

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 大手 聡 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 ALK2 の構成的活性型変異によると考えられる。BMP の細胞内情報伝達系を抑制する分子として、受容体がリン酸化する転写因子 Smad の脱リン酸化反応を触媒すると考えられている SCP1 の作用機序を解析した。SCP1 の標的は Smad の下流因子であり、本因子は 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、2006 年、2番染色体上の BMP 受容体をコードする ACVR1/ALK2 が責任遺伝子として同定された。これまでに我々は、国内 FOP 症例の 1 例を除く全ての症例が ALK2 タンパク質の 206Arg が His 残基に変異した典型的変異を有することを報告し、さらに、この変異体がリガンド非依存的に細胞内情報伝達系を活性化する構成的活性型であることを明らかにした。そこで本研究では、FOP の治療法への応用を目指して、BMP 活性を阻害するシグナルとして、ALK2 がリン酸化する転写因子の脱リン酸化反応を触媒することが報告されたホスファターゼ SCP1 の作用機序を解析した。

B. 研究方法

マウス SCP1 の発現は、各臓器から調整した cDNA を用いてリアルタイム PCR 法で定量化した。SCP1 cDNA は、マウス筋芽細胞 C2C12 からクローニングし、発現ベクターを構築した。C2C12 細胞の BMP シグナルを活性化するために、リコンビナント BMP-4

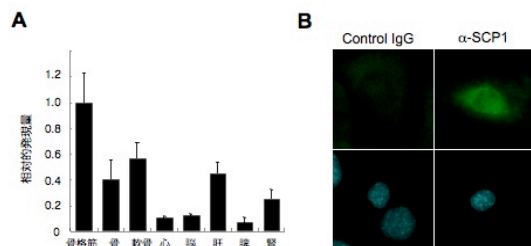
処理の他に、構成的活性型 BMP 受容体（BMPR-IAca、構成的活性型転写因子 Smad1（Smad1 (DVD)）の過剰発現を行った。BMP シグナルは、骨芽細胞の分化マーカーとしてアルカリホスファターゼ（ALP）活性、BMP 初期応答遺伝子の Smad 結合配列を含むルシフェラーゼレポーターアッセイで定量化した。さらに、Smad のリン酸化レベルや目的タンパク質の細胞内局在は、ウエスタンブロット法や免疫染色法で検出した。

（倫理面での配慮）

なし。

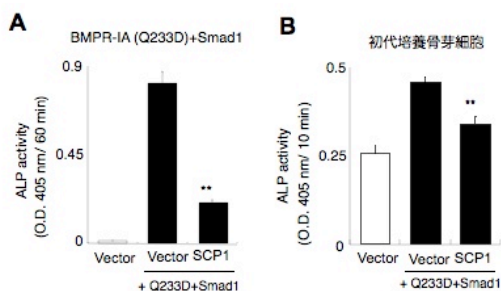
C. 研究結果

マウス SCP1 mRNA の発現量は、検討した臓器の中で特に骨格筋が高かった（図 1 A）。C2C12 における SCP1 タンパク質は、細胞質内の核周囲に局在した（図 1 B）。

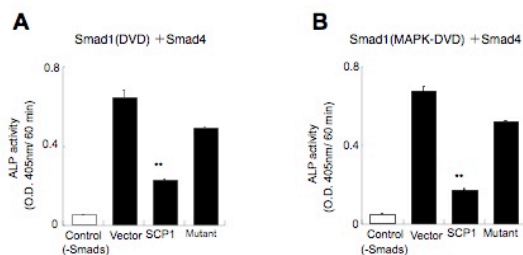


D. 考察

従来の報告のように、SCP1 は BMP-4 処理、または構成的活性型 BMP 受容体によって誘導される ALP 活性を抑制した(図 2A、未発表)。この SCP1 による BMP シグナルの抑制活性は、C2C12 細胞のみならず初代培養骨芽細胞でも認められた(図 2B)。



