

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390423

研究課題名（和文） 筋組織の異所性骨化に基づく運動器の形成と再生機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of regulation in locomotive tissues

研究代表者

片桐 岳信（KATAGIRI TAKENOBU）

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80245802

研究成果の概要（和文）：筋芽細胞 C2C12 を用いて、Bone morphogenetic protein (BMP) の細胞内情報伝達系と、その調節因子を解析した。その結果、転写因子 Smad を介した経路が骨芽細胞分化の誘導や筋分化の抑制に重要であり、この抑制経路として転写因子 Zranb2 や膜上の補助受容体 DRAGON を同定した。筋組織で骨化が進行する進行性骨化性線維異形成症は、BMP 受容体の ALK2 の細胞内領域にアミノ酸置換を伴う遺伝的な変異が生じ、Smad 経路が構成的に活性化されることが原因と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We studied molecular mechanisms of heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein (BMP) signaling in C2C12 myoblasts. The Smad-dependent pathway plays critical roles for both an induction of osteoblast differentiation and inhibition of myogenesis. The Smad-dependent signaling was suppressed by Zranb2 or DRAGON. In patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), one of BMP receptors, ALK2, was genetically mutated and activated the Smad-dependent signaling regardless of the binding to BMPs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：再生、蛋白質、筋芽細胞、細胞・組織、骨形成、骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

骨・軟骨組織は、個体発生の過程で、筋組織中の多分化能を有する未分化間葉系細胞が、外界からの制御を受けながら骨芽細胞や、軟骨細胞へ分化して形成される。この前駆細胞の性状や、その制御因子等に関しては、未だ不明な点が多い。

進行性骨化性線維異形成症

（Fibrodysplasia Ossificans Progressiva, FOP）は、骨格筋組織中に異所性骨化が起こる遺伝性疾患で、筋組織で異所性骨化を誘導する Bone Morphogenetic Protein (BMP) の受容体 ALK2 をコードする ACVR1 遺伝子に変異が同定された。

我々は、筋芽細胞 C2C12 を用いて、BMP が筋分化を抑制し、骨芽細胞様細胞の分化

を誘導することを報告した。この実験系は、BMP の受容体や転写因子を介した細胞内情報伝達系の解析に適している。

2. 研究の目的

本研究では、FOP における異所性骨化の発症機序を解明し、BMP による骨形成の誘導機構を明らかにすることで、筋組織、軟骨組織、骨組織の形成や再生を司る制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

筋芽細胞 C2C12 を用いて、ALP 活性、ルシフェラーゼレポーター活性で BMP 活性を定量化した。筋分化は、筋幹細胞の出現を指標とした。cDNA のクローニングは、通常の RT-PCR 法で行い、DNA の塩基配列を確認した。タンパクの発現量は、それぞれに特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法で行った。Smad の DNA 結合能は、Id1 の BMP 応答配列をプローブとして解析した。

4. 研究成果

FOP 患者で同定された ALK2 (R206H) の機能的変化を解析した。野生型 ALK2 は Smad1 をリン酸化しないのに対し、R206H 変異体は BMP 非存在下で強く Smad1 をリン酸化し、Smad1 の転写活性を上昇させた (図 1)。また、ALK2(R206H) 変異体は、C2C12 細胞の筋分化を抑制し、Smad1 や Smad5 のリン酸化を介して ALP 活性を上昇させた。上昇した ALP 活性は、BMP 受容体阻害剤の Dorsomorphin で抑制された。

従って、FOP で同定された ALK2 (R206H) 変異体は、構成的活性化型と考えられた。

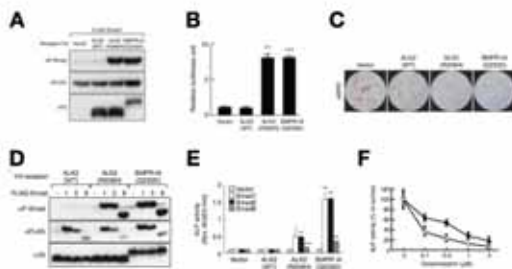


図 1. FOP における ALK2 の構成的活性化

Fukuda et al., J Biol Chem, 2008

FOP 患者では、ALK2 (R206H) 以外にも L196P や G356D など、臨床症状の異なる 10 種類以上の変異体が同定された。これらの生物活性を C2C12 細胞を用いて比較した (図 2)。BMP 初期応答遺伝子のレポーター活性、筋分化抑制活性、Smad11/5/8 のリン酸化活性、ALP 誘導活性とも、L196P 変異体は R206H と同等で、G356D 変異体は R206H よ

