

200906122A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

進行性骨化性線維異形成症（FOP）の生体試料の集積と  
新規治療法の開発に関する基盤研究

（H21－難治－一般－067）

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 古谷 博和

平成22年（2010年3月）

# 目 次

## I. 総括研究報告

進行性骨化性線維異形成症（FOP）の生体試料の集積と  
新規治療法の開発に関する基盤研究

古谷 博和 .....	1
（資料）FOP新規患者さん発見のためのアンケート調査用紙 .....	7

## II. 分担研究報告

1. 変異 *ALK2* による細胞内シグナル解析モデルの樹立

片桐 岳信 .....	11
-------------	----

2. 対立遺伝子特異的RNAiノックダウン法を用いた  
変異 *ALK2* 遺伝子の発現抑制

北條 浩彦 .....	14
-------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	17
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	21
-----------------------	----

# I. 総括研究報告

## 総括研究報告書

進行性骨化性線維異形成症(FOP)の生体試料の集積と新規治療法の開発に関する基盤研究  
(H21-難治-一般-067)研究分担者 古谷 博和 独立行政法人 国立病院機構大牟田病院 神経・筋センター  
臨床研究部長

**研究要旨** 進行性骨化性線維異形成症(fibrodysplasia ossificans progressiva: FOP)はその特徴的な症状から、これまで整形外科、リハビリ科で症例の診断や経過観察が行われている事が多かった。FOP発症の原因遺伝子として $ALK2(ACVR1)$ 遺伝子が同定され、殆ど全ての症例がR206Hの変異で発症する事が判明している。しかし我々はこれまでに世界初のG356D変異を有する患者さんを発見するとともに、 $ALK2$ の遺伝子産物が構成的に骨形成シグナルを伝達する可能性を明らかにし、筋組織の急激な破壊・再生が異所性の骨化を誘発する可能性を提唱してきた。従って変異を有する $ALK2$ 遺伝子の発現抑制やそのシグナルを阻害する薬剤、例えばある種の低分子化合物がFOPの有効な治療薬になり得る可能性が考えられる。

そこで本年度はまずFOPの生体試料の収集の目的で、特にこれまで見過ごされていた可能性の高い日本全国の神経内科領域の医療機関にFOPの実態調査を行い、新たに5例のFOP疑い症例と2例の確定症例を見いだした。これはFOPの罹患率(0.61/10<sup>6</sup>)から考えると極めて多く、FOP症例が神経内科関連医療機関で診療されている事が明らかとなった。

一方新たなFOP治療法の開発研究としては、まず非典型的FOPとして報告されている $ALK2$ のG356D変異を安定的に発現する筋芽細胞の樹立を試みた。その結果 $ALK2$ タンパク質を定常的に発現する株が得られ、細胞内シグナルの発現に典型的FOPとの間で差異が認められた。さらにその原因を解明するために、 $ALK2$ -EGFP融合タンパクを一過性に発現させ、FACSで分画する実験系を構築した。このシステムは、今後のFOPの病態及び治療研究に用いるために有用であると考えられる。

またRNAi法を利用した治療法の開発として、FOP発症と関連する $ALK2$ 遺伝子内の変異塩基部位(R206H)をターゲットとする対立遺伝子特異的RNAi誘導を検討し、変異型 $ALK2$ 遺伝子に対して特異的なRNAiノックダウンを誘導するsiRNA二量体を設計し選定した。この対立遺伝子特異的RNAi誘導法を治療に応用することで、正常型 $ALK2$ 遺伝子の発現に影響せずに、異常型 $ALK2$ 遺伝子だけを特異的に発現抑制する新しい治療の可能性が開けた。これらの成果は、今後FOPの具体的な治療法の開発の上で有用なツールになると考えられた。

## A. 研究の目的

進行性骨化性線維異形成症(fibrodysplasia ossificans progressiva: FOP)(進行性骨化性筋炎)は、全身の骨格筋における異所性骨化と関節融合のために寝たきり生活を送るようになり、心不全、呼吸不全などで死に至る、罹患率0.61/10<sup>6</sup>の極めて稀な常染色体優性の難病で、現時点では治療法は全く見いだされていない。またFOP症例の98%近くが突然変異で発症し、その殆ど全てが $ALK2(ACVR1)$ 遺伝子のR206H変異で発症する事がわかっている。

一方FOPはその特徴的な症状から、これまで整形外科、リハビリ科で症例の診断や経過観察が行われている事が多かった。本研究では、FOPの実態調査・技術的支援そして生体試料の収集を、特にこれまで見過ごされていた可能性の高い神経内科領域の医療機関で行い、将来の臨床診断・治療応用につなげることを目的とする。

## B. 研究方法

## (1) 生体試料の集積研究

NHO 大牟田病院の倫理委員会で本研究に関して承認を得た後に、日本神経学会世話人所属の医療機関および大学病院、神経内科が専門診療科として存在する全国の公的医療機関、民間病院計 567 カ所に一次アンケート用紙(添付資料1)を送付し回答を得た(表 1, 2)。

表 1. 一次調査アンケート送付先

送付先病院	件数
大学病院・NHO 病院	415
公的研究機関附属病院	2
都道府県立病院	12
市立病院	26
民間総合病院	72
個人病院・医院	31
その他	9
<b>計</b>	<b>567</b>
送付先診療科	件数
総合内科	7
神経内科	462
リハビリ科	3
その他	95
<b>計</b>	<b>567</b>

表 2. 一次調査アンケート回答

回答先病院	件数(回答率(%))
大学病院・NHO 病院	103(24.8)
公的研究機関附属病院	0(0.0)
都道府県立病院	6(50.0)
市立病院	5(19.2)
民間総合病院	23(31.9)
個人病院・医院	7(22.6)
その他	2(22.2)
計	146(25.7)

この中で「FOP が疑われる症例を経験している」という回答があった医療機関に対しては、電話もしくは電子メールなどで二次調査の可能性について問い合わせを行った。なお、「FOP が疑い症例あり」という回答があった医療機関がこれまで遺伝子診断などを行った経験があり、患者さんもしくはその御家族からの承諾が得られた場合は、FOP の遺伝子診断を NHO 大牟田病院もしくは埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病態生理部門で行った。

