

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461541

研究課題名(和文) 骨形成不全症の分子生物学的病態解明とWntシグナル経路を介する新しい分子標的治療

研究課題名(英文) The elucidation of the molecular biologic pathology in the Osteogenesis imperfecta and new molecular target treatment by the Wnt signal pathway.

研究代表者

菅野 潤子 (Kanno, Junko)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：30509386

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)：本研究の目的は、骨形成不全症(OI)の分子学的背景の全容解明と新しい分子標的治療法の確立である。日本人OI患者の80%にCOL1A1遺伝子、COL1A2遺伝子変異を同定し、遺伝学的背景と表現型の検討を行った(Junko Kanno: Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2017 印刷中)。引き続き、COL1A1遺伝子、COL1A2遺伝子に変異を見いだされなかった患者を対象としてエクソーム解析を行った。エクソーム解析で1名の患者に本邦初のPPIB変異を同定した。患者の臨床像は過去の報告と同様であった。現在、機能解析の準備中である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is the whole aspect elucidation of the molecular background of osteogenesis imperfecta (OI) and the establishment of a new molecular target treatment. COL1A1 and COL1A2 mutations were detected in 79% of Japanese patients with OI in this study. (Junko Kanno: Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2017 in press). We performed exome analysis for the patients that mutation was not found continuously by COL1A1 gene, COL1A2 gene. We identified this country first PPIB variation in exome analysis to one patient. The clinical phenotype of the patient was similar to some previous reports. We are preparing for the functional analysis now.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：骨形成不全症 COL1A1 COL1A2 PPIB

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨形成不全症 (Osteogenesis imperfecta;OI) は易骨折性と骨変形を特徴とする遺伝性骨粗鬆症で、全身の結合組織の型コラーゲン分子の形成あるいは修飾の異常による。重症例は致死性である。型コラーゲンは、1鎖と2鎖によるらせん構造をとり、1鎖、2鎖はCOL1A1、COL1A2にコードされる。OIの原因はCOL1A1とCOL1A2変異によるコラーゲン形成の異常によるものが最多であるが、近年、コラーゲンの修飾の異常として1鎖のプロリンの水酸化に關与する複合体を構成するCRTAP、LEPRE1、PP1Bの変異が報告された。以降、シャペロン形成に關わるSERPINH1、FKBP10、骨芽細胞分化に關わるSP7、骨の鈣化に關わるSERPINF1、C-propeptide開裂に關わるBMP1、骨の成熟に關わるIFITM5、カチオンチャンネルに關わるTMEM38Bなど新規の責任遺伝子が次々と同定されている。

(2) 欧米では、OI患者のCOL1A1とCOL1A2の解析で約90%で変異陽性と報告されているが (Marlowe 2002)、日本での大規模な報告はDHPLC法によるCOL1A1、COL1A2解析のみで (Kataoka 2007)、変異検出率は41%と低く、DHPLC法で検出されない変異や他の遺伝子が原因である事が示唆される。多数の原因遺伝子があり、従来法のsanger法のみでは解析労力が多大であり、分子学的背景の全容解明には、次世代シーケンス法などを用いた網羅的な解析が必要とされる。

(3) 2013年、早期発症で重度の骨変形その他、知的障害や神経症状も呈するOIの原因遺伝子として新たにWNT1が同定された (Christine M 2013)。Wnt1は、Frizzled (Fzd) を受容体、LRP5/6を共受容体とする-catenin依存性のリガンドで、骨形成のシグナル伝達経路の主要分子の一つである。In vitroでは、異常型Wnt1タンパクによりWntシグナル伝達が障害されていることが示されている。またWnt1は骨髄での発現も示され、骨髄の造血幹細胞発育環境において正常な造血に必須の造血系細胞と骨芽系細胞間のクロストークにはWntシグナルが重要な役割を担っているとされる。OIでは、このクロストークに変化が生じているとされ、骨形成における造血細胞の役割を支持するものである。これらの機序より、Wntシグナル経路はOIの治療標的となりうる。

(4) 一方、OIの治療には破骨細胞のアポトーシスを誘導し、骨吸収を抑制して骨密度を増加させるビスホスホネート製剤がこれまで投与されてきたが、本剤はカップリング作用により骨形成も同時に抑制し、また、顎骨壊死などの副作用も報告されている。カップリングの影響を受けない新たな分子標的治療としてSema3Aや抗Sema4D抗体が期待される。Sema3AはSemaphorinファミリーに属する分子で、軸索伸長のガイ