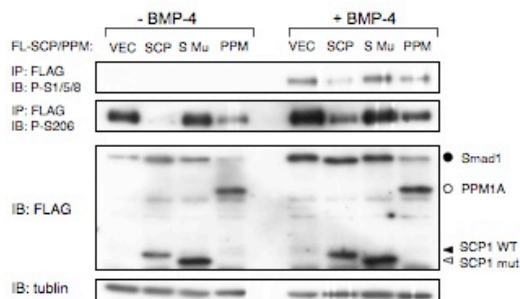
SCP1 による BMP の抑制作用が Smad の脱リン酸化によるか否かを検討するために、我々が樹立した構成的活性型 Smad1 (Smad1 (DVD)) に対する効果を検討した。この Smad1 は、末端のアミノ酸置換により活性化状態のリン酸化 Smad と同様の構造を取り、リン酸化を受けなくとも BMP 活性を示す。図 3A に示すように、SCP1 はこの構成的活性型 Smad1 の活性も抑制した。



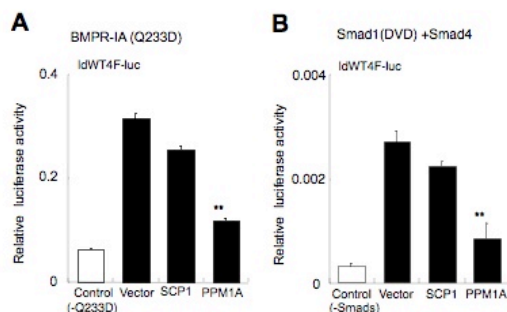
さらに、SCP1 の抑制作用が Smad1 のリンカー領域の脱リン酸化作用を介したものであるか否かを検討するために、Smad1 (DVD) のリンカー領域内の 4 カ所のリン酸化部位に変異を導入した Smad1 (MAPK-DVD) 変異体への効果を検討した。その結果、SCP1 はこのリンカー領域のリン酸化部位を持たない変異体の活性も抑制することが判明した

(図 3B)。

これまでに我々は、別の Smad ホスファターゼである PPM1A が、Smad の分解を促して BMP-4 活性を抑制することを報告した。そこで、SCP1 の Smad レベルに対する作用をウエスタンブロット法で解析した。すると、SCP1 は PPM1A とは異なり、Smad1 のタンパクレベルを減少させないことが判明した(図 4)。

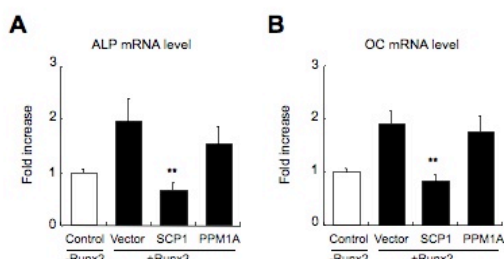


SCP1 と PPM1A の作用を比較するため、Smad1 の標的遺伝子である Id1 プロモーター・エンハンサーを組み込んだ瑠ルシフェラーゼレポーターに対する作用を検討した。すると、PPM1A は構成的活性型 BMP 受容体や構成的活性型 Smad1 が誘導するレポーター活性を抑制したのに対し、SCP1 はこれらの活性を殆ど抑制しなかった(図 5)。



SCP1 の作用機序を明らかにするため、BMP シグナルによる骨芽細胞分化の中で、

Smad のさらに下流で働く転写因子 Runx2 に対する SCP1 の作用を検討した。すると、SCP1 は、Runx2 が誘導する ALP やオステオカルシンの発現も抑制することが判明した (図 6)。



E. 結論

以上のように、ホスファターゼの 1 種である SCP1 は、BMP 受容体の活性化による骨芽細胞分化を抑制した。しかし、この作用機序は、受容体によってリン酸化される Smad の脱リン酸化を促すのではなく、Runx2 またはさらに下流で骨芽細胞分化に働く転写因子を標的とすることが判明した。これは、従来の仮説であるホスファターゼが Smad の脱リン酸化によって BMP 活性を阻害することを否定すると共に、BMP シグナルによって誘導される骨芽細胞分化における新しい重要な転写因子の存在を示唆する。今後の研究により、SCP1 の標的分子が明らかとなれば、BMP が誘導する骨形成の分子メカニズムが明らかになると共に、FOP の新しい治療標的となる可能性が期待できる。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H,

Murata E, Kanomata K, Nojima J, Ono Y, Yoda T, Fukuda T, and Katagiri T. (2011) Suppression of BMP-Smad axis-induced osteoblastic differentiation by small C-terminal domain phosphatase 1, a Smad phosphatase. *Molec Endocrinol*, in press.