(2) 新規治療法の開発研究(研究用細胞株の樹立)

FOP では殆ど全ての症例が *ALK2(ACVR1)* R206H の変異で発症する事が判明しているが、我々はこれまでに世界初の G356D 変異を有する患者さんを発見した。そこで野生型や変異型の *ALK2* タンパク質を定常的に発現する株をえる目的で、FOP 症例で見出された *ALK2(R206H)* と *ALK2(G356D)* 変異体、及び構成的活性型 *ALK2(Q207D)* の C 末端に V5 タグを付加した cDNA を作成し、それぞれを G418 耐性遺伝子を含む発現ベクターにクローニングして、マウス筋芽細胞 (C2C12) に BMP 応答性のルシフェラーゼレポータープラスミド (IdWT4F-luc) と同時にトランスフェクトした。

G418 存在下で形成された耐性コロニーをピックアップし、各クローンの性状を検討した。(ALK2 の発現は V5 タグの免疫染色、BMP 応答性はルシフェラーゼ活性、BMP による骨芽細胞への分化能と筋分化能は、それぞれ ALP 活性とミオシン重鎖 (MHC) の免疫染色で検討。) また、新たに ALK2 の野生型、R206H、G356D 変異体の C 末端に

表 3. FOP 疑い症例

症例	医療施設	遺伝子診断	結果
A	個人病院・医院	(-)	-
B	大学病院	(-)	-
C	個人病院・医院	(-)	-
D	大学病院	(-)	-
E	NHO 病院	(+)	(+)
F	NHO 病院	(-)	-
G	NHO 病院	(+)	(+)
H	NHO 病院	(-)	-

(+) あり、もしくは陽性 (-) なし -; データなし

EGFP を付加した融合タンパク発現ベクターを構築し、C2C12 細胞に一過性に導入した後、EGFP と ALK2 の発現を FACS で解析した。

(3) 新規治療法の開発研究(選択的遺伝子発現抑制を行う RNAi 法の確立)

FOP の治療のためには正常型 *ALK2* 遺伝子の発現を抑制しないで、変異型 *ALK2* 遺伝子だけを特異的に抑制する新しい RNAi 誘導技術を確立し、その効果を正確に検討する必要がある。その目的のために、変異型 *ALK2* 遺伝子の特異的にノックダウンする対立遺伝子特異的 RNAi 誘導法の確立に、以下のような方法で取組んだ。

- (1) ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子とウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれコードした発現プラスミドを利用してレポーターアリルを構築するため、変異アリル (R206H)、正常アリルに相当するオリゴ DNA を合成し、それらをそれぞれのレポーター遺伝子の 3' 非翻訳領域に挿入して、変異レポーターアリルと正常レポーターアリルを構築した。
- (2) 変異アリルをターゲットとする合成 siRNA を作製し、正常、変異レポーターアリルをそれぞれ含んだ発現プラスミド DNA と  $\beta$  ガラクタシダーゼ ( $\beta$  GAL) 遺伝子を含んだ発現プラスミド DNA (コントロールとして用いた) をリポフェクタミン 2000 試薬 (Invitrogen 社) によるリポフェクションによってヒト HeLa 細胞に導入し、24 時間後、細胞抽出液を調製した。
- (3) 得られた細胞抽出液を用いて、発現した両ルシフェラーゼ活性そしてコントロールの  $\beta$  GAL 活性を測定した。そして、 $\beta$  GAL の活性値を基に両ルシフェラーゼの活性量 (発現量) を正常化し、テストした siRNA の変異型アリルに対するノックダウン効果と正常型アリルに対する影響を評価した。

C. 研究結果

(1) 生体試料の集積研究

567カ所の医療機関にアンケートを送付してそのうち146件(25.7%)から回答を得た(表1, 2)。回答率をみると、都道府県立病院、民間総合病院で高い傾向があったが、全体的には施設による大きな差は認められなかった。

回答が得られた146件のうち、8件にFOPが疑われる症例ありとの回答があった(表3)。ただ、回答者に詳細に問い合わせた結果、この中で症例DとEは同一症例である可能性が考えられており、FOP疑い例は全回答146件のうち7件(4.79%)と考えられる。

これらの症例の中で遺伝子診断承諾が得られた2例についてFOPの遺伝子診断を行った所、両例共に*ALK2(ACVR1)*遺伝子遺伝子のR206H変異で発症したFOP症例である事が判明した。

(2) 新規治療法の開発研究(研究用細胞株の樹立)

C2C12細胞に、*ALK2*の野生型、R206H、G356D、Q207D変異体を遺伝子導入し、V5陽性の安定株を樹立した。

各クローンについて、さらに、BMP-4存在下でルシフェラーゼ活性、ALP活性、MHC発現量を解析した結果、ルシフェラーゼ活性は変異体よりも野生型の#WT-A2株で活性が高く、ALP活性は



#G356D-6 株が最も高かった。筋分化能を示す MHC 陽性細胞数は、#R206H-E3 が最も高かった。さらに、ALK2-EGFP 融合タンパク質発現ベクターを C2C12 細胞に導入すると、EGFP と抗 ALK2 抗体に二重陽性の細胞集団が観察された。

### (3) 新規治療法の開発研究(選択的遺伝子発現抑制を行う RNAi 法の確立)

対立遺伝子特異的(アリル特異的)RNAi 評価システムを用いて、FOP 発症と関連する変異型 ALK2 遺伝子に対してアリル特異的 RNAi を誘導する siRNA のスクリーニングを行った。

標的とした変異型 ALK2 遺伝子は、殆んど全ての FOP 症例で観察されるアミノ酸置換を伴う R206H 変異である。この変異型アリルに対する siRNA を設計・合成し、その効果を上記の評価システムを用いて検討した。するとその結果、設計した siRNA は、変異型アリルに対して比較的強いノックダウンを示したものの、総じて両方のアリルに強い抑制効果を示した。そこで我々は、アリル特異的 RNAi を増強させるために、変異型アリルと正常型アリルの識別を強める siRNA の設計を試みた。