ダンス因子であるが、近年、骨における重要な役割が同定されてきた。Sema3A欠損マウスでは骨芽細胞分化や骨形成が低下しており、Sema3AがWntシグナルを増強することが明らかになった。骨粗鬆症モデルマウスへのSema3Aの投与は破骨細胞の分化抑制と骨芽細胞の分化促進を伴った有意な骨量増加を認めた (Hayashi 2012)。また、Sema4Dは骨芽細胞の分化抑制能を有し、Sema4D欠損マウスは骨量が増加しており、骨粗鬆症マウスへの抗Sema4D抗体の投与では骨形成が有意に促進するとされる。さらに骨細胞に特異的に発現しているsclerostinはWntの受容体への結合を阻害する作用を有し、抗sclerostin抗体は他の臓器でのWnt/-cateninシグナルを促進することなく骨形成促進作用を発揮する (Ominsky 2010)。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨形成不全症 (Osteogenesis imperfecta, OI) の分子学的背景の全容解明と新しい分子標的治療法の確立である。近年、OIの原因遺伝子が次々と見出され、従来法による多数の遺伝子解析は困難であり、早期診断と分子学的背景の全容解明のためには、次世代シーケンス法などによる網羅的な解析が必要である。一方、最近新たに原因遺伝子として同定されたWNT1は骨形成のシグナル伝達経路の主要分子の一つで骨髄でも発現しており、OIでは骨髄造血系細胞と骨芽細胞間のクロストークに変化が生じているとされる。本研究ではWntシグナルがこのクロストークに重要な役割を担っている点に着目、Wnt経路のシグナルを増強する抗sema4D抗体やSema3A、Wnt受容体への結合を阻害するsclerostinに対する抗体を用いた新たな分子標的治療を確立する。

3. 研究の方法

(1) OI患者の遺伝子解析

対象患者の確保

平成21年科学研究費補助金 (基盤研究 (C)) 研究代表者、菅野潤子) 「日本人OI患者の遺伝的背景に關わる研究」に参加した東北大学病院小児科通院中のOIの患者とその家族20名の他、その後、に当院で加療を開始した患者に対し、本研究への協力を依頼し、同意を取得する。また、国内の他施設に通院中のOI患者には、各施設の主治医に研究の協力を依頼し、同意の取得、検体の送付を依頼する。計100名の日本人OI患者の解析を行う。小児内分泌学会、骨系統疾患コンソーシウム、小児代謝性骨疾患研究会な

どにおいて、研究への参加を依頼する。

01の遺伝子検査

a) 01患者の末梢血白血球からゲノムDNAを抽出、01の既知の責任遺伝子 (*COL1A1*, *COL1A2*, *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1*, *FKBP10*, *SP7*, *IFITM5*, *BMP1*, *TMEM38B*, *WNT1*) の変異解析を直接シーケンシング法および、次世代シーケンサーを用いて行う。エクソンキャプチャーは、Sure Select Human All Exon kit (Agilent)を用い、エクソンライブラリはIllumina HiSeq 2000でシーケンシングした。得られたシーケンシングデータはUCSC hg19を標準ゲノム配列としてBWAによってマッピングおよび変異リスト化する。変異リストをフィルタリングし、候補遺伝子を限定する。

b) 上記にていずれかの遺伝子に変異を認めた場合、キャピラリーシーケンシング法により、患者ゲノムDNAにおける遺伝子変異を確認する。

c) エクソーム解析において、既知の原因遺伝子の一方の変異のみ検出された患者、及び全く変異が検出されなかった患者に対しては、アレイCGH、MLPA法等を用いて欠失や重複などコピー数の異常の検出を行う。アレイCGHは、Affymetrix社のcytoScanHDアレイを用いてゲノムコピー数の解析を行う。アレイCGHで同定が困難なゲノムコピー数の異常の検出については、既知の遺伝子に対してのみ、MLPAを行う。MLPAは、各遺伝子において、各エクソンに対する上流プローブと下流プローブを設計し、ハイブリダイゼーション、ライゲーション、multiplex PCRの後に、自動蛍光シーケンサーによるPCR産物の定量を行い、ゲノムコピー数の異常を検出する。

