

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

## 筋組織内でおこる異所性骨化メカニズムの解明と その治療法・予防法の開発

研究代表者 福田 亨(埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター)

研究分担者 片桐 岳信<sup>1)</sup>, 穉田 真澄<sup>2)</sup>, 織田 弘美<sup>3)</sup>, 加藤 仁<sup>4)</sup>

### 緒言

骨は運動・支持器官としての機能の他, カルシウムの貯蔵組織として胎生期から種々のサイトカインやホルモンにより時間的・空間的に厳密に制御され, 生涯にわたり恒常性が保たれる。一方, 通常の骨格形成とは別に, 本来は骨組織が形成されない部位に病的な骨形成が起こる現象として, 臨床的に筋組織内での異所性骨化が広く知られている。異所性骨化の誘発因子として, 過度のリハビリテーションや打撲, 脊髄損傷, 頭部外傷などが知られ, 人工透析や人工股関節置換術後にも異所性骨化が起こる。また, 遺伝性の難病として, 筋組織内で異所性骨化が起こる進行性骨化性線維異形成症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; FOP)が知られている<sup>1)</sup>。異所性骨化の進行は関節の可動域制限を伴うため, 著しい患者のQuality of Life (QOL)の低下を引き起こす。このため, 異所性骨化の分子メカニズムを解明し, それに基づく新しい治療法や予防法を確立することが求められている。

骨誘導因子(Bone Morphogenetic Protein; BMP)は骨基質中に含まれるサイトカインで, 筋組織内に移植すると異所性骨化を誘導することから, 異所性骨化の発症に深く関わることを示唆される。BMPは, 培養細胞を用いた実験系でも骨芽細胞への分化誘導能を示す。我々は, 筋サテライト細胞由来の筋芽細胞(C2C12細胞)が, BMPシグナルによって筋細胞から骨芽細胞へと分化することを発見した<sup>2)</sup>。また, 我々は世界で初めて血清から活性型BMPを単離することに成功し, BMPが全身性の骨形成因子である可能性を示した<sup>3)</sup>。このようにBMPやその活性調節因子は, 全身性の生理的骨形成や病的骨形成に重要な役割を担うと予想さ

れているが, その標的細胞などを含めた異所性骨化の発症機序は未だ明らかでない。

Wntは350~380個のアミノ酸からなる分泌性糖タンパクで23~24個のCys残基が分子内の共通した位置に保存されている<sup>4,5)</sup>。細胞外に分泌されたWntは細胞表面上に存在する7回膜貫通型受容体であり10種類報告されているfrizzled (Frz)と1回膜貫通型の共役受容体であるlow-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5/6に結合する。Wntシグナル伝達経路には $\beta$ -catenin/T-cell factor (TCF)を介してWnt標的遺伝子の発現を制御するWnt/ $\beta$ -catenin経路(Canonical経路), 細胞骨格系の制御に關与する細胞内平面極性(planar cell polarity:PCP)経路が知られている。Wntリガンドのうち少なくともWnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8およびWnt8bがWnt/ $\beta$ -catenin経路を活性化することが知られている。この経路の活性は細胞質に存在する $\beta$ -cateninの量によって決定される。通常, 細胞質内の $\beta$ -cateninの量はAxin, adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), casein kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ )の4つを含む複合体によって制御されるプロテアソーム依存性のタンパク質分解によって低いレベルに抑えられている。Frz/LRP複合体にWntが結合することにより惹起されるシグナルにより, その下流に存在するdishevelled (Dvl)はリン酸化され, 協働するAxinを介してGSK-3 $\beta$ の活性を阻害する。 $\beta$ -cateninはGSK-3 $\beta$ によってリン酸化されるとユビキチン化され, 26Sプロテアソームにて分解される。従ってGSK-3 $\beta$ の活性阻害は細胞質内の $\beta$ -cateninの集積につながる。リン酸化を免れた $\beta$ -cateninは核内へと移行し, 転写因子TCFと複合体を形成し, CREB binding protein (CBP)などの他の転写因子とも相互作用して標的とする遺伝子の転写を制御する<sup>4)</sup>。Wntシグナルは骨芽細胞の分化にも深く関わっており, 体内の骨量調節に重要なシグナル伝達経路である<sup>5)</sup>。培養

