ミニレビュー

歯根膜細胞の石灰化過程における TGF- β シグナルの役割山下元三^{*1}, 河原貴展^{*1}, 村上伸也^{*2}^{*1}大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科^{*2}大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座Role of TGF- β signaling in the ossification process of periodontal ligament cellsMotozo Yamashita^{*1}, Takanobu Kawahara^{*1} and Shinya Murakami^{*2}^{*1}Department of Periodontics, Osaka University Dental Hospital^{*2}Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of DentistryKey words : TGF- β , 歯根膜細胞, 細胞内シグナル

はじめに

生体の組織発生・再生並びに創傷治癒過程においては、様々なサイトカインが細胞機能を制御することでその生理的過程が維持されている。なかでも TGF- β (Transforming Growth Factor beta) は広汎な組織で発現が認められ、細胞の増殖分化、遊走、接着、アポトーシス、細胞外基質産生を担うサイトカインである。その多様な機能を通じて、組織や生体の発生や個体としての恒常性維持を制御し、シグナル経路の異常は癌、臓器の線維化、骨格形成の異常などの様々な疾患に関係している¹⁾。

歯周組織においては、線維芽細胞や歯槽骨中に TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 の発現が確認されてお

り²⁾、歯胚の発生や分化過程においても TGF- β を介したシグナルが重要であることが一連の遺伝子組み換え動物を用いた研究により明らかにされている³⁾。

本稿においては、硬組織形成における TGF- β の細胞内シグナル機構に焦点をあて解説をおこなうとともに、当研究室の研究成果から得られた知見より、将来的なサイトカインシグナル制御に基づいた分子標的薬開発への展望について論じたい。

ユビキチン化修飾による細胞内 TGF- β シグナルの制御機構

TGF- β スーパーファミリーは、アミノ酸の相同性を有する 33 種のポリペプチド蛋白因子により構成されており、同ファミリーには TGF- β , BMP (Bone

連絡先：山下元三

〒565-0871 吹田市山田丘 1-8

大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科

Motozo Yamashita

1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan

Department of Periodontics, Osaka University Dental Hospital

E-mail : yamashim@dent.osaka-u.ac.jp

図 1

A Smurfs による Smad 依存性の TGF- β /BMP シグナリングの制御機構

Smurfs は定常状態、活性化状態の R-Smads を直接、あるいは I-Smads を介して間接的に TGF- β /BMP 受容体、Smad4, SnoN, Runx2 を標的とし蛋白分解することで機能制御する。

B Smurf1 と Smurf2 の構造

Smurf は N 末端に膜脂質との結合に関与する C2 ドメイン、中央に PY モチーフとの結合に関わる WW ドメイン、C 末端に E3 ユビキチン酵素活性である Cys 残基を有する HECT ドメインを有している。Smurf1 は 2 個の Smurf2 は 3 個の WW ドメインをもち、R-Smad の Linker 部位の PY モチーフに結合する。

Morphogenetic Protein), Activin など生体の恒常性維持に重要な増殖・分化因子が含まれる⁸⁾。

TGF- β は、細胞膜表面上のヘテロ二量体であるセリン/スレオニンキナーゼ受容体を介して細胞内へのシグナル伝達を行う。細胞膜表面上に恒常的に発現している II 型受容体はリガンド刺激を受けて I 型受容体を近傍にリクルートし、その細胞内キナーゼ領域を活性化する。活性化された受容体は R-Smad (receptor-regulated Smad) である Smad2/3 の C 末端をリン酸化し、リン酸化 Smad2/3 は Co-Smad (common-mediator Smad) である Smad4 と複合体を作り、核内に移行し標的遺伝子の転写を誘導する。BMP シグナルにおいては受容体、基質蛋白である Smad は異なるものの、同様のメカニズムを介してシグナル伝達を行う^{4,5)}。この際に、TGF- β 受容体は non-canonical 経路として、Smad 非依存性に MAPKs, RhoA, PI3K/AKT シグナルを活性化することが明らかとなっている^{6,7)}。

リガンド刺激により惹起された細胞内シグナルは、I-Smad (inhibitory Smad) である Smad6/7 もしくは HECT タイプ E3 ユビキチンリガーゼである Smurf1/2 (Smad ubiquitin regulatory factors; Smurf1,