新たに設計した siRNA は、正常型、変異型アリルを識別し、変異型アリル特異的 RNAi ノックダウンを誘導することが示唆された。(特許出願準備中)

### (倫理面への配慮)

「進行性骨化性線維異形成症(FOP)の生体試料の集積と新規治療法の開発に関する基盤研究」の一環としての、患者さん発掘のためのフィールドサーチ(一次調査)については NHO 大牟田病院で倫理委員会で審査され、承認されている(受付番号 21-3)。また、「RNA 干渉法を用いた常染色体優性神経・筋疾患の治療に関する細胞レベルでの基礎研究」に関しても、NHO 大牟田病院で倫理委員会で審査され、生体試料の収集及び研究に関して承認されている(受付番号 20-7)。

以上の承認を得て採取した細胞を用いた *in vitro* の基礎研究にかんしては、特に倫理上の問題は無いと考えられた。

### D. 考察

FOP はその特徴的な症状から、これまで整形外科、リハビリ科で症例の診断および経過観察が行われている事が多い。しかし、1) FOP の初期には肢帯型筋ジストロフィー様の筋萎縮と筋力低下が認められる事、2) FOP 診断確定前に行われる筋生検では、非特異的なミオパチーの所見が認められる事、3) 異所性骨化、関節拘縮が目立たない症例では筋ジストロフィーと診断される症例が多い事などから、筋ジストロフィー病棟を有する神経内科関連の医療施設で長期入院や経過観察が行われている症例が多い事が予想された。

神経内科領域の医療機関に対する短期間のアンケート調査の結果、5 例の FOP 疑い症例と 2 例の確定症例が判明した事から考えて、FOP に関しては、今後も神経内科や一般内科にもその存在について注意を喚起する必要があると考えられた。

FOP の基礎研究用のモデル細胞の構築研究では、これまで ALK2 を構成的に発現した株細胞を樹立することは困難であったが、これは ALK2 の細胞内

シグナルによって細胞増殖等が影響を受けるか、同時に導入したレポーター遺伝子の影響が大きいと考えられていた。今回構築した EGFP との融合タンパクを用いた発現系では、一過性にせよ ALK2 を発現させた細胞を分画することが可能であった。このような細胞を解析することで、今後各 ALK2 の変異体特有の細胞内シグナルが明らかになると考えられる。

RNA 干渉法を用いた FOP の新しい治療法の開発では、安全な RNAi 治療法を実現するために、従来のような正常型、変異型(異常型)の両方をターゲットにする RNAi ノックダウンではなく、異常型遺伝子だけを特異的にノックダウンする新たな RNAi 誘導法の確立が、副作用のほとんどない安全な RNAi 治療の確立のために不可欠とされている。

FOP の殆んど全ての症例では、ALK2 遺伝子の 617G>A 変異 (R206H) であり、アミノ酸置換を伴う G(グアニン)から A(アデニン)への 1 塩基変異が認められる。本研究では、我々が既に開発している簡便な対立遺伝子特異的 RNAi 評価方法を使って設計した siRNA をスクリーニングし、変異型 ALK2 遺伝子の特異的に発現抑制する siRNA を設計・選定した。さらに、その発現抑制そして識別能力を検討するために IC50 試験も行い、選定した siRNA の詳細なデータを得た。

これらの成果は、ターゲットとなる変異型 ALK2 遺伝子の特異的発現抑制を誘導し、正常型 ALK2 遺伝子には影響を与えない新しい RNAi 治療の可能性を開くといえる。

### E. 結論

- (1) 短期間に簡便なアンケート調査を神経内科関連の医療機関に行う事で、5 例の FOP 疑い症例と 2 例の確定症例が判明した。FOP は神経内科領域でも注意する必要がある事が判明した。
- (2) ALK2 タンパク質を定常的に発現する細胞株を作成し、その細胞内シグナルの発現に差異が認められた。またその原因を解明するために、ALK2-EGFP 融合タンパクを一過性に発現させ、FACS で分画する実験系を構築した。このシステムは、変異 ALK2 の細胞内シグナルの解析に役立つ可能性がある。
- (3) FOP 発症と関連する ALK2 遺伝子内の変異塩基部位をターゲットとする対立遺伝子特異的 RNAi 誘導を検討し、変異型 ALK2 遺伝子に対して特異的な RNAi ノックダウンを誘導する siRNA 二量体を設計し選定した。この方法を治療に応用することによって、正常型 ALK2 遺伝子の発現に影響しないで、異常型 ALK2 遺伝子だけを特異的に発現抑制する新しい治療の可能性が開けた。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Furuya H, Ikezoe K, Shigeto H, Ohyagi Y, Arahata H, Araki E-I, Fujii N. Sleep- and non sleep-related hallucinations