りも弱かった。

特に、L196P を有する患者の発症が遅いことから、この変異体は生体内で活性が抑制されている可能性が示唆された。

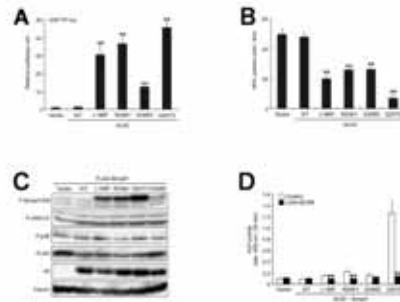


図 2. FOP で同定された新規 ALK2 変異体

Ohno et al., Biochem Biophys Res Commun, 2011

BMP による初期応答遺伝子の転写誘導作用や骨芽細胞分化誘導作用は、転写因子 Smad1 のリン酸化部位を酸性アミノ酸に置換することで再現された (図 3)。しかし、筋分化抑制作用は、Smad1 よりも核内の Smad4 が重要であることが判明した。

従って、BMP シグナルで活性化される Smad 経路が重要で、中でも Smad1 は骨芽細胞分化の誘導に、Smad4 は筋分化の抑制に関与すると考えられた。

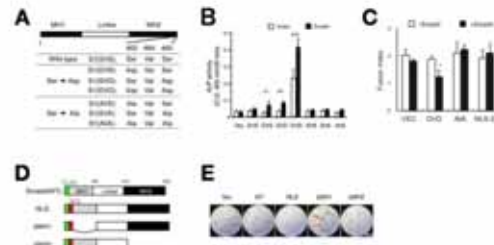


図 3. Smad による骨芽細胞と筋細胞の分化制御

Nojima et al., J Biol Chem, 2010

BMP 受容体がリン酸化した Smad1/5/8 を脱リン酸化する酵素として、PPM1A や SCP が見出された。しかし、我々が樹立した構成的活性化型 Smad1 変異体を用いても、これらの酵素は BMP 活性を抑制することが判明した (図 4)。

一連の結果より、PPM1A は Smad の分解亢進、SCP は Smad の下流で作用する転写因子を標的とする可能性が示唆された。

BMP の生物が Smad を介して伝達されることから、細胞内には Smad と相互作用して、

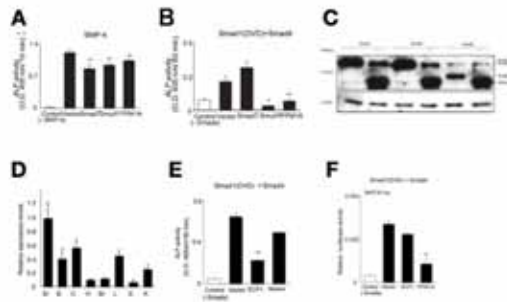


図4. Smadホスファターゼの作用機序

(Kokabu et al., J Bone Miner Res, 2010; Kokabu et al., Mol Endocrinol, 2011)

その活性を制御する分子があるものと予想した。これらを探査するために、FLAG-Smad1をHEK293T細胞に発現させ、結合分子を解析した。その結果、転写調節因子Zranb2がSmad1/5/8に結合することが明らかとなった(図5)。Zranb2は、BMP活性を抑制し、この活性はC端側のSRドメインに依存した。Zranb2は、Smadのリン酸化レベルや細胞内局在、標的DNA配列への結合能には変化を及ぼさなかった。