Smurf2) が、受容体自身もしくは基質蛋白である Smad をユビキチン化修飾により、蛋白分解、抑制することで細胞内シグナルが過剰とならないように制御している。TGF- β /BMP は、生命現象の発現において重要なサイトカインであることから、進化の過程でこのようなネガティブフィードバック機構を獲得し、精緻なシグナル制御システムを構築したと考えられている (図 1 A, B)。

Smurf1 は、TGF- β の細胞内シグナルの伝達因子として重要である Smad の調節制御因子として同定された。酵母 two yeast hybrid 法により、Smad1 結合蛋白として Smurf1 が最初に同定され、ホモロジー検索によりアミノ酸レベルで 80% の相同性をもつ Smurf2 がクローニングされた^{8,9)}。HECT 型 E3 である Smurf1 は、WW ドメインを介して Smad1/5 の Linker 部位の PPXY 配列に結合し、ユビキチン依存性に蛋白分解を誘導することにより細胞内での Smad1/5 の量を調節し BMP シグナルを制御していること、Smurf2 は同様のメカニズムで Smad1/2/3/5/7 の分解制御を示し、TGF- β シグナルを主に制御することが *in vitro* の実験系において明らかとなった。

しかしながら、WW ドメインの結合ドメインである

図2 Smurf1 ノックアウトマウスにおける骨量の増加と骨芽細胞活性の増強

- A Smurf1^{-/-}と Wt マウスの脚を Soft X-ray にて撮影, 比較した。
 B Smurf1^{-/-}と Wt マウス脛骨の非脱灰標本を Villanueva Goldner 染色により比較検討した。T: trabecular bone, C: cortical bone, 文献 14 より引用
 C Smurf1^{-/-}と Wt マウス頭蓋骨より採取した骨芽細胞を石灰化誘導培地にて長期培養し, ALP, van Gieson, Von Kossa 染色にて比較検討した。

PY モチーフが, R-Smads, I-Smads に存在し, Smurf1 と Smurf2 が標的蛋白を共有していたことから, *in vitro* の遺伝子を過剰発現した実験系では, Smurf1, Smurf2 単独の生物学的機能の詳細な解析は困難であった。そこで, 筆者は, Smurf1, Smurf2 のノックアウトマウスを作成し, 生体内での基質の同定をすることで生理学的役割を検討した (Yamashita *et al.* Cell, 2005) (図2 A, B, C)。

Smurf1 ノックアウトマウスは正常に生まれるが, 飼育中に週齢に依存的に最大 30% の骨量増加を示した。細胞レベルでは, BMP 刺激による骨芽細胞の活性の増強を認めた。驚くべきことに, Smurf1 ノックアウトマウスの骨芽細胞において, BMP シグナル経路である Smad1 のリン酸化蛋白の発現増強は見られず, MAPKKK である MEKK2 のリン酸化蛋白の蓄積が認められた。分子レベルでの解析により, Smurf1 ノックアウトマウスにおいては, MEKK2-JNK 経路により活性化された AP-1/ATF 転写因子複合体により Osteocalcin や I 型コラーゲンの発現増強がおこっていた。Smurf1 ノックアウトマウスにおいては Smurf2 が代償的に機能することで, canonical な Smad 依存性の TGF- β /BMP シグリング経路に影響が表れなかったものと判断される¹⁰⁾。

特筆すべきこととして, Smurf1 ノックアウトマウスは, その長期間にわたる飼育期間において腫瘍形成

を認めず, 緩やかな骨量の増加を示した。これは, 骨粗鬆症やリウマチ等の骨の代謝性疾患に対する治療薬開発の有効な分子標的になることを示唆する。

実際に, ヒト関節リウマチのモデルマウスである TNF- α Tg マウスと Smurf1^{-/-}との交配で得られた, TNF- α Tg, Smurf1^{-/-}マウスにおいてはリウマチ病態の改善が認められた。分子機構の一端として, TNF- α Tg マウスで見られる Runx2 の骨芽細胞での発現量の減少が Smurf1^{-/-}の導入により是正されたものと考えられている¹¹⁾。

