

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15556

研究課題名(和文) 進行性骨化性線維異形成症の新規病態モデルの開発

研究課題名(英文) Development of a new experimental model for fibrodysplasia ossificans progressiva

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：進行性骨化性線維異形成症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: FOP)は、軟組織で軟骨を介した異所性骨形成が起こる遺伝性疾患で、典型的FOP症例に共通なALK2のR206H変異が見出された。樹立したTet-Offシステム下でヒトALK2(R206H)を発現するマウスES細胞の染色体を解析したところ、転座や重複、由来不明断片の付加などが認められた。Dox非添加状態でALK2(R206)の発現を誘導したES細胞は、リガンドの添加で軟骨細胞に分化した。よって、我々が樹立したES細胞は、少なくともin vitroでFOPの病態を評価できる新しい実験系となる。

研究成果の概要(英文)：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a genetic disorder characterized by progressive heterotopic ossification in soft tissues, such as skeletal muscle, tendon and ligament. ALK2 was identified as a molecule responsible for FOP, and an R206H mutation of ALK2 was found in patients with typical FOP. Recently, we established mouse ES cell lines, which express human ALK2(R206H) under the control of Tet-Off system. In the present study, we analyzed karyotypes of the ES cell lines and found that they had a translocation, duplication and an addition of a fragment of chromosomes. In the absence of Dox, they differentiated to chondrocytes in vitro in response to a stimulation by the TGF-family ligand. These results suggest that the ES cell lines are novel model systems for FOP, at least in vitro.

研究分野：病態生理学

キーワード：希少疾患 異所性骨化 病態モデル

1. 研究開始当初の背景

進行性骨化性線維異形成症 (FOP) は、骨格筋組織等で異所性骨化が起こる遺伝性疾患であり、2007年に我が国の難病の1つに認定された。FOPの責任分子はBone Morphogenetic Protein (BMP)の1型受容体であるALK2であり、FOPでは細胞内領域にアミノ酸変異を生じることが明らかにされている。特に206番目のアルギニン残基がヒスチジン残基に置換するR206H変異は典型的な変異で、世界的に90%以上のFOP症例に認められている。

申請者らは、ALK2のR206H変異体が微量のBMPに反応して細胞内シグナルが活性化される機能獲得型変異であることを見出した。さらに、この知見に基づき、申請者らは、ALK2の細胞内シグナル阻害薬や、変異ALK2特異的なRNAi、ALK2による細胞分化阻害薬などの新しいFOP治療薬候補化合物を開発した。

しかし、FOPはヒトのみに見出されている疾患で、病態モデル動物が確立されていない。最近、ヒトと同じALK2のR206H変異を導入したノックインマウスの樹立が試みられたが、このマウスは出生直後に死亡することが判明した。従来、FOPの病態モデルマウスとして、人為的変異から発見されたALK2の構成的活性型変異体 (Q207D) を導入したマウスが用いられてきた。しかし、Q207D変異体の細胞内シグナル活性化機序がFOPのR206H変異体と異なる可能性が指摘されており、Q207D変異体のFOPの病態モデルとしての妥当性に疑問が残る。そのため、治療薬候補化合物を評価できるFOPの新しい病態モデルの樹立が望まれている。

2. 研究の目的

最近、申請者らはFOPのヒトALK2(R206H)を導入したマウスES細胞を樹立した (Fujimoto et al, BBRC 455:347-352, 2014)。このES細胞は、Tet-Offシステムの下でALK2の遺伝子発現を制御するものあり、FOP研究の新しい評価モデルへの応用が期待できる。そこで本研究では、本ES細胞を用いて、FOPの治療法開発を目指した新しい病態モデルの樹立を目的とした。

3. 研究の方法

マウスES細胞は、10%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS; Nichirei, Tokyo)、およびLIF (Leukemia inhibitory factor, Nacalai Tesque, Tokyo)を含むGMEM (Glasgow minimal essential medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)にて培養した。ALK2の発現は、培地中に1 mg/ml Doxycyclin (Dox) を添加して抑制し、発現を誘導する際はDox非添加培地で細胞を培養した。