従って、Zranb2はSmadのコアクチベータ等を標的として、BMP活性を抑制している可能性が考えられる。

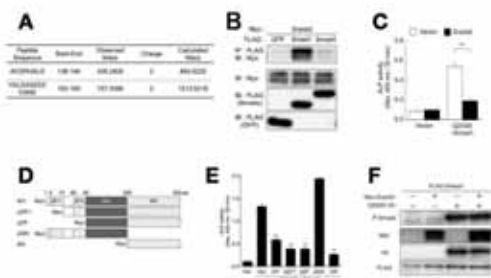


図5. 新規Smad抑制因子Zranb2の同定

(Ohta et al., J Cell Biochem, 2011)

筋組織や骨組織の形成に、BMPに加えてWntシグナルが関与する可能性が指摘されている。そこで、C2C12細胞を用いて、BMPとWntの相乗効果を検討した(図6)。古典的経路を活性化するWnt1やWnt3は、BMP-4で誘導されるALP活性をさらに上昇させた。一方、非古典的経路を活性化するWnt5aやWnt11は、BMP-4誘導性のALP活性を低下させた。Wnt3aによるBMP活性の促進作用は、beta-Catenninの過剰発現では再現できず、GSK3betaの特異的阻害剤(BIO)出再現された。

従って、古典的経路を活性化するWntは、GSK3beta活性の抑制を介して、BMPによる骨芽細胞分化誘導作用を相乗的に促進すると考えられた。

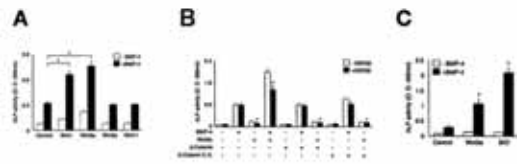


図6. WntシグナルによるBMP活性の促進

(Fukuda et al., Differentiation, 2010)

BMPは、標的細胞の膜上に存在するI型およびII型受容体に結合する。最近、新たな補助受容体としてDRAGONがBMP活性を促進することが報告された。そこで、DRAGONの作用を、C2C12細胞を用いて検討した。DRAGONのファミリーであるRGMaとRGMcを過剰発現させると、FOPの変異受容体で誘導したALP活性がわずかに上昇したが、DRAGONを共発現させるとALP活性は低下した(図7)。このDRAGONの作用は、細胞外で起こるもので、特に分子内のC端側に存在するvWFドメインが重要であることが判明した。

DRAGONは、BMPの鉄代謝の制御に関わる分子として同定されたが、BMPの骨芽細胞分化誘導活性はむしろ抑制することが判明した。この活性の逆転は、標的細胞により、膜上に発現する分子が異なるためである可能性が考えられた。

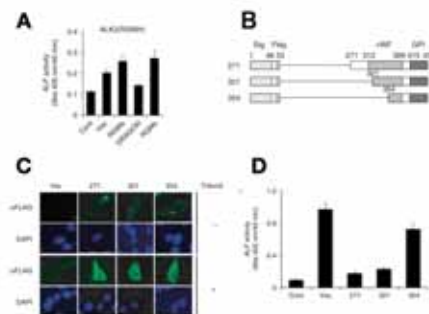


図7. BMP補助受容体DRAGONによる抑制効果

(Yanomata et al., Genes Cells, 2008)

一連の研究から、BMPによる骨形成の亢進は、細胞内情報伝達系の中でSmad経路が重要であり、これを負に制御する転写因子Zranb2や、膜上のDRAGONなどが明らかとなった。FOPは、BMP受容体のアミノ酸置換により、このSmad依存的経路がBMP非依的に活性化された状態と考えられた。FOPでは、筋再生とともに骨化が誘導される。筋再生で活性化されるWntシグナルは、BMPによる骨芽細胞分化を、GSK3betaを介して症

