別紙１

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

FOP の治療を目指した BMP シグナル抑制機構の解析に関する研究

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　進行性骨化性線維異形成症（FOP）は、骨形成を促す受容体タンパク ALK2 の変異によると考えられる。BMP 活性を抑制する分子として、補助受容体と考えられていた DRAGON と、Smad のホスファターゼ PPM1A の作用機序を解析した。DRAGON や PPM1A のような BMP シグナルの抑制因子は、FOP の治療を目指した新しい標的分子になる可能性がある。

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。

すでに我々は、この変異が ALK2 を構成的に活性化することで、骨形成を促進する Bone Morphogenetic Protein (BMP)の細胞内シグナルが活性化されることを見出した。そこで本研究では、FOP の治療法への応用を目指して、ALK2 活性を阻害するシグナルを解析した。

Ｂ．研究方法

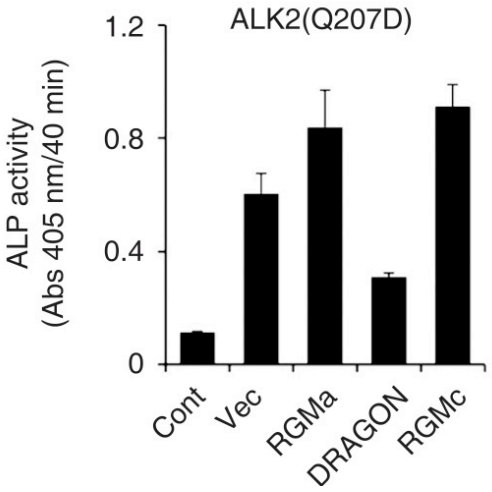
BMP の補助受容体と考えられている DRAGON、及びそのファミリーである RGMa と RGMc をマウス筋芽細胞からクローニングし、発現ベクターを構築した。また、BMP シグナルの中で転写因子 Smad のホスファターゼと報告されている PPM1A も、同様にクローニングして発現ベクターを構築した。

これらを、BMP シグナルで刺激した C2C12 にトランスフェクションし、骨芽細胞分化マーカーとして ALP 活性、BMP シグナルの指標として、BMP 初期応答遺伝子 Id1 のプロモーター・エンハンサーを含むルシフェラーゼレポーター活性を測定した。目的タンパク質は、ウエスタンブロット法、及び免疫染色法で検出した。

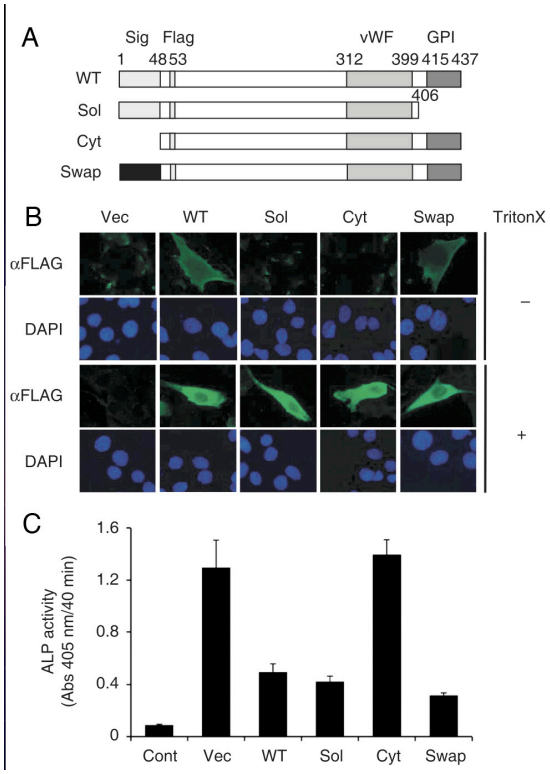
（倫理面での配慮）
なし

Ｃ．研究結果

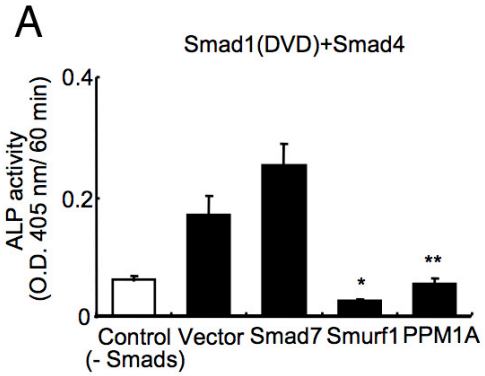
DRAGON は、BMP の構成的活性型受容体である ALK2(Q207D)と共に筋芽細胞で発現させると、ALK2 によって誘導される ALP 活性を抑制した。この作用は DRAGON に特異的で、同じファミリーの RGMa と RGMc には認められなかった（図１）。

