

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861339

研究課題名(和文)骨系統疾患由来の変異型受容体の解析に基づく骨代謝機序の解明

研究課題名(英文)Analysis of bone metabolism based on mutant ALK2 receptor associated with FOP.

## 研究代表者

宮本 阿礼 (Miyamoto, Arei)

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70634591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：進行性骨化線維異形成症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva;FOP)は全身の骨格筋で内軟骨性骨化によって異所性骨が形成される難治疾患である。この疾患はBMPのI型受容体である変異ALK2(R206H)の過剰なBMPシグナルの活性化により異所性骨化が誘導されると考えられている。そこで、我々は誘導性にヒトALK2(R206H)を発現するTgマウスを樹立し、このマウスの骨格筋組織から単核細胞を分離しin vitroで解析を行った。本研究により、我々はin vitroで骨格筋組織由来細胞を使用した新しい実験系を樹立する事に成功した新しい実験系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a rare hereditary disease, which is characterized by postnatal progressive heterotopic ossification in skeletal muscle through endochondral ossification. ALK2(R206H), a gain-of-function mutant of BMP type I receptor ALK2, have been found in patients with FOP, activates downstream signaling and induces heterotopic ossification. We have generated transgenic mice, in which ALK2(R206H) is expressed under the control of Cre/LoxP system. In the present study, we established a new model of chondrogenesis in vitro using the skeletal muscle cells prepared from ALK2(R206H) Tg mice. In conclusion, we established a new model of chondrogenesis using skeletal muscle cells. This in vitro model may be a useful tool to clarify the pathological mechanism of FOP and to develop a new treatment for FOP.

研究分野：骨疾患

キーワード：骨系統疾患 FOP BMP ALK2

### 1. 研究開始当初の背景

FOPはBMP受容体の1つであるALK2の活性化変異により異所性骨化が誘導される遺伝性疾患である。我々は、*in vitro*の解析からFOPで見出されたALK2(R206H)変異体がII型BMP受容体の1つであるBMPR-IIによってさらに活性化されることを見出した。この結果は、BMPR-IIの存在がALK2のBMPシグナルを介した異所性骨形成に促進的な役割を果たしている可能性を示唆する。そこで、本研究ではFOP及び骨形成におけるBMPR-IIとALK2の機能を生体、細胞、分子レベルで解析することを目的とした。

### 2. 研究の目的

我々は遺伝子疾患であるFOPの発生機序の解明のために、その遺伝子異常によるALK2(R206H)変異体の活性化機構を中心とし研究を行っている。現在までに、我々はCre-LoxPシステムでALK2(R206H)を誘導するTgマウスを使用した実験を*in vitro*、*in vivo*で行っているがそこで異所性骨形成を起こすような明確な結果は得られていない。これは骨格筋に存在する細胞や組織でのALK2(R206H)の発現のみが異所性骨を誘導する原因ではないことを示唆するものである。よって、遺伝子異常により実際のFOP患者では複数の要因でもって異所整骨が融合されていると考えられ、その原因の解明とそれに立脚した骨疾患治療方法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

申請課題の研究代表者である宮本が所属する埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター・病態生理部門は長年にわたりBMPによる骨代謝研究及びFOP研究を世界的にリードしてきた実績をもち、これらの研究に関する多くのノウハウや実験材料を有する。そこで、本研究では同部門のメンバーの協力をあおぎながら、可能な限り短時間で研究目標の達成を目指す。

#### 1. 筋再生時におけるALK2およびBMPR-II発

#### 現細胞の同定

変異ALK2がBMPR-IIによって活性化をうけることから、生体において筋再生時にこの2つの受容体を発現する細胞がFOPにおける異所性骨化の前駆細胞である可能性が考えられる。そこで、筋再生時におけるALK2およびBMPR-II発現細胞の同定を試みる。筋再生モデルとしては、一般的に用いられているヘビ毒の筋注モデルを用い、FACSおよび免疫組織学的解析によって2つの受容体を発現する細胞を同定する。