Smurf2 ノックアウトマウスは, 99% 以上が正常に生まれ, 野生型マウスと比較して表現型に大きな差異を示さなかったが, 稀に (<1%), kinky 或は looped tail の表現型を示した。異常の重篤度や出現頻度は, Smurf1 +/+; Smurf2^{-/-}, Smurf1^{-/-}; Smurf2 +/+ において増強が見られた。Smurf1^{-/-}; Smurf2^{-/-} ダブルノックアウトマウスは胎生 E7.5 において, mesoderm, somite の発育不全による胎生致死の表現型を示した。これらの遺伝子欠損マウスの解析により Smurf2 の発生期における重要な機能は, Wnt シグナルに代表される, 細胞極性の制御にあることが明らかとなった^{12,13)}。また, Smurf2 ノックアウトマウスは, 高齢期に各種の臓器にタイプの異なる腫瘍を生じたことから, Smurf2 は, 癌幹細胞のエピゲノムを制御していることが明らかとなった¹⁴⁾。(図3 A, B, C)

図3 Smurf1, Smurf2 遺伝子変異マウスにおける骨格形成の異常

- A Smurf1^{-/-}, Smurf2^{+/-}と Smurf1^{+/-}, Smurf2^{-/-}マウス骨格を Soft X-ray にて撮影, 比較した。
- B Smurf1^{-/-}, Smurf2^{-/-}ダブルノックアウトマウスは, 胎生 8.25 において Somite の発育不全を生じる。
- C 生体内で Smurf1 は MEKK2-JNK の調節制御を介して骨芽細胞の活性を制御する。

近年, 健康なヒト歯根膜細胞においては miR-17 により Smurf1 の発現が抑制されているが, 炎症歯根膜細胞においては TNF- α が miR-17 の発現を抑制し, 結果として発現増強した Smurf1 が Runx2 の蛋白分解を通じて硬組織形成を負に制御するとの興味深い報告がなされている¹⁵⁾。

TGF- β シグナル制御による歯根膜細胞の硬組織形成の誘導

歯根膜は, 歯を支持する弾性軟組織としての機能のみならず, 歯周組織における創傷治癒や再生において中心的な役割を担っている。その細胞性機構として, 歯根膜には臓器特異的な間葉系幹細胞である歯周組織幹細胞が存在すること, 歯根膜細胞並びに周囲組織の細胞が産生するサイトカインや細胞外基質 (ECM) 蛋白が, 骨芽細胞やセメント芽細胞などの硬組織形成に関わる細胞への増殖・分化を誘導することが明らかとなっている¹⁶⁾。

そこで歯根膜細胞における TGF- β シグナルの生理的意義を明らかにする為に, *in vitro* の歯根膜細胞培養モデルを用いて歯根膜細胞の分化過程に及ぼす TGF- β の影響を検討した。実験には, 我々の研究室で樹立したマウス歯根膜細胞株である MPDL22 を用いた¹⁷⁾。

MPDL22 は TGF- β I 型, *Alk* (*activin receptor-like kinase*) 1, 4, 5 ならびに II 型受容体, BMP 受容体を発現し, 細胞内シグナル伝達因子 *Smad*1, 2, 3, 4,

5, 6, 7 を発現していることを mRNA 並びに蛋白レベルで確認した。

MPDL22 は培養上清中に 2~4 ng/ml の TGF- β を恒常的に産生していることが確認されたことより, 細胞培養系への TGF- β の添加実験では歯根膜細胞自体が産生する内在性の TGF- β 由来の機能を検討することが困難であることが予測された。

そこで, 小分子ケミカルスクリーニングにより発見された TGF- β I 型受容体阻害剤を用い, 内在性 TGF- β によるシグナルを遮断することで, 歯根膜細胞の増殖, 分化, 石灰化過程における TGF- β の役割を検討した。

本研究においては, TGF- β I 型受容体阻害剤としては, 細胞膜透過性を有する SB431542¹⁸⁾ (分子量 384) を用いた。SB431542 は TGF- β I 型受容体の細胞内酵素活性ドメインへの ATP 結合を競合阻害することで阻害作用をもつ。ALK5 (IC₅₀ = 94 nM) に対しては強い親和性, ALK4 (IC₅₀ = 140 nM) に対しては比較的弱い親和性を示すことが特徴である (図 4 A, B)。

MPDL22 において, TGF- β 刺激により誘導される Smad3 のリン酸化は 10 μ M の SB431542 の前処理によって無刺激レベルまで抑制されること, TGF- β シグナルの標的遺伝子である PAI-1 遺伝子プロモーターの転写活性は, SB431542 により完全に抑制されることがルシフェラーゼアッセイにて確認された。

はじめに, MPDL22 の増殖能に TGF- β が及ぼす影響を *in vitro* 培養系を用いて BrdU の取り込みを指標に検討した。4 ng/ml の TGF- β の添加, SB431542 処

