別紙 1

国内の FOP 患者で見いだされた新しい ALK2 変異に関する研究

研究分担者　片桐岳信　埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病態生理部門　教授
研究分担者　芳賀信彦　東京大学大学院医学系研究科リハビリテーション医学　教授
研究協力者　福田　亨　埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病態生理部門　助教

研究要旨　2008 年、臨床症状が従来の FOP と異なる国内の FOP 患者から、新しい ALK2 の Gly356Asp 変異が見いだされた。従来の変異 ALK2 と新しい変異体を生化学的に比較検討し、FOP の臨床症状と ALK2 が誘導する細胞内シグナルの関連を検討した。その結果、FOP における筋組織内における異所性骨化は、変異 ALK2 によって誘導される Smad1/5/8 のリン酸化レベルと相関する可能性が示唆された。

A. 研究目的

進行性骨化性線維異形成症(Fibrodysplasia ossificans progressiva, FOP)は、主に筋組織の中で異所性骨化が進行する遺伝性疾患である。常染色体優性遺伝を示し、2006 年、2番染色体上の ACVR1/ALK2 遺伝子に家族性および孤発性 FOP に共通の、617G>A ヘテロ接合変異が同定された。

この遺伝子変異は、骨形成に重要なサイトカインとして知られる Bone morphogenetic protein (BMP)受容体の一種である ALK2 の仮性制御領域に位置し、Arg206 を His に変異させる。我々は、この変異 ALK2(R206H)が、リガンド非依存的に活性化された構成的活性型変異受容体であることを見いだした。

2008 年、国内の FOP 患者から新しい ALK2 の変異として G356D が見いだされた。この患者は、筋組織における異所性骨化の進行が極めて遅く、また、足の指が左右対称性に欠失するなど、従来の FOP 患者と異なる臨床症状を呈した。そこで、培養細胞を用いて、ALK2 の変異部位と FOP の臨床症状の関連を解析した。

B. 研究方法

FOP 患者から見いだされた R206H および G356D 変異 ALK2 の発現ベクターを構築した。これらを、Smad1 と共にマウス筋芽細胞(C2C12 細胞)に過剰発現させ、細胞内シグナルおよび細胞分化に対する影響を検討した。リガンド存在下での活性を検討するため、ALK2 を過剰発現させた細胞を、BMP-4 または BMP-7 で刺激した。BMP 受容体の特異的阻害剤として報告されている Dosromorphin による ALK2 の阻害効果を検討した。

C. 研究結果

BMP シグナルのレポーター遺伝子として、ID1 遺伝子の BMP 応答領域を組み込んだ IdWT4F-luc を用いて、変異 ALK2 の活性を検討した。新しく見いだされた ALK2(G356D)変異体はレポーターを活性化したが、従来から FOP で知られている ALK2(R206H)や、構成的仮性型変異として知られている ALK2(Q207D)変異体よりも活性が弱かった(図1A)。一方、BMP シグナル以外の経路として、TGF-βシグナルを CAGA-luc レポーターを用いて検討したが、いずれの ALK2 変異体も活性化しなかった(図2B)。

さらに、ウエスタンブロット法で ALK2 変異体

による細胞内シグナルの活性化を検討した。BMP 受容体の基質となる Smad1 のリン酸化は、G356D < R206H < Q207D の順で誘導されたが、ERK1/2 や p38 MAP キナーゼのリン酸化は誘導されなかった(図 1C)。

