

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20067

研究課題名(和文)骨格筋組織における異所性骨化誘導機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of heterotopic ossification in skeletal muscle

研究代表者

倉谷 麻衣(Kuratani, Mai)

埼玉医科大学・医学部・ポスドクター

研究者番号：50758109

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):全身の骨格筋組織で異所性骨化が起こる進行性骨化性線維異形成症(FOP)は、BMPの受容体であるALK2の機能獲得型変異で発症する。FOPでは筋組織の損傷で骨化が誘発される。野生型マウスに筋損傷を誘発すると、BMP-2およびBMP-7の発現が上昇した。BMP-7またはBMP-2の濃縮ペレットを筋組織に移植すると両者ともに異所性骨を誘導した。FOPの変異ALK2(R206H)発現細胞を用いてBMP特異的レポーター解析を行うと、BMP-7で強いシグナル誘導を確認した。以上のことからBMP-7はFOPにおける筋損傷後の異所性骨化誘導機構に関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文):Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a rare genetic disorder characterized by progressive heterotopic ossification (HO) in soft tissues, such as skeletal muscle, especially after trauma. A gain-of-function mutation in ALK2, ALK2(R206H), is commonly found in patients with typical FOP. ALK2 is a type I receptor of BMP and transduces osteogenic signaling. In the present study, we observed that expression levels of BMP-2 and BMP-7 increased in injured muscle. In vivo implantation of BMP-2 and BMP-7-containing pellets drove HO in skeletal muscle. We analyzed their biological activity on ALK2(R206H) in vitro, BMP-7, induced BMP-specific luciferase reporter activities in C2C12 cells expressing human ALK2(R206H). In conclusion, BMP-7, which increased in injured muscle, contribute to the muscle trauma-induced HO in FOP.

研究分野：病態生理学

キーワード：骨格筋 異所性骨化 BMP 進行性骨化性線維異形成症 軟骨・骨

#### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋組織内への移植で異所性の軟骨組織や骨組織を誘導する BMP は、TGF-ファミリーの成長因子である。異所性骨誘導活性を持つ BMP は、I 型受容体である ALK1、ALK2、ALK3 および ALK6 のいずれかに結合し、下流の細胞内シグナルを誘導する。

全身の骨格筋組織で異所性の軟骨組織や骨組織が形成される難病の進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; FOP) は、ALK2 の遺伝的な機能獲得型変異により発症する。FOP では、筋組織の損傷に伴い異所性骨化が急激に進行することが知られているが、その誘導メカニズムは不明な点が多かった。

申請者の所属する研究グループは、FOP の変異 ALK2 が II 型受容体によって活性化されやすいことを明らかにした (Fujimoto et al, Mol Endocrinol, 2015)。この発見は、微量のリガンドによって FOP の変異 ALK2 が活性化し、異所性骨を誘導する可能性を示唆している。

#### 2. 研究の目的

本研究は、骨格筋組織における異所性骨誘導機構を解明することを目的とした。筋損傷で発現誘導される TGF-ファミリーのリガンドを同定し、それらの異所性骨誘導活性を *in vivo* および *in vitro* で解析した。

#### 3. 研究の方法

(1) 筋損傷で mRNA 発現が誘導される TGF-ファミリーのリガンドを同定した。野生型マウスの後肢筋にヘビ毒である CTX (カルディオトキシン) と NTX (ノテキシン) の投与で筋損傷を誘発し、定量的 RT-PCR での mRNA 発現を解析した。筋損傷は組織学的に H.E. 染色で確認した。

(2) 野生型マウスを用い、(1) で同定した TGF-ファミリーリガンドの異所性骨誘導活性を *in vivo* で解析した。リガンドをコラーゲンスポンジに含ませて濃縮したペレットをマウス後肢筋に移植した。移植 7 日後、14 日後に組織切片を作製し、H.E. 染色、アルシアンブルー染色およびアリザリンレッド S 染色を実施して、異所性の軟骨組織および骨組織形成を組織学的に解析した。

(3) (1) で同定した TGF-ファミリーリガンドの細胞内シグナル誘導活性を *in vitro* で解析した。BMP の I 型受容体を一過的に過剰発現した HEK293A 細胞に、(1) で同定した BMP を添加して、BMP シグナル特異的なルシフェラーゼレポーター (WT4F-luc) 活性を解析した。