- Relationship to ghost tales and their classifications. *Dreaming* (2009), 19(4): 232-238.
2. Miyoshi K, Ohyagi Y, Sakae N, Motomura K, Ma L, Taniwaki T, Furuya H, Tabira T, Kira JI. Enhancement of activation of caspases by presenilin 1 gene mutations and its inhibition by secretase inhibitors. *J Alzheimer Dis*, (2009) 16: 551-564.
  3. Ma L, Ohyagi Y, Miyoshi K, Sakae N, Motomura K, Taniwaki T, Furuya H, Takeda K, Tabira T, Kira JI. Increase in p53 protein levels by presenilin 1 gene mutations and its inhibition by secretase inhibitors. *J Alzheimer Dis*, (2009) 16: 565-575.
  4. Ikezoe K, Furuya H, Arahata H, Nakagawa M, Tateishi T, Fujii N, Kira JI. Amyloid-beta accumulation caused by chloroquine injections precedes ER stress and autophagosome formation in rat skeletal muscle. *Acta Neuropathol*, (2009) 117: 575-582
  5. Tateishi T, Hokonohara T, Yamasaki R, Miura S, Kikuchi H, Iwaki A, Tashiro H, Furuya H, Nagara Y, Ohyagi Y, Nukina N, Iwaki T, Fukumaki Y, Kira J. Familial amyotrophic lateral sclerosis with the *FUS* mutation and neuronal basophilic inclusion. *Acta Neuropathol*, (2010) 119(3): 355-364.
  6. Suzuki N, Aoki M, Warita H, Kato M, Mizuno H, Shimakura N, Akiyama T, Furuya H, Hokonohara T, Iwaki A, Togashi S, Konno H, Itoyama Y. FALS with *FUS* mutation in Japan with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. *J Hum Genet*, in press.
  7. 古谷博和, 梅本文二. 軽症福山型筋ジストロフィー患者さんの臨床と摂食. 難病と在宅ケア, 2010, 印刷中.
  8. 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. Constitutively activated ALK-2 and increased Smad1/5 cooperatively induce BMP signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem* (2009) 284:7149-7156.
  9. Kanomata K, Kokabu S, Nojima J, Fukuda T and Katagiri T. DRAGON, a GPI-anchored membrane protein, inhibits BMP signaling in C2C12 myoblasts. *Genes Cells* (2009) 14:695-702.
  10. Shen Q, Little SC, Xu M, Haupt J, Ast C, Katagiri T, Mundlos S, Seemann P, Kaplan FS, Mullins MC and Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva ACVR1 R206H mutation activates ligand-independent and ligand-sensitive chondrogenesis and regulates zebrafish dorso-ventral patterning. *J Clin Invest* (2009) 119: 3462-3472.
  11. Katagiri T. Heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein signaling: fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Oral Biosci* (2010) 52:33-41.
  12. Kokabu S, Nojima J, Kanomata K, Ohte S, Yoda T, Fukuda T and Katagiri T. Protein phosphatase magnesium-dependent 1A-mediated inhibition of BMP signaling is independent of Smad-dephosphorylation. *J Bone Miner Res*, (2010) in press.
  13. 片桐岳信. FOP (進行性骨化性線維異形成症). *Arthritis* (2009) 7:158-163.
  14. 片桐岳信. 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 (2010) 22:30-32.
  15. 片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) の発症メカニズム. *Clin Neurosci*, (2010) 印刷中.
  16. Eda A., Tamura Y., Yoshida M., and Hohjoh H. Systematic gene regulation involving miRNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell. *BBRC* (2009) 388: 648-653.
  17. Kitamura K., Itou Y., Yanazawa M., Ohsawa M., Suzuki-Migishima R., Umeki Y., Hohjoh H, Yanagawa Y., Shinba T., Itoh M., Nakamura K., and Goto Y. Three human ARX mutations cause the lissencephaly-like and mental retardation with epilepsy-like pleiotropic phenotypes in mice. *Hum. Mol. Genet.* (2009) 18: 3708-3724.
  18. Hohjoh H, Akari H., Fujiwara Y., Tamura Y., Hirai H., and Wada K. Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. *Gene* (2009) 432: 60-66.
  19. Tamura Y., Yoshida M., Ohnishi Y., and Hohjoh H. Variation of gene silencing involving endogenous microRNA in mammalian cells. *Mol Biol Rep* (2009) 36: 1413-1420.
2. 著書
    1. 佐々木裕之&北條浩彦. 「機能性小分子 RNA の大規模シークエンス」 実験医学 (2009) 27: 14-19.
  3. 学会発表 (特別講演・シンポジウム)
    1. Hohjoh H. "MicroRNA modulation of neuronal differentiation" Joint Symposium of the 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19<sup>th</sup> Antisense Symposium, Fukuoka, Japan, 11. 6. 2009.
    2. 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
3. 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
  4. 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
  5. 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
  6. 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

(国際発表)

1. Furuya H, Umemoto G, Kitajima T, Kikuta T, Fujii N. The correlation between oral dysfunction and swallowing test in myotonic dystrophy type 1(DM1). The 7th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting, Wulzburg, Germany, Sep 9-12, 2009.
2. Katagiri T.: Roles of Smad pathways in the conversion of myoblasts to osteoblastic cells by BMPs. Gordon Research Conference on Bones & Teeth
3. 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
4. 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.
5. Eda A., Tamura Y., Yoshida M. and Hohjoh H. "Systematic gene regulation pathway involving functional small RNAs during neuronal differentiation of mouse embryonic carcinoma cell" 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, Hawaii, USA., October 20-24 (October 23), 2009.
6. Eda A., Tamura Y., Yoshida M. and Hohjoh H. "Gene regulation involving functional small RNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell" RNAi Europe, Berlin, Germany, September 17-18, 2009.

(国内発表)

1. 古谷博和、藤井直樹、福田亨、片桐岳信。R206H ではなく G356D 変異を有する *ALK2(ACVR1)* 遺伝子のハプロタイプ解析と発現。第 50 回日本神経学会総会。東北大学百周年記念会館。仙台。2009 年 5 月 21 日

2. 荒畑 創、荒木栄一、古谷博和、藤井直樹、吉良潤一。mdx マウスにおける新規免疫療法の開発。第 50 回日本神経学会総会。仙台国際センター。仙台。2009 年 5 月 22 日
3. 古谷博和、池添浩二、梅本丈二、荒畑 創、荒木栄一、服巻保幸、藤井直樹。軽症福山型筋ジストロフィー(FCMD) 2 例の臨床所見と嚥下障害の検討。第 27 回日本神経治療学会総会。熊本市市民会館。熊本。2009 年 6 月 12 日
4. 古谷博和、荒畑 創、藤井直樹、三浦史郎、柴田弘紀、服巻保幸。軽症福山型筋ジストロフィー患者に名の *fukutin* 遺伝子ハプロタイプ解析。第 32 回日本分子生物学会年会。2009 年 12 月 10 日。パシフィコ横浜(神奈川)
5. 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 回松本ポーンフォーラム
6. 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
7. 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
8. 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
9. 片桐岳信：「難病・進行性骨化性線維異形成症 (FOP) の研究者から」。FOP 講演会
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 枝垂希子、田村美子、吉田満史子、北條浩彦。「Systematic gene regulation involving miRNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell」第 32 回日本分子生物学会大会。横浜。12. 12. 2009.
17. 大西悠亮、十時泰、豊田敦、渡部聡朗、山本耕裕、徳永勝士、榊佳之、佐々木裕之、北條浩彦。



「マウス初期胚に存在する機能性 small RNA の解析」第 82 回日本生化学学会大会、名古屋、10. 23. 2009.

