

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09605

研究課題名(和文) 多発性外骨腫症に対する阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of inhibitors for Multiple Hereditary Exostoses

研究代表者

倉谷 麻衣 (Mai, Kuratani)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：50758109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多発性外骨腫症(MHE)は、全身の骨で骨軟骨腫が発生する遺伝性骨系統疾患であり、プロテオグリカン合成に必要な糖転移酵素Ext1やExt2の機能欠失型変異が原因で発症する。本研究では、新しい *in vitro* の実験系の樹立を目的とし、Ext1機能欠失を模倣した培養軟骨細胞、およびExt1変異体の過剰発現系を確立した。本研究結果から、我々の樹立した実験系は、Ext1変異に起因するMHEの病態を模倣するものであり、分子メカニズムの解明や阻害剤の開発に応用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で樹立した解析法は、多発性外骨腫の発生機序解明と阻害薬の開発に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Multiple Hereditary Exostoses (MHE) is a genetic bone disease, which is characterized by growths of multiple osteochondromas. Patients with MHE carry a loss-of-function mutant of Ext1 and Ext2, which encodes a glycosyltransferase essential for heparan sulfate biosynthesis. In the present study, we established a new two types of *in vitro* experimental systems. The first is chondrocyte culture system that mimics the functional deletion of Ext1. The second is overexpression of mutant Ext1 in cultured cells. Our results suggest that the two experimental systems mimic the pathological condition of MHE. These are a useful model to examine the molecular mechanisms of mutant Ext1 and the potential therapeutics for MHE.

研究分野：病態生理学

キーワード：遺伝性疾患

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多発性外骨腫症 (Multiple Hereditary Exostoses: MHE) は、良性の骨軟骨腫が全身の骨で発生する遺伝性疾患であり、50,000 人に 1 人の割合で発症すると報告されている。特に、骨幹端部に骨軟骨腫が発生することが知られており、幼少期から腫瘍が増大し、四肢や脊柱の変形、低身長をきたす。また、腫瘍が悪性化する場合があります。早期からの治療が切望されているが、外科的に腫瘍を切除する対処療法が行われている。多発性外骨腫症は、プロテオグリカンの糖鎖合成に必須の EXT1 (Exostosin Glycosyltransferase 1) や EXT2 (Exostosin Glycosyltransferase 2) 遺伝子の機能欠失型変異によって生じることが知られている。近年の遺伝子改変マウスを用いたモデルマウスの解析から、EXT1 の機能欠失により、Bone Morphogenetic Protein (BMP) シグナルが亢進し、骨軟骨腫が発生する可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、多発性外骨腫症に対する阻害剤等の薬効を検討するために、多発性外骨腫症の病態を *in vitro* で模倣したスクリーニング系を確立することを目的とし、下記 2 つの解析系を樹立した。

- (1) Ext1 機能欠失を模倣した軟骨細胞分化系
- (2) 変異型 Ext1 に起因する BMP シグナル定量解析系

### 3. 研究の方法

(1) 培養細胞の内在性 Ext1 遺伝子をノックアウトするために、guide RNA の設計及び、核酸と Cas9 タンパク質を電気穿孔法で導入する条件を検討した。

(2) (1) で設定した条件下で、マウス軟骨細胞株に Ext1 遺伝子を標的とした guide RNA 及び、Cas9 タンパク質を導入し、PCR 法及び、ウエスタンブロット法にて、Ext1 のノックアウト効率を検討した。

(3) (2) で樹立した Ext1 KO 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、限界希釈液を用いて単一細胞クローンを取得した。取得したクローンについては、欠失部位の塩基配列を DNA シークエンスによって、確認した。

(4) (3) で取得した単一細胞由来の Ext1 KO クローンと野生型の細胞を用いて、細胞を高密度、低血清条件下で培養し、軟骨基質を染色するアルシアンブルー染色によって、細胞分化能を比較検討した。

(5) マウス正常組織より野生型 Ext1 をコードする cDNA 領域をクローニングし、発現ベクターを構築した。さらに、部位特異的変異導入法を用いて、MHE 症例で報告のある変異を導入した変異型 Ext1 ベクターも構築した。

(6) (5) で樹立したベクターと BMP 特異的シグナルに応答するレポータープラスミドを培養細胞に導入し、BMP シグナルに対する変異型 Ext1 の影響を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 公共データベースと guide RNA 設計支援ソフトウェアを使用して、ガイド RNA を作製した。遺伝子導入に使用する各試薬の濃度、電気穿孔法のパルス電圧及び、パルス幅等を詳細に検討し、遺伝子導入法を最適化した。

(2) PCR 法で標的部位の遺伝子が欠失されていることを確認し、抗 Ext1 抗体を用いたウエスタンブロット法によって、Ext1 タンパクの欠失を確認した。

(3) 取得した単一細胞由来のクローンについて、Ext1 をコードする遺伝子の一部が欠失していることを確認した。

(4) コントロールの細胞と比較し、Ext1 KO 細胞は、細胞分化が亢進している傾向が認められた。

(5) 変異型 Ext1 を一過性に発現させた細胞では、低濃度の BMP 処理条件下で、コントロール群に比較し、BMP シグナルが亢進している傾向が見られた。

以上の結果から、Ext1 変異に起因する多発性外骨腫症を模倣する *in vitro* 解析系を樹立することができた。今後、本研究成果を応用し、多発性外骨腫症に対する阻害剤を探索できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katagiri T, Tsukamoto S, Kuratani M	4. 巻 9
2. 論文標題 Accumulated Knowledge of Activin Receptor-Like Kinase 2 (ALK2)/Activin A Receptor, Type 1 (ACVR1) as a Target for Human Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 736 ~ 736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9070736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tsukamoto S, Kuratani M, Hamai R, Tsuchiya K, Suzuki O, Yamada T, Katagiri T
2. 発表標題 Establishment of an in vivo model of ectopic calcification in mouse skeletal muscle
3. 学会等名 ASBMR 2021 Annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本翔、倉谷麻衣、鈴木 治、片桐岳信
2. 発表標題 マウス骨格筋における異所性石灰化モデルの確立と解析
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本翔、倉谷麻衣、片桐岳信
2. 発表標題 びまん性特発性骨増殖症に関連するALK2 K400E変異体の機能解析
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sho Tsukamoto, Mai Kuratani, Takenobu Katagiri
2. 発表標題 Functional characterization of a unique mutant of ALK2, p.K400E, that is associated with a skeletal disorder, diffuse idiopathic skeletal hyperostosis
3. 学会等名 ASBMR(米国骨代謝学会)2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	片桐 岳信 (Takenobu Katagiri)  (80245802)	埼玉医科大学・医学部・教授  (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------