(4) (1) で同定した TGF-ファミリーリガンドの、FOP の変異 ALK2 に対するシグナル誘導活性を解析した。C2C12 細胞に、Tet-On シス

テムのトランスアクチベーターを導入し、Dox (ドキシサイクリン) 依存的に FOP の変異 ALK2 (R206H) の発現を誘導する細胞を樹立した。培地に Dox (1  $\mu$ g/ml) を添加して ALK2 (R206H) を発現させた細胞に、(1) で同定した TGF-ファミリーリガンドで刺激し、WT4F-luc 活性を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 野生型マウス筋組織に CTX および NTX を投与すると、どちらを投与した場合でも、3 日目には多数の単核細胞の浸潤があり、筋組織の損傷を確認した。定量的 RT-PCR 解析から、CTX あるいは NTX で損傷を誘発して 3 日後の筋組織では、BMP-2、BMP-7 および Activin A の mRNA 発現が定常状態の筋組織と比べ 3 倍以上高いことが判明した。

近年、野生型 ALK2 に対して異所性骨誘導活性を持たない Activin A が、FOP の変異 ALK2 に対してはシグナル誘導活性を示すことが明らかとなり、FOP の異所性骨化への関与が既に示唆されている (Hatsell et al, Sci Trans Med 2015; Hino et al. PNAS 2015)。本研究では、損傷した筋組織で、Activin A のほかに発現上昇がみられた BMP-2 および BMP-7 に着目し、以下の実験を進めた。

(2) 野生型マウスを用いて、BMP-2 および BMP-7 の異所性骨誘導活性を *in vivo* で解析した。BMP-2 あるいは BMP-7 を濃縮したペレットをマウスの筋組織に移植すると、移植 7 日目にはアルシアンブルーに染まる軟骨組織が、14 日目にはアリザリンレッド S に染まる骨組織が観察された。このことから、筋損傷で発現誘導される BMP-2 および BMP-7 は、両者ともに骨格筋組織内で異所性骨の誘導活性を持つことが確認された。

(3) *In vitro* で、BMP の I 型受容体を一過的に発現した細胞を用い、BMP-2 および BMP-7 の BMP 特異的なルシフェラーゼレポーター解析を行うと、BMP-2 は ALK3 の発現細胞でシグナル活性化したのに対し、BMP-7 は ALK2 発現細胞で強いシグナル誘導を確認した。さらに、BMP-2 は ALK2 発現細胞ではシグナル誘導が検出されなかった。このことから、骨格筋組織で異所性骨を誘導する BMP-2 は主に ALK3 を介してシグナルを誘導するのに対し、BMP-7 は ALK2 を介してシグナルを誘導することが考えられた。

(4) Tet-On システムで FOP の変異 ALK2 (R206H) の発現誘導できる細胞を用い、筋損傷で発現誘導される BMP-2、BMP-7 および Activin A の ALK2 (R206H) に対する BMP 特異的なルシフェラーゼレポーター活性を定量した。培地に Dox を添加して ALK2 (R206H) を発現させた細胞に、BMP-2 で刺激した場合、強いシグナル誘導は検出されなかった。一方で、BMP-7 あるいは Activin A で刺激すると、

Dox 非添加条件と比べ、どちらも 5 倍以上高い活性を示した。Activin A は、FOP の変異 ALK2(R206H)を活性化することが近年明らかとなり、FOP の異所性骨化への関与が示唆されている。本研究では、Activin A のほかに、BMP-7 が ALK2(R206H)発現細胞で強いシグナル誘導を示した。BMP-7 は損傷した筋組織で発現が上昇したため、FOP における筋損傷後の異所性骨化誘導機構に関与する可能性がある。

#### 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 2 件)

Machiya A, Tsukamoto S, Ohte S, Kuratani M, Fujimoto M, Kumagai K, Osawa K, Suda N, Bullock AN, Katagiri T. Effects of FKBP12 and type II BMP receptors on signal transduction by ALK2 activating mutations associated with genetic disorders. *Bone*. 111: 101-108. 査読有 doi: 10.1016/j.bone.2018.03.015