1) 埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター  
2) 埼玉医科大学 中央研究施設 形態部門  
3) 埼玉医科大学 整形外科 脊椎外科  
4) 埼玉医科大学 医学部 医学科

細胞を用いた種々の実験から、Wntが骨芽細胞を成熟した骨芽細胞へと分化を促すことが示されており、また未分化間葉細胞から骨芽細胞への分化にWntが必要とされる可能性が示されている。近年Wntシグナル伝達経路の異常と骨の疾患について明らかにされつつある。まずFzの共役受容体であるLRP5の遺伝子異常が骨密度の異常な低下や上昇に結びついていることが報告され<sup>6,7)</sup>、またこの共役受容体の変異が若年性に骨粗鬆症を発症し、骨量の減少に起因する骨折や骨の変形を特徴とする骨粗鬆症-偽神経膠腫症候群 (osteoporosis-pseudoglioma syndrome:OPPG)の原因となることが報告されている<sup>6)</sup>。

近年、BMPシグナルとWntシグナルの相互作用の存在が示唆されているが、詳細については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、異所性骨化の発症メカニズムの一端を解明するため、骨芽細胞分化におけるBMPとWntの相互作用の解明を試みた。

## 材料・方法

実験にはマウス筋芽細胞由来C2C12細胞を用いた。15%FBSおよびPenicillin-Streptomycinを添加したDMEM培地を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で培養を行った。各リガンド処理を行ったC2C12細胞の骨芽細胞分化は骨芽細胞の特異的分化マーカーとして知られるalkali phosphatase (ALP)の酵素活性およびOsteonectin、I型コラーゲンおよびOsteocalcin遺伝子の発現を指標に判定した。測定は各リガンド処理後3日目に行った。各シグナル系の活性化はIdWT4F-luc (BMP) およびSuperTOPflash (Wnt) を用いたLuciferase assayにより検討を行った。Luc活性の測定は各リガンド処理後1日目に行った。

## 結果および考察

### Canonical WntリガンドとBMPは骨芽細胞分化を相乗的に誘導する

C2C12細胞を各WntリガンドとBMP-4で処理し、

ALP活性を測定したところCanonical WntリガンドであるWnt1およびWnt3aがBMPと相乗的に骨芽細胞分化を誘導した(図1, A)。一方、non-canonical WntリガンドであるWnt5aおよびWnt11ではこのような効果は認められなかった。また、Wnt3aは濃度依存的にALP活性を上昇させることが明らかとなった(図1, B)。さらに、BMP-6もBMP-4同様にWnt3aと骨芽細胞分化を相乗的に誘導することが観察された(図1, C)。これらの結果からCanonical WntがBMPと相乗的に骨芽細胞分化を誘導することが示唆された。

### WntとBMPは骨芽細胞分化の初期分化を誘導する

WntとBMPによる骨芽細胞分化誘導を詳細に検討するため、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を検討したところ、BMP単独処理群と比較しWnt+BMP処理で骨芽細胞分化の初期マーカーであるI型コラーゲンおよびOsteonectin遺伝子の発現が有意に上昇していることが観察された(図2)。しかしながら、後期分化マーカーであるOsteocalcin遺伝子の発現に変化は認められなかった。以上の結果からWntとBMPは骨芽細胞分化の初期分化を誘導することが示された。

### WntとBMPによる骨芽細胞分化誘導はβ-catenin系を介さない

両リガンドによる骨芽細胞分化誘導メカニズムを明らかにするため、WntがBMPシグナルを活性化するか否かをLuciferase assayにより検討した。その結果、WntはBMPのreporterであるIdWT4Fを活性化しなかった(図3, A)。さらに、WntはBMPの細胞内シグナル伝達分子であるSmad1/5/8のリン酸化にも影響を与えなかった(図3, B)。同様にBMPがWntシグナルを活性化するか検討を行ったところ、BMPによるWntシグナルの活性化は観察されなかった(図3, C)。この現象を詳細に検討するため、Wntシグナルの細胞内シグナル伝達分子であるβ-cateninおよび恒常的活性化型β-cateninをBMP-4と共にC2C12細胞で過剰発現させたところ、Wnt+BMPで見られるようなALPの相乗的な活性化は観察されなかった(図4)。一方、Wnt

