Taketani, K. *et al.* Key role of ATF3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. *Oncogene* **31**, 2210-2221, doi:10.1038/onc.2011.397 (2012).
- 43 Ferron, M. & Vacher, J. Targeted expression of Cre recombinase in macrophages and osteoclasts in transgenic mice. *Genesis* **41**, 138-145, doi:10.1002/gene.20108 (2005).
- 44 Dacquin, R., Starbuck, M., Schinke, T. & Karsenty, G. Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev Dyn* 224, 245-251, doi:10.1002/dvdy.10100 (2002).
- 45 Iezaki, T. *et al.* Transcriptional Modulator Ifrd1 Regulates Osteoclast Differentiation through Enhancing the NF-κB/NFATc1 Pathway. *Mol Cell Biol* 36, 2451-2463, doi:10.1128/mcb.01075-15 (2016).
- 46 Ozaki, K. *et al.* The L-type amino acid transporter LAT1 inhibits osteoclastogenesis and maintains bone homeostasis through the mTORC1 pathway. *Sci Signal* 12, doi:10.1126/scisignal.aaw3921 (2019).
- Zhou, H. *et al.* ATF3 regulates multiple targets and may play a dual role in cardiac
 hypertrophy and injury. *Int J Cardiol* 174, 838-839, doi:10.1016/j.ijcard.2014.04.160 (2014).
- 48 Ogasawara, T. *et al.* Osteoclast differentiation by RANKL requires NF-kappaB-mediated downregulation of cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6). *J Bone Miner Res* 19, 1128-1136, doi:10.1359/jbmr.2004.19.7.1128 (2004).
- 49 Sankar, U., Patel, K., Rosol, T. J. & Ostrowski, M. C. RANKL coordinates cell cycle withdrawal and differentiation in osteoclasts through the cyclin-dependent kinase inhibitors p27KIP1 and p21CIP1. *J Bone Miner Res* **19**, 1339-1348, doi:10.1359/jbmr.040321 (2004).
- 50 Allan, A. L., Albanese, C., Pestell, R. G. & LaMarre, J. Activating transcription factor 3 induces DNA synthesis and expression of cyclin D1 in hepatocytes. *J Biol Chem* 276, 27272-27280, doi:10.1074/jbc.M103196200 (2001).
- 51 James, C. G., Woods, A., Underhill, T. M. & Beier, F. The transcription factor ATF3 is upregulated during chondrocyte differentiation and represses cyclin D1 and A gene transcription. *BMC Mol Biol* 7, 30, doi:10.1186/1471-2199-7-30 (2006).

- Albanese, C. *et al.* Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *J Biol Chem* 274, 34186-34195, doi:10.1074/jbc.274.48.34186 (1999).
- Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E. & Yaniv, M. Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo j* 19, 2056-2068, doi:10.1093/emboj/19.9.2056 (2000).
- 54 Bentires-Alj, M., Kontaridis, M. I. & Neel, B. G. Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat Med* **12**, 283-285, doi:10.1038/nm0306-283 (2006).
- Rauen, K. A. The RASopathies. Annu Rev Genomics Hum Genet 14, 355-369,
 doi:10.1146/annurev-genom-091212-153523 (2013).
- Rodriguez-Viciana, P. *et al.* Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* **311**, 1287-1290, doi:10.1126/science.1124642 (2006).
- Li, T. *et al.* Targeted deletion of the ERK5 MAP kinase impairs neuronal differentiation,
 migration, and survival during adult neurogenesis in the olfactory bulb. *PLoS One* 8, e61948,
 doi:10.1371/journal.pone.0061948 (2013).
- 58 Sohn, S. J., Sarvis, B. K., Cado, D. & Winoto, A. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 277, 43344-43351, doi:10.1074/jbc.M207573200 (2002).
- 59 Cserjesi, P. *et al.* MHox: a mesodermally restricted homeodomain protein that binds an essential site in the muscle creatine kinase enhancer. *Development* **115**, 1087-1101 (1992).
- Sapkota, G., Alarcón, C., Spagnoli, F. M., Brivanlou, A. H. & Massagué, J. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell* 25, 441-454, doi:10.1016/j.molcel.2007.01.006 (2007).
- 61 Zhao, M., Mishra, L. & Deng, C. X. The role of TGF-β/SMAD4 signaling in cancer. *Int J Biol Sci* 14, 111-123, doi:10.7150/ijbs.23230 (2018).

