

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03808

研究課題名(和文)骨形成および異所性石灰化の分子基盤の解明と骨形成促進物質の開発

研究課題名(英文)Analysis of molecular mechanisms of bone formation and heterotopic calcification

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨や歯の形成には、成長因子BMPとWntが重要である。我々は、BMPによる骨形成にWnt7bが重要なことを見出した。本研究では、BMPの2種類の膜貫通型キナーゼ受容体(ALK2とALK3)の細胞外領域に結合する阻害モノクローナル抗体を作製した。Wnt7bは、内軟骨性骨化と呼ばれる一連の骨形成過程で、最終分化した肥大軟骨細胞が産生する骨形成因子であった。Wnt7bの活性を促進する化合物を見出し、促進活性に重要な基本骨格を明らかにした。外傷性に筋組織中に硬組織が形成される病態モデルマウスを樹立し、これが異所性石灰化であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生理的および病的な硬組織形成機序の一端が明らかとなり、その制御分子を開発することに成功した。成長因子BMPとWntは、共にin vivoにおける骨形成に極めて重要な因子として知られる。我々は、BMPが誘導する内軟骨性骨化の過程にWnt7bが重要なことを明らかにした。さらに、Wnt7b活性を促進する化合物を探索し、共通の基本骨格を明らかにした。また、BMP受容体に対する阻害モノクローナル抗体を開発した。骨格筋の外傷性に誘導される硬組織の病態モデルを開発し、これが骨形成とは異なる異所性石灰化であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：BMP and Wnt signaling is important for bone and tooth development. We found that Wnt7b is essential for BMP-induced bone formation. We developed blocking antibodies against BMP receptors. We identified Wnt7b as the bone-inducing factor produced by hypertrophic chondrocytes during endochondral ossification. Furthermore, we found chemical compounds that stimulate Wnt7b activity in vitro. We developed a mouse model of trauma-induced mineralization of muscle tissue and found that the hard tissue formed is an artificial calcification, but not bone formation.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨形成 BMP Wnt 受容体 低中分子化合物 石灰化

1. 研究開始当初の背景

骨を形成するための骨芽細胞は、その増殖や分化、機能がさまざまなホルモンや成長因子、サイトカインによって調節される。骨は、身体を支える重要な支持組織であり、健康な生活を営むために欠かすことができない運動器の 1 つである。加齢などによって骨量が減少する骨粗鬆症では、骨が身体を支えきれずに骨折が起こり、日常生活に大きな支障を来す。骨粗鬆症や骨折に対する治療法として、骨形成を促して骨量を増加させる方法の確立が望まれている。一方、骨組織が過剰に形成される疾患も知られており、骨形成の中心をなす制御機構の解明とその制御法の開発が望まれている。

ヒトやマウスなどの脊椎動物において、骨形成を促す生理活性物質として、副甲状腺ホルモン (PTH) や、Wnt シグナルの重要性が明らかにされている。PTH は、連続投与すると骨吸収を促す作用を有するが、間欠投与すると骨芽細胞を活性化して骨形成を促進する。

骨密度が増加する硬結性骨化症 (sclerosteosis) と呼ばれる遺伝性疾患の原因遺伝子の解析から、Wnt アンタゴニスト SOST/Sclerostin の機能喪失が同定された。この疾患は Wnt の抑制分子が変異したことにより、過剰な Wnt シグナルが亢進して骨形成が促されると考えられる。また、骨粗鬆症を伴う偽神経芽腫 (Osteoporosis-pseudoglioma; OPPG) と呼ばれる疾患では、Wnt 受容体の LRP5 の遺伝的な機能喪失が同定された。これらの発見から、Wnt は骨形成に重要な成長因子であることが明らかとなっている。

骨誘導因子として知られる Bone morphogenetic protein (BMP) は、実験的な骨形成を誘導するだけでなく、胎生期における生理的な骨組織の発生や、骨折の再生などに重要な成長因子群である。BMP を含む Transforming growth factor- (TGF-) ファミリーの細胞内シグナルは、標的細胞が膜上に発現する膜貫通キナーゼ受容体によって伝達される。病的な骨形成が起こる遺伝子疾患として知られる進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia ossificans progressiva; FOP) は、BMP 受容体である ALK2 の機能獲得型変異で発症することが判明している。研究代表者の片桐らは、FOP 症例における過剰な BMP シグナルによる骨化を抑制するため、ALK2 の細胞外領域に結合して細胞内シグナルを阻害する抗体を開発した。