2) Ono Y, Calbaheu F, Morgan JE, Katagiri T, Amthor H, and Zammit PS. (2011) BMP signaling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells. *Cell Death Differ*, in press.

3) Tokuzawa Y, Yagi K, Yamashita Y, Nakachi Y, Nikaido I, Bono H, Ninomiya Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Akita M, Motegi H, Wakana S, Noda T, Sablitzky F, Arai S, Kurokawa R, Fukuda T, Katagiri T, Schonbach C, Suda T, Mizuno Y, and Okazaki Y. (2010) Id4, a new candidate gene for senile osteoporosis acts as a molecular switch promoting osteoblast differentiation. *PLoS Genet* 6:e1001019.

4) Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Kanomata K, Yoneyama K, Kato H, Akita M, Oda H, and Katagiri T. (2010) Canonical Wnts and BMPs cooperatively induce osteoblastic differentiation through a GSK3b-dependent but a b-catenin-independent

mechanism. *Differentiation* 80:46-52.

5) Nojima J, Kanomata K, Takada Y, Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Takada T, Tsukui T, Yamamoto TS, Sasanuma H, Yoneyama K, Ueno N, Okazaki Y, Kamijo R, Yoda T, and Katagiri T. (2010) Dual roles of Smad proteins in the conversion from myoblasts to osteoblastic cells by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* 285:15577-15586.

6) 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* 25:653-660.

7) 片桐岳信、神菌淳司、中島康晴、鬼頭浩史、須佐美隆史、芳賀信彦 (2010) BMP と進行性骨化性線維異形成症. *クリニカルカルシウム* 20:1510-1517

8) 片桐岳信 (2010) 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) の病態と新規治療薬の開発. *クリニカルカルシウム* 20:1204-1211.

9) 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 Neurosci* 28:480-481.

10) 松崎 哲、片桐岳信、松崎文子、見崎 徹、大竹 明 (2010) 進行性骨化性

線維異形成症の歯科治療について *歯界展望* 115:556-557.

2. 学会発表

1) Katagiri T.: Potentiation of bone morphogenetic protein activity in the extracellular environment. Gordon Research Conference on Signal Transduction by Tissue Engineered Extracellular Matrices. (2010 年 6 月 27-7 月 2 日、米国メイン州)

2) 大手聡、古株彰一郎、福田亨、笹沼寛樹、米山克美、進正史、自見英治郎、片桐岳信：新規 Smad 結合分子 Zranb2 の同定と BMP シグナル阻害因子の解析. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (2010 年 7 月 21 日、東京)

3) 雪田聡、細谷明宏、片桐岳信、中村浩彰：骨芽細胞分化における SUMO 化修飾の役割. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (2010 年 7 月 21 日、東京)

4) 片桐岳信、福田亨、古株彰一郎、大手聡、福島秀文、野島淳也、米山克美、笹沼寛樹、進正史、自見英治郎、豊田宏光、高岡邦夫、小池達也、片桐岳信：血小板第 4 因子は血中の新規 BMP 活性促進因子である. 第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (2010 年 7 月 22 日、東京)

5) 自見英治郎、片桐岳信、永野健一、青木和広、大谷啓一、福島秀文：aly/aly マウスでは BMP による Smad1/5/8 のリン酸化が亢進することで骨形成が亢進する.