図4 歯根膜細胞における TGF-β シグナルの遮断

- A SB431542 の化学構造式, MPDL22 において TGF-β I 型受容体阻害剤 SB431542 (10 mM) 前処理後に TGF-β にて誘導される Smad3 のリン酸化をウエスタンブロッティング法にて検討した。TGF-β 応答性プラスミドである *I2x* (CAGA)-*Luc* ルシフェラーゼ活性を SB431542 (10 mM) 存在・非存在下で測定した。
- B LY364947, Inhibitor II の化学構造式, MPDL22 において LY364947 あるいは Inhibitor II (10 μM) 前処理後に TGF-β にて誘導される Smad3 のリン酸化をウエスタンブロッティング法にて検討した。

図5 TGF-β I 型受容体阻害剤処理による ALPase 活性と石灰化物形成の増加

BMP-2 (50 ng/ml), SB431542 (10 μM) 存在・非存在下で, MPDL22 を石灰化誘導培地中にて長期培養を行い, 分化誘導 12 日目にアリザリン染色を行った。

理を用いた内在性 TGF-β シグナルの遮断のどちらも増殖能に有為な影響を及ぼさなかった。

次に SB431542 存在・非存在下において歯周組織に発現している代表的なサイトカインである BMP-2, FGF-2, TGF-β, PDGF-BB を石灰化誘導培地へ添加し, MPDL22 の長期培養を行うことで, 石灰化物形成への影響を検討した。BMP-2 添加により石灰化物の形成は増強, FGF-2 および TGF-β の添加により石灰化物の形成は抑制され, PDGF-BB 添加群では同形成は変化を認めなかった。BMP-2 刺激に対する TGF-β

の相互作用を検討したところ, BMP-2 添加により誘導される石灰化物形成は, TGF-β 添加により抑制され, SB431542 添加により著しく増強された。興味深いことに, SB431542 単独添加による内在性 TGF-β シグナルの遮断のみでは石灰化物形成の変化を認めなかった。形成された石灰化物の定量化解析により, BMP-2 により誘導される石灰化物形成の増強は SB431542 処理により 4 倍以上に増強されることが確認された。

この際に, BMP-2 誘導性のアルカリフォスファターゼ活性並びに骨芽細胞分化遺伝子である *Runx2* や *osterix* の mRNA 発現の増強が石灰化誘導培地交換 4 日後の分化過程の初期より認められた (図5)。

その一方, SB431542 処理によりコラーゲン産生の低下が認められ, 石灰化長期培養期間の初期のみに SB431542 処理を行った場合が, 効率よく石灰化物形成を増強された。これらより, 内在性の TGF-β シグナルは BMP-2 誘導性の石灰化物形成に対して, 初期過程においては抑制的に作用し, 後期においては ECM 蛋白産生を介して促進的に機能していることが示唆された。

また, DNA マイクロアレイによる遺伝子の網羅解析を行ったところ, SB431542 処理により発現が変動した遺伝子として BMP シグナルのネガティブフィー

図 6 A 歯根膜細胞の石灰化過程における TGF- β シグナルによる BMP シグナルの制御 (作業仮説)

B TGF- β RI 阻害剤の歯周組織再生療法への応用 (作業仮説)

ドバック機構に関わる遺伝子である *Smad7*, *Smurf1*, *SnoN* の¹⁹⁾発現の低下と、硬組織形成に関わる *Wnt* や *Vegf*, *Igf*, *Fgf* 等の増殖因子の増強を認めた。この際に、細胞形質の癌化に関連する遺伝子発現の変動が抽出されなかったことは臨床応用に際し、安全性への担保として重要と考えられる。

当教室において樹立した 3 種類の初代培養ヒト歯根膜細胞株を用いて検討したところ、SB431542 は BMP-2 誘導性の石灰化物形成の亢進作用があることを確認した。また、TGF- β I 型受容体 ALK5 への親和性が異なる阻害剤 LY364947 あるいは Inhibitor II^{20, 21)} をヒト歯根膜細胞の石灰化誘導長期培養系に添加した場合においても、同様に石灰化物形成の亢進を認めた。これらの結果は、TGF- β シグナルは歯根膜細胞の硬組織物形成の過程において、初期の硬組織形成細胞への分化は抑制する一方、コラーゲンをはじめとする細胞外基質産生を通じた石灰化の成熟を誘導していることを意味する。