18. 大西悠亮、徳永勝士、北條浩彦. 「RNAi を用いたアレル特異的発現抑制の評価方法の確立と応用」第 54 回日本人類遺伝学会、東京、9. 23. 2009.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1) 特許取得

特許出願番号：特願 2009-283653

発明者： 北條浩彦、高橋理貴

発明の名称：「長鎖繰返し配列を含有する遺

伝子又は遺伝子産物の選択的又は優先的回収方法」

出願人： 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願日： 平成 21 年 12 月 15 日

##### 2) 実用新案登録

該当なし

##### 3) その他

該当なし

(資料) FOP新規患者さん発見のためのアンケート調査用紙

診療科 責任者 様

2009年11月5日

厚生労働省厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
「進行性骨化性線維異形成症(FOP)の生体試料の集積と  
新規治療法の開発に関する基盤研究」研究班

拝啓

秋気いよいよ深まってまいりました。

さてこの度厚生労働省 難治性疾患克服事業の一環として、上記研究班を立ち上げる事になりました。FOP は以前「進行性化骨性筋炎」とも呼ばれていましたが、子供の頃から全身の筋肉やその周囲の膜、腱、靭帯などが徐々に硬くなって骨に変わり、このため手足の関節の動く範囲が狭くなったり、背中が変形したりする極めて稀な病気です。

これまで FOP は主として整形外科やリハビリテーション科でフォローされている事が多く、これらの診療科を中心として実態調査がなされてきました。しかし、FOP は肢帯型筋ジストロフィー様の筋萎縮・筋力低下を呈する事から、神経内科や筋ジス病棟に入院されている方もいらっしゃるようです。そこで、今回当研究班では神経内科・筋ジス病棟、リハビリ病棟を中心として FOP の実態調査を行う事になりました。

まことに恐れ入りますが、以下の一次アンケート用紙にご回答を御記入のうえ、11月30日までに、当方宛にご返送いただけませんか。

なお、FOP が疑われる症例に関しましては、二次調査や遺伝子診断のお勧めをお願いする事もございますが、そのような研究をご希望されない場合はその旨御記入いただけましたらそのように取りはかれますので、よろしくご返送のほどお願いいたします。

この件に関しましてご不明の点がございましたら、下記までお問い合わせ下さい。何とぞ御協力のほどよろしくお願い申し上げます。

敬具

(主任研究員)

〒837-0911 福岡県大牟田市橘1044-1  
国立病院機構大牟田病院 神経・筋センター  
臨床研究部長(神経内科) 古谷 博和 拝  
Tel: 0944-58-1122 Fax: 0944-58-6804  
電子メール: [furuya@oomuta.hosp.go.jp](mailto:furuya@oomuta.hosp.go.jp)



(資料) FOP新規患者さん発見のためのアンケート調査用紙

進行性骨化性線維異形成症(Fibro dysplasia Ossificans Progressiva:FOP)について  
(詳しくは難病情報センターのサイトなどを御参照下さい[<http://www.nanbyou.or.jp/sikkan/121.htm>])

進行性骨化性線維異形成症(Fibro dysplasia ossificans progressiva:FOP)(MIM:135100)は、以前は進行性化骨性筋炎と呼ばれていましたが、小児期から全身の骨格筋や筋膜、腱、靭帯などの線維性組織が進行性に骨化し、このため四肢・体幹の可動性低下や変形を生じる疾患で、患者さんには母趾形態異常(図1)の他に禿頭、難聴、乱杭歯などの小奇形も高頻度で合併されますし、全身の骨格筋における異所性骨化と関節融合のために寝たきり生活を送るようになり、次第に心不全、呼吸不全などが悪化して死に至る事の多い常染色体優性の疾患です。現時点では治療法は全く見いだされておきませんが、FOP発症の原因遺伝子として $ALK2(ACVR1)$ 遺伝子が同定され、殆ど全ての症例が、R206Hの変異で発症することが判明しており、しかも常染色体優性の疾患でありながら、その95%以上が突然変異で発症する事も知られています。

FOPの有病率は世界中どこでも大体200万人に1名程度で、本邦ではこれまでに50～80人程度の患者さんが把握されていますが、正確な人数は把握されていません。

この病気の特徴である異所性の骨化は乳児期から学童期にかけて初めて起きることが多く、まず皮膚の下が腫れたり硬くなったりして、時に熱を持ったり痛みを伴うことがあります。この症状を繰り返しながら異所性骨化を生じ、手足の関節の動きが悪くなったり、背中が変形したりします。

異所性骨化の部分はX線単純撮影を行うと容易に化骨化が確認出来ますし(図2)、脊椎のX線単純撮影では脊椎硬直(rigid spine)を確認出来ます(図3)。また、肋軟骨の部分にも骨化と融合が起こりますので、胸部の3D-CTを撮りますと、この部分の化骨化を確認する事が出来ます。

患者さんはひどい関節拘縮のためにベッド上生活を余儀なくされ、顎関節の拘縮のために十分な開口が出来ずに摂食のたびに大変苦勞しておられます。



図1



図2

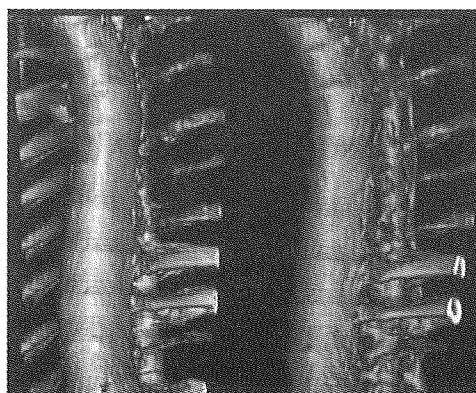


図3

## II. 分担研究報告



分担研究報告書

変異 *ALK2* による細胞内シグナル解析モデルの樹立

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、骨形成を促す受容体タンパク *ALK2* の遺伝子変異によって発症し、殆ど全ての遺伝子変異は *ALK2* の R206H 変異である事が判明されており、遺伝学的に均一な疾患と考えられている。本研究では、世界的に多く認められる典型的 FOP の *ALK2* (R206H) 変異と、非典型的 FOP として報告されている *ALK2* の G356D 変異を安定的に発現する筋芽細胞の樹立を試みた。*ALK2* タンパク質を定常的に発現する株が得られ、細胞内シグナルの発現に差異が認められた。そこでその原因を解明するために、*ALK2*-EGFP 融合タンパクを一過性に発現させ、FACS で分画する実験系を構築した。このシステムは、今後の FOP の病態及び治療研究に用いるために有用であると考えられた。