状的に促進することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Katagiri T. (2012) Recent topics in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Oral Biosci*, in press. (査読有)
2. Ohte S, Kokabu S, Iemura S, Sasanuma H, Yoneyama K, Shin M, Suzuki S, Fukuda T, Nakamura Y, Jimi E, Natsume T, and Katagiri T. (2011) Identification and functional analysis of Zranb2 as a novel Smad-binding protein that suppresses BMP signaling. *J Cell Biochem* 113:808-814. (査読有)
3. Ohte S, Shin M, Sasanuma H, Yoneyama K, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Maruki Y, Matsuoka M, Nanba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Furuya H, Kamizono J, Kitoh H, Nakashima Y, Susami T, Haga N, Komori T and Katagiri T. (2011) A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H. *Biochem Biophys Res Commun* 407:213-218. (査読有)
4. Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Shin M, Yoneyama K, Murata E, Kanomata K, Nojima J, Ono Y, Yoda T, Fukuda T, and Katagiri T. (2011) Suppression of BMP-Smad axis-induced osteoblastic differentiation by small C-terminal domain phosphatase 1, a Smad phosphatase. *Mol Endocrinol* 25:474-481. (査読有)
5. Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Kanomata K, Yoneyama K, Kato H, Akita M, Oda H, and Katagiri T. (2010) Canonical Wnts and BMPs cooperatively induce osteoblastic differentiation through a GSK3 β -dependent but a β -catenin-independent mechanism. *Differentiation* 80:46-52. (査読有)
6. Nojima J, Kanomata K, Takada Y, Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Takada T, Tsukui T, Yamamoto TS, Sasanuma H, Yoneyama K, Ueno N, Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T, and Katagiri T. (2010) Dual roles of Smad proteins in the conversion from myoblasts to osteoblastic cells by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 285:15577-15586. (査読有)
7. Kokabu S, Nojima J, Kanomata K, Ohte S, Yoda T, Fukuda T and Katagiri T. (2010) Protein phosphatase magnesium-dependent 1A-mediated inhibition of BMP signaling is independent of Smad-dephosphorylation. *J Bone Miner Res* 25:653-660. (査読有)
8. Katagiri T. (2010) Heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein signaling: fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Oral Biosci* 52:33-41. (査読有)
9. Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, Nojima J, Nakamura A, Kamizono J, Noguchi Y, Iwakiri K, Kondo T, Kurose J, Endo K, Awakura T, Fukushi J, Nakashima Y, Chiyonobu T, Kawara A, Nishida Y, Wada I, Akita M, Komori T, Nakayama K, Nanba A, Maruki Y, Yoda T, Tomoda H, Yu PB, Shore EM, Kaplan FS, Miyazono K, Matsuoka M, Ikebuchi K, Ohtake A, Oda H, Jimi E, Owan I, Okazaki Y, and Katagiri T. (2009) Constitutively activated ALK-2 and increased Smad1/5 cooperatively induce BMP signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem* 284: 7149-7156. (査読有)
10. Shen Q, Little SC, Xu M, Haupt J, Ast C, Katagiri T, Mundlos S, Seemann P, Kaplan FS, Mullins MC and Shore EM. (2009) The fibrodysplasia ossificans progressiva R206H ACVR1 mutation activates BMP-independent chondrogenesis and zebrafish embryo ventralization. *J Clin Invest* 119: 3462-3472. (査読有)
11. Kanomata K, Kokabu S, Nojima J, Fukuda T and Katagiri T. (2009) DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. *Genes Cells* 14:695-702. (査読有)