In vitro の実験系において、低分子型 TGF- β I 型受容体阻害剤により間葉系幹細胞、血管内非細胞並びにリンパ管の分化が誘導されることが明らかにされており^{22, 23, 24)}、成人マウス全身投与モデルにおいては顕著な骨質の改善が認められた²⁵⁾。また、ヒトにおいては既に悪性腫瘍の治療薬として LY2157299 の臨床治験 (イーライリリー, 米国) が開始されていることも興味深い。

内在性の TGF- β シグナル制御に基づいた分子標的薬と増殖因子の併用療法の開発による、次世代型歯周組織再生療法樹立に向けた今後の発展が期待される (図 6 A, B)。

おわりに

TGF- β に誘導される ECM 蛋白である I 型コラーゲンは、骨組織、歯根膜細胞や歯肉線維芽細胞において活発に代謝、生合成され、硬組織形成過程のみならず歯の支持組織としての恒常性維持に重要な役割を果たしている。

Ehlers-Danlos 症候群は、コラーゲンの遺伝的異常を原因とした結合組織性疾患であり、重篤な歯周病を発症する。近年、大動脈解離を特徴とする結合組織性疾患である Marfan 症候群等において、*fibrillin* 遺伝子あるいは TGF- β 受容体のヘテロ遺伝子変異による TGF- β の過活性化が報告されており、歯周病への高い罹患率が注目されている²⁶⁾。

また、当研究室にて歯根膜特異的遺伝子として発見された *PLAP-1/ASPN* (*periodontal ligament associated protein-1*)¹⁷⁾ の遺伝子多型はヒト軟骨細胞の TGF- β シグナルに影響を及ぼし、ECM 蛋白である Aggrecan の産生異常を原因とする変形性関節炎の発症に寄与することが明らかとなっている²⁷⁾。

これら一連の分子疫学研究は、TGF- β シグナルコラーゲン (ECM 蛋白) 生合成系の異常が歯周病の分子病態の一因をになうことを強く示唆するものではないだろうか。現在、多施設の協力のもと、侵襲性歯周炎と *PLAP-1* 遺伝子多型の相関の疫学調査が進行中であり、大阪大学歯学部附属病院においては侵襲性歯周炎患者の全ゲノムの解読に着手している。

ヒトゲノムの全容解読により解明された疾患遺伝子には、サイトカインシグナルに関わるものが多い。これらの情報を基盤とした、歯周病の病理病態の解明とサイトカインシグナルを制御する新規分子標的薬の開発が、ゲノム診断型テーラーメイド医療実現へのブレークスルーになるもの期待している。