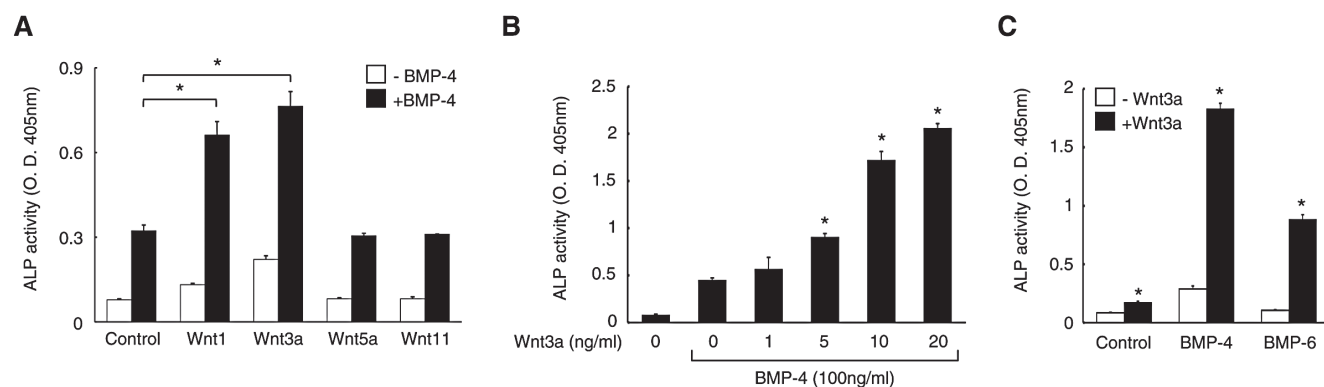


図1. WntとBMPによる骨芽細胞分化誘導。

およびBMPと共にGSK3 $\beta$ を過剰発現させたところ、ALPの相乗的な活性化は有意に抑制された。

本研究により、BMPとWntは骨芽細胞分化の初期段階を相乗的に誘導することが明らかとなった。さらに、この相乗的誘導はGSK3 $\beta$ には依存するが、 $\beta$ -cateninには依存しない系を介することが示唆された。今後さらにWntとBMPの相乗効果メカニズムを解析することで、異所性骨化発症メカニズムの解明に貢献できるものと期待される。

## 研究成果リスト

### 論文

- 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, Katagiri T. 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.* 2008;377:905-9.
- 2) Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro H, Okazaki Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;368:267-72.
- 3) Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, Nojima J, Nakamura A, Kamizono J, Noguchi Y, Iwakiri K, Kondo T, Kurose J, Endo K, Awakura T, Fukushima J,

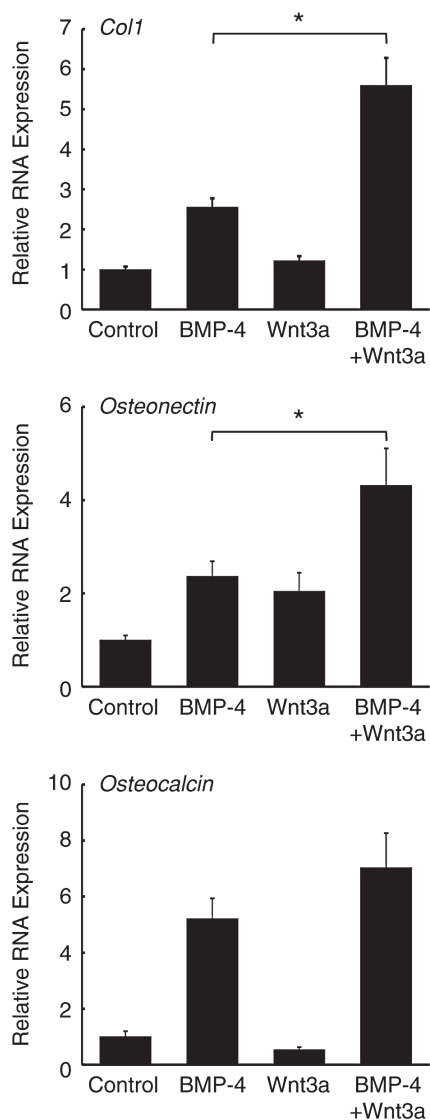


図2. 骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現確認。

Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Haga N, Furuya H, Katagiri T. 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.* 2008;377:905-9.