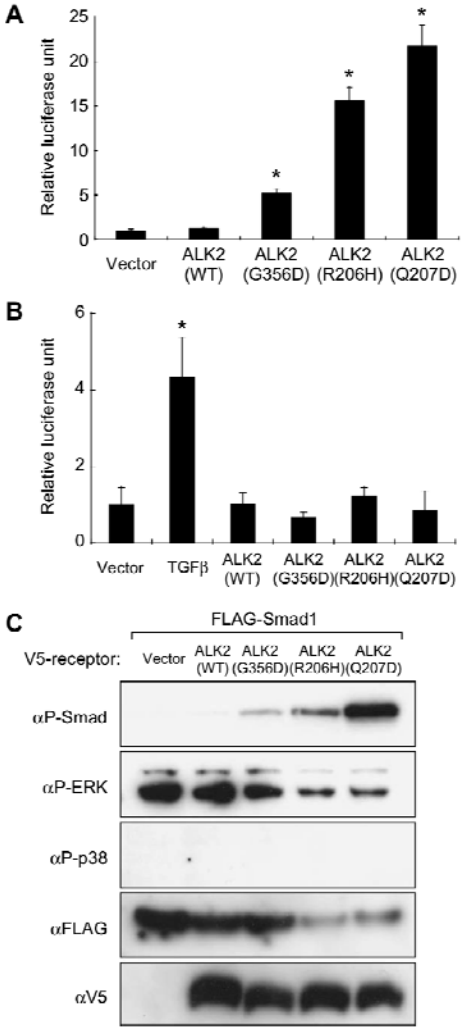

図 1. ALK2 変異体による細胞内シグナルの活性化

ALK2 変異体の筋分化に対する影響を検討したところ、G356D < R206H < Q207D の順でミオシン重鎖陽性の筋細胞への分化を抑制した(図 2A)。骨芽細胞の分化マーカとなるアルカリホスファターゼ(ALP)活性も、Smad1/5/8 との発現で ALK2(G356D)により有意に誘導されたが、その ALP 活性は ALK2(R206H)や ALK2(Q207D)によって誘導されたものよりも弱かった(図 2B)。ALK2(G356D)は、ALK2(R206H)と同様にリガンド存在下で ALKP 活性を誘導し、特に BMP-7 と相乗的に ALP 活性を誘導した(図 2C)。

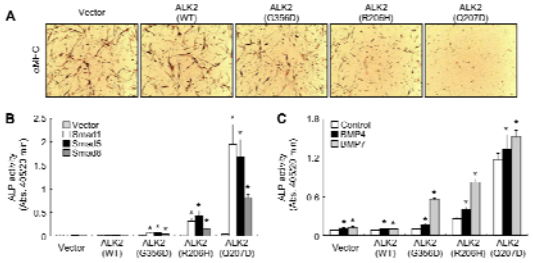

図 2. ALK2 変異体の筋分化および骨芽細胞分化に対する影響

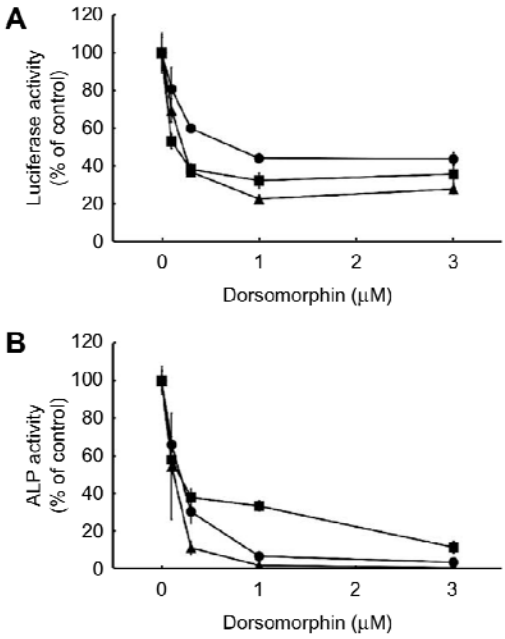

図 3. Dorsomorphin による ALK2 変異体の抑制

ALK2(G356D)に対する BMP 受容体阻害剤 Dorsomorphin の効果を検討した。Dorsomorphin は、ALK2(R206H) や ALK2(Q207D)の場合と同様に、ALK2(G356D)

変異体が誘導するIdWT4F-lucやALP活性を濃度依存的に抑制した(図3)。

D. 考察

これまでに、国内のFOP症例の遺伝的変異として ALK2(R206H)のみが知られていた。最近、新しいALK2の変異として、臨床症状がやや異なるFOP症例から、ALK2(G356D)変異が見いだされた。本症例は、特に母趾が欠失する点では従来の FOP よりも重篤な症例とも考えられるが、その一方で筋組織内での異所性骨化の進展は極めて遅い特徴を併せ持つ。そこで、これらの症状の機序を解明する目的で、変異ALK2をin vitroで生化学的に解析した。