研究代表者らのグループでは、BMP を含む全ての Transforming growth factor- (TGF-) ファミリーの細胞内シグナルに必須と考えられている転写共役因子 Smad4 をノックアウトしたマウスでは、予想に反して骨量が増加することを見出した。この作用は、軟骨細胞における Wnt7b の発現増加が関与することが判明している。

筋組織では、交通事故などの外傷性に硬組織の形成が起こることが知られている。しかし、この病態を反映したモデル実験系は確立されておらず、その発症機序や病態は不明な点が多い。研究代表者のグループでは、マウス筋組織を損傷させることで、再現性良く筋組織内に硬組織形成を誘導できる病態モデルを確立した。

2. 研究の目的

上記のような背景の下、本研究では骨形成の制御機構を解明し、骨代謝関連の疾患に応用することを目的とした。

- (1) ヒト型 BMP 受容体 ALK2 を有するマウスモデルの確立と解析
- (2) BMP 受容体に対する機能性抗体の確立
- (3) Smad4 シグナル依存的な内軟骨性骨化の制御機構の解析
- (4) 筋損傷による異所性硬組織形成モデルマウスの確立と解析

3. 研究の方法

(1) マウス ALK2 の 330 番セリン残基を、ヒト型のプロリン残基のコドンに変異させた遺伝子改変マウスラインを樹立した。取得したヘテロ接合体マウスの雌雄を自然交配し、生まれたマウスのジェノタイピングを行い、最終的に目的とするホモマウスを同定した。

(2) BMP 受容体の ALK2 と ALK3 を抗原としてラットを免疫し、脾臓とミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを樹立した。ハイブリドーマの培養上清を試料として、ALK2 と ALK3 に結合する抗体を産生するクローンをスクリーニングした。取得したクローンを無血清培地に純化・培養し、培養上清に分泌された抗体を Protein G カラムを用いて精製した。BMP シグナルを特異的に検出するルシフェラーゼアッセイで、抗体の作用を検討した。

(3) 全身の Smad4 遺伝子を薬剤投与誘導性にノックアウトできるコンディショナルノックアウト(cKO)マウスの骨形成を、マイクロ CT 撮影や、パラフィン切片を用いて組織学的に解析した。同様に Wnt7b 遺伝子を誘導性にノックアウトできる KO マウスを用いて、骨形成における役割を解析した。さらに、「大村天然化合物ライブラリー」の化合物を用いて、独自に確立した Wnt 特異的な細胞内シグナル定量系で、Wnt 活性促進化合物をスクリーニングした。

(4) マウスの後肢にヘビ毒を局所投与し、マイクロ CT 撮影で石灰化した硬組織形成を経時的に解析した。また、摘出した筋組織のパラフィン切片を作製し、形成された硬組織を組織学的に解析した。さらに、硬組織が形成された筋組織を走査電子顕微鏡や FTIR 分析し、硬組織の性状を解析した。

4. 研究成果

(1) マウスの ALK2 遺伝子に変異を導入し、330 番セリン残基をヒト型のプロリン残基に置換したマウスを樹立した。この ALK2 変異体を有するマウスは、BMP の移植によって誘導される異所性骨が小さくなった。これは、BMP の骨誘導活性が齧歯類で高く、ヒトでは低いことを反映した結果と考えられた。今回樹立したマウスは、ヒトにおける BMP 活性を解析する有用なモデルとなることが期待されるため、特許を出願した。

(2) それぞれ、ALK2 と ALK3 に結合する抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。アフィニティー精製した抗体の一部は、用量依存的に培養細胞における BMP シグナルを阻害した。

(3) Smad4 cKO マウスは、特に、成長板軟骨近傍の骨髄における海綿骨量が増加した。これは、骨形成の亢進によるものであり、成長板軟骨中の最終分化した肥大軟骨細胞において Wnt7b の発現が増加するためと考えられた。実際、Smad4 と Wnt7b を同時に cKO したマウスでは、Smad4 cKO で認められた骨量増加は認められなかった。さらに、Wnt7b 単独の cKO マウスは、著しく内軟骨性骨化が抑制されることを見出した。培養軟骨細胞の分化に伴い Wnt7b の発現が増加し、BMP を添加すると Wnt7b の発現は抑制された。従って、BMP の Smad4 を介した細胞内シグナルが、Wnt7b の発現を抑制すると考えられた。これらの成果は、論文として投稿中である (Tsukamoto et al.)。