- 2) Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, Fukuda T, Maruyama M, Okuda A, Amemiya T, Kondoh Y, Tashiro H, Okazaki Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;368:267-72.
- 3) Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, Nojima J, Nakamura A, Kamizono J, Noguchi Y, Iwakiri K, Kondo T, Kurose J, Endo K, Awakura T, Fukushima J,

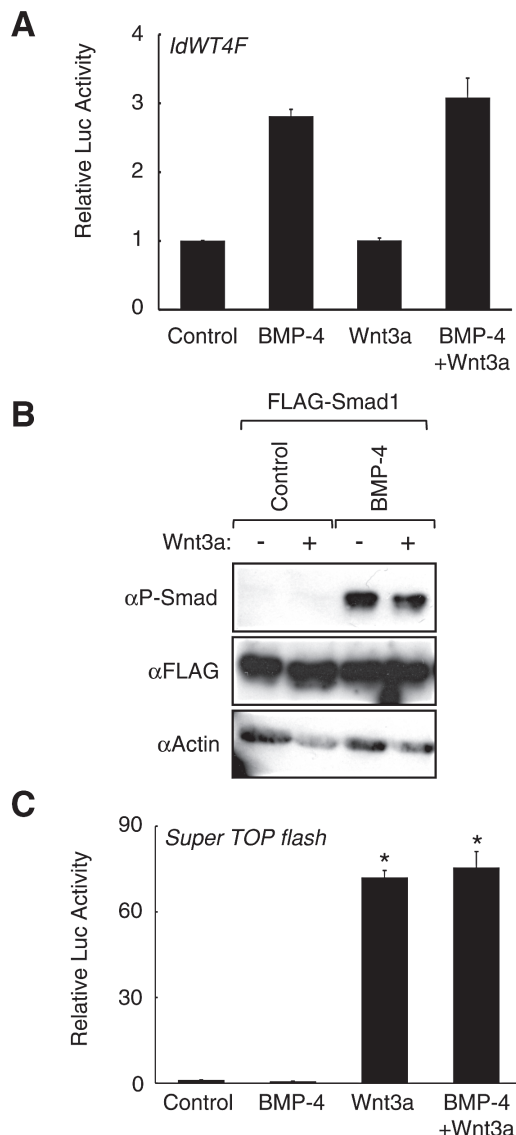


図3. WntとBMPは互いのシグナル系を活性化しない。

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, Katagiri T. Constitutively activated ALK2 and increased SMAD1/5 cooperatively induce bone morphogenetic protein signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J. Biol. Chem.* 2009;284:7149-56.

- 4) Kanomata K, Kokabu S, Nojima J, Fukuda T, Katagiri T. DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. *Genes Cells* 2009;14:695-702.
- 5) Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, Tanabe M, Takezawa S, Takada I, Yamaoka I, Yonezawa M, Kondo T, Furutani Y, Yagi H, Yoshinaga S, Masuda T, Fukuda T, Yamamoto Y, Ebihara K, Li DY, Matsuoka R, Takeuchi JK, Matsumoto T, Kato S. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009;106:9280-5.
- 6) Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, Yagi K, Yatsuka-Kanesaki Y, Suda T, Fukuda T, Katagiri T, Kondoh Y, Amemiya T, Tashiro H, Okazaki Y. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett.* 2009;583:2263-8.
- 7) Kokabu S, Nojima J, Kanomata K, Ohte S, Yoda T, Fukuda T, Katagiri T. Protein Phosphatase Magnesium-Dependent 1A-Mediated Inhibition

of BMP Signaling is Independent of Smad Dephosphorylation. *J. Bone Miner. Res.* 2009; in press.