Katagiri T, Tsukamoto S, Kuratani M. Heterotopic bone induction via BMP signaling: Potential therapeutic targets for fibrodysplasia ossificans progressiva. *Bone*. 109: 241-250. 査読有 doi: 10.1016/j.bone.2017.07.024

##### [学会発表](計 10 件)

倉谷麻衣、塚本翔、関根典子、片桐岳信. BMP 受容体 ALK2 を介した異所性骨化モデルの構築. 第 15 回 RCGM フロンティアシンポジウム(2017 年 12 月 1 日~2 日、埼玉医科大学 30 周年記念講堂、埼玉県日高市)

塚本翔、関根典子、倉谷麻衣、熊谷桂吾、大久保美里、片桐岳信. 転写共役因子 Smad4 は軟骨細胞分化を介して骨形成を制御する. 第 15 回 RCGM フロンティアシンポジウム(2017 年 12 月 1 日~2 日、埼玉医科大学 30 周年記念講堂、埼玉県日高市)

Kuratani M, Tsukamoto S, Katagiri T. Analysis of the TGF- family ligands that are increased in regenerating skeletal muscle and induce BMP signaling via a mutant ALK2 associated with fibrodysplasia ossificans progressiva. The 65th Annual Meeting of Japanese association for Dental Reserch (2017

年 11 月 18 日~19 日、昭和大学、東京都品川区)

Tsukamoto S, Sekine N, Kuratani M, Kumagai K, Katagiri T. Analysis of skeletal phenotype in Smad4 conditional knockout mice. The 65th Annual Meeting of Japanese association for Dental Reserch (2017 年 11 月 18 日~19 日、昭和大学、東京都品川区)

Tsukamoto S, Sekine N, Kuratani M, Kumagai K, Tanaka S, Jimi E, Oda H, Katagiri T. Postnatal ablation of Smad4 enhances endochondral ossification in epiphyseal growth plate. ASBMR 2017 Annual Meeting (2017 年 9 月 8 日~11 日、Colorado Convention Center、デンバー、コロラド州、アメリカ)

Tsukamoto S, Sekine N, Kuratani M, Kumagai K, Tanaka S, Jimi E, Oda H, Katagiri T. Analysis of skeletal growth in Smad4 knockout mice. 2017 FASEB Science Research Conferences in The TGF- Superfamily (2017 年 7 月 9 日~14 日、The Marriott Lisbon,リスボン、ポルトガル)

倉谷麻衣、大手聡、塚本翔、町谷亜位子、熊谷桂吾、片桐岳信. Tet-On 誘導システムによる進行性骨化性線維異形成症の ALK2 変異体発現 C2C12 細胞の樹立. 第 4 回若手による骨格筋細胞研究会(2016 年 11 月 14 日~15 日、ウインクあいち、愛知県名古屋市)

Kuratani M, Ohte S, Tsukamoto S, Machiya A, Kumagai K, Katagiri T. Expression of the TGF- family ligands in the injured skeletal muscle. 第 14 回 RCGM フロンティアシンポジウム(2016 年 11 月 11 日~12 日、埼玉医科大学 30 周年記念講堂、埼玉県日高市)

Kumagai K, Tsukamoto S, Ohte S, Machiya A, Kuratani M, Katagiri T. Functional analysis of mutant ALK2 associated with a novel skeletal dysplasia and diffuse intrinsic pontine glioma. 第 14 回 RCGM フロンティアシンポジウム(2016 年 11 月 11 日~12 日、埼玉医科大学 30 周年記念講堂、埼玉県日高市)

Katagiri T, Ohte S, Tsukamoto S, Kuratani M, Machiya A, Kumagai K. Establishment of Tet-On C2C12 cells express ALK2 responsible for fibrodysplasia ossificans progressiva and diffuse intrinsic pontine glioma. 2016 ASBMR Annual Meeting(2016年9月16日～19日、Georgia World Congress Center, アトランタ、ジョージア州、アメリカ)

塚本 翔 (TSUKAMOTO, Sho)  
埼玉医科大学・医学部・助教

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉谷 麻衣 (KURATANI, Mai)  
埼玉医科大学・医学部・ポストドクター  
研究者番号：50758109

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

片桐 岳信 (KATAGIRI, Takenobu)  
埼玉医科大学・医学部・教授