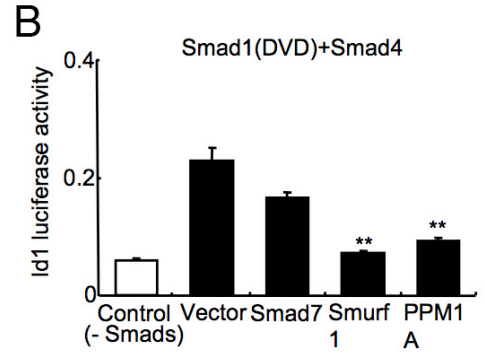


DRAGON による BMP 活性の抑制ドメインを解析したところ、シグナルペプチドを含む分泌型 DRAGON に抑制活性が認められ、他の分泌タンパク質のシグナルペプチドと置換しても、強い抑制活性が認められた（図２）。

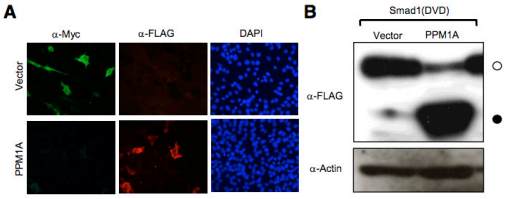


また、Smad のホスファターゼ PPM1A は、抑制に必要と考えられる C 末端の BMP 受容体によるリン酸化部位に変異を導入した Smad1 変異体の活性も抑制した（図３）。





Smad1 と PPM1A を共発現させると、Smad1 の発現量が低下することが、免疫染色法とウエスタンブロット法で確認された（図４）。



D．考察

DRAGON は、BMP の補助受容体として同定された分子で、肝細胞では BMP 活性を促進することが知られている。しかし、本研究の結果、少なくとも筋芽細胞では、DRAGON

によって BMP 活性が強力に抑制されることが判明した。この活性は分泌型 DRAGON に認められることから、細胞外で BMP 受容体等に作用するものと考えられた。

一方、SmadC 末端のホスファターゼとして知られる PPM1A は、予想されるリン酸化部位を持たない Smad1 の活性も強力に阻害した。このとき、Smad1 のタンパク質レベルが減少しており、脱リン酸化反応よりもタンパクの分解亢進が抑制の機序である可能性が考えられた。

DRAGON と PPM1A は、構成的活性型 BMP 受容体を抑制したことから、これらの発現亢進を促すことにより、FOP における BMP シグナルも阻害できる可能性が考えられる。

Ｅ．結論

DRAGON や PPM1A のように構成的活性型 BMP 受容体を阻害する分子は、新しい FOP の治療法の確立に役立つ可能性がある。。

Ｆ．健康危険情報
なし

Ｇ．研究発表

1.論文発表

1) Kanomata K, Kokabu S, Nojima J, Fukuda T and Katagiri T. (2009) DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. ***Genes Cells*** 14:695-702, 2009.

2) Kokabu S, Nojima J, Kanomata K, Ohte S, Yoda T, Fukuda T and Katagiri T. (2010) Protein phosphatase magnesium-dependent 1A-mediated inhibition of BMP signaling is independent of Smad-dephosphorylation. ***J Bone Miner Res***, in press.

3) Shen Q, Little SC, Xu M, Haupt J, Ast C, Katagiri T, Mundlos S, Seemann P, Kaplan FS, Mullins MC and Shore EM. (2009) Fibrodysplasia ossificans progressiva ACVR1 R206H mutation activates ligand-independent and ligand-sensitive chondrogenesis and regulates zebrafish dorso-ventral patterning. ***J Clin Invest*** 119: 3462-3472.

