

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592176

研究課題名(和文) ヒト骨化性筋炎は、幹細胞病か? : 変異ALK2遺伝子による筋幹細胞の骨分化誘導

研究課題名(英文) Fibrodysplasia Ossificans Progressiva as a Candidate for Muscle Stem Cell Disease

研究代表者

橋本 有弘 (Hashimoto, Naohiro)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・研究所再生再建医学研究部・部長

研究者番号：00208456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：進行性骨化性繊維異形成症(FOP)は、骨形成因子BMPの受容体ALK2の遺伝子変異が原因となって、骨格筋が骨組織に置き換わってしまうという特異な優性遺伝病である。FOP型変異ALK2をマウス筋前駆細胞Ric10に発現させて、骨分化の誘導機序を検討した。FOP型変異ALK2を発現させても、Ric10は骨分化しなかった。しかし、さらに炎症性サイトカインIL6で刺激すると、下流因子STAT3の活性化を介してFOP型変異ALK2による微弱なSmadシグナルが増幅され、異所性の骨分化が誘導された。FOP型変異ALK2とIL6の協調作用によって筋前駆細胞に骨分化が誘導されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a dominant inherited disease caused by a mutated receptor for bone morphogenetic proteins ALK2/ACVR1 bearing a single amino acid substitution of Arg to His at codon 206 (R206H). We found that ALK2(R206H) is a constitutively leaky but not a functionally active receptor because it stimulated Smad pathway very slightly without ligand binding, and could not induce osteogenesis in mouse myogenic progenitor cells. An inflammatory cytokine IL-6 triggered osteogenesis in myogenic cells expressing ALK2(R206H). The present results suggest that ALK2(R206H)-expressing myogenic progenitor cells act as osteoprogenitor cells when they are stimulated with IL-6 and provide a new mechanistic insight in inflammatory stimulus-triggered heterotopic bone formation in FOP patients. FOP is a candidate for a disease caused by muscle stem cells that are misled down a heterotopic osteogenic differentiation pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：幹細胞 組織・細胞 再生医学 発生・分化 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

骨化性筋炎 (fibrodysplasia ossificance progressiva, FOP) は、BMP-I 型受容体 ALK2 の遺伝子変異が原因となって、骨格筋組織が異所性に骨化する遺伝性疾患である。申請者は、筋幹細胞が骨分化能を有する多能性幹細胞であることを明らかにした (Wada, Hashimoto et al., 2002)。さらに、独自に確立したヒト筋前駆細胞培養系を用いて、ヒト筋前駆細胞が骨形成細胞としての性質を有することを示し、「骨化性筋炎 FOP は、筋幹細胞の分化制御異常によって生じる幹細胞病である」という仮説を提唱した (Hashimoto et al., Mech Dev, 2008)。

FOP の原因となる、BMP-I 型受容体 ALK2 の遺伝子変異が明らかになり、我が国においても遺伝子診断が行われるようになった。しかし、ALK2 遺伝子は、様々な組織・細胞で広範に発現しており、「骨格筋組織でのみ異所的骨化が誘導される」ためには、骨格筋に特異的な要因の関与が考えられる。しかし、遺伝子変異から異所的骨化に到る発症機序には不明の点が多い。特に治療法開発のために重要な「FOP 型変異 ALK2 が筋組織に骨化を誘導する機構」および骨形成細胞の由来については、解明されていなかった。

2. 研究の目的

申請者は、筋幹細胞が骨分化能を有する多能性幹細胞であることを明らかにし、FOP における骨形成細胞の有力な候補であることを示した。本研究の目的は、「骨化性筋炎 FOP は、筋幹細胞の分化制御異常によって生じる幹細胞病である」という仮説を検証し、その発症メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) マウス前駆細胞 Ric10 の培養