A. 研究の目的

2006 年、FOP の責任遺伝子として *ACVR1/ALK2* 遺伝子が同定され、家族性 FOP と孤発性 FOP に共通の、206 番目のアルギニンがヒスチジン残基に置換した変異（R206H）が発見された。その後、本研究代表者の Furuya らは、世界で初めて新しい FOP の遺伝子変異として、*ALK2* の 356 番目のグリシンがグルタミンに置換した変異（G356D）を見出した。

両変異を有する FOP 患者の臨床的所見は、筋組織における異所性骨化の進行や、母指の変形・短縮の程度に大きな差が認められる。しかし、これらの変異 *ALK2* を一活性に発現させた筋芽細胞では、明らかな細胞内情報伝達系の差異は同定されなかった。

そこで本研究では、FOP で発見された *ALK2* の変異の生化学的差異を解明し、新しい治療法の開発に資することを目的として、構成的に変異 *ALK2* を発現する筋芽細胞の樹立を試みた。

B. 研究方法

FOP 患者で見出された *ALK2* (R206H) と *ALK2* (G356D) 変異体、及び構成的活性型 *ALK2* (Q207D) の C 末端に V5 タグを付加した cDNA を作成した。これらを、それぞれ G418 耐性遺伝子を含む発現ベクターにクローニングし、マウス筋芽細胞（C2C12）に BMP 応答性のルシフェラーゼレポータープラスミド（IdWT4F-luc）と同時にトランスフェクトした。G418 存在下で形成された耐性コロニーを 96 個以上ピックアップし、各クローンの性状を検討した。*ALK2* の発現は V5 タグの免疫染色、BMP 応答性はルシフェラーゼ活性、BMP による骨芽細胞への分化能と筋分化能は、それぞれ ALP 活性とミオシン重鎖（MHC）の免疫染色で検討した。

また、新たに *ALK2* の野生型、R206H、G356D 変異体の C 末端に EGFP を付加した融合タンパク発現ベクターを構築し C2C12 細胞に一過性に導入した後、EGFP と *ALK2* の発現を FACS で解析した。

C. 研究結果

C2C12 細胞に、それぞれ *ALK2* の野生型、R206H、G356D、Q207D 変異体を遺伝子導入し、V5 陽性の安定株を樹立した（図 1）。

各クローンについて、さらに、BMP-4 存在下でルシフェラーゼ活性、ALP 活性、MHC 発現量を解析した結果、ルシフェラーゼ活性は変異体よりも野生型の #WT-A2 株で活性が高く、ALP 活性は #G356D-6 株が最も高かった（図 2 及び 3）。

また、筋分化能を示す MHC 陽性細胞数は、#R206H-E3 が最も高かった（図 4）。

さらに、*ALK2*-EGFP 融合タンパク質発現ベクターを C2C12 細胞に導入すると、EGFP と抗 *ALK2* 抗体に二重陽性の細胞集団が観察された（図 5）。

(倫理面への配慮)

患者さんから承認を得て採取した細胞を用いた *in vitro* の基礎研究であるので、特に問題は無いと考えられた。

D. 考察

これまで *ALK2* を構成的に発現した株細胞を樹立することは困難であったが、これは *ALK2* の細胞内シグナルによって細胞増殖等が影響を受けるか、同時に導入したルシフェラーゼ・レポーター遺伝子の影響と考えられていた。今回構築した EGFP との融合タンパクを用いた発現系では、一過性にせよ *ALK2* を発現させた細胞を分画することが可能であった。このような細胞を解析することで、今後各 *ALK2* の変異体特有の細胞内シグナルが明らかになると考えられる。