ALK2(G356D)は、BMPのレポーター遺伝子を活性化すると共に、筋分化を抑制し、骨芽細胞分化を誘導したことから、従来の R206H 変異と同様に構成的活性型であることが明らかとなった。しかし、その活性は R206H や Q207D 変異体に比べて極めて弱いことが判明した。これらの活性は、BMP 受容体の細胞内基質である転写調節因子 Smad1 のリン酸化レベルと良く相関していた。従って、ALK2(G356D)変異体による異所性骨化は、受容体の構成的活性によるもので、本症例の進行が遅いことは、受容体のキナーゼ活性が弱いためと考えられた。

一方、母趾の欠失のように、G356D 変異の方が重篤な症状を呈する原因は、Smad1/5/8リン酸化とは別の機序によると推測された。そこで、ALK2(G356D)が Smad1/5/8 ではなく、一般的にTGF-β受容体の基質と考えられているSmad2/3を活性化するか否かを検討した。しかし、CAGA-luc の活性化は認められず、Smad以外のERK1/2やp38 MAPキナーゼの活性化も認められなかった。現時点で G356D による母趾の欠失機序は明らかでないが、今後、タンパクの安定性や細胞内局在の変化などを検討する必要があると思われる。

従来のALK2(R206H)によるFOP症例と、今回見いだされたALK2(G356D)による症例の特徴から、ALK2 には少なくとも2つの働きがあることが推察される。すなわち、1つは胎生期における手足の指の形成制御であり、もう1つはFOP における筋組織での異所性骨形成の誘導である。本研究により、少なくとも後者の作用は、細胞内の Smad1/5/8 のリン酸化を介した作用であることが示唆され、このシグナル計の阻害剤である Dorsomorphin のような薬剤が有効であることが示された。

E. 結論

FOPは、ALP2の変異によって起こる疾患であり、変異部位の違いにより誘導される細胞内シグナルの量的・質的さにより、症状に差が認められる可能性がある。

F. 研究発表

1.論文発表

1) Fukuda T, Kanomata K, Nojima J, Kokabu S, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Komori T, Maruki Y, Matsuoka M, Miyazono K, Nakayama K, Nanba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Haga N, Furuya H, and Katagiri T. (2008) A unique mutation of ALK2, G356D, found in a patient with fibrodysplasia ossificans progressiva is a moderately activated BMP type I receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 37: 905-909.

2) Kaplan FS, Shen Q, Lounev V, Seemann P, Groppe J, Katagiri T, Pignolo RJ, and Shore EM. (2008) Skeletal Metamorphosis in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Metab* 26: 521-530.

3) The International Clinical Consortium on FOP, (Katagiri T, contributing member). The Medical Management of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: Current Treatment Considerations. *Clin Proc Intl Clin Consort FOP* 3 (1):1-82, 2008.

4) Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, Nojima J, Nakamura A, Kamizono J, Noguchi Y, Iwakiri K, Kondo T, Kurose J, Endo K, Awakura T, Fukushi J, Nakashima Y, Chiyonobu T, Kawara A, Nishida Y, Wada I, Akita M, Komori T, Nakayama K, Nanba A, Maruki Y, Yoda T, Tomoda H, Yu PB, Shore EM, Kaplan FS, Miyazono K, Matsuoka M, Ikebuchi K, Ohtake A, Oda H, Jimi E, Owan I, Okazaki Y, and Katagiri T. (2008) Constitutively activated ALK-2 and increased Smad1/5 cooperatively induce BMP signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem*, in press.

5) Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, Bouxsein ML, Hong DW, McManus PM, Katagiri T, Sachidanandan C, Kamiya N, Fukuda T, Mishina Y, Peterson RT, and Bloch KD. (2008) BMP type I receptor inhibition prevents ectopic ossification in a mouse model of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Med* 14: 1363-1369.