8 週齢の雌 ICR マウスの腓腹筋から、筋サテライト細胞由来の筋前駆細胞を分離し、細

胞クローン Ric1 を樹立した (Wada, Hashimoto et al., 2002; Mukai et al., 2008)。細胞は、I 型コラーゲン・コート培養ディッシュに播き、気相を 10%炭酸ガスとし、37 で培養した。培地は、高グルコース含有ダルベッコ改変細胞培養液に 20%ウシ胎児血清および 2%ウルトロサーG(バイオセブラ社)を添加した培地 pmGM を用いた。

(2) 遺伝子発現実験

PCR 法によって、ヒト ALK2 遺伝子に FOP 型の変異を導入した。さらに変異 ALK2 遺伝子を発現ベクター-pcDNA3.1 に挿入し、ヒトサイトメガロウィルスのプロモーターによって発現させた。細胞への遺伝子導入は、脂質ベースの遺伝子導入試薬 FuGENE6 を用いて行った。ALK2 は、抗 ALK2 抗体を用いた蛍光抗体法によって検出した。

(3) アルカリ性フォスファターゼ活性の測定

Ric10 細胞にベータ・ガラクトシダーゼ発現ベクター-pMiwZII, を ALK2 発現プラスミドと同時に導入した。細胞を界面活性剤 NP40 を用いて溶解させ、アルカリ性フォスファターゼ活性に関してはパラニトロフェニル・フォスフェートを、ベータ・ガラクトシダーゼに関してはニトロフェニル-ガラクトピラノシドを基質として、反応させ、吸光度を測定した。ベータ・ガラクトシダーゼ活性を遺伝子導入効率の指標として、ALK2 によって誘導されるアルカリ性フォスファターゼ活性を算出した。

(4) レポーターアッセイ

骨形成因子応答配列 (BRE) の下流にホタルのルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーター・プラスミドを、Ric10 細胞に導入し、デュアルルシフェラーゼ法によって、ALK2 の下流における遺伝子発現活性を測定した。

4. 研究成果

(1) FOP 型変異 ALK2 の機能変化の解明

FOP 型変異 ALK2 をマウス筋前駆細胞 Ric10 に発現させたところ、骨分化マーカーであるアルカリ性フォスファターゼ (ALP) は検出されたが、きわめて低レベルにとどまった。

FOP 型変異 ALK2 をマウス筋前駆細胞 Ric10 に発現させ、種々の濃度の BMP2 で刺激し、ALP 活性を比較した。野生型 ALK2 と FOP 型変異 ALK2 との間に、BMP2 感受性に関する差はないことが明らかになった。

BMP 応答配列 (BRE) を用いたレポーターアッセイの結果、FOP 型変異 ALK2 による Smad 経路の活性化は、BMP2 刺激を与えた場合の 20% 以下にとどまった。

以上の結果は、FOP 型変異 ALK2 は、「活性化型変異体ではない」ことを示しており、FOP の発症機序は、遺伝子変異だけでは説明できないと考えられる。

(2) 炎症性サイトカインによる FOP 型変異 ALK2 の作用増強

FOP 型変異 ALK2 を Ric10 細胞に発現させ、炎症性サイトカイン IL6、IL1、TNF で刺激した。IL6 で刺激した場合のみ、BMP 刺激なしでも ALP 発現レベルは著しく増大した。

BMP 応答配列 (BRE) を用いたレポーターアッセイの結果、FOP 型変異 ALK2 発現 Ric10 細胞に IL6 刺激を加えると、FOP 型変異 ALK2 の下流に位置する Smad 経路が活性化されることが明らかになった。