#### 2. ALK2(R206H)Tgマウスの解析

異所性骨形成におけるALK2の機能を解析するため、ALK2(R206H)トランスジェニック(Tg)マウスの解析を行う。BMPシグナルは発生で重要な役割を果たすことからALK2(R206H)の過剰発現マウスは胎生致死に至る可能性が高いため、Cre-LoxPシステムでALK2(R206H)の発現を誘導するTgマウスを用いる。ALK2(R206H)Tgマウスはすでに申請者の所属する研究室で作製された(未発表)。マウス筋組織内にアデノウイルスベクターを用いてCre酵素を局所的に発現させてTgの発現を誘導し、ALK2(R206H)の発現とBMPシグナルの変化をウエスタンブロットおよびFACSで確認する。ALK2(R206H)の発現に伴う異所性骨形成を、ソフトX撮影、マイクロCT撮影、組織切片の免疫染色法にて解析する。また、四肢間葉系細胞特異的Prx1-Creマウスを導入し、これらと交配させることで四肢の骨格形成におけるALK2(R206H)の影響を検討する。

#### 3. BMPR-II Tgマウスの作製

生理的骨形成および異所性骨におけるBMPR-IIの機能を解析するため、BMPR-II Tgマウスを作製する。上記ALK2(R206H)Tgマウスと同様に、BMPR-II過剰発現マウスは胎生致死に至る可能性が高いため、Cre-LoxPシステムを用いたTgマウスの作製を試みる。Tgマウス作製のためのベクターは申請者が構築

し、その後の Tg マウス作製は高い専門技術を持つ外部専門業者に委託する。

#### 4. In vivo 遺伝子導入による BMPR- の機能解析

In vivo 遺伝子導入による BMPR- および ALK2 の機能解析を行う。In vivo 遺伝子導入は In vivo エレクトロポレーターを用いたプラスミドベクターの導入とアデノウイルスベクターを併用して進める。マウス筋組織に BMPR- , ALK2 の発現ベクター又はそれぞれの shRNA 発現ベクターを導入し、異所性骨形成や筋再生における2つの受容体の機能を解析する。BMPR- , ALK2 発現プラスミドベクター、ALK2 発現アデノウイルスベクターは既に所属研究室で作製した。

#### 5. ALK2 リン酸化阻害剤探索系の構築

BMPR- II による ALK2 のリン酸化を阻害する化合物は FOP の予防・治療薬になると考えられる。そこで、ハイスループットに適應可能な non-RI の評価系を構築する。BMPR- II と ALK2 を安定発現させた HEK293 細胞を樹立し、それぞれの膜画分を酵素および基質とした評価系を構築する。活性の検出には Promega 社 Kinase-Glo Luminescent Kinase Assay system を導入する。

#### 6. 筋再生時における ALK2 および BMPR- II 発現細胞の解析

初年度に同定した ALK2, BMPR- II 発現細胞の解析を行う。FACS または MACS によって目的細胞を単離し、in vitro における骨・軟骨および脂肪細胞分化能の評価を行う。また、免疫不全マウスに目的細胞を移植することで異所性骨形成の有無を確認する。

#### 7. BMPR- II Tg マウスの解析

初年度の ALK2(R206H) Tg マウスと同様の方法で、BMPR- II Tg マウスにおける生理的および異所性骨形成を評価する。

#### 8. 異所性骨化モデルマウスの作製、解析

ALK2(R206H) と BMPR- II Tg マウスで異所性骨化が誘導されない場合、ALK2(R206H), BMPR- II のダブルトランスジェニックマウスを作製し異所性骨化の形成を検討する。また、初年度に作製する ALK2(R206H), BMPR- II 発現ベクターを用い、in vivo 遺伝子導入の共発現系で異所性骨化の誘導を試みる。

#### 9. ALK2 リン酸化阻害剤の探索

初年度に構築した評価系を用いて ALK2 リン酸化阻害剤のスクリーニングを行う。Cell free の評価系と細胞を用いた評価系で迅速に化合物を選択し、2次評価系として上記3で作製した異所性骨化モデルマウスを用いてさらに有効な化合物を選択する。

上記に記した解析により、生理的および異所性骨形成における BMPR- , ALK2 の機能解析を行う。申請者は所属機関で実施する筋組織内の幹細胞に関するテーマの連帯研究者としても研究を行う。これらの研究目標はそれぞれ異なるが、両者はともに筋組織内異所性骨化に関する研究で、それぞれの研究成果や研究体制が相乗的な効果を生むことが期待される。