マウスES細胞の染色体数は、それぞれ20個の分裂像について解析した。

4. 研究成果

我々が樹立したマウスES細胞を用いて、新たなin vivoのFOP病態モデルを樹立することを目標とした。そこで、まず、樹立したマウスES細胞が個体作製に適しているかを判断するために、染色体解析を行った。

Dox誘導性に最も高いALK2(R206H)の発現が認められたクローンRH#2は、染色体数が40本ではなく、39本であることが判明した。さらに、このクローンでは、14番染色体の末端に由来不明の染色体断片の付加が確認され、個体作製には不相当と判断された。

そこで、別のクローンとして、RH#40についても同様に染色体解析を行った。本クローンの染色体数は、40本であった。しかし、解析した半数の細胞は正常核型であったものの、残る半数には8番染色体と19番染色体の間でロバートソン転座が確認された。また、8番染色体が重複したトリソミーであることも判明した。したがって、クローンRH#40も、クローンRH#2と同様に染色体に異常を認め、インジェクションによる個体作製には不相当と判断された。

最近、FOPのALK2(R206H)が、TGF- β ファミリーのリガンドの中でActivin Aに特異的に反応して細胞内でSmad1/5を活性化し、異所性の内軟骨性骨化を誘導するというモデルが提唱された。これは、我々が提唱したR206H変異体がリガンドに高感受性になるという機序とも合致する。そこで、TGF- β ファミリーのリガンド刺激によるES細胞の軟骨細胞分化能をin vitroで検討した。

クローンRH#2を用いて遠心管培養法で軟骨分化を誘導すると、Dox非添加群でALK2(R206H)の発現を誘導した細胞では、Activin Aを添加すると軟骨細胞分化の指標となるCol2a1遺伝子の発現が誘導された。この結果は、Activin AがES細胞のALK2(R206H)に結合して軟骨分化を誘導した可能性を示しており、本実験系がFOPの異所性骨化を解析できる新しいin vitroの病態モデルとなることを示唆する。

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 3件)

1. Katagiri T (2016) A door opens for fibrodysplasia ossificans progressiva. Trends in Biochemical Sciences 41:119-121. 査読有 doi: 10.1016/j.tibs.- 2015.11.010
2. Katagiri T and Watabe T (2016) Bone Morphogenetic Proteins. Cold Spring Harb Perspect Biol 8:a021899. 査読有 doi: 10.1101/cshperspect.a021899
3. 片桐岳信 (2016) 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) と骨免疫学. Clinical Calcium 26: 39-46. 査読無 doi: CliCa121116771683

〔学会発表〕(計 21 件)