機能解析: HEK293T細胞に野生型*WNT1*と変異*WNT1*を導入し、MC3T3-E1細胞との共培養システムによりWnt/ cateninシグナル伝達系及び骨芽細胞分化の差を検討。遺伝子解析で新規の変異が同定された場合は、以下の機能解析実験を行う。

A. 野生型及び変異*WNT1*導入HEK293細胞の作成 (例: *WNT1*変異が同定された場合)

a) ベクターpBI-CMV2 (Clontech) とQuikChange (Stratagene) を用いて、野生型及び変異*WNT1*をHEK293細胞に導入する (HEK293-WNT1^{WT}細胞及びHEK293-Wnt1^{Mut}細胞)。

b) 上記HEK293-Wnt1細胞を10cmシャーレに培養し、near-confluentとなった段階でTrizolにてRNAを抽出、RT-PCRにて野生型及び変異*WNT1*のmRNA発現を確認する (-actinを対照とする)。また抗Wnt1抗体 (Abcam) を用いて、Western blotにてWnt1蛋白発現も確認する (-actin対照)。

B. HEK293-Wnt1細胞と骨芽細胞様MC3T3-E1細胞 (E1細胞) との共培養システムの確立

a) 6穴プレートにE1細胞、インサートにHEK293-Wnt1細胞をそれぞれ播き、共培養を行う。培地には、骨芽細胞の分化を促すため500 μMアスコルビン酸と10mM glycerophosphateを添加する。このシステムにより、HEK293-Wnt1^{WT}細胞からは野生型Wnt1が、HEK293-Wnt1^{Mut}細胞からは変異Wnt1がそれぞれ分泌され、E1細胞に作用することが期待される。

b) 共培養開始後3日目に抽出キットを用いてE1細胞の核分画、細胞質分画それぞれを抽出し、Western blotにて -cateninの発現量を測定し、野生型群と変異群とで比較する (核分画はLaminB、細胞質分画は -actinをそれぞれ対照とする)。

c) 共培養開始後3日、7日、10日、14日、21日にそれぞれ培地及びE1細胞融解分画を採取、ELISAキットを用いてアルカリフォスファターゼ活性を測定する。

d) c)と同様、共培養開始後3日、7日、10日、14日、21日にそれぞれE1細胞からキットを用いてRNAを抽出し定量的RT-PCRを行う。また、Wnt/ -catenin系の下流産物である*Axin2*と*Lef1*、及び骨芽細胞の分化の指標となるオステオカルシンのmRNA発現を各々野生型群と変異群とで比較する。

e) 共培養開始後14日のウェルにアリザリンレッド染色を行い、E1細胞の石灰化を野生型群と変異群とで比較する。

HEK293-Wnt1細胞-E1細胞共培養システムにおける、sema3タンパク、抗Sema4D抗体及び抗sclerostin抗体の影響を検討。

上記Bに示した共培養システムに、sema3、抗Sema4D抗体、抗sclerostin抗体を、それぞれ濃度を変えて投与し、b) ~ e)と同様の実験を行う。

分子標的治療の検討: 上記共培養システムにsema3タンパク、抗Sema4D抗体、抗sclerostin抗体を投与し、治療効果としての骨芽細胞分化、細胞内シグナル伝達の変化を検討する。