#### 4. 研究成果

(1) ALK2(R206H) Tg マウスの筋組織内にアデノウイルスベクターを用いて Cre 酵素を局所的に発現させて Tg の発現を誘導し、ALK2(R206H) の発現を誘導し、異所性骨形成を、ソフト X 撮影、マイクロ CT 撮影、組織切片の免疫染色法にて解析したが、異所性骨化は認められなかった。

そこで、実際にこのマウスが ALK2(R206H) を発現しているのかを細胞レベルで検討し、その細胞で異所性骨の誘導が可能であるかを

検討した。

Tg マウスの肢骨格筋をコラゲナーゼで消化し、単核細胞を調整した。細胞に DNA 組換え酵素 Cre を発現するアデノウイルス( Ad-Cre ) とコントロール( Ad-DR ) を感染させると、

Ad-Cre では FOP 変異を有するヒト ALK2 の発現が誘導さ

れた。同時

に、BMP を添

加しなくても転写因子

Smad1/ 5 の

リン酸化が

誘導され、

BMP 初期応

答因子の

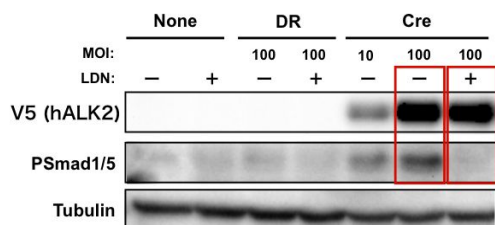
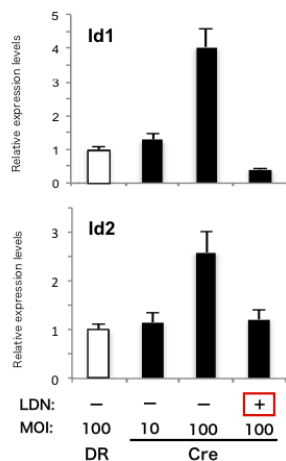
Id1 や Id2

遺伝子の発

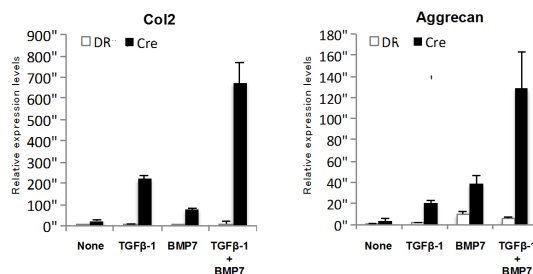
現上昇が認められた。これらの遺伝子発現や

Smad1/5 のリン酸化は、ALK2 の阻害剤

LDN-193189 で抑制された。



次に、FOP における異所性骨化は軟骨を経て形成される内軟骨性骨化といわれていることから、この細胞で軟骨分化誘導を行った。その結果、Ad-Cre を感染させた細胞群は、BMP と TGF- $\beta$  刺激で型コラーゲン、アグリカンの軟骨分化マーカー遺伝子の発現上昇を認め、アルシアンブルー染色陽性の軟骨組織が認められた。一方、コントロールのアデノウイルスを感染させた細胞では、軟骨分化が誘導されなかった。



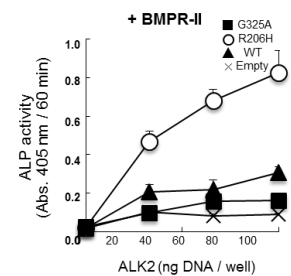
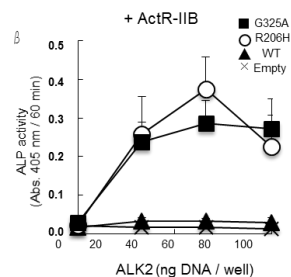
我々は、骨格筋組織由来細胞を使用し、in vitro で FOP 変異を有した ALK2 による軟骨細胞分化が解析できる新しい実験系を樹立した。この in vitro のモデルは、FOP の発症機序の解析や治療方法の開発への応用が期待できる。

(2) ALK2 の野生型、変異体 ALK2(R206H) および遅発性 FOP の変異体 ALK2(G325A) の発現ベクターを作製し、それぞれを筋芽細胞 C2C12 に発現させ解析を行った。それぞれの細胞に II 型受容体の一つである ActR-11B を共発現させたところいずれの変異体でも ALP 活性が上昇し BMP シグナルの活性化が確認された。