1. Machiya A, Fujimoto M, Ohte S, Tsukamoto S, Osawa K, Kuratani M, Bullock AN, Suda N, Katagiri T. A role of FKBP12 in signal transduction of mutant ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressiva and diffuse intrinsic pontine glioma. BMP Signaling in Cancer. St. Catharine's College ケンブリッジ、イギリス(2016年3月15-17日)
2. Tsukamoto S, Ohte S, Sekine N, Kuratani M, Machiya A, Katagiri T. TGF- β signaling suppresses chondrocyte differentiation. Gordon Research Conference on Bones & Teeth. Hotel Galves, ガルベストーン、テキサス州、アメリカ(2016年2月17-18日)
3. Katagiri T, Ohte S, Tsukamoto S, Yoneyama K, Kuratani M, Machiya A. Establishment and characterization of Tet-On C2C12 cell lines that express mutant ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressiva. Gordon Research Conference on Bones & Teeth. Hotel Galves, ガルベストーン、テキサス州、アメリカ(2016年2月15-16日)
4. 片桐岳信: 骨格筋組織における異所性骨形成、九州大学口腔細胞工学セミナー(2015年12月9日、福岡県福岡市)
5. 倉谷麻衣、町谷亜位子、藤本舞、大澤賢次、塚本翔、大手聡、片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症(FOP)における筋損傷後の骨化の誘発。精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発」班班会議(2015年12月8-9日、国立精神・神経医療研究センター 神経研究所教育研究棟ユニバーサルホール、東京都小平市)
6. 倉谷麻衣、町谷亜位子、藤本舞、塚本翔、大手聡、片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症における変異 ALK2 の活性化機序。第3回若手による骨格筋細胞研究会(2015年11月24-25日、九州大学、福岡県福岡市)
7. 町谷亜位子、藤本舞、須田直人、片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症におけるFKBP12の役割。第74回日本矯正歯科学会大会(2015年11月18-20日、福岡国際会議場、福岡県福岡市)
8. Ohte S, Yoneyama K, Tsukamoto S, Kuratani M, Machiya A, Katagiri T. Establishment and characterization of C2C12 cells expressing human ALK2 under control of Tet-On system. Australian New Zealand Bone & Mineral Society (ANZBMS) Annual Meeting 2015 (2015年11月1-4日、Hotel Grand Chancellor, タスマニア、オーストラリア)
9. Machiya A, Fujimoto M, Ohte S, Tsukamoto S, Suda N, Katagiri T. A role of FKBP12 in activation of mutant ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). Australian New Zealand Bone & Mineral Society (ANZBMS) Annual Meeting 2015 (2015年11月1-4日、Hotel Grand Chancellor, タスマニア、オーストラリア)
10. 片桐岳信: TGF- β ファミリーによる運動器の制御、第13回RCGMフロンティアシンポジウム、(2015年10月31日、埼玉医科大学創立30周年記念講堂、埼玉県日高市)
11. 倉谷麻衣、町谷亜位子、塚本翔、大手聡、片桐岳信. 筋分化における TGF- β ファミリーシグナル分子の発現。第13回RCGMフロンティアシンポジウム(2015年10月30-31日、埼玉医科大学創立30周年記念講堂、埼玉県日高市)
12. 町谷亜位子、藤本舞、大手聡、塚本翔、倉谷麻衣、須田直人、片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症(FOP)の骨化シグナル活性化機構におけるFKBP12とII型BMP受容体の役割。第13回RCGMフロンティアシンポジウム(2015年10月30-31日、埼玉医科大学創立30周年記念講堂、埼玉県日高市)
13. 塚本翔、大手聡、関根典子、倉谷麻衣、町谷亜位子、片桐岳信. TGF- β シグナルによる軟骨細胞の分化調節機構の解析。第13回RCGMフロンティアシンポジウム(2015年10月30-31日、埼玉医科大学創立30周年記念講堂、埼玉県日高市)
14. Machiya A, Fujimoto M, Tsukamoto S, Kuratani M, Ohte S, Suda N, Katagiri T: Role of FKBP12 in signal transduction by mutant ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressiva. American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2015 Annual Meeting, 2015年10月9-10日、シアトル、ワシントン州、アメリカ)
15. 町谷亜位子、藤本舞、須田直人、片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症(FOP)のALK2変異体の活性化機構におけるFKBP12とBMP II型受容体の役割。第57回歯科基礎医学会学術大会(2015年9月12日、朱鷺メッセ、新潟県新潟市)
16. 片桐岳信: FOPの最前線、J-FOP患者家族会交流会(2015年9月5日、ホテルグランドヒル市ヶ谷、東京都新宿区)
17. 片桐岳信: 生理的および病的骨形成のメカニズム。第33回日本骨代謝学会学術

- 集会 Meet the Expert 6 (2015年7月25日、京王プラザホテル、東京都新宿区)
18. 片桐岳信: BMPと骨形成. 第33回日本骨代謝学会学術集会 学術賞受賞講演 (2015年7月24日、京王プラザホテル、東京都新宿区)
 19. 町谷亜位子、藤本舞、塚本翔、大澤賢次、大手聡、須田直人、片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症(FOP)の ALK2 変異体活性化における FKBP12 の役割. 第33回日本骨代謝学会学術集会 (2015年7月23-25日、京王プラザホテル、東京都新宿区)
 20. Katagiri T, Tsukamoto S, Ohte S, Machiya A, Kuratani M: Establishment of a novel model of heterotopic ossification in skeletal muscle in fibrodysplasia ossificans progressiva. Gordon Research Conference on Myogenesis. (2015年6月21日-26日、Renaissance Tuscany Il Ciocco、ルッカ、イタリア)
 21. Katagiri T: Recent topics on fibrodysplasia ossificans progressiva. Seminar (Sapienza University of Rome) (2015年6月19日、Sapienza University of Rome、ローマ、イタリア)

〔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 0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〕
ホームページ等

埼玉医科大学ゲノム医学研究センターHP
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