- 62 Bobick, B. E., Matsche, A. I., Chen, F. H. & Tuan, R. S. The ERK5 and ERK1/2 signaling pathways play opposing regulatory roles during chondrogenesis of adult human bone marrowderived multipotent progenitor cells. *J Cell Physiol* 224, 178-186, doi:10.1002/jcp.22120 (2010).
- 63 Wang, C. *et al.* Sox9-induced chondrogenesis in mesenchymal stem cells was mediated by ERK5 signal pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **62**, 1-7 (2016).
- Gao, B. *et al.* Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1.
 Nat Genet 28, 386-388, doi:10.1038/ng577 (2001).
- 65 Gao, B. *et al.* A mutation in Ihh that causes digit abnormalities alters its signalling capacity and range. *Nature* **458**, 1196-1200, doi:10.1038/nature07862 (2009).
- 66 Choi, Y. H. *et al.* Akt enhances Runx2 protein stability by regulating Smurf2 function during osteoblast differentiation. *Febs j* **281**, 3656-3666, doi:10.1111/febs.12887 (2014).
- David, D., Nair, S. A. & Pillai, M. R. Smurf E3 ubiquitin ligases at the cross roads of oncogenesis and tumor suppression. *Biochim Biophys Acta* 1835, 119-128, doi:10.1016/j.bbcan.2012.11.003 (2013).
- Lin, X., Liang, M. & Feng, X. H. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasomedependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 275, 36818-36822, doi:10.1074/jbc.C000580200 (2000).
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D. J., Hemmati-Brivanlou, A. & Derynck, R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* A. 98, 974-979, doi:10.1073/pnas.98.3.974 (2001).
- Han, G. *et al.* Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development. *Dev Cell* 11, 301-312, doi:10.1016/j.devcel.2006.06.014 (2006).
- Kavsak, P. *et al.* Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6, 1365-1375, doi:10.1016/s1097-2765(00)00134-9 (2000).

- Wu, Q. *et al.* Smurf2 induces degradation of GSK-3beta and upregulates beta-catenin in chondrocytes: a potential mechanism for Smurf2-induced degeneration of articular cartilage. *Exp Cell Res* 315, 2386-2398, doi:10.1016/j.yexcr.2009.05.019 (2009).
- Kim, S., Lim, J. H. & Woo, C. H. ERK5 inhibition ameliorates pulmonary fibrosis via regulating Smad3 acetylation. *Am J Pathol* 183, 1758-1768, doi:10.1016/j.ajpath.2013.08.014 (2013).
- Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y. & Asahara, H. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J Biol Chem* 280, 8343-8350, doi:10.1074/jbc.M413913200 (2005).
- Song, B., Estrada, K. D. & Lyons, K. M. Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 379-388, doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.010 (2009).
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. & de Crombrugghe, B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16, 2813-2828, doi:10.1101/gad.1017802 (2002).
- Lefebvre, V. & de Crombrugghe, B. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* 16, 529-540, doi:10.1016/s0945-053x(98)90065-8 (1998).
- Fukuchi, M. *et al.* High-level expression of the Smad ubiquitin ligase Smurf2 correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62, 7162-7165 (2002).
- Jin, C. *et al.* Smad ubiquitination regulatory factor 2 promotes metastasis of breast cancer cells by enhancing migration and invasiveness. *Cancer Res* 69, 735-740, doi:10.1158/0008-5472.Can-08-1463 (2009).
- Zhang, H. & Cohen, S. N. Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence.
 Genes Dev 18, 3028-3040, doi:10.1101/gad.1253004 (2004).