それに対し、II 型受容体の一つである BMPR2 では R206H では BMP シグナルの活性化が確認されたが、G325A

では活性化しなかった。これにより ALK2 の変異部位により活性を受ける II 型受容体病態が異なることが明確となった。

これらの違いが病態の進行度、発症時期に関与することが示唆された。さらに我々は、変異型 ALK2 の II 型受容体による活性化メカニズムを解明するため変異型 ALK2 がリン酸化を受けやすい部位の同定を行った。その結果、変異型 ALK2 の GS ドメインの 203 番目のスレオニンのリン酸化がいずれの変異体 ALK2 においても II 型受



容体による活性化に重要だということが明らかとなった。この結果は今後 FOP のみならず他の骨系統疾患研究の進展と新規治療方法の開発に貢献するものと考えられる。

#### 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 4 件)

Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Suda N, Katagiri T.

" Mutant activin-like kinase 2 in fibrodysplasia ossificans progressiva are activated via T203 by BMP type II receptors. "

Mol Endocrinol. 2015 Jan;29(1):140-52

Katagiri T, Osawa K, Tsukamoto S, Fujimoto M, Miyamoto A and Mizuta T  
" Bone morphogenetic protein-induced heterotopic bone formation: What have we learned from the history of a half century? "

J Dent Sci Rev. 2015 May 52(2) 42-50

Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Machiya A, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T.

" Smad9 is a new type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. "

Sci Rep. 2014 Dec 23;4:7596

Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Machiya A, Okuda A, Suda N, Katagiri T.

" Establishment of a novel model of chondrogenesis using murine embryonic stem cells carrying fibrodysplasia ossificans progressiva-associated mutant ALK2. "

Biochem Biophys Res Commun. 2014 Dec

12;455(3-4):347-52

[学会発表](計 4 件)

The 12<sup>th</sup> RCGM International Symposium of Academic Frontier, Miyamoto A, Osawa K, Tsukamoto S, Fujimoto M, Mizuta T, Ohte S, Katagiri T.

" Establishment of a new model of chondrogenesis using skeletal muscle cells. " 31<sup>th</sup> October 2014 - 1<sup>st</sup> November 2014, 30<sup>th</sup> Anniversary Hall, Hidaka Campus, Saitama Medical University (埼玉県日高市)

The 12<sup>th</sup> RCGM International Symposium of Academic Frontier, Osawa K, Tsukamoto S, Fujimoto M, Miyamoto A, Mizuta T, Ohte S, Katagiri T.

" Establishment of a new in vivo experimental model for heterotopic bone formation in skeletal muscle " 31<sup>th</sup> October 2014 - 1<sup>st</sup> November 2014, 30<sup>th</sup> Anniversary Hall, Hidaka Campus, Saitama Medical University (埼玉県日高市)

The 12<sup>th</sup> RCGM International Symposium of Academic Frontier, Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Mizuta K, Tsukamoto S, Miyamoto A, Okuda A, Suda N, Katagiri T.

" Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells carrying an active form of ALK2 " 31<sup>th</sup> October 2014 - 1<sup>st</sup> November 2014, 30<sup>th</sup> Anniversary Hall, Hidaka Campus, Saitama Medical University (埼玉県日高市)

第 56 回歯科基礎医学会学術大会

『Tet-off システムを用いた BMP 受容体 ALK2 発現 ES 細胞の樹立と機能解析』、藤本舞、大澤賢次、宮本阿礼、古株彰一郎、須田直人、片桐岳信、2014 年 9 月 25-2014 年 9 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

埼玉医科大学 病態生理部門

[http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div04\\_PPhysiol/index.html](http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div04_PPhysiol/index.html)

進行性骨化性繊維異形成症(FOP)に関する調査研究班

<http://fop.umin.jp/>

埼玉医科大学 FOP 診療・研究プロジェクト

[http://www.saitama-med.ac.jp/medlinks/saitama\\_univ\\_fop/](http://www.saitama-med.ac.jp/medlinks/saitama_univ_fop/)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

宮本 阿礼 (MIYAMOTO, Arei)

埼玉医科大学 医学部 研究員

研究者番号：70634591

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：