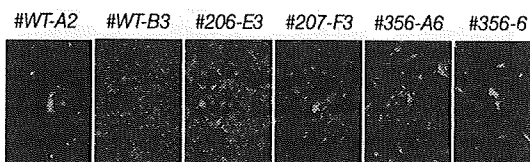


図 1. 樹立した細胞株の抗 V5 免疫染色像

特になし

E. 結論

ALK2-EGFP 融合タンパクを用いた細胞分画法は、変異 *ALK2* の細胞内シグナルの解析に役立つ可能性がある。

F. 健康危険情報

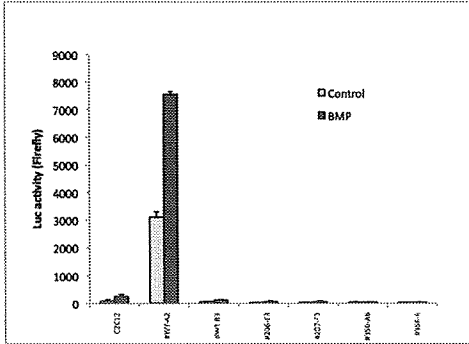


図2. 樹立した細胞株のルシフェラーゼ活性

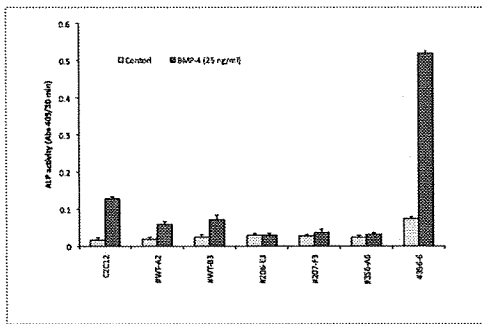


図3. 樹立した細胞株のALP活性

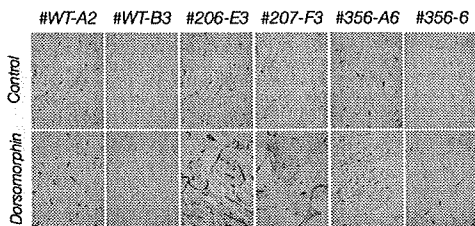


図4. 樹立した細胞株のMHC染色像

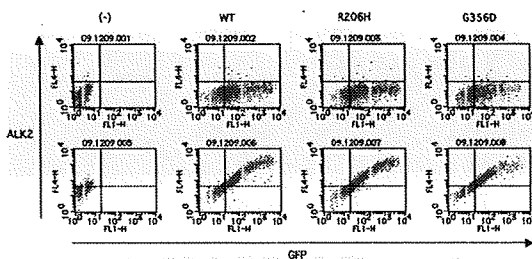


図5. ALK2-EGFP発現細胞のFACS解析

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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. (2009) Constitutively activated ALK-2 and increased Smad1/5 cooperatively induce BMP signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem* 284:7149-7156.
- 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.
- 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.
- Katagiri T. (2010) Heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein signaling: fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Oral Biosci* 52:33-41.
- 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.*
- 片桐岳信 (2009) FOP (進行性骨化性線維異形成症). *Arthritis* 7:158-163.
- 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* 22:30-32.
- 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, 印刷中.*

2. 著書

特になし

3. 学会発表

(特別講演・シンポジウム)

- 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
- 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
- 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

4. 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
5. 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

#### (国際発表)

1. Katagiri T.: Roles of Smad pathways in the conversion of myoblasts to osteoblastic cells by BMPs. Gordon Research Conference on Bones & Teeth
2. 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
3. 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

#### (国内発表)

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
5. 片桐岳信：「難病・進行性骨化性線維異形成症 (FOP) の研究者から」。FOP 講演会
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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

#### H. 知的所有権の出願・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

分担研究報告書

対立遺伝子特異的 RNAi ノックダウン法を用いた変異 *ALK2* 遺伝子の発現抑制

研究分担者 北條 浩彦 国立精神・神経センター神経研究所 室長

**研究要旨** 本研究は、難治性の遺伝性疾患である進行性骨化性線維異形成症(fibrodysplasia ossificans progressiva: FOP)の根本的治療を目指し、RNA interference (RNAi)法を用いた新しい治療法の開発そしてその実現をめざした研究開発を行う。根本的な治療法が未だ確立していないFOPの治療戦略として、RNAi法を利用した病因遺伝子、変異型*ALK2* (*ACVR1*) 遺伝子の発現抑制が有効であると考えられる。しかしながら、その有効な技術を実際の治療に応用するためにはまだ多くの課題を解決しなければならない。特に正常型*ALK2*遺伝子の発現を抑制しないで変異型*ALK2*遺伝子だけを特異的に抑制する新しいRNAi誘導技術の確立、そしてその効果の検討が必要であると考えられる。そこで我々は、まず、変異型*ALK2*遺伝子の特異的にノックダウンする対立遺伝子特異的RNAi誘導法の確立に取り組んだ。

**A. 研究の目的**

本研究の目的は、いままで有効な治療法がなかった進行性骨化性線維異形成症(fibrodysplasia ossificans progressiva: FOP)に対して、次世代の先端医療技術として注目されている RNA interference (RNAi)法を用いた遺伝子ノックダウンによって根本的治療の道を開くことにある。FOPは、骨格筋の異所性骨化と関節融合を起し、心不全や呼吸不全などで死にいたる難治性の疾患である。そして、この疾患はドミナントネガティブな遺伝子変異によって発症する遺伝子疾患であることも知られている。

FOPの原因遺伝子は、*ALK2* (*ACVR1*) 遺伝子であり、ほとんど全ての症例で、この遺伝子の617G>A(R206H)変異が観察されている。さらに近年、1 FOP 症例から新たな1067G>A(G356D)変異を持った *ALK2* 遺伝子も見つかっている。よって、治療戦略的には、病因となる変異型 *ALK2* タンパク質の除去や 変異型 *ALK2* 遺伝子の発現抑制が根本的治療の道を開くこと考えられる。これに基づき我々は、次世代の先端医療技術として注目されている RNAi 法を用いて、変異型 *ALK2* 遺伝子をターゲットとする small interfering RNA (siRNA: RNAi を誘導する小さな二本鎖 RNA) を設計し、その効果を検討した。特に、変異型 *ALK2* 遺伝子を強く抑制し、正常型の *ALK2* 遺伝子にはほとんど影響しないような対立遺伝子特異的 (疾患原因遺伝子特異的) な RNAi ノックダウンを誘導する siRNA の設計を試みた。

**B. 研究方法**

対立遺伝子 (アレル) 特異的 RNAi の評価。

- 1) ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子とウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれコードした発現プラスミドを利用してレポーターアレルを構築した。まず、変異アレル (R206H 変異)、正常アレルに相当するオリゴ DNA を合成し、それらをそれぞれのレポーター遺伝子の3'非翻訳領域に挿入して変異レポーターアレルそして正常レポーターアレルを構築した。

- 2) 変異アレルをターゲットとする合成 siRNA を作製し、正常、変異レポーターアレルをそれぞれ含んだ発現プラスミド DNA とベクター・ガラクトシダーゼ遺伝子を含んだ発現プラスミド DNA (コントロールとして用いた) をリポフェクタミン2000試薬 (Invitrogen 社) によるリポフェクションによってヒト HeLa 細胞に導入し、24時間後、細胞抽出液を調製した。
- 3) 得られた細胞抽出液を用いて、発現した両ルシフェラーゼ活性そしてコントロールのベクター・ガラクトシダーゼ活性を測定した。そして、ベクター・ガラクトシダーゼの活性値を基に両ルシフェラーゼの活性量 (発現量) を正常化し、テストした siRNA の変異型アレルに対するノックダウン効果と正常型アレルに対する影響を評価した。

