

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
分担研究報告書

FOP における筋損傷に伴う異所性骨化の機序に関する研究

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

研究要旨 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) は、骨形成を促す BMP の I 型受容体 ALK2 の機能獲得型変異によって発症すると考えられる。FOP では、骨格筋組織の損傷が局所的な異所性骨化を誘発する。この機序を解析した結果、筋損傷時に BMP の II 型受容体の発現が増加し、これが変異 ALK2 をリン酸化によって活性化する可能性が示された。

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、ヒト 2 番染色体上の BMP の I 型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、FOP 症例で同定された変異 ALK2 が、リガンド非依存的に BMP の細胞内情報伝達系を活性化する機能獲得型変異であることを報告した。典型的 FOP 症例では、局所的な筋損傷によって急激な異所性骨化が誘発されることが知られている。そこで本研究では、FOP の変異 ALK2 の活性化における筋損傷の役割を検討した。その結果、筋損傷時に発現量の増加する BMP の II 型受容体による ALK2 のリン酸化が、BMP の細胞内情報伝達系の活性化に重要なことが明らかとなった。

B. 研究方法

筋再生は、マウスの前脛骨筋に cardiotoxin を投与して誘導した。投与 3 日後に前頸骨筋を抽出し、常法に従って全 RNA を抽出した後、cDNA に逆転写した。BMP の II 型受容体 (BMPR-II, ActR-II, および

ACTR-IIB) の発現は、SYBR Green 法によるリアルタイム PCR で定量化した。野生型および R206H 変異を導入した ALK2 のリン酸化レベルは、細胞抽出液を Phos-tag を添加した条件下でポリアクリルアミド電気泳動を行い、抗 V5 抗体を用いた Western blot 法で検出される ALK2 の移動度で解析した。ALK2 の活性は、C2C12 細胞におけるアルカリホスファターゼ (ALP) の誘導活性を指標に定量化した。

(倫理面での配慮)

なし。

C. 研究結果

マウスの前頸骨筋に cardiotoxin を投与すると、BMP の II 型受容体 mRNA の発現量が増加した。特に、BMPR-II の発現は、対照の PBS 投与群に比べて有意に増加した (図 1 A)。

発現の増加した BMPR-II の活性を、C2C12 細胞で検討した。BMPR-II 単独、あるいは野生型 ALK2 と共発現してもほとんど ALP 活性を誘導しなかったが、FOP の R206H 変異を有する ALK2 と共発現すると、C2C12 細胞の ALP 活性を相乗的に誘導した (図 1 B)。

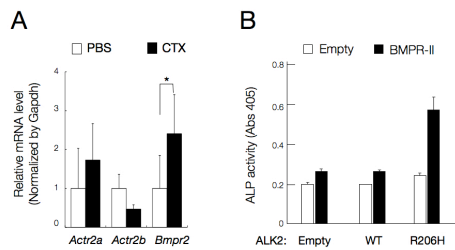


図1. 筋再生時のBMPR-II発現誘導とR206Hの活性化  
(A)リアルタイム・PCR法によるBMPのII型受容体mRNA発現量の解析。(B)BMPR-IIの共発現による、ALK2(R206H)の活性化。

そこで、BMPR-II と ALK2 を共発現させた際の ALK2 のリン酸化レベルを検討した。R206H 変異体は、BMPR-II 非存在下でも野生型よりもリン酸化されていたが、BMPR-II を共発現させると 90%以上がリン酸化された。

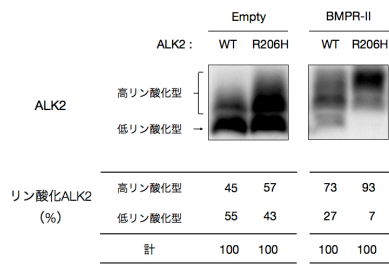


図2. BMPR-IIによるALK2のリン酸化レベルの比較  
BMPR-IIと野生型 (WT) またはR206H変異のALK2を共発現させた。細胞抽出液をPhos-tagを用いたPAGEで分離し、抗V5抗体でALK2を検出した。画像解析ソフトを用いて、高リン酸化型と低リン酸化型ALK2を定量化した。

