

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791046  
 研究課題名（和文） 進行性骨化性線維異形成症のモデルメダカの作製と発症機構の解明  
 研究課題名（英文） Construction of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Animal Model  
 研究代表者 清水 厚志 (SHIMIZU ATSUSHI)  
 慶應義塾大学・医学部・助教  
 研究者番号：30327655

研究成果の概要：FOP は筋肉や腱、靭帯、関節等が骨化する遺伝病である。本研究では患者と同じ変異を導入したトランスジェニック (Tg) メダカの作製を試みた。筋特異的プロモーター下流に IRES-GFP を含むバイシストロニックな発現コンストラクトを構築したが蛍光を示す胚は得られなかった。プロモーター直下に GFP を連結した場合には骨格筋において明瞭な蛍光を示したので、GFP 融合タンパク質として Tg メダカを作製した結果、筋組織に顕著な表現型を示す Tg メダカを得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

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：FOP、ACVR1、BMP4、骨異形成、筋再生、分化異常

## 1. 研究開始当初の背景

進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: FOP) は 200 万人に 1 人の割合で見つかる稀な疾患であり、筋肉や腱、靭帯、関節等が骨化する常染色体優性の遺伝病である。関節が骨化することにより動作が不自由になり運動障害を生じる。また、顎部に骨化が生じた場合には食餌困難、胸部に生じた場合には呼吸困難を併発するが、外科的治療は外傷部に新たな骨化を引き起こす要因となり、非根治治療ですら極めて困難である。そのため、FOP 発症の分子生物学的機構を詳細に調べることが治療につながる唯一の方法である。

これまで FOP の発症原因は BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) の異所性あるいは

は過剰発現が原因であると考えられていたが、2006年4月に原因遺伝子が細胞増殖因子 BMP Type I receptor の 1 種である ACVR1 (Activin Receptor Type IA) であることが判明し、すべての患者において ACVR1 の 617 番目の塩基の G から A への変異による 206 番目のアミノ酸のアルギニンからヒスチジンへの置換が発症原因である事が突き止められた (*Nature Genet.*, 38:525-527(2006))。ACVR1 は ActRIA、Tsk7L、SKR1、ALK2 と呼ばれ Acvr1 のノックアウトマウスは胚性致死であること (*Dev. Biol.*, 213:314-326 (1999))、骨形成のみならず (*Mech. Dev.*, 121:173-182(2004))、胚の左右非対称性の形成においても重要な役割があり (*Dev. Biol.*, 276:185-193(2004))、さらに Acvr1 が恒常的

に活性化(CA; Constitutively Activate)された変異体であるラット由来のAlk2<sup>CA</sup>を発現するウイルスをニワトリの肢芽に感染させたところ、関節部の融合や骨の過形成がみられることが知られていた(*J. Bone Miner. Res.*, 18:1593-1604(2003))。

すなわち、ACVR1の詳細な発現・機能解析、そしてFOP患者と同じ変異をもつモデル動物の作製がFOP治療への第1歩であると考えられる。

## 2. 研究の目的

研究代表者はヒトゲノムシーケンシングと疾患原因遺伝子の解析を進めるとともに、モデル生物であるメダカのゲノムシーケンシングと遺伝子解析を進めてきた。メダカは日本発のモデル生物であり、発生が早く、多産、胚が透明であること、純系(近交系)が存在し多数の変異体が得られている、等からモデル生物として極めて有用な特徴を兼ね備えている。さらに、ゲノム情報がすでに公開されたことで、変異体の原因遺伝子探索も加速することが期待されている。また、発生のモデルとしてだけでなくモルフォリノアンチセンスオリゴによるノックダウン解析やトランスジェニック(Tg: Transgenic)メダカの作製が容易であることから、ヒトの疾患モデルの作製や疾患原因遺伝子の解析にも活用され始めている。

そこで本研究ではFOP患者と同じ変異を持つACVR1、あるいは恒常活性型変異を持つACVR1、そしてBMP4を発現するTgメダカを作製し、FOPの動物モデルを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象遺伝子の同定

ヒトACVR1、BMP4の配列はNCBIのRefSeqを参照した。メダカ相同遺伝子の同定はヒトACVR1、BMP4のアミノ酸配列をblastxによりメダカゲノム配列、あるいはest配列に対して検索し、部分配列を同定した。

### (2) 発現コンストラクトの構築と調整

プライマーはPrimer3(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)により設計した。RT-PCRにはAmpliTaq Gold® (ABI)、変異導入、クローニングにはPrimeSTAR (TAKARA)を用いた。制限酵素はfermentas社製を用いた。DNAリガーゼはLigation high ver.2 (TOYOBO)を用いた。インジェクション用のDNAの調整はGENOMED社JetStar Endotoxin Free kitにて精製後、200 ng/ulのストック溶液を調整し、I-SceI (Roche)により消化した。