文 獻

- 1) Derynck R, Miyazono K : The TGF- β family. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York : 1023-1061, 2008.
- 2) Ye P, Simonian M, Chapple CC, Gibbins JR, Kumar RK, Hunter N : Differential expression of transforming growth factors-beta 1, -beta 2, -beta 3 and the type I, II, III receptors in the lining epithelia of inflamed gingiva. *Pathology*, 35(5) : 384-392, 2003.
- 3) Xu X, Jeong L, Han J, Ito Y, Bringas P, Chai Y : Developmental expression of Smad1-7 suggests critical function of TGF-beta/BMP signaling in regulating epithelial-mesenchymal interaction during tooth morphogenesis. *Int J Dev Biol*, 2003 ; 47(1) : 31-39, 2003.
- 4) Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH : TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol*, 75 : 115-157, 2000.
- 5) Shi Y, Massagué J : Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6) : 685-700, 2003.
- 6) Derynck R, Zhang YE : Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature*, 425 : 577-584, 2003.
- 7) Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell*. 26 : 31(6) : 918-924, 2008.
- 8) Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH : A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400 : 687-693, 1999.
- 9) Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R : Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA*, 98 : 974-979, 2001.
- 10) Yamashita M, Ying SX, Zhang G, Li C, Cheng SY, Deng C, Zhang YE : Ubiquitin Ligase Smurf1 Controls Osteoblast Activity and Bone Homeostasis by Targeting MEKK2 for Degradation. *Cell*, 121 : 101-113, 2005.
- 11) Guo R, Yamashita M, Zhang Q, Zhou Q, Chen D, Reynolds DG, Awad HA, Yanoso L, Zhao L, Schwarz EM, Zhang YE, Boyce BF, Xing L : Ubiquitin Ligase Smurf1 Mediates Tumor Necrosis Factor-induced Systemic Bone Loss by Promoting Proteasomal Degradation of Bone Morphogenetic Signaling Proteins. *JBC*, 283(34) : 23084-23092, 2008.
- 12) Narimatsu M, Bose R, Pye M, Zhang L, Miller B, Ching P, Sakuma R, Luga V, Roncari L, Attisano L, Wrana JL : Regulation of Planar Cell Polarity by Smurf Ubiquitin Ligases. *Cell*, 137 : 295-307, 2009.
- 13) Tang LY, Yamashita M, Coussens NP, Tang Y, Wang X, Li C, Deng CX, Cheng SY, Zhang YE : Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF- β signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. *EMBO J*, 30(23) : 4777-4789, 2011.
- 14) Blank M, Tang LY, Yamashita M, Burkett SS, Cheng SY, Zhang YE : A tumor suppressor function of Smurf2 associated with controlling chromatin landscape and genome stability through RNF20. *Nature Medicine*, 18 : 227-234, 2012.
- 15) Liu Y, Liu W, Hu C, Xue Z, Wang G, Ding B, Luo H, Tang L, Kong X, Chen X, Liu N, Ding Y, Jin Y : MiR-17 Modulates Osteogenic Differentiation Through a Coherent Feed-Forward Loop in Mesenchymal Stem Cells Isolated from Periodontal Ligaments of Patients with Periodontitis. *Stem Cells*, 29 : 1804-1816, 2011.
- 16) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, CY, Shi S : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429) : 149-155, 2004.
- 17) Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa K, Saito M, Toyosawa S, Murakami S : PLAP-1/asperin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem*, 282 : 23070-23080, 2007.
- 18) Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS : SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*, 62(1) : 65-74, 2002.
- 19) Luo K : Negative regulation of BMP signaling by the ski oncoprotein. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A Suppl 3 : 39-43, 2003.
- 20) Sawyer JS, Anderson BD, Beight DW, Campbell RM, Jones LM, Herron DK, Lampe JW, McCowan JR, McMillen WT, Mort N, Parsons S, Smith ECR, Vieth M, Weir LC, Yan L, Zhang F, Yingling JM : Synthesis and activity of new aryl- and heteroaryl-substituted pyrazole inhibitors of the transforming growth factor-beta type I receptor kinase domain. *J Med Chem*, 46(19) : 3953-3956, 2003.
- 21) Gellibert F, Woolven J, Fouchet MH, Mathews N, Goodland H, Lovegrove V, Laroze A, Nguyen VL, Sautet S, Wang R, Janson C, Smith W, Krysa G, Boullay V, Gouville AC, Huet S, Hartley D : Identification of 1,5-naphthyridine derivatives as a novel series of potent and selective TGF-beta type I

- p>receptor inhibitors.
- J Med Chem*
- , 47(18) : 4494-4506, 2004.
- 22) Maeda S, Hayashi M, Komiya S, Imamura T, Miyazono K : Endogenous TGF- β signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *EMBO J.* ; 23(3) : 552-563, 2004.
- 23) Watabe T, Nishihara A, Mishima K, Yamashita J, Shimizu K, Miyazawa K, Nishikawa S, Miyazono K : TGF- β receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Biol.* ; 163 (6) : 1303-1311, 2003.
- 24) Oka M, Iwata C, Suzuki HI, Kiyono K, Morishita Y, Watabe T, Komuro A, Kano MR, Miyazono K : Inhibition of endogenous TGF- β signaling enhances lymphangiogenesis. *Blood.* ; 111(9) : 4571-4579, 2008.
- 25) Mohammad KS, Chen CG, Balooch G, Stebbins E, McKenna CR, Davis H, Niewolna M, Peng XH, Nguyen DH, Ionova-Martin SS, Bracey JW, Hogue WR, Wong DH, Ritchie RO, Suva LJ, Derynck R, Guise TA, Alliston T. : Pharmacologic inhibition of the TGF- β type I receptor kinase has anabolic and anti-catabolic effects on bone. *PLoS One.* ; 4(4) : e5275. 2009.
- 26) Suda N, Shiga M, Ganburged G, Moriyama K : Marfan syndrome and its disorder in periodontal tissues. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 312B (5) : 503-509, 2009.
- 27) Nakamura T, Shi D, Tzetis M, Rodriguez-Lopez J, Miyamoto Y, Tsezou A, Gonzalez A, Jiang Q, Kamatani N, Loughlin J, Ikegawa S. Meta-analysis of association between the ASPN D-repeat and osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* ; 15 ; 16 (14) : 1676-1681, 2007.
-