

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861208

研究課題名(和文) 新たな異所性骨形成モデルの確立と骨化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Establishment of novel animal model of ectopic bone formation

研究代表者

大澤 賢次(Osawa, Kenji)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70638238

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)：マウスの後肢骨格筋に対して、Cardiotoxin (CTX)を注入して筋損傷を誘発した群と筋損傷を誘発しない群の2群に分け、超音波遺伝子導入法により緑色蛍光タンパク(GFP)発現プラスミドベクターを導入し、導入効率を蛍光顕微鏡にて評価した。筋損傷を誘発した群ではGFPの発現が上昇していた。つぎに、ヒト骨形成因子(BMP2)発現プラスミドベクターを導入したところ、筋損傷を誘発した群では、異所性骨の形成がより顕著に確認された。以上の結果から、本方法はBMPによる骨誘導のメカニズムや生体内での骨形成の解析に有用となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic proteins (BMPs) induce heterotypic bone formation in soft tissues, such as skeletal muscle, and induce osteoblastic differentiation of myoblasts in vitro. We attempted to establish an in vivo experimental model for heterotypic bone formation using ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation). A mixture of BMP-encoding plasmid vector and a micro bubble echo-contrast agent was injected to the gastrocnemius muscle of mice, and ultrasound irradiation was performed at the injection site. Radiopacity was observed in the BMP transfection site and heterotypic endochondral ossification was observed in the muscle tissue, indicating that local expression of BMP could induce the heterotypic ossification. Moreover, bone formation could be enhanced by cardiotoxin (CTX) injection before sonoporation. This model may be a useful tool to clarify mechanisms of BMP-induced bone formation in vivo.

研究分野：口腔内科学

キーワード：骨形成 骨形成因子(BMP) 超音波遺伝子導入 骨誘導

1. 研究開始当初の背景

BMP は、骨形成を誘導する重要な因子である。申請者のグループでは、約 20 年前に、BMP が筋芽細胞株 C2C12 の筋管細胞への分化を抑制する一方で、骨芽細胞様細胞への分化を誘導することを示した(Katagiri et al., J Cell Biol, 1994)。BMP 細胞内シグナルは、細胞膜上の型および型の膜貫通型セリン・スレオニンキナーゼ受容体によって伝達される。型受容体は、型受容体をリン酸化し、リン酸化によって活性化された型受容体は、さらに下流の転写因子 Smad1/5/8 をリン酸化することで骨形成に関わる遺伝子の転写が調節される。申請者らのグループでは、C2C12 細胞に活性型変異を導入した BMP の I 型受容体や Smad を過剰発現させると、骨芽細胞様細胞へ分化誘導されることを明らかにした(Akiyama et al., Exp Cell Res., 1997; Nojima et al., J Biol Chem., 2010)。これらの結果は、BMP が I 型受容体と Smad を介して骨形成を誘導することを示唆する。FOP は、全身の骨格筋や靭帯、腱における異所性骨形成を特徴とする遺伝子疾患の 1 つで、発症率は 200 万人に 1 人と非常に希で、我が国では現在およそ 60 人の患者が確認されている(Katagiri, J Oral Biosci., 2012)。FOP 症例では、筋組織が損傷を受けるとその部位で急激に骨形成が進行するため、異所性骨の外科的除去、生検、筋肉注射といった医療行為は禁忌とされる。こうした背景から、FOP は in vivo の解析が困難で、発症機序などは長らく不明であった。

2006 年、家族性 FOP の連鎖解析から、BMP の型受容体である ALK2 が責任遺伝子であることが判明し(Shore et al., Nat Genet, 2006)、これまでに、FOP 患者から 11 種類の ALK2 変異体が同定されている。申請者の研究グループでは、FOP の変異 ALK2 がいずれも機能獲得型変異体であることを見いだした(Fukuda et al., Biochem Biophys Res Commun., 2008; Fukuda et al., J Biol Chem, 2009; Ohte et al., Biochem Biophys Res Commun., 2011)。我々は、C2C12 細胞を用いた実験から、FOP の ALK2 変異体が BMP の型受容体キナーゼによってリン酸化されやすく、下流の Smad1/5/8 が活性化されることが異所性骨化の機序である可能性を見いだした。

申請者は、これまで in vivo における BMP 遺伝子導入法による骨誘導を研究してきた(Osawa et al., J. Gene Med., 2009; Osawa et al., J. Gene Med., 2010)。中でもソノポレーションは、ウイルスベクターよりも構築の容易なプラスミドベクターを直接組織内に注入し、そこに超音波を照射するシンプルな操作により遺伝子導入が可能で、目的分子の活性を簡便に生体内で評価できる。ソノポレーションを応用することで、BMP リガンドだけでなく、BMP 受容体や Smad の遺伝子を骨格筋内に導入すれば、in vivo で骨組織の