以上の結果から、ALK2 遺伝子変異に IL6 刺激が加わることによって、骨分化が誘導されることが示された。

(3) 炎症性サイトカインと BMP シグナル経路のクロストーク・ポイント

IL6 の作用が、FOP 型変異 ALK2 に依存する

か否かを検討するため、IL6 を様々な濃度の BMP とともにマウス筋前駆細胞 Ric10 に作用させた。閾値以下の BMP2 (10 ng/ml) 単独で刺激すると、骨分化マーカーであるアルカリ性フォスファターゼ (ALP) は、ほとんど誘導されなかった。しかし、BMP2 (10 ng/ml) と IL6 で刺激すると、ALP の発現は顕著に増大した。より低濃度 (5 ng/ml 以下) あるいは高濃度 (100 ng/ml 以上) の BMP2 では、IL6 による増幅は認められなかった。この結果は、IL6 は、BMP-ALK2-Smad 経路を直接活性化しないものの、微弱な Smad シグナルを増幅することを示している。

定量的解析を進めるために、従来の活性染色法および ALP 酵素活性比色定量法に替わる、ALP 活性の高感度検出系を開発した。ALP の蛍光基質 ELF97 と DNA 蛍光染色薬 SytoxGreen を用いて、細胞当たりの ALP 活性 (相対値) を高感度かつ再現性良く定量できる条件を確立した。

IL6 の下流で活性化される転写因子 STAT3 の阻害剤 Nifuroxiamide および 5,15-DPP の「IL6 依存的骨分化誘導」への影響を検討した。Nifuroxiamide は、「IL6 依存的骨分化誘導」に対して抑制作用を示したが、同時に、単独で Ric10 の細胞増殖を抑制し、筋分化をも阻害した。STAT3 以外の標的に対する副作用の可能性が考えられる。5,15-DPP は、細胞増殖および筋分化に影響を与えなかったが、「IL6 依存的骨分化誘導」を抑制した。

(4) マウス筋前駆細胞における FOP 型変異 ALK2 の恒常的発現誘導の試み

FOP 変異型 ALK2 遺伝子を発現する筋前駆細胞が、筋組織内 (in vivo) で IL6 依存的に骨分化するか否かを検証するため、筋前駆細胞 Ric10 に、FOP 変異型 ALK2 遺伝子発現プラスミドを導入し、恒常的発現細胞株を分離した。しかし、分離できた細胞における ALK2 の発現は著しく低かった。ALK2 の過剰発現は、マ

ウス筋前駆細胞の機能を阻害する可能性が示された。

(5)研究成果の位置づけと今後の展望

BMP-1 型受容体 ALK2 の遺伝子変異が、FOP の原因であることは、広範な遺伝子調査から確定的である。しかし、ALK2 遺伝子は、様々な組織・細胞で広範に発現しており、「骨格筋組織でのみ異所的な骨化が誘導される」機構は、未だ解明されていない。FOP に対する治療法開発のためには、「FOP 型変異 ALK2 が筋組織に骨化を誘導する機構」を明らかにすることが喫緊の課題である。

本研究の結果、IL6 は、マウス筋前駆細胞に作用すると、FOP 型変異 ALK2 による微弱な Smad シグナルを増幅し、異所性の骨分化を誘導することが示された。この成果は、FOP における異所性の骨分化に、骨格筋幹細胞が関与する可能性を示唆している。一方、マウス骨格筋に大過剰量の BMP2 を投与すると、異所性の骨形成が誘導される。この骨形成には、血管内皮系譜の細胞が寄与していると報告されている。FOP 型変異 ALK2 を原因とする骨形成と大過剰量の BMP 投与によって誘導される骨形成の発症機序に違いがあるのか否か、は今後の重要な課題である。

我々は、ヒトとマウスの筋前駆細胞を比較検討し、ALK2/Smad シグナル系の応答性が、大きく異なっていることを見いだしている。ヒト筋細胞固有の性質を明らかにすることは、FOP の発症機構を解明するうえで、きわめて重要な課題である。我々が樹立した不死化ヒト筋前駆細胞は、重要なブレークスルーをもたらす鍵となりうる解析系である。ヒト筋細胞に固有な性質の解明は、未だ不明の点が多い、FOP 発症機序解明の端緒となることが期待される。

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 5 件)