第 28 回日本骨代謝学会学術集会 (2010 年 7 月 22 日、東京)

6) Ohte S, Kokabu S, Fukuda T, Iemura S, Sasanuma H, Yoneyama K, Shin M, Jimi E, Natsume T, Katagiri T: Identification and characterization of a nuclear protein as a co-suppressor of BMP-regulated Smads. 8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins (September 15-18, 2010, Leuven, Belgium)

7) Katagiri T, Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Shin M, Yoneyama K, Fukuda T: PPM1A and SCP1, Smad phosphatases, inhibit BMP-induced osteoblastic differentiation by different molecular mechanisms. 8th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins (September 15-18, 2010, Leuven, Belgium)

8) 進正史、福島秀文、吉田弘之、青木和広、Masuda Kahn、大谷啓一、片桐岳信、自見英治郎：航空がん細胞の顎骨浸潤における BMP シグナル活性化の役割。第 52 回歯科基礎医学会学術大会 (2010 年 9 月 21 日、東京)

9) 雪田聡、細谷明宏、片桐岳信、中村浩彰：BMP による分化制御機構における SUMO 化修飾の役割。第 52 回歯科基礎医学会学術大会 (2010 年 9 月 22 日、東京)

10) 片桐岳信、古株彰一郎、進正史：

Smad ホスファターゼに夜冷え誘導性骨芽細胞分化の抑制機序。第 52 回歯科基礎医学会学術大会 (2010 年 9 月 22 日、東京)

11) 妹尾吉訓、福島秀文、片桐岳信、青木和広、永野健一、大谷啓一、細川隆司、自見英治郎：aly/aly マウスにおける骨形成メカニズムの解明。第 52 回歯科基礎医学会学術大会 (2010 年 9 月 22 日、東京)

12) 平田志津、福島秀文、片桐岳信、諸富孝彦、青木和広、永野健一、大谷啓一、北村知昭、寺下正道、自見英治郎：NF- κ B シグナルの抑制は BMP による骨形成を促進する。第 52 回歯科基礎医学会学術大会 (2010 年 9 月 22 日、東京)

13) Katagiri T, Fukuda T, Tomoyasu A, Goto M, Kodaira K, Kokabu S, Ohte S, Kanomata K, Tsukui T, Fukushima H, Serizawa H, Nojima J, Nakamura A, Yoneyama K, Sasanuma H, Shin M, Fujita K, Akita M, Kowalska A, Jimi E, Toyoda H, Takaoka K, Koike T, Higashio K, Suda T: Platelet factor 4 is a novel potentiator of BMP-induced osteoblastic differentiation and bone formation. ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) 2010 annual meeting (October 15-19, 2010, Toronto, Ontario, Canada)

14) Ohte S, Kokabu S, Fukuda T, Iemura S, Sasanuma H, Yoneyama K,

Shin M, Jimi E, Natsume T, Katagiri T: Identification of Zranb2, a novel R-Smads binding protein, as a suppressor of BMP signaling. ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) 2010 annual meeting (October 15-19, 2010, Toronto, Ontario, Canada)

学校法人北里研究所、埼玉医科大学、発明者：供田洋、松田大介、内田龍児、片桐岳信、野中健一、増間碌郎、大村智

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

15) 大手聡、古株彰一郎、家村俊一郎、笹沼寛樹、米山克美、進正史、自見英治郎、夏目徹、福田亨、片桐岳信：新規 Smad 結合分子 Zranb2 は BMP シグナル抑制因子である。第 8 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム (2010 年 11 月 3 日、埼玉)

16) 笹沼寛樹、福田亨、大手聡、古株彰一郎、進正史、米山克美、加藤仁、穂田真澄、織田弘美、片桐岳信：骨芽細胞分化における BMP と Wnt シグナルの相互作用の解明。第 8 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム (2010 年 11 月 3 日、埼玉)

17) 進正史、古株彰一郎、大手聡、米山克美、笹沼寛樹、福田亨、片桐岳信：SCP1 は BMP 誘導性の骨芽細胞分化において Smad の下流因子を抑制する。第 8 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム (2010 年 11 月 3 日、埼玉)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

1) 特願 2010-255134、名称：「骨分化阻害剤およびその製造方法」、特許出願人：