### (3) アニマルモデル(メダカ)

トランスジェニック作製のためのメダカはCabシステムを用いた。インジェクション前日よりオス2匹、メス3匹を透明な仕切り板で隔離した。インジェクション当日早朝に仕切り板をとりのぞき、受精後数分以内の卵を回収し、インジェクションまで4℃で保冷した。インジェクションは1細胞期に細胞質に行い、その後28℃に保温した0.0005%メチレンブルーを入れたメダカ胚用溶液に静置した。青変した死亡胚は随時除去した。

### (4) 蛍光の観察

インジェクションした胚の蛍光の観察にはAxiovert 40 CFL (ZEISS)を用いた。蛍光フィルターはGFP-3035B (Semrock)を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) ヒトACVR1のクローニング

クロンテック社のHuman MTC Panelを鋳型とし、PCR法によりヒトACVR1のコーディング領域全長を増幅し、pCR4-TOPOベクターにクローニングした。PCR法の際に用いたプライマーには予めKozak配列と制限酵素認識部位(*Eco* RI, *Bam* HI)を導入した。

### (2) メダカACVR1のクローニング

自ら構築したメダカ時期特異的cDNA(MSC)パネルとメダカ組織別cDNA(MTC)パネルを用いて予測された部分配列に設計したプライマーを用いてPCR法により、メダカACVR1の発現時期、組織を確認した。続いて肝臓cDNAを鋳型とし、RACE法により転写開始点と3' UTRを決定した。予測されたメダカACVR1全コーディング領域をpCR4-TOPOベクターにクローニングした。PCRの際に用いたプライマーには予めKozak配列と制限酵素認識部位(*Eco* RI, *Bam* HI)を導入した。

### (3) メダカBMP4のクローニング

ACVR1と同様にメダカMSC、MTCパネルよりクローニングを行った。PCRの際に用いたプライマーには予めKozak配列と制限酵素認識部位(*Eco* RI, *Bam* HI)を導入した。

### (4) ACVR1への変異の導入

pCR4-TOPOへクローニングしたACVR1を鋳型とし、メガプライマー法にて変異を導入し、ACVR1のFOP型変異体G617A (ACVR1<sup>FOP</sup>)および恒常活性型変異体G619G, G621C (ACVR1<sup>CA</sup>)を作製した。

(5) 筋特異的プロモーターのクローニング  
ACVR1 は様々な組織で発現しているが、特に骨格筋での発現量が多い。また、FOP 患者で骨化が進行するのも筋である。そこで、メダカにおいて既知の骨格筋特異的プロモーターである Myl2: myosin light polypeptide 2 を用いた。Myl2 の転写開始点をふくむおよそ 2 kb の上流配列をメダカゲノム DNA より PCR 法で増幅し、pCR4-TOPO へクローニングした。PCR 法の際に用いたプライマーには予め制限酵素認識部位 (*Xho* I, *Eco* RI) を導入した。

(6) 骨格筋特異的 GFP 発現 Tg メダカの作製

クオンテック社の pEGF-N1 の CMV プロモーターを除去し、Myl2 プロモーターを挿入した。続いて SV40 poly(A) 下流とプロモーター上流にメガヌクレアーゼである *I-SceI* 認識配列 18 塩基対を挿入した。

得られた発現コンストラクト pIST2-Myl2::eGFP (図1) を精製し、*I-SceI* で消化後、1 細胞期のメダカ受精卵およそ 100 個に 30 ng/ul の濃度にてガラスキャピラリーでインジェクションした。

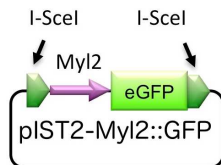


図1 骨格筋特異的 GFP 発現コンストラクト

eGFP の蛍光を示した胚 (F0) を選択し、成魚まで飼育し、非 Tg メダカと掛け合わせる事で骨格筋特異的 eGFP 発現 Tg メダカラインを確立した (図2)。



図2 : 筋特異的 GFP 発現 Tg メダカ

(7) IRES を用いたバイストロニックな発現コンストラクトの構築

クオンテック社の pIRES2-DsRed2 の IRES 配列を上記 pIST2-Myl2::eGFP の GFP 上流に挿入し、次いで IRES の上流にヒト ACVR1<sup>FOP</sup>、メダカ ACVR1<sup>FOP</sup>、あるいはメダカ BMP4 を挿入した (図3)。