2.学会発表

1) 大竹　明、織田弘美、池淵研二、片桐岳信、岡崎康司：進行性骨化性線維異形成症（Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: FOP）の５症例. 第2回埼玉北西部骨代謝研究会

2) 大竹　明、織田弘美、池淵研二、片桐岳信、岡崎康司：進行性骨化性線維異形成症（Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: FOP）の５症例. 第38回埼玉小児発育障害研究会

3) 野島淳也、古株彰一郎、依田哲也、片桐岳信：筋分化におけるSmad4－E4F1相互作用の役割.　第50回歯科基礎医学会

4) 古株彰一郎、野島淳也、依田哲也、片桐岳信:BMPシグナルにおけるSmad1のリン酸化と脱リン酸化の役割. 第50回歯科基礎医学会学術大会

5) Nojima J, Kanomata K, Fukuda T, Nakamura A, Tsukui T, Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T, Katagiri T.: Dual Roles of Smad Proteins in the Conversion from Myoblasts to Osteoblastic Cells by BMPs. 30th ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) annual meeting

6) 鹿又一洋、福田　亨、野島淳也、中村厚、古株彰一郎、片桐岳信：BMP補助受容体DRAGONはBMPによる骨芽細胞分化を抑制する．第6回RCGMフロンティアシンポジウム

7) 古株彰一郎、野島淳也、福田　亨、鹿又一洋、中村　厚、依田哲也、片桐岳信：R-SmadのホスファターゼPPM1AはSmadの脱リン酸化ではなく分解を促しBMP活性を抑制する．　第6回RCGMフロンティアシンポジウム

8) 野島淳也、鹿又一洋、福田　亨、中村厚、古株彰一郎、岡崎康司、依田哲也、片桐岳信：BMPはSmad4-E4F1を介して筋分化を抑制する．第15回BMP研究会

9) 古株彰一郎、野島淳也、福田　亨、鹿又一洋、依田哲也、片桐岳信：R-SmadのホスファターゼPPM1AによるBMP活性の抑制はSmadの脱リン酸化に依存しない分解を介す．　第15回BMP研究会

10) 野島淳也、鹿又一洋、福田　亨、中村　厚、古株彰一郎，依田哲也、片桐岳信:BMPシグナルは核内のSmad4とE4F1の相互作用によって筋分化を抑制する．第26回日本骨代謝学会学術集会

11) 鹿又一洋、福田　亨、野島淳也、中村　厚、古株彰一郎、片桐岳信：BMP補助受容体DRAGONはBMPによる骨芽細胞分化を抑制する.第26回日本骨代謝学会学術集会

12) 古株彰一郎、野島淳也、福田　亨、鹿又一洋、依田哲也、片桐岳信：SmadのホスファターゼPPM1AはSmadの脱リン酸化ではなく分解を促進してBMPシグナルを抑制する．　第26回日本骨代謝学会学術集会

13) 古株彰一郎、野島淳也、福田　亨、中村　厚、鹿又一洋、依田哲也、片桐岳信：R-SmadのホスファターゼPPM1AによるBMPの活性抑制には脱リン酸化に依存しないSmadの分解が重要である．　第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会（BMB2008）

14) 野島淳也、鹿又一洋、福田　亨、中村　厚、古株彰一郎、岡崎康司、依田哲也、片桐岳信：BMPシグナルはSmad4-E4F1を介して筋分化を制御する．第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会（BMB2008）

15) 片桐岳信：成長に伴い筋が骨化する難病・進行性骨化性線維異形成症．第19回小児成長研究会・教育講演

16) Katagiri T.: Constitutively activated ALK2 and increased Smad1/5 cooperatively induce BMP signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. 7th International Conference on BMPs.

17) Katagiri T.: Constitutively activated ALK2 and increased Smad1/5 cooperatively induce BMP signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. Gordon Research Conference on

Musculoskeletal Biology &
Bioengineering.

18）片桐岳信：全身の骨化を伴う難病：進行性骨化性線維異形成症（FOP）　―発症メカニズムの解明から治療法に向けて-. 第50回歯科基礎医学会・シンポジウム３

19）片桐岳信：難病・進行性骨化性線維異形成症（FOP）研究の進歩.　第６回RCGM国際シンポジウム

20）片桐岳信:進行性骨化性線維異形成症（FOP）研究における最近の進歩.　第15回BMP研究会・教育講演

21）片桐岳信：筋組織が骨化する難病・進行性骨化性線維異形成症（FOP）.　第26回日本骨代謝学会学術集会・ミニシンポジウム9

22）片桐岳信：小児の難病・進行性骨化性線維異形成症（FOP）.　第26回小児代謝性骨疾患研究会・教育講演

G. 知的財産権の出願・登録状況
　該当無し