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 片桐岳信, 筋肉が骨になるメカニズム, 第 9 回 RCGM フロンティアシンポジウム, 2011 年 11 月 3 日, 埼玉県日高市
2. 片桐岳信, 他, Smad の新規転写抑制因子 Zranb2 の同定と機能解析, 第 53 回 歯科基礎医学会学術大会演, 2011 年 10 月 1 日, 岐阜県岐阜市
3. Katagiri T, et al., BMP signaling inhibits myogenesis and induces osteoblastic differentiation in satellite cells during muscle regeneration, ASBMR 2011 Annual Meeting, 2011 年 9 月 16-20 日, San Diego, California, U. S. A.
4. Ohte S, et al., BMP type II receptors further stimulate constitutively activated mutant ALK2 found in fibrodysplasia ossificans progressiva, ASBMR 2011 Annual Meeting, 2011 年 9 月 16-20 日, San Diego, California, U. S. A.
5. Katagiri T, et al., Molecular mechanisms of heterotopic bone formation in skeletal muscle induced by BMP signaling, Gordon Research Conference on Myogenesis, 2011 年 8 月 24 日 -9 月 2 日, Waterville Valley, New Hampshire, U. S. A.
6. 大手聡, 他, 新規 Smad 結合分子 Zranb2 は BMP シグナル抑制因子である, 第 18 回 BMP 研究会, 2011 年 7 月 31 日, 大阪府大阪市
7. 片桐岳信, 筋が骨化する難病 進行性骨化性線維異形成症, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 29 日, 大阪府大阪市
8. 大手聡, 他, 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) で同定された ALK2 は II 型 BMP 受容体によってさらに活性化される, 第 29 回日本骨代謝学会学術集会, 2011 年 7 月 28-30 日, 大阪府大阪市
9. Katagiri T, Characterization of mutant forms of ALK2 found in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva, Gordon Research Conference on Myogenesis, 2011 年 6 月 19-24 日, Les Diablerets, Switzerland
10. Katagiri T, Heterotopic bone formation and muscle regeneration, 32nd Annual Meeting of Japanese Society of Inflammation and Regeneration, 2011 年 6 月 3 日, 京都府京都市
11. 片桐岳信, 骨形成を促す BMP 細胞内情報伝達系とその制御機構の解明, 第 8 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム, 2010 年 11 月 3 日, 埼玉県
12. Ohte S., et al., Identification of Zranb2, a novel R-Smads binding protein, as a suppressor of BMP signaling, ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) 2010 annual meeting, 2010 年 10 月 15-19 日, カナダ、トロント
13. 片桐岳信, Smad ホスファターゼによる BMP 誘導性骨芽細胞分化の抑制機序, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会, 2010 年 9 月 22 日, 東京都
14. Katagiri T, et al., PPM1A and SCP1, Smad phosphatases, inhibit BMP-induced osteoblastic differentiation by different molecular mechanisms., 8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, 2010 年 9 月 15 日-9 月 18 日, ベルギー、ルーベン
15. Ohte S., et al., Identification and characterization of a nuclear protein as a co-suppressor of BMP-regulated Smads, 8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, 2010 年 9 月 15 日-9 月 18 日, ベルギー、ルーベン
16. Katagiri T, Potentiation of bone morphogenetic protein activity in the extracellular environment, Gordon Research Conference on Signal Transduction by Tissue Engineered Extracellular Matrices, 2010 年 6 月 27 日-7 月 2 日, 米国メイン州
17. 片桐岳信, 筋組織における異所性骨化の機序解明と治療への応用, 第 7 回 RCGM フロンティアシンポジウム, 2009 年 11 月 3 日, 埼玉県
18. 片桐岳信, BMP の Smad 依存的シグナルによる筋芽細胞分化の抑制機構, 第 64 回日本体力医学会大会, 2009 年 9 月 19 日, 新潟
19. 片桐岳信, Smad1 のリン酸化・脱リン酸化による骨芽細胞分化誘導の制御, 第 51 回歯科基礎医学会学術集会・総会, 2009 年 9 月 10 日, 新潟
20. Katagiri T, Roles of Smad pathways in the conversion of myoblasts to osteoblastic cells by BMPs., Gordon Research Conference on Bones & Teeth, 2009 年 7 月 15 日, 米国メイン州

〔産業財産権〕
出願状況（計1件）

名称：骨分化阻害剤およびその製造方法
発明者：供田洋、他
権利者：学校法人北里研究所、埼玉医科大学
種類：特願 2010-255134
番号：特願 2010-255134
出願年月日：2010年11月15日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div04_PPhysiol/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

福田 亨 (FUKUDA TORU)
慶應大学・医学部・助教
研究者番号：20301492
(H21のみ)

大手 聡 (OHE SATOSHI)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：00547979
笹沼 寛樹 (SASANUMA HIROKI)
埼玉医科大学・医学部・研究員
研究者番号：30571707
米山 克美 (YONEYAMA KATSUMI)
埼玉医科大学・医学部・助手
研究者番号：20571574
進 正史 (SHIN MASASHI)
埼玉医科大学・医学部・研究員
研究者番号：70549261
自見 英治郎 (JIMI EIJIRO)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：40276598

(3) 連携研究者

穰田 真澄 (AKITA MASUMI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：60105905