#### 学会発表

- 1) 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 September 12-16, 2008, Montreal, Canada.
- 2) 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2008年10月28日大阪.
- 3) 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2008年10月28日大阪.
- 4) 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2008年10月30日大阪.
- 5) 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2008年10月30日大阪.
- 6) 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

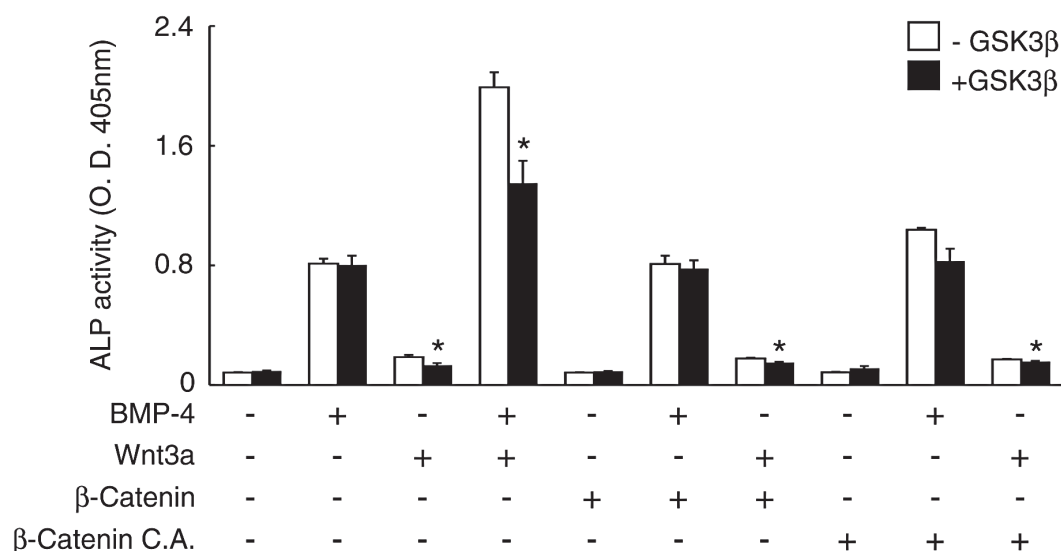


図4. WntとBMPはβ-catenin非依存的な系で骨芽細胞分化を誘導する。

- ナルを抑制する. 第26回日本骨代謝学会学術集会 2008年10月30日 大阪.
- 7) 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)2008年12月11日 兵庫.
- 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)2008年12月12日 兵庫.
- 9) Kokabu S, Nojima J, Kanomata, Yoda T, Fukuda T, Katagiri T: Protein phosphatase magnesium-dependent 1A inhibits BMP signaling by stimulating Smad degradation independent of dephosphorylation at the carboxyl termini. 2nd Joint Meeting International Bone & Mineral Society and Australian & New Zealand Bone & Mineral Society March 22, 2009, Sydney, Australia.
- 10) Katagiri T, Kanomata K, Kokabu S, Nojima J, Fukuda T: DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. 2nd Joint Meeting International Bone & Mineral Society and Australian & New Zealand Bone & Mineral Society March 24, 2009, Sydney, Australia.
- 11) 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 2009年7月25日 大阪.
- 12) 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 2009年7月25日 大阪.
- 13) 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(2009年7月27日, 大阪).
- 14) 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 2009年7月27日 大阪.
- 15) 福田亨, 古株彰一郎, 大手聡, 片桐岳信: WntとBMPリガンドによる相乗的な骨芽細胞の誘導機構. 第32s回BMP日本分子生物学会年会 2009年12月12日 横浜.

#### 参考文献

- 1) Fukuda T, Kohda M, Kanomata K, et al. Constitutively activated ALK2 and increased SMAD1/5 cooperatively induce bone morphogenetic protein signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem* 2009;284:7149-56.
- 2) Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994;127:1755-66.
- 3) Kodaira K, Imada M, Goto M, et al. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:1224-31.
- 4) Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002;296:1644-6.
- 5) Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004;341:19-39.
- 6) Gong Y, Slee RB, Fukai N, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001;107:513-23.
- 7) Boyden LM, Mao J, Belsky J, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;346:1513-21.