形成におけるさまざまな情報伝達分子の役割を、経時的・空間的に評価することが可能と考えた。

2. 研究の目的

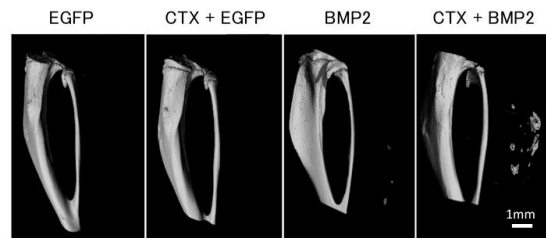
上記の背景をもとに、本研究ではソノポレーションを応用した新しいモデル実験系の確立による筋組織における異所性骨化の分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウスの下腿骨格筋に対して、ソノポレーションにより FOP で見出された変異 BMP 受容体 (ALK2) の遺伝子導入を行い、経時的に 4 週間までの骨誘導活性を評価する。我々はこれまでに C2C12 細胞を用いて、変異 ALK2 の活性化には BMP の II 型受容体によるリン酸化が重要な事を見出した。そこで、変異 ALK2 と II 型受容体を共発現させて、in vivo の骨誘導について検討する。また、我々が同定した II 型受容体によるリン酸化部位 (Thr203) を変異させた変異 ALK2 を用いて、骨誘導活性における II 型受容体によるリン酸化の重要性も検討する。骨誘導は、筋組織の X 線、マイクロ CT 撮影、組織標本、Realtime RT-PCR や、Western Blotting などにより評価する。受容体の共発現で骨誘導が認められない場合、ALK2 のリガンドとなる BMP7 遺伝子の共発現や、筋損傷を誘発するヘビ毒投与の併用などを検討する。

4. 研究成果

野生型マウスの後肢骨格筋に対して、骨形成因子である BMP2 発現ベクターを用いた骨誘導実験では pCAGGS-BMP2 ベクターを用いた群で骨形成を誘導できた。一方、pcDEF3-BMP2 ベクターを用いた群では骨形成が誘導できなかった。また蛍光タンパク (GFP) 発現ベクターを用いた実験では、pCAGGS-GFP を用いた群では対象の筋組織に GFP の発現が確認できたが、pcDEF3 ベクターを用いた群では、微弱な GFP の発現に止まった。



(uCT)

次に、野生型マウス後肢骨格筋に対して、ヘビ毒(Cardiotoxin)を注入して筋損傷を誘発した群と筋損傷を誘発しない群の 2 群に分け、それぞれ超音波遺伝子導入法により緑色蛍光タンパク (GFP) 発現プラスミドベクターを導入し、導入効率を蛍光顕微鏡にて評価したところ、筋損傷を誘発した群では筋損傷を誘発しない群と比較して、GFP の発現が上

昇していた。同様の実験系において、BMP2 発現ベクターを導入したところ、筋損傷を誘発した群では筋損傷を誘発しない群と比較して、筋組織内における異所性骨の形成量が顕著に増加した(図)。

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 6 件)

Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Machiya A, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T. Smad9 is a new type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. *Sci Rep*. 2014 Dec 23;4:7596. doi: 10.1038/srep07596.

Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Machiya A, Okuda A, Suda N, **Katagiri T**. Establishment of a novel model of chondrogenesis using murine embryonic stem cells carrying fibrodysplasia ossificans progressiva associated mutant ALK2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 12;455(3-4):347-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.012.

Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Suda N, Katagiri T. Mutant activin-like kinase 2 in fibrodysplasia ossificans progressiva are activated via T203 by BMP type II receptors. *Mol Endocrinol*. 2015 Jan;29(1):140-52.

Tada Y, Kokabu S, Sugiyama G, Nakatomi C, Aoki K, Fukushima H, Osawa K, Sugamori Y, Ohya K, Okamoto M, Fujikawa T, Itai A, Matsuo K, Watanabe S, Jimi E. The novel I B kinase inhibitor IMD-0560 prevents bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014 Dec 15;5(23):12317-30.

Nakao K, Osawa K, Yasoda A, Yamanaka S, Fujii T, Kondo E, Koyama N, Kanamoto N, Miura M, Kuwahara K, Akiyama H, Bessho K, Nakao K. The Local CNP/GC-B system in growth plate is responsible for physiological endochondral bone growth. *Sci Rep*. 2015 May 27;5:10554. doi: 10.1038/srep10554.

Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M, Yamanaka S, Okubo Y, Fujimura K, Bessho K. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Jan;45(1):124-31. doi: 10.1016/j.ijom.2015.06.022.

[学会発表](計 1 件)

Osawa K, Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Miyamoto A, Katagiri T.

Establishment of a new in vivo experimental model for heterotopic bone formation in skeletal muscle. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier. 2014 年 10 月, 埼玉県日高市.

Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Mizuta T, Osawa K, Tsukamoto S, Miyamoto A, Okuda A, Suda N, Katagiri T.

Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells carrying an active form of ALK2. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier. 2014 年 10 月, 埼玉県日高市.

Miyamoto A, Osawa K, Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Katagiri T.

Establishment of a new model of chondrogenesis using skeletal muscle cells. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier. 2014 年 10 月, 埼玉県日高市.

Mizuta T, Tsukamoto S, Fujimoto M, Miyamoto A, Osawa K, Katagiri T.

Establishment of a new luciferase reporter plasmid for monitoring intracellular signaling of non-osteogenic members of the TGF- family. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier. 2014 年 10 月, 埼玉県日高市.

Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T. Chondrogenic differentiation of murine Smad 9 is a new type of transcriptional repressor in BMP signaling. The 12th RCGM International Symposium of Academic Frontier. 2014 年 10 月, 埼玉県日高市.

[図書](計 2 件)

Katagiri T, Tsukamoto S, Osawa K, Kokabu S. *A Tissue Regeneration Approach to Bone and Cartilage Repair*. Springer International Publishing. 2014.

片桐岳信, 塚本翔, 大澤賢次. *骨代謝-つくり、壊し、変える-そのメカニズムと最新治療*. 羊土社. 2014.

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 骨形成抑制剤

発明者: 片桐岳信

権利者: 大澤賢次、塚本翔

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/052602

出願年月日: 平成 28 年 1 月 29 日

国内外の別: 国内

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

大澤 賢次 (OSAWA, Kenji)
九州歯科大学 歯学部・助教
研究者番号：70638238

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：