Shiomi, K., Y. Nagata, T. Kiyono, A. Harada and N. Hashimoto

“Differential Impact of the Bisphosphonate Alendronate on Undifferentiated and Terminally Differentiated Human Myogenic Cells.” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 61:418-427.2014. 査読あり

Mukai, A. and N.Hashimoto

Regulation of Pre-Fusion Events: Recruitment of M-cadherin to Microrrafts Organized at Fusion-competent Sites of Myogenic Cells. ” *BMC Cell Biol* 14(1): 37. 2013. DOI 10.1186/1471-2121-14-3. 査読あり

橋本有弘

骨格筋サテライト細胞研究の背景
生体の科学,Vol.64 No.2, 98-104, 2013.
査読なし

橋本有弘

筋サテライト細胞の多分化能
生体の科学,Vol.64 No.2, 105-110, 2013.
査読なし

Shiomi, K., Kiyono, T., Okamura, K., Uezumi, M., Goto, Y., Yasumoto, S., Shimizu, S. and Hashimoto, N

Cdk4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential *Gene Therapy*, 18:857-866. 2011. 査読あり

[学会発表](計 10 件)

Naohiro Hashimoto

Glucocorticoid is essential to proliferation of human myogenic cells
Gordon Research Conference

July 7-12, 2013, the Il Ciocco, Lucca, Italy.

Naohiro Hashimoto and Kosuke Shiomi

Glucocorticoids repress

Rb-dependent/stress-induced cell cycle arrest of human myogenic cells: a possible mechanism of glucocorticoid therapy for Duchenne muscular dystrophy

Frontiers in Myogenesis

Meeting: Development, Function and Repair of the Muscle Cell, Society of Muscle Biology . New York University June 5, 2012.

Naohiro Hashimoto

Recruitment of M-cadherin/p120 Catenin Complex to Lipid Raft is Critical for Establishing Fusion Competence of Myogenic Cells

the FASEB Science Research Conference on *Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells* August 16, 2012 at the Il Ciocco, Lucca, Italy.

橋本有弘

骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）の性質解明

第 29 回筋肉の、2012 年 9 月 13 日、岐阜

橋本有弘

骨格筋幹細胞を標的とした再生医療
整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム
「筋損傷を科学する」

2012 年 10 月 27 日、名古屋

橋本有弘

Cell Biological Study on Human Myogenic Stem Cell and Progenitor Cell
第 35 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「骨格筋幹細胞研究の最前線

(Frontiers of muscle stem cell research)」
2012 年 12 月 11 日、福岡

Kosuke Shiomi and Naohiro Hashimoto

Immortalization of Human Myogenic Cells from Healthy and Diseased Muscles Without Compromising Differentiation Potential
Cold Spring Harbor Asia and ISSCR Conference: Cellular Programs and Reprogramming

Shuzo, China, October 24-28, 2011.

Naohiro Hashimoto, Yuki Nagata, and Kosuke Shiomi

Immortalized Human Myogenic Cells Derived From Muscle Satellite Cells: New Cell Models Of Neuromuscular Diseases
BIT Life Sciences ' 4th Annual Congress of Regenerative Medicine and Stem Cell
Beijing, China, November 11-13, 2011

橋本有弘、塩見浩介、永田有希、向敦史、上住円、岡村菊夫

自己筋幹細胞を用いた高齢者の尿失禁に対する再生治療の開発

第 99 回日本泌尿器科学会総会シンポジウム
2011 年 4 月 25 日、名古屋

橋本有弘

転倒防止研究会 第 8 回研究集会
サルコペニア発症における筋再生システムの役割解明をめざして
2011 年 10 月 2 日、東京

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ncgg.go.jp/research/lab07.html>

6 . 研究組織
(1)研究代表者
橋本 有弘 (HASHIMOTO, Naohiro)
独立行政法人国立長寿医療研究センター・研究所・部長
研究者番号 : 00208456