ALK2 の GS ドメインに存在する 9 カ所のセリンとスレオニン残基を、それぞれアラニンとバリンに置換した変異体 (9AV) を作製し、BMPR-II によるリン酸化をと活性化を検討した。すると、9AV 変異を導入した ALK2 は、R206H 変異を有していても、BMPR-II によるリン酸化をほとんど受けなかった。さらに、この変異体を BMPR-II と C2C12 細胞に共発現しても、ALP 活性の誘導は認められなかった。

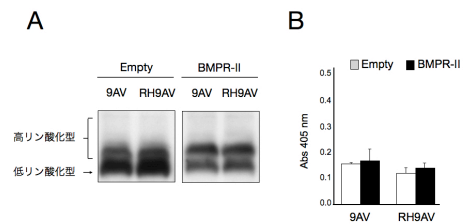


図3. GSドメイン変異体のBMPR-IIによる活性化  
BMPR-IIとGSドメイン変異体 (9AVおよびRH9AV) の共発現による、ALK2のリン酸化レベル (A)とALP誘導活性(B)。

#### D. 考察

FOP 症例では、遺伝的な ALK2 の変異が認められている。これまで、この ALK2 変異体は構成的活性型変異と考えられてきた。しかし、FOP 症例では筋損傷によって局所的な異所性骨化が誘導されることが知られており、遺伝的な ALK2 の変異に加えて、さらに BMP シグナルを活性化する機序の存在が示唆された。

本研究では、マウスの筋再生モデルを用いて BMP の II 型受容体の 1 種である BMPR-II の mRNA レベルが筋損傷後に増加することを見いだした。BMPR-II と FOP の R206H 変異 ALK2 を共発現すると、ALK2 のリン酸化が更新すると共に、ALP の誘導活性が亢進した。一方、ALK2 のリン酸化部位を変異させると、BMPR-II による活性化は消失した。これらの結果は、R206H は II 型受容体によってリン酸化を受けやすい変異体であり、筋損傷によって II 型受容体の発現量が増加することが、FOP の急激な異所性骨化の一因である可能性が示唆する。従来、ALK2 の活性阻害薬が FOP の治療薬として検討されてきたが、II 型受容体の阻害も、新たな FOP 治療薬を提供する可能性が考えられる。

## E. 結論

FOP の R206H 変異 ALK2 は、BMP の II 型受容体によるリン酸化と活性化を受けやすいことが、FOP の異所性骨化の原因である可能性が考えられる。

## 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) Ohte S, Kokabu S, Iemura S, Sasanuma H, Yoneyama K, Shin M, Suzuki S, Fukuda T, Nakamura Y, Jimi E, Natsume T, and Katagiri T. Identification and functional analysis of Zranb2 as a novel Smad-binding protein that suppresses BMP signaling. *J Cell Biochem* 113: 808-814, 2012.
- 2) Takahashi M, Katagiri T, Furuya H, and Hohjo H. Disease-causing allele specific silencing against the ALK2 mutants, R206H and G356D, in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Gene Ther* 19: 781-785, 2012.
- 3) Katagiri T. Recent topics in fibrodysplasia ossificans progressiva. *54*: 119-123, 2012.
- 4) Shin M, Ohte S, Fukuda T, Sasanuma H, Yoneyama K, Kokabu S, Miyamoto A, Tsukamoto S, Hohjoh H, Jimi E and Katagiri T. Identification of a novel BMP-inducible transcript, BIT-1, by utilizing the conserved BMP-responsive elements in the Id genes. *J None Miner Metab*, in press.

5) Yamamoto R, Matsushita M, Kitoh H, Masuda A, Ito M, Katagiri T, Kawai T, Ishiguro N, Ohno K. Clinically applicable antianginal agents suppress osteoblastic transformation of myogenic cell and heterotopic ossification in mice. *J Bone Miner Metab*, in press.

6) 片桐岳信. レチノイン酸受容体- $\gamma$ アゴニストによる異所性骨化の強力な阻害. *Olive* 2: 192-194, 2012.

7) 片桐岳信. BMP シグナルと骨形成・炎症. *Clinical Calcium* 22: 1677-1683, 2012.

7) 片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症 (FOP). *Bone Joint Nerve*, 印刷中.