4) マウス筋組織にヘビ毒を局所投与すると、マイクロ CT で長期間にわたり不透過像を示す硬組織が誘導された。この硬組織は、骨組織と同様のヒドロキシアパタイト結晶であった。しかし、形成された硬組織は骨組織とは異なり骨髄等は確認できなかった。従って、この硬組織は骨形成ではなく、異所性石灰化と考えられた。このモデルは、筋組織における外傷性の異所性硬組織の発症機序や治療法などの研究に応用が期待されるため、特許を出願した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katagiri Takenobu, Tsukamoto Sho, Kuratani Mai	4. 巻 9
2. 論文標題 Accumulated Knowledge of Activin Receptor-Like Kinase 2 (ALK2)/Activin A Receptor, Type 1 (ACVR1) as a Target for Human Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 736 ~ 736
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9070736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohte Satoshi, Yamazaki Hiroyuki, Takahashi Ohgi, Rotinsulu Henki, Wewengkang Defny S., Sumilat Deiske A., Abdjul Delfly B., Maarisit Wilmar, Kapojos Magie M., Zhang Huiping, Hayashi Fumiaki, Namikoshi Michio, Katagiri Takenobu, Tomoda Hiroshi, Uchida Ryuji	4. 巻 35
2. 論文標題 Inhibitory effects of sesquiterpene lactones from the Indonesian marine sponge <i>Lamellodysidea</i> cf. <i>herbacea</i> on bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127783 ~ 127783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.127783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Hirofumi, Sakai Naoki, Ohte Satoshi, Sato Tomohiro, Sekimata Katsuhiko, Matsumoto Takehisa, Nakamura Kana, Watanabe Hisami, Mishima-Tsumagari Chiemi, Tanaka Akiko, Hashizume Yoshinobu, Honma Teruki, Katagiri Takenobu, Miyazono Kohei, Tomoda Hiroshi, Shirouzu Mikako, Koyama Hiroo	4. 巻 38
2. 論文標題 Novel bicyclic pyrazoles as potent ALK2 (R206H) inhibitors for the treatment of fibrodysplasia ossificans progressiva	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127858 ~ 127858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.127858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto Sho, Kuratani Mai, Katagiri Takenobu	4. 巻 137
2. 論文標題 Functional characterization of a unique mutant of ALK2, p.K400E, that is associated with a skeletal disorder, diffuse idiopathic skeletal hyperostosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115410 ~ 115410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115410	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka Masaru, Tsukamoto Sho, Orihara Yuta, Kawamura Rieko, Kuratani Mai, Haga Nobuhiko, Ikebuchi Kenji, Katagiri Takenobu	4. 巻 138
2. 論文標題 Design of primers for direct sequencing of nine coding exons in the human ACVR1 gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115469 ~ 115469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Machiya Aiko, Tsukamoto Sho, Ohte Satoshi, Kuratani Mai, Suda Naoto, Katagiri Takenobu	4. 巻 137
2. 論文標題 Smad4-dependent transforming growth factor- family signaling regulates the differentiation of dental epithelial cells in adult mouse incisors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115456 ~ 115456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jimi Eijiro, Katagiri Takenobu	4. 巻 23
2. 論文標題 Critical Roles of NF- B Signaling Molecules in Bone Metabolism Revealed by Genetic Mutations in Osteopetrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7995 ~ 7995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katagiri Takenobu, Tsukamoto Sho, Kuratani Mai, Tsuji Shinnosuke, Nakamura Kensuke, Ohte Satoshi, Kawaguchi Yoshiro, Takaishi Kiyosumi	4. 巻 14
2. 論文標題 A blocking monoclonal antibody reveals dimerization of intracellular domains of ALK2 associated with genetic disorders	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-38746-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 片桐岳信、塚本翔、倉谷麻衣、福田枝里子	4. 巻 81
2. 論文標題 進行性骨化性線維異形成症	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本臨床増刊号 最新の骨粗鬆症学	6. 最初と最後の頁 621 - 626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 齧歯類変異型ALK2遺伝子を有する齧歯類	発明者 片桐岳信、塚本翔、 倉谷麻衣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-162653	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 モデル動物及びその製造方法、並びに石灰化剤	発明者 片桐岳信、塚本翔、 倉谷麻衣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-141591	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>埼玉医科大学 医学部 ゲノム基礎医学 http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biomedsci/index.html</p> <p>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/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	自見 英治郎 (Jimi Eijiro) (40276598)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	浅見 行弘 (Asami Yukihiro) (70391844)	北里大学・感染制御科学府・教授 (32607)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協 力 者	塚本 翔 (Tsukamoto Sho)		
研究 協 力 者	倉谷 麻衣 (Kuratani Mai)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関