4. 研究成果

直接シーケンス法にて、日本人 01 患者の COL1A1 遺伝子、COL1A2 遺伝子解析を行い、遺伝学的背景と表現型の検討を行った (Junko Kanno :Journal of Bone and Mineral Metabolism, 2017 印刷中)。COL1A1 遺伝子、COL1A2 遺伝子の変異陽性率は約 80% で、過去の報告の日本人の陽性率(41%)より高く、欧米の報告による陽性率(90%)より低かった。殆どが同一地域の患者であったが、異なる家系間で同一の変異は検出されず、one and Mineral Metabolism, 2017 印刷中)。COL1A1 遺伝子、COL1A2 遺伝子の変異は異質性に富んでいた。表現型は Ⅱ型で重症、病因遺伝子による差は認めなかった。Gly から Ser への変異が COL1A1 遺伝子、COL1A2 遺伝子とも最多 (7 家系/14 家系) で過去の報告と一致し、この変異陽性の患者は重症であった。パミドロネート治療効果は全例で認められたが、治療効果と病型、原因遺伝子、遺伝子型との相関は認めなかった。COL1A2 遺伝子 Exon 44 に変異を認めた患者で、脳出血の合併を認めた。この患者の plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)活性は測定感度以下であった。01 と脳内出血の合併の報告は散見され、過去の報告で遺伝子変異が判明しているものは COL1A2 遺伝子 Exon 49 に変異を認める (Faqeih E. Am J Med Genet A. 2009)。過去の脳出血合併の 01 の患者において、PAI-1 欠損症の合併を認めた (Goddeau PP. Arch Neurol. 2010)。PAI-1 欠損症の責任遺伝子 *SERPINE1* (7q22.1) と *COL1A2* (7q21.3) は、局在が近接しており、関連が示唆される。引き続き、COL1A1 遺伝子、COL1A2 遺伝子に変異を見いだされなかった患者を対象としてエクソーム解析を行った。エクソーム解析で 1 名の患者に本邦初の PPIB 変異を同定した。患者は重症の 01 で、新生児期より骨折を繰り返していた。重度の骨変形で介助なしには歩行できなかった。青色強膜はごく軽度、歯牙形成不全は認めず、骨密度は著明低値で 6 歳から pamidronate 治療を行った。治療反応性は良好であった。エクソーム解析で新規の *PPIB* ミスセンス変異 E126G をホモ接合性に検出した。検出された変異は、SNP のデータベースに報告なく、PolyPhen-2 の機能予測で probably damaging であった。患児において、他の既知の 01 遺伝子の変異は検出されなかった。エクソームで検出された変異をサンガー法でも確認した。両親はこの変異のヘテロ接合体であった。患者の臨床像は過去の報告と同様であった。1 型コラーゲンの合成には 1 鎖の 986 番目のプロリン残基の水酸化が 3 重螺旋の形成に必須でこのプロリン残基のみを特異的に水酸化する複合体 P3H1・CRTAP・CyPB の何れかの異常で重症の 01 を発症する。正常ではこの 3 つがコンプレックスを形成してコラーゲンに結合し、P3H1 活性を示す。P3H1 がないと、当然ながら酵素活性は発揮できなくな

り、cyclophilinB や CRTAP がなくとも、P3H1 はコラーゲンに結合することはできるがその活性は低くなる。また CyPB は P3H1 か CRTAP のいずれかがないと、コラーゲンへの結合ができなくなる。CyPB をコードする PPIB の異常は、これまでに血族婚の家系の重症の 01 患者で報告されている。これまでの報告の PPIB 変異は全てのエクソンに存在し全てプライベート変異である。トランケーション変異が比較的重症例に多く、1 家系を除き患者は血族婚の家系のホモ接合体であった。これまで 8 家系の報告があるが本邦での報告はない。中等症から重症が多く、1 家系で II 型とされているが、妊娠中期での termination 例であり致死性かどうか判断できない。DI や青色強膜は軽度またはなく、知的発達正常、治療反応性は良好な例が多い。本症例は血族婚ではないが、同地区の出身で血縁があることも示唆された。現在、機能解析の準備中である。

Wnt の介する pathway に変異が見いだされた患者はいなかった。

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 1 件)

Junko Kanno, Akiko Saito-Hakoda, Shigeo Kure, Ikuma Fujiwara, Responsiveness to Pamidronate Treatment Is Not Related to Genotype of Type I Collagen in Patients with Osteogenesis Imperfecta. Journal of Bone and Mineral Metabolism. 査読有、2017.印刷中

[学会発表](計 3 件)

Junko Kanno, 「A case of osteogenesis imperfecta caused by PPIB mutation (First Japanese case)」、The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society, 2016 年 11 月 17 日~20 日、東京国際フォーラム(東京)

菅野潤子, 「PPIB 遺伝子に新規のミスセンス変異をホモ接合性に同定した骨形成不全症の一例」、第 119 回日本小児科学会 2016 年 5 月 13 日~15 日、ロイトン札幌(札幌)

Junko Kanno, 「A case of osteogenesis imperfecta caused by PPIB mutation (First Japanese case)」、International Congress of Human Genetics in 2016, 2016 年 4 月 3 日から 7 日、京都国際会議場(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 潤子 (KANNO, JUNKO)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号: 30509386

(2) 研究分担者

藤原 幾磨 (Fujiwara, Ikuma)

東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10271909

新堀 哲也(Niihori, Tetsuya)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40436134

箱田 明子(Hakoda, Akiko)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：70509398

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()