**C. 研究結果**

対立遺伝子特異的(アレル特異的)RNAi 評価システムを用いて、FOP 発症と関連する変異型 *ALK2* 遺伝子に対してアレル特異的 RNAi を誘導する siRNA のスクリーニングを行った。標的とした変異型 *ALK2* 遺伝子は、殆んど全ての FOP 症例で観察されるアミノ酸置換を伴う617G>A (R206H) 変異である。この変異型アレルに対する siRNA を設計・合成し、その効果を上記の評価システムを用いて検討した。その結果、設計した siRNA は、変異型アレルに対して比較的強いノックダウンを示したものの、総じて両方のアレルに強い抑制効果を示した。そこで我々は、アレル特異的 RNAi を増強させるために、変異型アレルと正常型アレルの識別を強める siRNA の設計を試みた。新たに設計した siRNA は、正常型、変異型アレルを識別し、変異型アレル特異的 RNAi ノックダウンを誘導することが示唆された。この siRNA に関しては、現在、特許出願のための準備を進めている。

**(倫理面への配慮)**

本年度は、被験者ゲノム DNA を用いた解析を行わなかった。来年度以降、被験者サンプルを用

いた解析を実施する際には、先ず国立精神・神経センター倫理審査委員会で審査を受け、その承認を得てから研究を実施する。

#### D. 考察

安全な RNAi 治療法を実現するためには、従来のような正常型、変異型(異常型)の両方をターゲットにする RNAi ノックダウンではなく、異常型遺伝子だけを特異的にノックダウンする新しい RNAi 誘導法の確立が必要である。これは副作用のほとんどない安全な RNAi 治療の確立のために不可欠である。

FOP の発症に関連する遺伝子変異は、その主なものが *ALK* 遺伝子の 617G>A 変異であり、アミノ酸置換を伴う G(グアニン)から A(アデニン)への 1塩基変異 (R206H) である。このような 1塩基変異の違いを識別し RNAi ノックダウンすることは容易なことではなく、特にそのような RNAi を誘導する siRNA の設計と評価が極めて大変な作業である。本研究では、我々が既に開発した簡便な対立遺伝子特異的 RNAi 評価方法を使って設計した siRNA をスクリーニングし、変異型 *ALK2* 遺伝子の特異的に発現抑制する siRNA を設計・選定した。さらに、その発現抑制そして識別能力を検討するために IC50 試験も行い、選定した siRNA の詳細なデータを得た。これらの成果は、ターゲットとなる変異型 *ALK2* 遺伝子の特異的発現抑制を誘導し正常型 *ALK2* 遺伝子には影響を与えない新しい RNAi 治療の可能性を開くといえる。

#### E. 結論

- 1) FOP 発症と関連する *ALK2* 遺伝子内の変異塩基部位をターゲットとする対立遺伝子特異的 RNAi 誘導を検討し、変異型 *ALK2* 遺伝子に対して特異的な RNAi ノックダウンを誘導する siRNA 二量体を設計し選定した。
- 2) この対立遺伝子特異的 RNAi 誘導法を治療に応用することによって、正常型 *ALK2* 遺伝子の発現はそのまま(影響しないで)、異常型 *ALK2* 遺伝子だけを特異的に発現抑制する新しい治療の可能性が開けた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Eda A., Tamura Y., Yoshida M., and Hohjoh H. Systematic gene regulation involving miRNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell. *BBRC*, 388: 648-653, 2009.
2. Kitamura K., Ito Y., Yanazawa M., Ohsawa M., Suzuki-Migishima R., Umeki Y., Hohjoh H., Yanagawa Y., Shinba T., Itoh M., Nakamura K., and Goto Y. Three human ARX mutations cause the lissencephaly-like and mental retardation with epilepsy-like pleiotropic phenotypes in mice. *Hum. Mol. Genet.*, 18: 3708-3724, 2009.
3. Hohjoh H., Akari H., Fujiwara Y., Tamura

Y., Hirai H., and Wada K. Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene. *Gene*, 432: 60-66, 2009.

4. Tamura Y., Yoshida M., Ohnishi Y., and Hohjoh H. Variation of gene silencing involving endogenous microRNA in mammalian cells. *Mol Biol Rep*, 36: 1413-1420, 2009.

##### 2. 著書

2. 佐々木裕之&北條浩彦. 「機能性小分子 RNA の大規模シークエンス」 実験医学, 27: 14-19, 2009.

##### 3. 学会発表

(特別講演・シンポジウム)

1. Hohjoh H. "MicroRNA modulation of neuronal differentiation" Joint Symposium of the 5<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19<sup>th</sup> Antisense Symposium, Fukuoka, Japan, 11. 6. 2009.

(国際発表)

1. Eda A., Tamura Y., Yoshida M. and Hohjoh H. "Systematic gene regulation pathway involving functional small RNAs during neuronal differentiation of mouse embryonic carcinoma cell" 59<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, Hawaii, USA., October 20-24 (October 23), 2009.
2. Eda A., Tamura Y., Yoshida M. and Hohjoh H. "Gene regulation involving functional small RNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell" RNAi Europe, Berlin, Germany, September 17-18, 2009.

(国内発表)

1. 枝垂希子、田村美子、吉田満史子、北條浩彦. 「Systematic gene regulation involving miRNAs during neuronal differentiation of mouse P19 embryonic carcinoma cell」 第 32 回日本分子生物学会大会、横浜、12. 12. 2009.
2. 大西悠亮、十時泰、豊田敦、渡部聡朗、山本耕裕、徳永勝士、榊佳之、佐々木裕之、北條浩彦. 「マウス初期胚に存在する機能性 small RNA の解析」 第 82 回日本生化学学会大会、名古屋、10. 23. 2009.
3. 大西悠亮、徳永勝士、北條浩彦. 「RNAi を用いたアレル特異的発現抑制の評価方法の確立と応用」 第 54 回日本人類遺伝学会、東京、9. 23. 2009.

#### H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許出願番号：特願 2009-283653

発明者：北條浩彦、高橋理貴  
発明の名称：「長鎖繰返し配列を含有する遺伝子又は遺伝子産物の選択的又は優先的回収方法」



出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団  
出願日：平成 21 年 12 月 15 日

（ここに特許請求の範囲を記載する）

（ここに特許請求の範囲を記載する）

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表