### 2. 学会発表

- 1) 片桐岳信. 筋肉が骨になるメカニズム. *Clinical Science Forum* (2012年5月19日、東京)
- 2) 片桐岳信. 転写因子 Smad による細胞分化モデルの確立. 第11回松本ボーンフォーラム (2012年5月25日、長野)
- 3) Katagiri T, Tsukamoto S, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Fujimoto M, Sasanuma H and Miyamoto A: Smad-dependent intracellular signaling pathway regulates heterotopic bone formation induced by BMPs in skeletal muscle. *Gordon Research Conference on Muscle: excitation/contraction coupling* (June 3-8, 2012, Les Diablerets, Switzerland)
- 4) 塚本翔、大手聡、米山克美、藤本舞、

進正史、笹沼寛樹、自見英治郎、片桐岳信：BMP 及び TGF- $\beta$  特異的シグナルを伝達する構成的活性型 Smad の解析. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 (2012 年 7 月 19-21 日、東京)

5) 大手聡、藤本舞、米山克美、笹沼寛樹、進正史、塚本翔、福田亨、古株彰一郎、片桐岳信：I 型 BMP 受容体 ALK2 の活性化には II 型 BMP 受容体による GS ドメイン内 Thr203 のリン酸化が必須である. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 (2012 年 7 月 19-21 日、東京)

6) 米山克美、塚本翔、大手聡、笹沼寛樹、進正史、藤本舞、片桐岳信：BMP 受容体 ALK2 の Tet-On 誘導システムによる発現誘導細胞の樹立. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 (2012 年 7 月 19-21 日、東京)

7) 片桐岳信、進正史、大手聡、福田亨、笹沼寛樹、米山克美、古株彰一郎、宮本阿礼、塚本翔、自見英治郎：Id 遺伝子の BMP 応答領域の解析に基づく新規 BMP 応答転写産物の同定. 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 (2012 年 7 月 19-21 日、東京)

8) 大手聡、藤本舞、米山克美、笹沼寛樹、進正史、塚本翔、福田亨、古株彰一郎、片桐岳信：進行性骨化性線維異形成症における変異型 BMP 受容体 ALK2 の活性化機構. 第 19 回 BMP 研究会 (2012 年 7 月 22 日、東京)

9) 塚本翔、大手聡、米山克美、藤本舞、進正史、笹沼寛樹、片桐岳信：BMP の異所性骨化を伝達する細胞内シグナルの解析. 第 19 回 BMP 研究会 (2012 年 7 月 22 日、東京)

10) 藤本舞、須田直人、片桐岳信. 進行

性骨化性線維異形成症から同定された新規 ALK2 変異体の機能解析. 第 54 回歯科基礎医学会 (2012 年 9 月 14-16 日、福島 11) 片桐岳信. 変異型 Smad1/5/8 を用いた BMP 細胞内シグナルの解析. 第 54 回歯科基礎医学会 (2012 年 9 月 14-16 日、福島)

12) Satoshi Ohte, Mai Fujimoto, Katsumi Yoneyama, Hiroki Sasanuma, Masashi Shin, Sho Tsukamoto, Arei Miyamoto, Toru Fukuda, Shoichiro Kokabu, Takenobu Katagiri. Critical Role of ALK2 Phosphorylation at Thr203 in Activation by BMP type II Receptors. American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting (October 12-15, 2012, Minneapolis, Minnesota, USA)

13) Masashi Shin, Satoshi Ohte, Toru Fukuda, Hiroki Sasanuma, Katsumi Yoneyama, Shoichiro Kokabu, Sho Tsukamoto, Hirohiko Hohjoh, Eijiro Jimi, Takenobu Katagiri. Identification of a Novel BMP-inducible Transcript, BIT-1, by Utilizing the Conserved BMP-Responsive Elements in the Id Genes. American Society for Bone and Mineral Research 2012 Annual Meeting (October 12-15, 2012, Minneapolis, Minnesota, USA)

14) Sho Tsukamoto, Satoshi Ohte, Katsumi Yoneyama, Mai Fujimoto, Arei Miyamoto, Eiko Murata, Eijiro Jimi, Takenobu Katagiri. Linker Regions of Smad1/5/8 Regulate Bone-inducing

Activity of BMPs. American Society for  
Bone and Mineral Research 2012 Annual  
Meeting (October 12-15, 2012,  
Minneapolis, Minnesota, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。