4) Katagiri T. (2010) Heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein signaling: fibrodysplasia ossificans progressiva. ***J Oral Biosci***, in press.

5) 片桐岳信（2009）FOP（進行性骨化性線維異形成症）. **Arthritis**, 印刷中.

6) 片桐岳信（2010）進行性骨化性線維異形成症（FOP）の発症メカニズムの解明と治療法. **日本未熟児新生児学会雑誌**, 印刷中.

7) 片桐岳信（2010）進行性骨化性線維異形成症(FOP)の発症メカニズム. **Clin Nerosci**, 印刷中.

2.学会発表

1) 古株彰一郎、野島淳也、福田亨、大手聡、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 活性の抑制には Smad の脱リン酸化に依存しない分解が重要である． 第 8 回松本ボーンフォーラム

2) 片桐岳信：筋肉が骨になる難病・進行性骨化性線維異形成症（FOP）．第 20 回電顕サマースクール

3) 福田亨、古株彰一郎、大手聡、片桐岳信：筋組織内に異所性骨化を生じる遺伝性難病 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva)． 運動器科学研究会

4) 片桐岳信：筋組織における異所性骨化の機序解明と治療への応用． 第 7 回 RCGM フロンティアシンポジウム

5) 片桐岳信：筋肉が骨になる難病・進行性骨化性線維異形成症（FOP）．九州歯科大学 最新生命科学

6) 片桐岳信：「難病・進行性骨化性繊維異形成症（FOP）の研究者から」． FOP 講演会

7) Katagiri T.: Roles of Smad pathways in the conversion of myoblasts to osteoblastic cells by BMPs. Gordon Research Conference on Bones & Teeth

8) 古株彰一郎、大手聡、野島淳也、依田哲也、福田亨、片桐岳信：Smad C 末端のホスファターゼ PPM1A と SCP1 はリンカー領域の MAPK リン酸化部位を介して BMP シグナルを抑制する．第 27 回日本骨代謝学会学術集会

9) 福田亨、古株彰一郎、大手聡、片桐岳信 : Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) で同定された ALK2 変異体の解析．第 27 回日本骨代謝学会学術集会

10) 古株彰一郎、大手聡、福田亨、片桐岳信：Smad1 のリン酸化・脱リン酸化による骨芽細胞分化誘導の制御．第 16 回 BMP 研究会

11) 福田亨、古株彰一郎、大手聡、片桐岳信 : Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) で新たに同定された ALK2 変異体の解析．第 16 回 BMP 研究会

12) 片桐岳信、古株彰一郎、依田哲也：Smad1 のリン酸化・脱リン酸化による骨芽細胞分化誘導の制御． 第 51 回歯科基礎医学会学術集会・総会

13) 片桐岳信：BMP の Smad 依存的シグナルによる筋芽細胞分化の抑制機構． 第 64 回日本体力医学会大会

14) Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Katagiri T.: Functional Analysis of Mutant ALK2 Receptors Found in Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). 31st ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) annual meeting

15) Kokabu S, Ohte S, Nojima J,

Kanomata K, Yoda T, Katagiri T.: PPM1A and SCP1 suppress BMP activity via novel mechanism independent of Smad C-terminal dephosphorylation. 31st ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) annual meeting

16) 大手聡、福田亨、古株彰一郎、片桐岳信：骨芽細胞における Smad と Runx2 のクロストーク. 第 7 回 RCGM フロンティアシンポジウム

17) 古株彰一郎、大手聡、依田哲也、福田亨、片桐岳信：Smad1 の骨芽細胞分化誘導活性は C 末端とリンカー領域のリン酸化により制御される. 第 7 回 RCGM フロンティアシンポジウム

18) 塚本翔、佐藤康敬、鍋島麻子、大手聡、古株彰一郎、福田亨、片桐岳信：進行性骨化性線維異形成症 (FOP) で同定された ALK2 変異体の安定発現細胞の樹立. 第 7 回 RCGM フロンティアシンポジウム

19) 福田亨、古株彰一郎、大手聡、片桐岳信：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)で同定された 10 種類の ALK2 変異体の機能解析. 第 7 回 RCGM フロンティアシンポジウム

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1.特許取得
なし

2.実用新案登録
なし

3.その他
なし