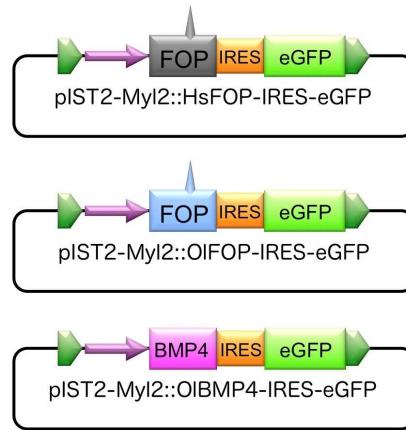


図3 : バイストロニック発現コンストラクト

(8) バイストロニック Tg メダカの作製

(7) の3つの発現コンストラクトを(6)と同様に精製と前処理を行った。それぞれ 100 個程度の受精卵にインジェクションしたが、蛍光を示す胚は1つも得る事ができなかった。そこで、DNA 濃度を 30 ng/ul から順次 100 ng/ul まで上昇させたが、死亡する胚の割合が増えたのみであった。

(9) 恒常活性型 GFP 融合 ACVR1 発現 Tg メダカの作製

ACVR1 は膜タンパク質であり、BMP と結合するドメインが膜外に存在する。そこで、ACVR1 の BMP 結合部分から上流、eGFP、ACVR1 膜結合部位を含む下流の3つの断片を PCR 法により融合させ、pIST2-Myl2::eGFP の eGFP と置き換える事により BMP 結合部位を eGFP と置き換えた融合タンパク質発現コンストラクト pIST2-Myl2::HsACVR1<sup>ca</sup> を構築した (図4)。

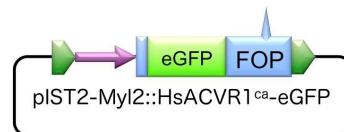


図4 : 融合タンパク質発現コンストラクト

融合タンパク質発現コンストラクトを(6)と同様に精製と前処理を行い、30 ng/ul の濃度にてインジェクションしたところ、複数の GFP 陽性胚が得られた。うち、GFP の発現が顕著だった3つの胚 (F0) を選び、成魚まで飼育した (図5) 。Tg メダカは顕著な筋量の低下を示し、2匹は成長途中で死亡した。生育した1匹を非 Tg メダカと掛け合わせた、GFP 陽性の F1 を得ることはできなかった。

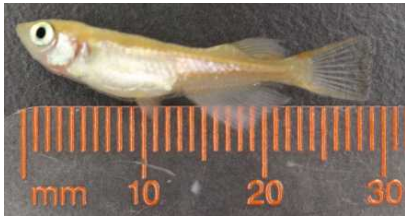


図5：ACVR1<sup>CA</sup>発現 Tg メダカ

以上の研究により、  
骨格筋特異的 Tg メダカの作製  
ヒト ACVR1 のメダカでの発現

は達成できたが、当初目的としていた IRES によるバイシストロニック Tg メダカは作製できなかった。また、融合タンパク質として活性型の ACVR1 を発現するメダカを作製することはできたが、ライン化する事はできず、表現形解析には至らなかった。ACVR1<sup>CA</sup>Tg メダカのファウンダー (F0) が生育できなかった理由としては ACVR1 の過剰発現による筋組織の発達異常が考えられるが、今後より詳細な解析が必要である。

一方、今回のもう1つの対象遺伝子である BMP4 のようなサイトカインは融合タンパク質にすると活性を失う事が知られているため、融合タンパク質の戦略をとる事ができなかった。また、ACVR1<sup>CA</sup>Tg メダカが早期に死亡した事を加味すると、今後は Cre/loxP システムやヒートショックプロテインなどの誘導型のプロモーターを用いる事で、ライン化を成し遂げた後に BMP4 や ACVR1 を誘導できるようなシステムを開発することが必要とされる。

#### 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1件)

Liang, C.S., Ikeda, D., Kinoshita, S., Shimizu, A., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N. and Watabe, S., "Myocyte enhancer factor 2 regulates expression of medaka *Oryzias latipes* fast skeletal myosin heavy chain genes in a temperature dependent manner." *Gene*. 407:42-53 (2008). 査読有り

[学会発表](計1件)

清水 厚志、清水 信義

進行性骨化性線維異形成症に関する疾患モデルメダカの作製、第31回日本分子生物学会年会(2008.12.9)(神戸ポートアイランド)神戸

[その他](計1件)

清水厚志

「進行性骨化性線維異形成症モデル生物の作製と発症機構の解明」

埼玉医科大学ゲノム医学研究センターセミナー (2008.11.9)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 厚志 (SHIMZU ATSUSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30327655

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし