

進行性骨化性線維異形成症における骨化シグナル活性化機序の解析
と胚性幹細胞を用いた新しい病態モデルの構築

藤 本 舞

明海大学大学院歯学研究科
歯 学 専 攻

(指導：須田直人教授)

Analysis of Molecular Mechanisms for Induction of Heterotopic
Ossification in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) and
Establishment of a Novel *in vitro* Model for FOP Using
Embryonic Stem Cells

Mai FUJIMOTO

Meikai University Graduate School of Dentistry

(Mentor: Prof. Naoto SUDA)

歯甲第 314 号 2015 年 3 月 23 日取得

本学位論文は、下記の2編の論文と、これらの論文に関する追加データ (Fig. 12A、16、17、27) をもとにして作成したテシス論文である。

1, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Suda N, Katagiri T.

Mutant Activin-Like Kinase 2 in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva are Activated via T203 by BMP Type II Receptors. *Mol. Endocrinol.* 2014 doi: 10.1210/me.2014-1301

2, Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Machiya A, Okuda A, Suda N, Katagiri T. Establishment of a novel model of chondrogenesis using murine embryonic stem cells carrying fibrodysplasia ossificans progressiva-associated mutant ALK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014 doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.012

目次

序論(骨代謝における BMP シグナルの役割).....	4
第 I 章(進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化シグナル活性化機序の解析) ..	10
抄録.....	11
Abstract.....	13
緒言.....	15
材料と方法.....	18
結果.....	23
考察.....	33
結論.....	42
第 II 章(胚性幹細胞を用いた FOP の新しい病態モデルの構築).....	43
抄録.....	44
Abstract.....	45
緒言.....	46
材料と方法.....	48
結果.....	53
考察.....	58
結論.....	64
まとめ.....	65
謝辞.....	67
参考文献.....	68
図の説明.....	88
Table.....	101
Figure.....	103

序論（骨代謝における BMP シグナルの役割）

進行性骨化性線維異形成症 (fibrodysplasia ossificans progressiva, FOP) は、骨格筋を中心とした腱、靭帯等の軟組織内に進行性の異所性骨化を生じる疾患である^{1,4}。異所性骨化の進展に伴い、関節が癒合して可動域が極度に減少する。FOP 症例の異所性骨化は心筋や平滑筋には起こらず、骨格筋に特有であると考えられている。しかし、骨格筋組織でも、舌や眼輪筋、横隔膜等に異所性骨化を認めた報告はない⁵。典型的 FOP 症例の場合、出生時に左右対称性の外反母趾様の変形、頸椎の変形・癒合が認められるものの、通常、骨格筋組織内の異所性骨化は認められない^{5,6}。しかし、10 歳前後から背部などに腫瘤が出現し、数週間後には内部に異所性骨化が認められるようになる。頭頸部領域では、頸椎の先天性奇形と頸部筋膜、靭帯、頸部周囲筋内の骨化によって頸部の運動障害が生じる⁷。一般的に FOP の異所性骨化は、体幹から末梢へ、上方部（頸・肩）から下方部（腰）へ、背部側から腹部側へと進展することが知られている⁸。FOP では、骨格筋の損傷・再生が急性の異所性骨化を誘発するため、筋肉内注射や生検、手術のような侵襲的医療処置は禁忌とされている⁵。そのため、FOP における異所性骨化発症初期段階の組織学的変化や分子機構は、未だ不明な点が多い。今日、FOP の異所性骨化を抑制するような治療法は確立されておらず、打撲等の外傷を含めた骨格筋組織の傷害を防ぐことが、異所性骨化の発症を遅延させるために重要とされる。

FOP 患者では、出生後の顎顔面の成長にも大きな影響が生じる^{7,9}。今までに FOP 患者における下顎頭の形成不全や、筋突起の骨軟骨腫が報告されている¹⁰。成長期における下顎骨の成長障害によって、多くの FOP 患者では下顎骨の劣成長

による上下顎骨の不調和を認める。内耳の形成不全も生じることが報告されている¹¹。また異所性骨化による下顎頭と下顎窩の癒合が起こり、30歳頃までに約24%のFOP症例で開口障害を生じる^{7,9}。顎顔面領域の筋肉内に生じる異所性骨化や、顎関節部の癒合によって開口障害を引き起こすため、口腔清掃状態が不良となり、カリエスや歯肉炎、歯周炎を惹起しやすくなる^{9,12}。開口障害や、局所麻酔の刺激による異所性骨化発症の危険性から、歯科治療は困難となることが多い⁹。しかし、現在開口障害を改善する積極的治療法は確立されておらず、全身麻酔下での歯科治療や、予防的口腔内ケアを行うことが推奨される^{9,12}。

FOP症例と同様の骨格筋組織における異所性骨化は、bone morphogenetic protein (BMP)と呼ばれる成長因子の移植によって誘導できると知られている。BMPは、1965年、酸で脱灰した骨基質が骨格筋組織内で異所性骨化を誘導する原因物質として発見され¹³、さらに trypsin による消化で失活したことから BMP と命名された¹⁴⁻¹⁶。異所性骨誘導活性を有した BMP は、8 M urea や 4 M guanidine hydrochloride などの強力なタンパク変性剤を用いることで脱灰骨基質から抽出することが可能であった¹⁷。抽出・精製した BMP 画分と不活性な抽出残渣を再構成して骨格筋組織に移植すると、さまざまな実験動物において異所性骨化を誘導することができる。高純度に精製された BMP 画分に含まれるペプチドのアミノ酸配列を決定した結果、BMP は、さまざまな細胞の増殖や分化、組織形成や再生に重要な transforming growth factor- β (TGF- β)ファミリーのメンバーであることが判明した¹⁸⁻²⁰。TGF- β ファミリーには、一次構造の相同性の高い BMP、activin、growth and differentiation factor (GDF)などを含む

30種類以上のメンバーが分類される²¹。脱灰骨基質から精製された異所性骨誘導活性を示す BMP 画分には、少なくとも BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 のペプチド配列が含まれた。この中で、BMP-3 以外の BMP は、それぞれのリコンビナントタンパク質が単独で異所性の骨組織や軟骨組織の誘導活性を示す^{18, 22, 23}。一方、TGF- β 自身や BMP-3 を骨格筋組織に移植しても異所性骨化を誘導しない^{18, 24}。BMP による異所性骨化が FOP 症例の異所性骨化と類似していることから、BMP 自身や BMP のシグナル伝達分子の遺伝的変異が FOP に関与する可能性が示唆された^{25, 26}。

マウス筋芽細胞株 C2C12 は、再生過程のマウス大腿筋組織から樹立された単核細胞で、骨格筋分化のマスター遺伝子である MyoD を発現しながら増殖する^{27, 28}。コンフルエントに達して増殖が停止すると、MyoD ファミリーの転写因子である myogenin 等を発現し筋細胞へと分化する²⁸。成熟した筋細胞は、myosin や troponin などの収縮タンパク質を発現し、互いに融合して多核の筋管細胞となる。C2C12 細胞を骨誘導活性のある BMP の存在下で培養すると、myogenin や myosin や troponin などの発現が抑制された単核細胞となる。この単核細胞は、alkaline phosphatase (ALP)、osteocalcin、副甲状腺ホルモン受容体など、骨芽細胞に特徴的な分子を発現する²⁹。一方、C2C12 細胞を異所性骨誘導活性のない TGF- β 1 存在下で培養すると、筋分化は抑制されるものの骨芽細胞の分化マーカーの誘導は認めない^{29, 30}。この結果は、BMP は *in vivo* だけではなく、C2C12 細胞を用いた *in vitro* の実験系でも骨芽細胞様細胞への分化誘導活性を有することを示す。このことは、TGF- β ファミリーの *in vitro* における骨芽細胞

様細胞への分化誘導活性が、*in vivo*における異所性骨誘導活性と相関することを示している。この C2C12 細胞を用いた *in vitro* の実験系は BMP 活性を簡便に評価できる有用な実験系であることが示唆された。

TGF- β ファミリーの生物活性は、標的細胞が細胞膜上に発現する膜貫通型セリン・スレオニンキナーゼ受容体によって細胞内へ伝達される³¹。これらの TGF- β ファミリーと結合する受容体は、一次構造から I 型と II 型の 2 種類に分けられる³²⁻³⁷。I 型受容体は、細胞膜貫通領域の直下にあるグリシンとセリン残基が連続した GS ドメインと呼ばれる構造が保存された 7 種類 (activin receptor-like kinase 1; ALK1, ALK2, ALK3/BMPR-IA, ALK4, ALK5/T β R-1, ALK6/BMPR-IB, ALK7) からなる^{25, 26, 38}。一方、GS ドメインを持たない 4 種類の受容体 (BMPR-II, ActR-IIA, ActR-IIB, T β R-II) は、II 型受容体に分類される^{25, 26}。II 型受容体のキナーゼは構成的に活性化されており、リガンド結合を介してリクルートされる I 型受容体を基質として、I 型受容体の GS ドメインをリン酸化する。非リン酸化状態の I 型受容体のキナーゼ活性は不活性型で、II 型受容体により GS ドメインがリン酸化されて立体構造が変化することによって不活性型のキナーゼ活性が活性化される。TGF- β や activin は先に II 型受容体と結合し、その複合体に I 型受容体が結合するが、BMP と I 型受容体の結合には II 型受容体を必要としない³¹。骨誘導活性を示す BMP は、3 種類の II 型受容体 (BMPR-II, ActR-IIA, ActR-IIB) と 4 種類の I 型受容体 (ALK1, ALK2, ALK3, ALK6) に結合し、骨誘導活性を示さない TGF- β や activin は、3 種類の II 型受容体 (T β R-II, ActR-IIA, ActR-IIB) と 3 種類の I 型受容体 (ALK4, ALK5, ALK7) と結合する²¹。

I型受容体に結合して BMP シグナルを抑制する分子として FKBP12 が報告されている³⁹。FKBP12 は、FK506 のマクロライド構造と結合し、カルシニューリン経路やセリンキナーゼ経路を阻害することで、免疫抑制効果を示す⁴⁰⁻⁴⁸。受容体にリガンドが結合していない状態では、I型受容体の細胞内領域に FKBP12 が結合し、下流へのシグナル伝達を抑制している。そこへリガンドが結合すると、II型受容体がI型受容体をリン酸化し、FKBP12 がI型受容体から遊離され、下流にシグナルが伝達される⁴⁹。以上のように FKBP12 の機能が明らかとなり、FOP の発症と FKBP12 の関係も明らかになり始めている。すなわち FOP から報告された ALK2 変異体においても、ALK2 内の遺伝的変異により FKBP12 との結合性が低下し、その結果下流にシグナルを伝達しやすくなっている可能性が示唆されている。⁵⁰⁻⁵³

各リガンドの生化学的な結合特性から明らかなように、リガンドの生物活性は結合するI型受容体に依存する。実際、BMP を結合するI型受容体である ALK1、ALK2、ALK3、ALK6 の GS ドメインに酸性アミノ酸を導入した構成的活性型変異体を C2C12 に過剰発現すると、BMP で刺激した場合と同様に、骨芽細胞の分化マーカーである ALP 活性が誘導される⁵⁴⁻⁵⁷。活性化されたI型受容体は、細胞内で複数の細胞内情報伝達系を活性化する。転写因子 Smad1、Smad5、Smad8 (Smad9) は BMP の I 型受容体の基質であり、BMP 受容体によって Smad の C 末端に保存されたセリン・バリリン・セリン (SVS) モチーフ内の 2 つのセリン残基がリン酸化される^{58,59}。Smad1 の C 末端に保存された 2 つのセリン残基を酸性アミノ酸であるアスパラギン酸(D)へ置換した DVD 変異体は、

リン酸化状態と類似した立体構造を取り、構成的活性型 Smad1 として、BMP 非存在下でも C2C12 細胞の ALP 活性や、アフリカツメガエルの腹側化を誘導する⁶⁰⁻⁶¹。活性化された Smad1/5/8 は二量体を形成し、さらに Co-Smad に分類される Smad4 とヘテロ三量体を形成して核内へ移行する。核内へ移行した Smad 複合体は、標的遺伝子のエンハンサー領域に存在する GGCGCC、または GGAGCC の 6 塩基からなるコア配列を認識して結合し転写を制御する。BMP 初期応答遺伝子として同定された Id1、Id2、Id3、BIT-1 遺伝子は、これらの Smad 結合配列が保存されており、ルシフェラーゼ・レポーターとして BMP 特異的な細胞内情報伝達の解析に応用される⁶²⁻⁶⁵。

FOP は稀少疾患の 1 つで、発症率は人種、地域、性別等によらず、世界的に人口約 200 万人あたり 1 人と推定されている^{1,2,4}。本邦では、約 60 の FOP 症例が確認されている。近年、FOP の責任遺伝子として、I 型 BMP 受容体の ALK2 をコードする *ACVR1* が同定された⁶⁶。現在、FOP 共通に ALK2 内には複数の遺伝子変異が報告されている^{4,67}。しかし、FOP は、筋損傷やウイルス感染によって急激な異所性骨化を誘導することから、生検や外科的処置が禁忌となっている。よって異所性骨化の発症の詳細なメカニズムの解明と、有効な治療法の確立には至っていない。そこで、本研究では、FOP の異所性骨化発症のメカニズムを分子レベルで解明することと、FOP の治療法の評価が可能な実験系の確立を目的とした。

第 I 章

進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化シグナル
活性化機序の解析

抄録

FOP は、幼少期から骨格筋組織内に異所性骨化を生じる遺伝性疾患である。早期に発症する典型的 FOP 症例から、BMP の I 型受容体の 1 つである ALK2 の機能獲得型変異が同定されていた。最近、47 歳まで異所性骨化を生じなかった遅発性 FOP 症例から、新規の ALK2 変異体が同定された。本研究では、典型的 FOP 症例と遅発性 FOP 症例から同定された ALK2 変異体を用いて細胞内シグナルの活性化機構を解析した。典型的 FOP および遅発性 FOP のいずれの ALK2 変異体も、C2C12 細胞に過剰発現させると BMP 活性を示す機能獲得型変異体で、BMP の II 型受容体である BMPR-II または ActR-IIb との共発現でその活性がさらに上昇した。II 型受容体による活性化は、これまでに FOP 症例から同定された 12 種類の ALK2 変異体全てに認められたが、心疾患から同定された ALK2 変異体では認められなかった。この II 型受容体による FOP の ALK2 変異体の活性化は、II 型受容体のキナーゼ活性依存的であった。ALK2 のリン酸化部位である GS ドメインの 9 つ全てのセリン・スレオニン残基をアラニン・バリン残基に置換すると、FOP の ALK2 変異体の II 型受容体による活性化が阻害された。9 つのセリン・スレオニン残基のうち、T203 残基が II 型受容体による活性化に必須であった。T203 残基を酸性アミノ酸に置換しても、ALK2 の活性化は認められず、II 型受容体存在下でも活性化は見られなかった。FOP の ALK2 変異体を C2C12 細胞に過剰発現させると、野生型 ALK2 よりも高度にリン酸化され、II 型受容体の共発現でさらにリン酸化レベルが上昇した。ALK2 に T203V 変異を導入すると、ALK2 のリン酸化レベルが低下した。ALK2 の T203 は、他の I 型 BMP 受容体にも保存されており、これらスレオニン残基はリガンド刺激

による BMP シグナルの活性化に必須であった。以上の結果から、FOP の ALK2 変異体は II 型 BMP 受容体によって活性化を受けやすい変異体であることが明らかとなった。ALK2 の変異部位により、活性化する II 型受容体が異なることが、各 ALK2 変異体による FOP の臨床症状の違いに関与する可能性がある。ALK2 変異体の II 型受容体による活性は、II 型受容体のキナーゼ活性依存的で、ALK2 の T203 残基が必須であった。しかし、ALK2 の T203 残基は自身がリン酸化されて活性化するのではなく、ALK2 分子内の他の残基のリン酸化レベルを制御することによって、ALK2 の活性化を調節する可能性が示された。本研究により初めて明らかとなった FOP の ALK2 の活性化メカニズムに基づき、今後、新規の FOP 治療法開発の可能性も示された。

Abstract

FOP is a genetic disorder characterized by progressive heterotopic ossification in soft tissues, such as the skeletal muscles. FOP has been shown to be caused by gain-of-function mutations in ALK2, which is a type I receptor for BMPs. In the present study, we examined the molecular mechanisms that underlie the activation of intracellular signaling by mutant ALK2. Overexpression of mutant ALK2 from FOP patients in C2C12 cells enhanced the activation of intracellular signaling by co-expression with type II BMP receptors, such as BMPR-II and ActR-IIB, whereas that from heart disease patients did not. This enhancement was dependent on the kinase activity of the type II receptors. Substitution mutations at all 9 serine and threonine (Ser/Thr) residues in the ALK2 GS domain simultaneously inhibited this enhancement by the type II receptors. Of the 9 Ser/Thr residues in ALK2, T203 was found to be critical for the enhancement by type II receptors. In contrast to unmutated T203, neither ALK2(R206H) nor ALK2(G325A) carrying the T203D or T203E mutation, in which the

threonine residue has been substituted with aspartic acid (D) and glutamic acid (E) at T203, induced ALP activity in C2C12 cells, even in the presence of BMPR-II and ActR-IIB. The T203 residue was conserved in all of the BMP type I receptors, and these residues were essential for intracellular signal transduction in response to ligand stimulation. The phosphorylation levels of the mutant ALK2 related to FOP were higher than those of wild-type ALK2 and were further increased by the presence of type II receptors. The phosphorylation levels of ALK2 were greatly reduced in mutants carrying a mutation at T203, even in the presence of type II receptors. These findings suggest that the mutant ALK2 related to FOP is enhanced by BMP type II receptors via the T203-regulated phosphorylation of ALK2. Thus, it was suggested that the differences between ALK2 mutants with respect to sensitivity to BMP type II receptors might affect the clinical features of FOP, especially the onset of heterotopic ossification.

緒言

FOP は、骨格筋組織内に進行性の異所性骨化を生じる疾患である。これまでに、父親から子へ遺伝した家族性 FOP 症例⁶⁶⁻⁶⁸や、一卵性双生児が共に発症した FOP 症例が報告されている^{69,70}。こうした症例の解析から、FOP は常染色体優性遺伝形式を示す遺伝性疾患であることが明らかとなった^{1,66}。しかし、稀少疾患であるために大規模な家系解析が困難であり、FOP の責任遺伝子は長い間不明であった。

2006 年、家族性 FOP 症例の連鎖解析から、FOP の責任遺伝子として 2 番染色体 q23-24 に位置し、I 型 BMP 受容体の ALK2 をコードする *ACVR1* が同定された⁶⁶。家族性 FOP 症例と孤発性 FOP 症例では、*ACVR1* に共通の c.617G>A 変異が同定され、この変異が ALK2 の GS ドメイン内に位置する 206 番目のアルギニン残基をヒスチジン残基に置換 (p.R206H) することが明らかとなった。その後の研究から、ALK2 の R206H 変異は、さまざまな人種の典型的 FOP に認められることが明らかとなっている。R206H を導入したヒト ALK2 を C2C12 細胞に過剰発現させると、BMP 非存在下で Smad1/5 のリン酸化が誘導され、骨芽細胞分化マーカーの ALP 活性が誘導される⁵⁴。これは、典型的 FOP 症例で同定された ALK2 の R206H 変異体が機能獲得型変異であることを示し、FOP の異所性骨化が BMP の細胞内情報伝達系の活性化によって誘導されることを示す。その後の研究により、骨格筋組織内で異所性骨化を生じた臨床症状の異なる FOP 症例から、ALK2 の細胞内領域に 10 種類以上の変異が同定された^{4,67}。これは、FOP が *ACVR1* 単一の変異によって起こる遺伝性疾患であることを示

唆する。現在、FOP 患者において、他の遺伝子変異は報告されていない。最近、FOP 症例以外に、先天性心疾患症例からも、新規の ALK2 細胞内領域の変異が報告されている。これらの ALK2 変異体は、野生型よりも活性が低いことから、ALK2 の機能欠失型変異と考えられる^{71,72}。さらに、小児脳腫瘍症例のエキソーム解析からも、ALK2 の変異が報告された⁷³⁻⁷⁶。

典型的 FOP 患者では、10 歳前後と幼少期から進行性に異所性骨化を生じ、筋損傷やインフルエンザ等のウイルス感染によって急激な異所性骨化が起こることが報告されている^{2,4}。最近、海外の FOP 症例から新しい ALK2 の変異体 p.G325A が同定された⁷⁷。本症例では、典型的 FOP 症例で急性異所性骨化が誘発される筋損傷でも異所性骨化を生じず、47 歳まで異所性骨化を発症していないが、ウイルス感染を疑わせる紅斑性発赤や発熱の発症後に異所性骨化が誘発された⁶¹。患者は、肩甲骨周囲に異所性骨化を認め、典型的 FOP 症例の異所性骨化の好発部位と一致していた。この遅発性 FOP 症例では、典型的 FOP 症例と同様に出生時の外反母趾様変形が認められた⁶¹。これらの症状の違いは、ALK2 の R206H 変異体と G325A 変異体の間には、活性化機序に差があることを示唆する。そこで本研究では、典型的 FOP 変異体である ALK2 の R206H 変異体と、遅発性 FOP から同定された新規変異体である G325A 変異体における細胞内シグナルの活性化機序を解析した。その結果、両変異体とも II 型 BMP 受容体のキナーゼ活性依存的に活性化されるものの、それぞれを活性化する II 型受容体が異なることが明らかとなった。さらに、ALK2 内の II 型受容体によるリン酸化部位の解析から、ALK2 の GS ドメイン内に位置する 203 番目のスレオニン

残基が、II型受容体による ALK2 のリン酸化に重要なことを見いだした。このスレオニン残基は、ALK1、ALK3、ALK6 にも保存されており、BMP による異所性骨誘導活性を伝達する全ての I型 BMP 受容体において、このスレオニン残基を介した受容体のリン酸化レベルの制御が、シグナル伝達に重要なメカニズムであることを明らかとした。

材料と方法

発現ベクターの構築：

野生型ヒト ALK2 cDNA は、ヒト腎臓の全 RNA (Clontech, Palo Alto, CA, USA) から Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で逆転写した cDNA を鋳型として、PrimeSTAR DNA polymerase (TAKARA, 滋賀) を用いて、V5 タグが付加された pcDNA3 ベクターに挿入した。ALK2 の C 末端に V5 タグを付加した形で polymerase chain reaction (PCR) 法で増幅し、得られた cDNA を pcDEF3 ベクター⁷⁸ の *Bam*HI と *Eco*RV 切断部位間に挿入した。ALK2 の各変異体 (R206H⁵⁴、G325A、L196P⁷⁹、R202I、PF197-8L、Q207E、R258S、G328R、G328W、G328E、G356D⁵⁵、R375P、Q207D、A15G、H286N、R307L および L343P) は、野生型発現ベクターを鋳型として PrimeSTAR DNA polymerase (TAKARA) を用いた PCR 法により、変異を導入して作製した。用いた各プライマーの塩基配列を、Table 1 に示す。さらに、PrimeSTAR DNA polymerase (TAKARA) を用いた PCR 法により、R206H 変異体と G325A 変異体の GS ドメイン内のセリン残基をアラニン残基へ、スレオニン残基をバリン残基へそれぞれ置換した。

マウス ALK1 cDNA は、TRIzol (Invitrogen) を用いて抽出したマウス腎臓、マウス ALK3 cDNA はマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞、マウス ALK6 cDNA はマウス軟骨の各全 RNA を用いて、Superscript III (Invitrogen) で逆転写した cDNA を鋳型に、PrimeSTAR DNA polymerase (TAKARA) を用い PCR 法で pcDEF3 ベクターに挿入した。さらに、各野生型発現ベクターを鋳型として、

PrimeSTAR DNA polymerase (TAKARA) を用いた PCR 法により、ALK1 (T197V)、ALK3 (T229V)、ALK6 (T199V) 変異を導入した。

マウス ActR-IIA とマウス ActR-IIB は、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞の全 RNA を鋳型とし、PrimeSTAR DNA polymerase (TAKARA) を用いて Polymerase chain reaction (PCR) 法で増幅した。得られた cDNA を pcDEF3 ベクターに挿入し、C 末端に FLAG タグを付加した。構築したベクターを鋳型として PCR 法により、ActR-IIB (K241R) 変異を導入し、キナーゼ活性が消失した II 型受容体を作製した。本研究で作製した全ての cDNA は、ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて塩基配列を確認した。ヒト BMPR-II は、宮園浩平先生 (東京大学) より供与していただいた。

細胞培養とトランスフェクション：

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞は、15% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS; Nichirei, 東京) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Nacalai Tesque, 京都) で 37.0°C, CO₂ 濃度 5.0% の環境下で培養した²⁹。C2C12 細胞は 1.5×10⁴ 個/cm² の密度で播種し、翌日、96 穴プレートの 1 ウェルあたり 200 ng プラスミド DNA を、0.5 ml の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用して製品に添付されたプロトコールに従い遺伝子導入した。ヒト胎児由来腎細胞 HEK293A 細胞は、10% FBS (Nichirei) を含む DMEM (Nacalai Tesque) で培養し、3×10⁴ 個/cm² の密度で播種し、翌日、各プラスミド DNA を遺伝子導

入した。

ALP 活性の測定とルシフェラーゼ・レポーターアッセイ：

C2C12 細胞における骨芽細胞様細胞への分化の指標として、96 穴プレートに播種した細胞の ALP の酵素活性を測定した。細胞を PBS (phosphate buffered saline) にて洗浄後、acetone-ethanol 溶液を室温で 1 分間処理した。ALP 活性は、1 mg/ml *p*-nitrophenylphosphate を含む ALP 測定液 [0.1 mM diethanolamine, 0.5 mM MgCl₂ (pH 10.0)] を用い、室温で 60 分間反応させた後、NaOH 溶液を添加して反応を停止させ、遊離した *p*-nitrophenol の量を波長 405 nm の吸光度を吸光度計 (Infinite F50, Tecan, Switzerland) で測定した^{54,80}。

ルシフェラーゼ・レポーターアッセイは、BMP シグナル特異的なルシフェラーゼ・レポーターとして、*Id1* の BMP 応答領域で firefly luciferase を発現する Id1WT4F-luc⁶² (40 ng/well) を使用した。また、同時に補正用の SV40 プロモーターで renilla luciferase を発現する phRL-SV40 (Promega, Madison, WI) (10 ng/well) を、全 DNA 量を 200 ng/well に合わせて 96 穴プレートに播種した細胞に導入し、BMP 特異的なルシフェラーゼ活性を標準化した。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いてプロトコールに従って測定 (GENios, Tecan) した^{60,81}。一部の実験では、遺伝子導入後、1 ng/ml GDF2/BMP9 (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)、10 ng/ml BMP7 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)、10 ng/ml BMP4 (R&D Systems,

Minneapolis, MN, USA)、10 ng/ml GDF5 (Peprotech) を含む新鮮な培地に交換し、翌日、ルシフェラーゼ活性を測定した。

ウエスタンブロットおよび Phos-tag 解析：

細胞を 1% Triton X-100 を含む Tris-HCl buffer [10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 7.8)] で溶解し、17,400 g で 30 分間遠心分離した上清をウエスタンブロットに使用した。調整したサンプルは、8% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分画した後、Tobin 転写バッファー [25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine 及び 20% Methanol (pH 8.3)] を用いて、250 mA、1 時間、PVDF メンブレン (Immobilon-P membrane, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に転写した。ウエスタンブロットには、以下の一次抗体を使用した。ウサギ抗 Phospho-Smad1/5 モノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA; 1000 倍希釈)、マウス抗 FLAG モノクローナル抗体 (clone M2, Sigma-Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA; 500 倍希釈)、マウス抗 V5 モノクローナル抗体 (clone V5005, Nacalai Tesque; 1000 倍希釈)、ウサギ抗 Smad1 モノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology; 1000 倍希釈)、ウサギ抗 tubulin ポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology; 1000 倍希釈)。二次抗体として、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体、またはヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA; 2000 倍希釈) を使用した。また、化学発光反応には Immobilon Western Chemiluminescent HRP

Substrate (Merck Millipore) を用い、ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて検出した⁵⁴。検出した画像は、Profinia Software (Bio-Rad) を用いて解析した。

ALK2 のリン酸化量は、Phos-tag 試薬 (Wako Chemicals, 大阪) を用いて解析した。サンプルを、75 μ M Phos-tag、100 μ M $MnCl_2$ を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分画した。その後、ゲルを 1 mM EDTA を添加した Tobin 転写バッファー [25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine 及び 20% Methanol (pH 8.3)] で 20 分間洗浄し、再度、10 分間転写バッファーで洗浄した後、PVDF メンブレンに転写した⁸²⁻⁸⁴。Phos-tag 試薬を用いたウェスタンブロットには、一次抗体としてマウス抗 V5 モノクローナル抗体 (Nacalai Tesque; 1000 倍希釈)、二次抗体として、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 2000 倍希釈) を使用した。また、化学発光の検出は Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore) を用い、ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad) を用いて検出した⁵⁴。検出した画像は、Profinia Software (Bio-Rad) を用いて解析した。

統計処理：

統計処理は、2 群間比較においては Student's t 検定、3 群間以上の比較においては Tukey-Kramer 試験で ANOVA を用いて行った。結果は平均 \pm SD (n = 3) として表した。統計的有意差は、*は $p < 0.05$ 、** は $p < 0.01$ として示した。

結果

ALK2 の G325A 変異体も Smad1/5 を介して BMP シグナルを活性化する

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に、ヒト野生型 ALK2、ALK2 の R206H 変異体、及び G325A 変異体をそれぞれ過剰発現させた。野生型 ALK2 は BMP シグナル特異的ルシフェラーゼ・レポーターを誘導しなかったのに対し、ALK2 の G325A 変異体と R206H 変異体は用量依存的にレポーター活性を誘導した (Fig. 1A)。G325A 変異体が誘導したレポーター活性は、いずれの用量でも R206H 変異体が誘導した活性よりも弱かった (Fig. 1A)。また、G325A および R206H 変異体が誘導したレポーター活性は、I 型 BMP 受容体の Smad 経路特異的阻害剤である LDN-193189⁸⁵ によって用量依存的に抑制された (Fig. 1B)。FLAG-Smad1 と各 ALK2 を共発現させると、G325A および R206H 変異体のいずれも Smad1/5 のリン酸化レベルが増加し、その量は G325A 変異体の方が低かった (Fig. 2A)。また、各 ALK2 と Smad1 の共発現で誘導される ALP 活性も、Smad1/5 のリン酸化レベルと同様に R206H よりも G325A 変異体の方が低かった (Fig. 2B)。以上の結果から、遅発性 FOP 症例から同定された ALK2 の G325A 変異体も、典型的 FOP 症例の R206H 変異体と同様に、Smad 依存的な細胞内情報伝達系を活性化する機能獲得型変異体であるものの、G325A 変異体の活性は R206H 変異体よりも弱いことが示された。

II 型 BMP 受容体による変異 ALK2 の活性化

TGF- β ファミリーの I 型受容体は、II 型受容体によって活性化される⁸⁶。そこ

で、C2C12細胞に各 ALK2 と TGF- β ファミリーに対する 4 種類の II 型受容体 (BMPR-II、ActR-IIA、ActR-IIB、および T β R-II) をそれぞれ共発現させて、誘導される ALP 活性を評価した。BMPR-II は、R206H 変異体との共発現で用量依存的に ALP 活性を誘導したが、野生型 ALK2 あるいは G325A 変異体との共発現では ALP 活性を誘導しなかった (Fig. 3A)。ActR-IIA は、単独の過剰発現で C2C12 細胞の ALP 活性を誘導した (Fig. 3B)。ActR-IIA と各 ALK2 を共発現させると、その活性は ActR-IIA 単独で誘導した ALP 活性よりも低下した (Fig. 3B)。ActR-IIB は、野生型 ALK2 との共発現では ALP 活性を誘導しなかった (Fig. 3C)。しかし、R206H 変異体や G325A 変異体との共発現で、ActR-IIB の用量依存的に強い ALP 活性を誘導した (Fig. 3C)。T β R-II の場合、どの条件でも ALP 活性は誘導されなかった (Fig. 3D)。以上の結果から、FOP 症例から同定された ALK2 の R206H 変異体は II 型 BMP 受容体の BMPR-II と ActR-IIB によって、G325A 変異体は ActR-IIB によって活性化されることが示された。

これまでに、臨床症状が異なる FOP 症例から 12 種類の ALK2 変異体 (R206H⁶⁶、G325A⁷⁷、L196P⁸⁷、R202I⁸⁸、PF197-8L⁶⁷、Q207E⁶⁷、R258S⁸⁹、G328R⁶⁷、G328W⁶⁷、G328E⁹⁰、G356D⁹¹、および R375P⁶⁷) が同定されている。また、近年、先天性の心疾患症例から、4 種類の ALK2 変異体 (A15G、H286N、R307L、および L343P) が同定された^{71, 72}。これらの心疾患症例から同定された変異体は、むしろ野生型 ALK2 よりも低い酵素活性を示す^{71, 72}。そこで、これらの ALK2 変異体に対する BMP の II 型受容体の影響を検討した。G325A 変異体と Q207E 変異体を除いた 10 種類の変異体は BMPR-II との共発現で C2C12

細胞の ALP 活性を相乗的に誘導し、12 種類全ての変異体が ActR-IIB との共発現で ALP 活性を誘導した (Fig. 4A, 4B)。G325A 変異体と Q207E 変異体は、ActR-IIB との共発現によってのみ ALP 活性を亢進した (Fig. 4A, 4B)。一方、心疾患症例の 4 種類の ALK2 変異体は、BMPR-II および ActR-IIB との共発現でも ALP 活性を誘導しなかった (Fig. 4C, 4D)。これらの結果から、異所性骨化を伴う FOP 症例で同定されたすべての ALK2 変異体が、BMPR-II または ActR-IIB による活性化を受ける活性型変異であることが判明した。一方、心疾患で同定された ALK2 変異体は、II 型受容体存在下でも活性化しない機能喪失型変異と考えられた。

FOP の ALK2 変異体の活性化には II 型受容体のリン酸化酵素活性が必須である

TGF- β ファミリーの II 型受容体はセリン・スレオニンキナーゼで、I 型受容体を基質としてリン酸化して活性化する⁹²。そこで、FOP の ALK2 変異体の活性化における II 型受容体のキナーゼ活性の役割を検討するために、BMPR-II および ActR-IIB の ATP 結合部位であるリジン残基をアルギニン残基に置換し、キナーゼ活性を消失させた変異体 (KR 変異体) を作製し、ALK2 変異体との共発現での ALP 活性について検討した。ALK2 の R206H 変異体は、野生型 BMPR-II との共発現で C2C12 細胞のリン酸化 Smad1/5 を誘導し、ALP 活性を上昇させた (Fig. 5A, 5C)。一方、R206H 変異体と BMPR-II (KR) との共発現では、リン酸化 Smad1/5 も ALP 活性も、BMPR-II(WT) よりも弱かった (Fig. 5A, 5C)。

同様に、ALK2 の G325A 変異体も、ActR-IIB (KR) との共発現ではリン酸化 Smad1/5 や ALP 活性を誘導しなかった (Fig. 5B, 5D)。これらの結果は、II 型受容体による FOP の ALK2 変異体の活性化には、II 型受容体のキナーゼ活性依存的な ALK2 のリン酸化が重要なことを示唆する。

ALK2 の構成的活性型 Q207D 変異体は FOP の ALK2 変異体と活性化機序が異なる

ALK2 の Q207D 変異体は、ALK2 の人為的な遺伝子改変によって作製された構成的活性型変異体である。Q207D 変異体は FOP 症例で同定されていないものの、この変異を導入したマウスが FOP の病態モデルとして用いられている^{93, 94}。ALK2 の Q207D 変異体を C2C12 細胞に単独で過剰発現させると、弱い ALP 活性を誘導した (Fig. 6A - 6D)。そこで、Q207D 変異体と各 II 型受容体を共発現させた。FOP の ALK2 変異体の場合と同様に、BMPR-II や ActR-IIB との共発現では ALP 活性が上昇し (Fig. 6A, 6C)、ActR-IIA との共発現では ActR-IIA 単独より ALP 活性が低下し (Fig. 6B)、T β R-II との共発現では ALP 活性が誘導されなかった (Fig. 6D)。さらに、II 型受容体の KR 変異体の影響を調べると、R206H 変異体や G325A 変異体とは異なり、Q207D 変異体は BMPR-II (KR) や ActR-IIB (KR) との共発現でも C2C12 細胞の ALP 活性を誘導した (Fig. 7A, 7B)。Q207D 変異体は、単独の過剰発現で Smad1/5 のリン酸化を誘導し、その Smad1/5 のリン酸化レベルは II 型受容体の野生型および KR 変異体の共発現で変化しなかった (Fig. 7C, 7D)。以上のように、ALK2 の構成的活性型変異体

である Q207D 変異体は、FOP の ALK2 変異体と同様に BMP の II 型受容体によって活性化された。しかし、Q207D 変異体の活性化は II 型受容体のキナーゼ活性に依存しておらず、FOP の ALK2 変異体とは活性化機序が異なる可能性が示された。

II 型受容体による変異 ALK2 の活性化には T203 残基が重要な役割を果たす

ALK2 の R206H および G325A 変異体は、II 型受容体のキナーゼ活性依存的に活性化された。TGF- β ファミリーの II 型受容体は、I 型受容体の細胞膜直下に位置する GS ドメインをリン酸化して活性化する⁹⁵。ALK2 の GS ドメインは、5 つのセリン残基と 4 つのスレオニン残基を含む (Fig. 8)。そこで、これら 9 つのセリン残基とスレオニン残基をそれぞれアラニン残基とバリン残基に置換し、II 型受容体によってリン酸化を受けない ALK2 変異体の活性を解析した (Fig. 8)。9 カ所全てを置換した 9AV 変異を ALK2 の R206H と G325A 変異体にそれぞれ導入すると、BMPR-II や ActR-IIB の存在下であっても C2C12 細胞のリン酸化 Smad1/5 や ALP 活性が誘導されなくなった (Fig. 9A - 9D)。そこで、203 番目のスレオニン残基 (T203) と 209 番目のスレオニン残基 (T209) 以外の 7 カ所を置換した 7AV 変異体と、両スレオニン残基だけを置換した 2AV 変異体を作製し、それらの活性を検討した (Fig. 8)。R206H および G325A 変異体は、どちらも 7AV 変異を導入しても II 型受容体によって活性化され、リン酸化 Smad1/5 と ALP 活性が誘導された (Fig. 9A - 9D)。一方、2 カ所を置換した 2AV 変異を導入すると、9AV 変異と同様に R206H と G325A 変異体の両

者において、II型受容体による活性化が阻害された (Fig. 9A - 9D)。これらの結果は、II型受容体による FOP の ALK2 変異体の活性化には、GS ドメイン内の T203、または T209 のどちらか一方、あるいは両残基が重要であることを示唆する。

そこで、ALK2 の T203 と T209 をそれぞれバリン残基に置換した T203V と T209V 変異体を構築し、II型受容体による活性化を検討した (Fig. 10)。T209V 変異を導入した R206H と G325A 変異体は、それぞれ II型受容体との共発現で C2C12 細胞のリン酸化 Smad1/5 と ALP 活性を誘導した (Fig. 11A - 11D)。しかし、T203V 変異を導入した R206H と G325A 変異体は、II型受容体存在下でもリン酸化 Smad1/5 や ALP 活性を誘導しなかった (Fig. 11A - 11D)。この結果から、II型受容体による FOP の ALK2 変異体の活性化には、ALK2 の GS ドメイン内の T203 残基が重要と考えられた。この仮説をさらに検証するため、R206H と G325A 変異体において、T203 以外の 8 カ所を置換した 8AV 変異を作製し、それらの活性を検討した (Fig. 10)。すると、R206H と G325A の 8AV 変異体は、どちらも II型受容体の共存在下でリン酸化 Smad1/5 と ALP 活性を誘導することが明らかとなった (Fig. 11A - 11D)。以上の結果から、II型受容体による FOP の ALK2 変異体の活性化には、ALK2 の GS ドメイン内にある T203 残基が重要な役割を果たすことが確認された。

リガンド刺激による BMP の I 型受容体を介した細胞内シグナル活性化にも ALK2 の T203 に相当するスレオニン残基が必須である

ALK2のT203は、さまざまな脊椎動物のALK2に保存されている(Fig. 12A)。また、ALK2のT203に相当するスレオニン残基は、他のI型BMP受容体であるALK1、ALK3、ALK6のGSドメインにも保存されていた(ALK1: T197、ALK3: T229、ALK6: T199)(Fig. 12B)。そこで、ALK2のT203V変異に相当する変異をALK1、ALK3、ALK6に導入し、BMP/GDF刺激によるシグナル伝達における役割を解析した。野生型あるいはTV変異を導入したALK1、ALK2、ALK3、ALK6を発現させ、それぞれの受容体への結合が報告されているリガンド(GDF2/BMP9、BMP7、BMP4、GDF5)で刺激して、BMPシグナル特異的レポーターの活性を測定した。いずれのI型受容体も、野生型を過剰発現させると、リガンド刺激で誘導されるレポーター活性が上昇した(Fig. 13A - 13D)。一方、TV変異を導入したI型受容体が発現させた場合には、それぞれのリガンドで刺激してもレポーター活性は上昇せず、むしろ、Mock vectorの導入群よりも低下傾向を示した(Fig. 13A - 13D)。これらの結果は、ALK2のT203に相当する、すべてのBMPのI型受容体に保存されたGSドメイン内のスレオニン残基が、BMPシグナルの活性化に必須なことを示す。

ALK2のT203は非リン酸化状態でシグナルを活性化する

FOPのALK2変異体の活性化において、T203がII型受容体によるリン酸化部位として機能する可能性を検討した。リン酸化反応は、そのアミノ酸残基に負の電荷を導入し、立体構造変化を引き起こす。リン酸化部位のアミノ酸を酸性アミノ酸に置換すると、側鎖のカルボキシル基が解離して負の電荷を持ち、

リン酸化と同様な立体構造変化を受けることが、TGF- β ファミリーI型受容体や下流の転写因子 Smad を含めた数多くの分子で報告されている^{56, 60, 95}。そこで、ALK2 の T203 がリン酸化されてシグナルを活性化する可能性を検討するために、R206H および G325A 変異体の T203 残基を酸性アミノ酸のアスパラギン酸 (D) やグルタミン酸 (E) 残基に置換した変異体を作製し活性を検討した。これらの変異体を C2C12 細胞に発現させると、T203V 変異の場合と同様に、BMPR-II または ActR-IIB 受容体存在下でも ALP 活性は誘導されなかった (Fig. 14A, 14B)。この結果は、ALK2 の T203 が II 型受容体によるリン酸化を受けてリン酸化スレオニンとして機能するのではなく、非リン酸化状態のスレオニン残基として BMP シグナルを活性化する可能性を示唆する。

ALK2 の T203 は II 型受容体依存的な ALK2 のリン酸化量を制御する

T203 の ALK2 のリン酸化レベルに対する機能を解析した。リン酸化タンパク質に親和性の高い Phos-tag 試薬を添加したポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE を行うと、リン酸化されたタンパク質の移動度が低下し、同じ分子でもリン酸化分子を非リン酸化分子と分離できる。C2C12 細胞に各 ALK2 を発現させて Phos-tag でリン酸化レベルを解析すると、野生型 ALK2 は全体の 9% がリン酸化されていたのに対し、R206H と G325A 変異体では各々 34% と 20% がリン酸化されていた (Fig. 15A)。これら ALK2 変異体のリン酸化レベルは、II 型受容体との共発現によってさらに増加した (Fig. 15A)。そこで、ALK2 に T203V 変異を導入し、ALK2 のリン酸化レベルの変化を検討した。T203V 変異

を導入すると、野生型のみならず R206H と G325A 変異体でもリン酸化レベルが T203 に変異のないものと比較して低下し、さらに II 型受容体との共存下でもリン酸化レベルが低下した (Fig. 15B)。これらの結果から、ALK2 の T203 残基は、II 型受容体による ALK2 のリン酸化レベルを増加させる重要なアミノ酸残基である可能性が示された。

ActR-IIA が誘導する ALP 活性は、LDN-193189 によって抑制される

II 型受容体の 1 つである ActR-IIA を C2C12 細胞に発現させると、それ単独で ALP 活性を誘導した (Fig. 3B, 6B)。そこで、その誘導された活性が LDN-193189 の添加によって変化するか否かを検討した。ActR-IIA は、単独の過剰発現で C2C12 細胞の ALP 活性を誘導した (Fig. 16)。ActR-IIA と R206H 変異体を共発現させると、その活性は ActR-IIA 単独で誘導した ALP 活性よりも低下した (Fig. 16)。そこに LDN-193189 を添加すると、これらの ALP 活性は両者ともに抑制された (Fig. 16)。この結果から、ActR-IIA が誘導する ALP 活性は、ALK2 以外の他の I 型 BMP 受容体によって伝達されている可能性が示唆された。

FOP の ALK2 変異体は FKBP12 によって抑制される

FKBP12 は、BMP シグナルの抑制分子として報告されている³⁹。FOP 患者から報告された ALK2 変異体の活性化と FKBP12 の関与について検討した。C2C12 細胞に各 ALK2 変異体を過剰発現させると、リガンド非存在下でも BMP

シグナル特異的ルシフェラーゼ・レポーターを誘導した (Fig. 17)。さらに、FKBP12 を共発現させると、いずれの変異体でもその上昇した活性は抑制された (Fig. 17)。このことは、FOP で報告されている ALK2 変異体の活性化機序が、FKBP12 による抑制の減弱以外の機序によって起こることを示唆する。

考察

FOP は、BMP の I 型受容体 ALK2 の機能獲得型変異により、骨格筋組織内で異所性骨化が起こる遺伝性疾患である。典型的 FOP 患者では、幼少期から異所性骨化を生じ、筋損傷やインフルエンザ等のウイルス感染によって急激な異所性骨化が起こる^{2,4}。典型的 FOP 症例から見出された ALK2 の R206H 変異体の解析から、この R206H 変異体は構成的活性型変異と考えられた⁵⁴。近年、47 歳で初めて異所性骨化を発症した遅発性 FOP 症例から、ALK2 の新規変異体として G325A 変異が見出された⁷⁷。この遅発性 FOP 症例では、典型的 FOP 症例と同様に出生時の外反母趾様変形が認められる一方、幼少期に筋損傷による異所性骨化は生じなかった⁷⁷。これらの知見から、異所性骨化を生じる FOP 症例であっても、ALK2 の変異によって、骨化を誘導する細胞内シグナルの活性化機序が異なる可能性が示唆された。そこで本研究では、典型的 FOP 症例と遅発性 FOP 症例から同定された ALK2 変異体を比較解析することにより、臨床的な表現系の違いを生じる分子メカニズムを解明し、FOP における異所性骨化の発症機構を明らかにすることを目的とした。

BMP の II 型受容体による FOP 症例の ALK2 変異体の活性化

典型的 FOP 症例の R206H 変異体と遅発性症例の G325A 変異体を C2C12 細胞に過剰発現させると、両者とも BMP 非存在下で BMP 特異的細胞内シグナルを活性化した (Fig. 1A)。C2C12 細胞の骨芽細胞様細胞の分化マーカーである ALP 活性を比較すると、G325A 変異体が誘導した酵素活性は、R206H 変異体

が誘導した活性よりも低かった (Fig. 2B)。従って、G325A 変異を有する症例が遅発性である原因の一部は、G325A 変異体の活性が低いためと考えられた。FOP の ALK2 変異体を C2C12 細胞に過剰発現させると、ALK2 キナーゼの基質となる転写因子 Smad1/5 のリン酸化が亢進した (Fig. 2A)。この結果は、既報^{54, 55, 79}のように FOP 症例で見出された ALK2 変異体が機能獲得型変異であり、BMP 非存在下でも ALK2 が構成的に活性化された状態にある可能性を示唆した。しかし、ALK2 の構成的活性型変異として知られる Q207D 変異体とは異なり、FOP 症例から同定された ALK2 の変異体単独の過剰発現では、C2C12 細胞の ALP 活性をほとんど誘導しなかった (Fig. 2B, 3A - 3D)。これは、FOP 症例の ALK2 変異体が機能獲得型であるもの、遺伝的変異だけでは骨形成を誘導するための活性化が不十分な可能性を示唆する。

そこで、TGF- β ファミリーの I 型受容体の活性化に重要な II 型受容体の関与を検討した。その結果、典型的 FOP 症例の R206H 変異体は BMPR-II または ActR-IIB との共発現によって活性化され、遅発性 FOP 症例の G325A 変異体は BMPR-II では活性化されず、ActR-IIB によって活性化されることが明らかとなった (Fig. 3A - 3D)。これら BMPR-II と ActR-IIB による活性化は、これまでに FOP 症例から同定された 12 種類全ての変異体でも確認された (Fig. 4A, 4B)。一方、心疾患患者から機能喪失型変異として同定された ALK2 変異は、どちらの II 型受容体によっても活性化されなかった (Fig. 4C, 4D)。最近、ショウジョウバエを用いた研究からも、ALK2 の R206H 変異体が II 型受容体によって活性化されることが報告されている⁹⁶。これらの結果から、異所性骨化を伴う FOP

の ALK2 変異体は、BMP の II 型受容体である BMPR-II、あるいは ActR-IIB による活性化を受けやすい機能獲得型変異体であると考えられた。遅発性症例の G325A 変異体は、ActR-IIB で活性化された (Fig. 3C)。一方、BMPR-II との共発現では活性化されなかった (Fig. 3A)。これは、ALK2 の変異部位により、活性化する II 型受容体が異なることを示し、遺伝的に異なる変異を持つ FOP 症例の臨床症状の違いが、各 ALK2 変異体の II 型受容体に対する感受性の違いで起こる可能性を示唆する。今回の発見は、FOP の治療法を開発する上で、II 型受容体が新たな標的となる可能性も示唆する。

ALK2 の R206H 変異を有する典型的 FOP 症例では、成長に伴う比較的穏やかな異所性骨化に加え、筋損傷、あるいはウイルス感染後の急性異所性骨化が知られている^{2,4}。一方、G325A 変異が同定された今回の遅発性 FOP 症例では、47 歳までの間、筋損傷後にも異所性骨化を生じなかったが、ウイルス感染を疑わせる紅斑性発赤や発熱の発症後に異所性骨化が誘発された⁷⁷。従来の典型的 FOP 症例からは、筋損傷とウイルス感染による異所性骨化は同じ機序で誘発されると予想されていた。しかし、今回の遅発性 FOP 症例の所見は、筋損傷とウイルス感染後の異所性骨化は異なる分子メカニズムで誘発される可能性を示唆する。本研究の結果を考え合わせると、典型的 FOP 症例の R206H 変異体のみを活性化した BMPR-II が筋損傷後の異所性骨化に関与し、R206H 変異体と G325A 変異体の両者を活性化した ActR-IIB がウイルス感染後の異所性骨化に関与する可能性を示唆する。それぞれの ALK2 変異体の活性化機序として、筋損傷やウイルス感染により II 型受容体の遺伝子発現や細胞膜上への輸送が亢進

するような可能性が考えられる。今後、筋損傷やウイルス感染の *in vivo* モデルを用いて、リアルタイム PCR による mRNA 発現量の定量化や、特異的抗体を用いた FACS 解析による膜タンパクの解析等を行い、これらの可能性を実験的に検証する必要がある。

本研究において、ALK2 と II 型受容体を共発現させると ALK2 のタンパク量の減少が認められた (Fig. 5C, 5D, 7C, 7D, 9C, 9D, 11C, 11D, 15A, 15B)。受容体の発現量に関していくつかの検討を行ったが、未だそのメカニズムは不明である。しかし、細胞に ALK2 単独で発現させた時の発現量に変化はなく (data not shown)、リン酸化 Smad1/5 の発現量は、ALK2 の発現量に非依存であった。ALK2 と II 型受容体の共発現によって、この両者が複合体を形成し下流にシグナルを伝達する際に ALK2 が分解される可能性も考えられる。今後、より詳細なメカニズムの解明が必要であると考えられる。

ALK2 の Q207D 変異体は、人為的な変異導入実験で樹立された構成的活性型受容体である。FOP 症例から見出された ALK2 変異体も、Q207D 変異体のように *in vitro* における過剰発現で BMP 活性を示すことから、FOP 症例で同定された変異体ではないものの、Q207D 変異を導入した遺伝子改変マウスが FOP の病態モデルとして用いられている^{97,98}。本研究では、Q207D 変異体が FOP 症例の ALK2 変異体と同様に、BMPRII や ActRIIB との共発現によって活性化されることを明らかにした (Fig. 6A - 6D)。しかし、FOP の ALK2 変異体とは異なり、Q207D 変異体はキナーゼ活性を失った II 型受容体の KR 変異体によっても活性化されることが判明した (Fig. 7A - 7D)。この結果は、Q207D 変異体は、

単独で活性型であるのに対し、FOP から報告された ALK2 変異体は、活性化に II 型受容体を必要とすることを示す。このように Q207D 変異体が FOP 症例の ALK2 変異体とは異なる分子メカニズムで、細胞内の BMP シグナルを活性化している可能性を示唆する。従って、FOP の異所性骨化の分子メカニズムを *in vivo* で解析し、FOP に対する治療薬候補化合物の活性を評価するためには、FOP 症例から見出された遺伝子変異を導入した、ヒトの FOP と同様の分子メカニズムで異所性骨化を発症する新しい病態モデルの確立が必要である。

細胞培養に添加するウシ血清中には、筋分化抑制活性と骨芽細胞分化促進活性が認められる⁸⁰。C2C12 細胞に細胞内領域を欠失させたドミナントネガティブ型の ALK3 を発現させると、ウシ血清の筋分化抑制活性と骨芽細胞分化促進活性が阻害された⁵⁶。その後、この活性を指標に、血清から BMP-4 や BMP-9 が単離・同定され、血清存在下では、細胞が常に微量 BMP の影響を受けていることが明らかとなった^{99,100}。C2C12 細胞は、I 型 BMP 受容体として ALK1、ALK2、ALK3、II 型 BMP 受容体として BMPR-II、ActR-IIA、ActR-IIB を発現する^{56,101}。本研究で示したように、C2C12 細胞に ActR-IIA を発現させると、単独の過剰発現で ALP 活性を誘導した (Fig. 3B, 6B)。この ActR-IIA 受容体を過剰発現させた C2C12 細胞に I 型受容体の Smad 経路特異的な低分子阻害剤である LDN-193189 を添加すると、ALP の誘導活性が抑制された (Fig. 16)。この結果は、過剰発現させた ActR-IIA が内在性の I 型 BMP 受容体の活性化を介して、C2C12 細胞の ALP 活性を誘導したことを示す。C2C12 細胞では、I 型受容体の中で ALK3 の発現量が高く、ALK3 のドミナントネガティブ型受容体が BMP2

の作用を阻害することや、ALK3 の構成的活性型変異体が ALP 活性を誘導することが報告されており、ALK3 が C2C12 細胞における機能的 BMP 受容体の 1 つであることが示されている⁵⁶。本研究で示したように、C2C12 細胞に ActR-IIA と ALK2 を共発現させると、ActR-IIA 単独で誘導される ALP 活性が低下することが判明した (Fig. 3B, 6B)。以上の結果を考え合わせると、C2C12 細胞に過剰発現させた ALK2 の ActR-IIA に対する抑制効果は、ALK2 が ActR-IIA と内在性 ALK3 の相互作用に競合的に働くためと予想される。このように、本研究のような *in vitro* における受容体の過剰発現実験には、細胞の内在性受容体の発現量が影響する可能性が示唆された。*In vivo* の ALK2 発現細胞でも、*in vitro* と同様に、他の BMP 受容体との相互作用でシグナル量が増加する可能性がある。現時点で、FOP の異所性骨化における軟骨細胞や骨芽細胞の前駆細胞は明らかでない。骨格筋組織における ALK2 発現細胞の解析から、これらの前駆細胞が同定され、より生理的な BMP シグナルの活性化機構が明らかになる可能性がある。

ALK2 の活性化における T203 の役割

本研究では、II 型受容体による FOP 症例の ALK2 変異体の活性化には、ALK2 の GS ドメインに局在する T203 残基が必須なことを明らかにした。従来、TGF- β ファミリー I 型受容体の活性化は、II 型受容体による GS ドメイン内のリン酸化量の増加によると考えられており⁹⁵、特定の 1 残基が活性を制御するような機序は報告されていない。II 型受容体による ALK2 変異体の活性化には、II 型受容

体のキナーゼ活性が必須であったことから、T203 残基が II 型受容体によるリン酸化部位である可能性を検討した。リン酸化部位のアミノ酸を酸性アミノ酸に置換すると、側鎖のカルボキシル基が解離して負の電荷を持ち、リン酸化反応と同様な立体構造変化を受けることが報告されている。TGF- β ファミリー I 型受容体や下流の転写因子 Smad を含めた数多くの分子で報告された^{56,60,95}。そこで本研究では、ALK2 の T203 がリン酸化されてシグナルを活性化する可能性を検討するために、T203 残基を酸性アミノ酸のアスパラギン酸 (D) やグルタミン酸 (E) 残基に置換した変異体を作製し活性を検討した。しかし、T203 のリン酸化を模倣した T203D、および T203E 変異体は、T203 残基のリン酸化を阻害した T203V 変異体と同様に、II 型受容体の共存下で全く C2C12 細胞の ALP 活性を誘導しなかった (Fig. 14A)。これらの結果から、T203 は II 型受容体による直接のリン酸化部位ではなく、むしろ、非リン酸化状態として ALK2 の活性を亢進させると考えられた。この結果は、T203 残基の脱リン酸化反応がシグナルの活性化に重要な可能性も示唆しており、今後、細胞内シグナルの活性化における T203 のホスファターゼの関与等も検討する必要がある。

Phos-tag を用いた解析から、R206H と G325A 変異体は、野生型 ALK2 よりも細胞内で高レベルにリン酸化されることが判明した (Fig. 15A)。BMPRII や ActRIIB を共発現させると、R206H や G325A 変異体のリン酸化レベルがさらに増加したことから、FOP 症例の ALK2 変異体は、細胞内で II 型受容体によるリン酸化を受けやすいことが、BMP シグナルの活性化機序であると考えられた。そこで、II 型受容体による活性化に重要なことが判明した T203 残基に変異を導

入し、リン酸化レベルへの変化を検討した。各 ALK2 に T203V 変異を導入すると、II 型受容体を共発現させても ALK2 のリン酸化レベルが増加しないことが明らかとなった (Fig. 15B)。これらの結果より、T203 残基はそれ自身がリン酸化されるのではなく、II 型受容体による ALK2 全体のリン酸化レベルを亢進するために重要な残基であることが明らかとなった。G325A 変異体は、BMPRII 共存下で活性化されないにもかかわらず、両者の共発現で ALK2 のリン酸化レベルが増加した (Fig. 15A)。ALK2 の GS ドメイン内には、II 型受容体にリン酸化を受ける可能性のあるセリンおよびスレオニン残基が 9 カ所存在する (Fig. 8)。Phos-tag を用いた解析からも、リン酸化された ALK2 は複数のバンドとして検出されたことから、複数の残基がリン酸化されていることが確認された (Fig. 15A)。以上の結果を考え合わせると、G325A 変異体では、BMPRII との共発現によって複数の残基がリン酸化されているものの、シグナルの活性化に必須な残基がリン酸化されていない可能性が考えられる。今後、ALK2 分子内のシグナル伝達に必須なアミノ酸残基を GS ドメイン以外の範囲も含めて探索し、この仮説を実験的に検証する必要がある。

本研究において、T203 以外の 8 カ所のセリンおよびスレオニン残基を置換した 8AV 変異体も、II 型受容体の共存下で細胞内シグナルを活性化した。この結果は、T203 が II 型受容体による ALK2 のリン酸化の制御に必須であることを示すとともに、II 型受容体による活性化に重要なリン酸化部位が GS ドメイン外に存在する可能性を示唆する。従来、TGF- β ファミリーの細胞内シグナル伝達は、II 型受容体により I 型受容体の GS ドメイン内で複数の残基がリン酸化され、そ

のリン酸化レベルが増加することで I 型受容体の立体構造が変化し、FKBP12 等の抑制因子との結合が解除される結果、I 型受容体のキナーゼが活性化されると考えられてきた⁵¹。FOP 症例の ALK2 変異体においても、遺伝的変異により FKBP12 との結合性が低下する可能性が報告されている^{50, 53}。C2C12 細胞を用いて FKBP12 の過剰発現実験を行ったところ、R206H や G325A 変異体も FKBP12 によって抑制された (Fig. 17)。従って、FOP 症例の ALK2 変異体の活性化には、FKBP12 との結合親和性の変化以外の機序が関与している可能性もある。この 1 つとして、FOP の ALK2 変異体ではアミノ酸置換による立体構造の変化を生じており、本研究で示唆された II 型受容体による活性化に重要なアミノ酸残基のリン酸化レベルが亢進している可能性が考えられる。今後、さらに詳細な解析を行い、II 型受容体による ALK2 変異体の活性化に必要なリン酸化部位を同定することで、この仮説を検証する必要がある。

結論

本研究では、典型的 FOP 症例の R206H 変異体と、遅発性 FOP 症例の G325A 変異体の比較解析から、FOP の ALK2 変異体が BMP の II 型受容体 (BMPRII と ActRIIB) によって活性化されやすいことを明らかにした。また、ALK2 の変異体により活性化される II 型受容体が異なり、この感受性の差がそれぞれの FOP 症例の臨床症状に影響する可能性が示唆された。II 型受容体による FOP の ALK2 変異体の活性化は、II 型受容体のキナーゼ活性に依存し、この活性化には ALK2 の T203 残基が重要であることを見いだした。ALK2 の T203 残基は、自身がリン酸化されるのではなく、ALK2 分子全体のリン酸化レベルを亢進させてシグナルを活性化する可能性が示された。この ALK2 の T203 は、すべての I 型 BMP 受容体で保存されたスレオニン残基で、これらはリガンド刺激による BMP シグナルの活性化に必須であることを明らかにした。従って、この BMP の I 型受容体で保存されたスレオニン残基は、FOP 症例のみならず、II 型受容体による I 型受容体の活性化に必須と考えられた。この T203 を介した II 型受容体による ALK2 の活性メカニズムを基に、新しい FOP の治療法を開発する可能性が開かれた。

第 II 章

胚性幹細胞を用いた FOP の新しい病態モデルの構築

抄録

FOP は、全身の腱や骨格筋組織内に内軟骨性骨化による異所性骨化を生じる遺伝性疾患である。典型的 FOP 患者から、I 型 BMP 受容体の 1 つである ALK2 の変異 (p.R206H) が同定された。本研究では、Tet-Off システム下で、野生型あるいは R206H 変異型 ALK2 を発現するマウス ES 細胞を樹立した。今回樹立した野生型 ALK2 を発現する 3 クローン (WT#60、WT#65、WT#67) と、R206H 変異型 ALK2 を発現する 3 クローン (RH#2、RH#36、RH#40) は、いずれも doxycycline (Dox) 非存在下で ALK2 の mRNA とタンパク質が誘導された。R206H 変異体では、BMP 非存在下でも Dox 依存的な Smad1/5 のリン酸化や BMP 特異的レポーター活性の上昇を認めた。この BMP シグナルの活性の上昇は、I 型 BMP 受容体の Smad 経路の特異的阻害剤によって抑制された。R206H 変異体を発現するクローン RH#2 は、軟骨誘導培地に TGF- β 1 と BMP4 を添加すると、Dox 存在下でも軟骨細胞特異的な II 型コラーゲン(*Col2a1*)、アグリカン(*Acan*)、X 型コラーゲン(*Col10a1*)の発現が誘導された。さらに、Dox 非存在下で培養したクローン RH#2 は、TGF- β 1 のみを添加しても軟骨細胞分化が亢進した。本研究で樹立した ES 細胞は、FOP の異所性骨化の初期段階を反映する *in vitro* の実験系として有用であり、R206H 変異体を介して誘導される軟骨細胞分化を阻害する生理活性物質の探索へ応用が期待される。

Abstract

FOP is a genetic disorder characterized by heterotopic endochondral ossification in soft tissue. A mutation in BMP receptor ALK2, R206H, has been identified in patients with typical FOP. In the present study, we established murine embryonic stem (ES) cells that express wild-type human ALK2 or typical mutant human ALK2 [ALK2(R206H)] under the control of the Tet-Off system. Although wild-type ALK2 and mutant ALK2(R206H) were expressed in response to a withdrawal of doxycycline (Dox), BMP signaling was activated only in the mutant ALK2(R206H)-expressing cells without the addition of exogenous BMPs. The Dox-dependent induction of BMP signaling was blocked by a specific kinase inhibitor of the BMP receptor. The mutant ALK2(R206H)-carrying cells showed Dox-regulated chondrogenesis *in vitro*, which occurred in co-operation with transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). Overall, our ES cells are useful for studying the molecular mechanisms of heterotopic ossification in FOP *in vitro* and for developing novel inhibitors of chondrogenesis induced by mutant ALK2(R206H) associated with FOP.

緒言

骨格の発生様式は、膜性骨化 (intramembranous ossification) と内軟骨性骨化 (endochondral ossification) の2種類に区別される¹⁰²。膜性骨化では、血管に近接した未分化間葉系細胞がお互いに網目状構造を作り、骨芽細胞へと分化する。分化した骨芽細胞は線維性骨による骨組織を形成する。頭蓋骨や鎖骨の一部は膜性骨化によって形成される。一方、内軟骨性骨化は、将来、骨組織となる部分に、まず軟骨組織による原基が形成される。軟骨組織が分化・成熟すると、血管と共に未分化間葉系細胞が侵入し、未分化間葉系細胞が成熟した軟骨基質の近傍で骨芽細胞へと分化して骨基質を形成し始める。内軟骨性骨化は、主に長管骨等の発生時に観察される¹⁰²。

FOP は、進行性に骨格筋組織内に内軟骨性骨化による異所性骨化が生じる遺伝性の疾患である^{4, 103}。2006年、FOPの責任遺伝子として、BMPのI型受容体の一つをコードする *ACVR1* が同定され、典型的 FOP 症例に共通の変異 (p.R206H) が見出されされた⁶⁶。これまでに FOP から同定された *ALK2* の変異体は、いずれも *in vitro* で筋芽細胞 C2C12 などに過剰発現させると BMP 活性を示す機能獲得型変異であり、FOP で誘導される異所性骨化は、変異 *ALK2* による BMP シグナルの亢進によって誘導されると考えられる⁵⁴。C2C12 細胞は、BMP 刺激によって骨芽細胞様細胞へと分化するが、軟骨細胞の表現形質は示さない。

FOP 患者では、筋損傷によって急激な異所性骨化を誘導することから、生検や外科的処置は禁忌となっている。このため、FOP における異所性骨化におけ

る軟骨細胞や骨芽細胞の前駆細胞の性状は未だ不明な点が多い。近年、FOP の典型的変異体である R206H 変異体のノックインマウスが作製された¹⁰⁴。しかし、このマウスは出生直後に死亡するため、FOP の異所性骨化の発症機序の解明や、新たな治療薬の開発のために、FOP から見出された遺伝子変異を導入した新しい病態モデルの確立が望まれている。そこで本研究では、野生型 ALK2、および R206H 変異型 ALK2 の発現を Tet-Off システムで制御できるマウス ES 細胞を樹立した。さらに、FOP の異所性骨化の初期段階を反映する実験系として、樹立した ES 細胞を *in vitro* で軟骨細胞へ分化誘導させる実験系を確立した。本 ES 細胞は、FOP の異所性骨化の初期段階を反映する *in vitro* の実験系として有用であり、内軟骨性骨化を阻害するような治療法の開発へ応用が期待される。

材料と方法

マウス ES 細胞の培養と ALK2 遺伝子の導入：

Tet-Off システムが導入されたマウス ES 細胞株 EBRTcH3 細胞は、10%ゼラチンでコートしたディッシュ上で、10% FBS (Nichirei)、1 mM sodium pyruvate (Invitrogen)、1× nonessential amino acids (Gibco, Grand Island, NY, USA)、1 mM L-glutamine (Gibco)、55 μ M 2-mercaptoethanol (Gibco)、2000 U/ml leukemia inhibitory factor (Nacalai Tesque) を含む Glasgow Minimal Essential Medium (GMEM) (Sigma-Aldrich Chemicals) で 37.0°C, CO₂ 濃度 5.0% の環境下で培養した¹⁰⁵。ヒト ALK2 の遺伝子組み換えベクターとして、pZhCSfi ベクターの *Xho* I と *Not* I 切断部位間に、第 1 章で述べた V5 タグを付加した野生型、または FOP の R206H 変異型ヒト ALK2 cDNA を挿入した (Fig. 18)。それぞれの組み換えベクターを、Cre リコンビナーゼ発現ベクターと共に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて EBRTcH3 細胞に導入した。1 μ g/ml doxycycline (Dox) (BD Biosciences, San Jose, CA) と 25 μ g/ml zeocin (Invitrogen) を含む培地で 3 日間培養し、得られた各 zeocin 耐性コロニーを別々にクローニングした。さらに、各クローンの一部を 150 μ g/ml hygromycin (Invitrogen) 添加培地で培養して hygromycin 感受性を確認し、目的の遺伝子組み換えが起きているクローンを選択した。

軟骨分化培養：

ES 細胞を、 3.3×10^3 個/cm² の密度で非接着性 96 穴プレート (Sumitomo

Bakelite, 東京)に播種し、10% FBS と 1 µg/ml Dox 含有 GMEM(Sigma-Aldrich Chemicals) で 5 日間培養し、胚様体を形成させた。5 日後、胚様体を回収し、PBS にて洗浄後、Accutase (Gibco) によって細胞を分散させた。3×10³ 個の細胞を 15 ml 遠心管へ播種し、軟骨分化誘導培地を加え 190 g で 5 分間、遠心分離した。軟骨分化誘導培地は、0.1 µM dexamethasone (Wako Chemicals)、50 µM L-ascorbic acid 2-phosphate (Sigma-Aldrich Chemicals)、40 µg/ml L-proline (Sigma-Aldrich Chemicals)、1 mM sodium pyruvate (Nacalai Tesque)、1% ITS (CORNING, Corning, NY, USA) を添加した DMEM/Ham's F-12 (Nacalai Tesque) を使用した。軟骨分化誘導時には、10 ng/ml TGF-β1 (PeproTech)、50 ng/ml BMP4 (R&D Systems) を添加した。細胞は、2-3 日に一度、新鮮な培地に交換した^{106, 107}。

定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現の定量：

細胞から、Nucleo Spin RNA (TAKARA) を用いて抽出した全 RNA を鋳型に Superscript III (Invitrogen) で cDNA に逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、Premix Ex Taq (TAKARA) を用いて Thermal Cycler Dice Real-time system TP800 (TAKARA) で RNA の発現量を定量化した。内部標準遺伝子として、*Atp5f1* を使用した¹⁰⁸。使用したプライマーの配列を Table 2 に示す。

蛍光免疫染色：

ES 細胞における ALK2 の発現は、抗 V5 タグ抗体を用いた蛍光免疫染色法で確認した。ES 細胞をホルマリンで固定後、一次抗体であるマウス抗 V5 モノク

ローナル抗体 (Nacalai Tesque; 1000 倍希釈) を室温で 1 時間反応させ、その後、二次抗体である Alexa 594 蛍光標識されたヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (IgG; Molecular Probes, Life Technologies; 2000 倍希釈) を室温で 1 時間反応させ、BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence, 大阪) で観察した⁶⁰。

FACS 解析：

Dox 存在下、および非存在下で培養した ES 細胞を回収し、2 mM EDTA, 0.5% Bovine serum albumin (BSA) (pH 7.2) に懸濁し、Alexa 647 で蛍光標識 (Molecular Probes, Life Technologies) したヤギ抗 ALK2 ポリクローナル抗体 (R&D Systems) を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、Propidium iodide (BioLegend, San Diego, CA) を室温で 15 分反応させた。細胞の蛍光を、FACSCalibur (BD Biosciences) で検出し、Cell Quest software (BD Biosciences) で解析した。

ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ：

ルシフェラーゼ・レポーターアッセイは、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて製品に添付されたプロトコールに従って測定した。BMP シグナル特異的なルシフェラーゼ・レポーターとして、*Id1* の BMP 応答領域で firefly luciferase を発現する IdWT4F-luc⁶² (40 ng/well) を使用した。また、同時に SV40 プロモーターで renilla luciferase を発現する phRL-SV40 (Promega) (10 ng/well) をトランスフェクトし、BMP 特異的なルシフェラ

ーゼ活性を標準化した。ルシフェラーゼ活性は、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて製品に添付されたプロトコールに従って測定 (GENios, Tecan) した^{60,81}。

ウェスタンブロット：

細胞を 1% Triton X-100 を含む Tris-HCl buffer [10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 7.8)] で溶解し、17,400 g で 30 分間遠心分離した上清をウェスタンブロットに使用した。調整したサンプルは、8% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分画した後、Tobin 転写バッファー [25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine 及び 20% Methanol (pH 8.3)] を用いて、250 mA、1 時間、PVDF メンブレン (Immobilon-P membrane, Merck Millipore) に転写した。ウェスタンブロットには、以下の一次抗体を使用した。ウサギ抗 phospho-Smad1/5 モノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology; 1000 倍希釈)、マウス抗 V5 モノクローナル抗体 (clone V5005, Nacalai Tesque; 1000 倍希釈)、ウサギ抗 Tubulin ポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology; 1000 倍希釈)。二次抗体として、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体、またはヤギ抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch; 2000 倍希釈) を使用した。また、化学発光反応には Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore) を用い、ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad) を用いて検出した⁵⁴。検出した画像は、Profinia Software (Bio-Rad) を用いて解析した。

組織学的解析：

培養したペレットを4%パラホルムアルデヒドに浸漬し固定した。試料はエタノール・キシレン系で脱水し、パラフィンで包埋した後、8 μm 厚で薄切した。形成された軟骨組織は、アルシアンブルー染色およびケルンエヒテロート染色を行い、BZ-9000 顕微鏡 (Keyence) にて観察した。

統計処理：

統計処理は、Student's t 検定を用いた。結果は平均 \pm SD (n = 3) として表した。統計的有意性は、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ として示した。

結果

Tet-Off システムでヒト ALK2 の野生型および FOP 変異型を発現するマウス

ES 細胞の樹立

Tet-Offシステムによりヒト ALK2 の発現を制御する ES 細胞を樹立するため、マウス ES 細胞 EBRTcH3 を使用した。まず、pZhCSfi 組換えベクターの hCMV-1 プロモーター下流に、C 末端に V5 タグを付加したヒト ALK2 の野生型、または FOP の変異型 (R206H) cDNA を挿入した (Fig. 18)。それぞれの組換えベクターと Cre リコンビナーゼ発現ベクターを EBRTcH3 細胞に遺伝子導入し、Cre-LoxP による外来遺伝子カセットの組換えを誘導した (Fig. 18)。zeocin 存在下で耐性コロニーを選別し、さらに、hygromycin 感受性のコロニーを目的の組み換え体細胞として以下の実験に用いた (Fig. 18)。得られた各クローンを、Dox 存在下および非存在下で培養し、抗 V5 エピトープ抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。親株の EBRTcH3 細胞は、Dox の有無にかかわらず、抗 V5 抗体の蛍光を認めなかった (Fig. 19A)。一方、ALK2-V5 を導入したクローンの中から、Dox 非存在下で抗 V5 抗体の蛍光を認めるクローンとして、野生型の WT#60、WT#65、WT#67 の 3 クローン、FOP の変異型の RH#2、RH#36、RH#40 の 3 クローンを選択した (Fig. 19A)。選択した各クローンは、親株の EBRTcH3 細胞と同様に、典型的な形態の ES 細胞のコロニーを形成した (Fig. 19B)。樹立した各クローンにおいて、Dox 依存的な ALK2 の発現量を定量的 PCR 法で解析した。親株では Dox の有無にかかわらず ALK2 は検出されなかった (Fig. 20A)。一方、樹立した 6 クローンでは、Dox 存在下に比べ、Dox 非存

在下において *ALK2* の有意な発現上昇を認めた (Fig. 20A)。しかし、これらの 6 クローンでも、*ALK2* 以外の内在性 I 型 BMP 受容体 (*Alk1*、*Alk3*、*Alk6*) の発現は、Dox の有無で変化しなかった (Fig. 20A - 20D)。

Dox 依存的に発現誘導される *ALK2(R206H)* は BMP シグナルを活性化する

さらに、*ALK2* の細胞外領域を認識する抗 *ALK2* 抗体を用いて、Dox 非存在下で誘導した *ALK2* の FACS 解析を行った。親株では、Dox の有無で *ALK2* 抗体の蛍光強度に差を認めなかった (Fig. 21)。一方、樹立した野生型および FOP の変異型 *ALK2* を発現する 6 クローンでは、Dox 非存在下で蛍光強度が上昇したことから、誘導された *ALK2* が細胞膜上に局在することが確認された (Fig. 21)。さらに、抗 V5 抗体を用いたウェスタンブロット解析でも、野生型および R206H 変異体の全てのクローンで、Dox 非存在下において *ALK2*-V5 の発現が認められた (Fig. 22A)。野生型 *ALK2* を発現する 3 種類のクローン (WT#60、WT#65、WT#67) は、Dox 非存在下で *ALK2* の発現を誘導しても Smad1/5 のリン酸化は誘導されなかったが、FOP の R206H 変異体を発現する 3 種類のクローン (RH#2、RH#36、RH#40) は、Dox 非存在下で Smad1/5 のリン酸化を誘導した (Fig. 22A)。これらの結果は、樹立した野生型と変異体 *ALK2* はどちらも Dox 非存在下で誘導されるものの、変異体のみで BMP シグナルの活性化が起こることを示す。

そこで、リン酸化 Smad1/5 の結合配列を含む BMP シグナル特異的なルシフェラーゼレポーターを用いて、各クローンにおける Dox 依存的な BMP シグナ

ルの活性化を検討した。野生型 ALK2 を導入した 3 種類のクローンでは、Dox 非存在下で ALK2 を発現させてもルシフェラーゼ活性は上昇しなかった (Fig. 22B)。一方、R206H 変異体を導入した 3 種類のクローンでは、Dox 非存在下で ALK2 の発現を誘導すると、いずれもルシフェラーゼ活性が上昇した (Fig. 22B)。R206H 変異体を導入した 3 種類のクローンにおける Dox 依存的な遺伝子発現は、内在性の BMP の初期応答遺伝子である *Id1* および *Id2* においても認められた (Fig. 23A, 23B)。

さらに、R206H 変異体を導入した ES 細胞の Dox 依存的な制御による BMP シグナルに対する BMP 受容体特異的なキナーゼ阻害剤 (LDN-193189)⁸⁵ の効果を検討した。Dox 非存在下で誘導される R206H 変異体導入細胞における Smad1/5 のリン酸化は、LDN-193189 の添加によってほぼ完全に抑制された (Fig. 24A)。また、R206H 変異体を導入した細胞で、Dox 非存在下で誘導されたルシフェラーゼの活性も、LDN-193189 の添加によって抑制された (Fig. 24B)。これらの結果は、R206H 変異体導入細胞で認められた Dox 依存的な制御による BMP シグナルの活性化は、誘導される機能獲得型変異体の R206H 変異体のキナーゼ活性によって誘導されることを示す。

R206H 変異型 ALK2 発現クローンにおける軟骨分化誘導

FOP で引き起こされる異所性骨化は、内軟骨性骨化によって誘導される¹⁰³。そこで、Dox 非存在下で R206H 変異体を発現するクローン RH#2 を用いて、軟骨細胞への分化能について検討した。まず、クローン RH#2 を低接着性プレ

ート中で 5 日間培養し、3 胚葉に分化する胚様体を形成させた。この胚様体を分散した後、遠心管内で凝集させ、TGF- β 1 と BMP4 の存在下、または非存在下で 2 週間培養した。軟骨細胞分化の指標として II 型コラーゲン(*Col2a1*)、アグリカン(*Acan*)、X 型コラーゲン(*Col10a1*)の各 mRNA 量をリアルタイム PCR で解析した。その結果、TGF- β 1 と BMP4 を添加していないコントロール群では、Dox の有無にかかわらずこれらの軟骨細胞に特徴的な遺伝子発現は認められなかったが、TGF- β 1 と BMP4 を添加して培養すると、Dox 存在下でも軟骨細胞特異的な遺伝子の発現が誘導された (Fig. 25A - 25C)。さらに、Dox 非存在下で R206H 変異体を発現した細胞では、それらの軟骨分化マーカー遺伝子の発現量が有意に増加した (Fig. 25A - 25C)。TGF- β 1 と BMP4 添加群の細胞塊を組織学的に解析すると Dox 存在下で培養した群でもアルシアンブルー染色陽性の軟骨細胞の出現を認めた (Fig. 26A; Dox(+))。Dox 非存在下で R206H 変異体を発現した細胞では、アルシアンブルー陽性の細胞群がさらに増加しており、中心部まで均一な軟骨組織を認めた (Fig. 26A; Dox(-))。

そこで、培養系から BMP4 を除き TGF- β 1 だけを添加した培地を用いて、Dox 依存的に誘導した R206H 変異体による BMP シグナルによる軟骨細胞分化能を検討した。クローン RH#2 は、TGF- β 1 だけを添加した条件でも、Dox 存在下で軟骨細胞特異的な遺伝子の発現が誘導されたが、その発現量は TGF- β 1 と BMP4 同時添加の培養条件時に比べて低かった (Fig. 25D - 25F)。一方、Dox 非存在下で R206H 変異体を発現した細胞では、TGF- β 1 のみで培養しても、Dox 存在下に比べて軟骨分化マーカーの発現が有意に増加した (Fig. 25D - 25F)。

TGF- β 1 のみを添加して培養したクローン RH#2 を組織学的に解析すると、Dox 存在下ではアルシアンブルー染色陰性であったが、Dox 非存在下ではアルシアンブルー染色陽性の軟骨細胞が認められた (Fig. 26B; Dox(-))。一方、Dox 非存在下で野生型 ALK2 を発現するクローン WT#60 では、Dox 非存在下でも、TGF- β 1 添加群で軟骨細胞分化は誘導されなかった (date not shown)。

考察

Tet-Off システムで野生型および FOP 変異型ヒト ALK2 を発現するマウス ES

細胞株の樹立

本研究では、Tet-Off システムを用いて野生型 ALK2 あるいは R206H 変異体の発現を制御できる ES 細胞を樹立し、FOP 症例の異所性骨化初期段階で認められる軟骨細胞分化の再現を試みた。本研究には、Tet-Off システムで外来遺伝子の発現が可能な遺伝子発現ユニットが組み込まれたマウス ES 細胞 EBRTcH3 を用いた^{105,109}。EBRTcH3 細胞は、ユビキタスに発現する ROSA26 遺伝子座に tetracycline 制御性トランス活性化因子 (tTA) が挿入されており、さらにその下流に、tTA 結合配列で制御される CMV プロモーター、および hygromycin 耐性遺伝子が、2つの LoxP 配列に挟まれて導入されている (Fig. 18)。従って、tetracycline 誘導体の doxycycline (Dox) 存在下では、発現した tTA が Dox と結合して DNA 結合を阻害するため、下流の遺伝子発現が抑制されるが、Dox 非存在下では、発現した tTA が TRE に結合して下流の遺伝子発現を誘導する。さらに EBRTcH3 細胞は、外来遺伝子の部位特異的な挿入を可能にするため、tTA 配列の下流に 2つの LoxP 配列を持つ。目的の外来遺伝子を LoxP 配列で挟んだ組換えベクターを構築し、EBRTcH3 細胞に Cre リコンビナーゼと共発現させることで、効率よく目的遺伝子を ROSA26 遺伝子座で組み替えることができる。また、親の EBRTcH3 細胞の組換え部位には hygromycin 耐性遺伝子が挿入されており、Dox 非存在下では hygromycin 耐性細胞として培養できる。しかし、Cre-LoxP によって hygromycin 耐性遺伝子と目的の外来遺伝子が置換さ

れるため、hygromycin 感受性に变化する。本研究では、組換えベクターに zeosin 耐性遺伝子と共に、V5 タグを付加した野生型、または FOP の R206H 変異型ヒト ALK2 cDNA を挿入し、zeocin 耐性・hygromycin 感受性のコロニーを選択することで、目的とする ALK2 遺伝子組み換え細胞を樹立した。

ALK2 の R206H 変異体は、典型的な FOP 患者から同定された ALK2 変異体であり、我々を含む複数の研究グループにより機能獲得型変異体であることが示されている^{54, 55, 79}。本研究では、FOP の発症機序を解析する目的で、野生型と FOP の変異型 ALK2 cDNA を導入した ES 細胞を、それぞれ 3 クローンずつ樹立した。これらの ES 細胞は、親株の EBRTcH3 細胞と同様に ES 細胞に典型的な形態のコロニーを形成し、Dox 非存在下で培養するとヒト *ALK2* の発現が誘導され、さらにタンパク質レベルでも ALK2 の細胞膜上での発現が確認された (Fig. 19A, 19B, 20A, 21)。野生型と FOP 変異型のクローン間で、形態や ALK2 の発現レベルに差は認めなかったが、細胞内の BMP シグナルは、野生型と変異型 ALK2 導入細胞の間に明確な差を認めた。野生型 ALK2 を発現するクローンは、Dox 非存在下でも BMP シグナルを活性化しなかった (Fig. 22A, 22B)。しかし、R206H 変異体を発現するクローンは、Dox 非存在下で ALK2 の発現を誘導すると、BMP を添加しなくても BMP の細胞内シグナルを活性化した (Fig. 22A, 22B)。第 1 章の結果を考えわせると、EBRTcH3 細胞が発現する内在性の BMP の II 型受容体によって、Dox 依存的に誘導された R206H 変異体が活性化されると予想される。リアルタイム PCR で EBRTcH3 細胞と C2C12 細胞が発現する BMP の II 型受容体を解析した結果、EBRTcH3 細胞は、R206H 変異体

を活性化する ActR-IIB の発現が高いことが明らかとなった (Fig. 27)。以上の結果より、Tet-Off システムでヒト ALK2 の発現が制御できるマウス ES 細胞が樹立されたと結論した。

樹立したマウス ES 細胞株の *in vitro* における軟骨細胞への分化誘導

FOP における異所性骨化は、主に内軟骨性骨化で起こることが報告されている¹⁰³。しかし、FOP では筋損傷が急性の異所性骨化を誘発することから、バイオプシーや手術などの侵襲的医療行為は禁忌とされており、異所性骨化における組織学的な変化は不明な点が多い。また、FOP の内軟骨性骨化を反映する *in vivo* 実験モデルも確立されておらず、FOP の発症機序の解明や治療薬の開発のために、FOP の異所性骨化を反映する病態モデルの樹立が必要であると考えられた。そこで本研究では、樹立した ES 細胞を用いて、*in vitro* で軟骨細胞分化の誘導を試みた。

In vitro におけるマウス ES 細胞の軟骨細胞への分化誘導には、TGF- β 3 と BMP4 が相乗的に作用することが報告されている¹⁰⁶。骨髄由来の間葉系幹細胞を用いた研究から、TGF- β 1 も TGF- β 3 と同様に軟骨細胞分化を誘導することが知られている¹¹⁰。TGF- β シグナルは初期の軟骨細胞形成とその増殖を促進し、BMPシグナルは軟骨細胞の分化を亢進し軟骨基質の発現等を亢進させると考えられる。本研究では、主に FOP の R206H 変異体を発現するクローン RH#2 を用いて軟骨細胞分化を解析した。クローン RH#2 の培地に TGF- β 1 と BMP4 を添加すると、*Col2a1*、*Acan*、*Col10a1* の軟骨細胞分化マーカーの発現が誘導さ

れ、細胞の組織学的解析でもアルシアンブルー染色陽性の軟骨細胞を認めた (Fig. 25A - 25C, 26A)。この *in vitro* における軟骨細胞分化は、クローン RH#2 だけでなく、野生型 ALK2 を発現するクローン WT#60 でも確認された (data not shown)。これらの結果は、本研究で樹立した ES 細胞のクローンが、TGF- β と BMP シグナルの相乗作用で軟骨細胞へ分化することを示す。

クローン RH#2 を Dox 非存在下で培養すると、TGF- β 1 と BMP4 刺激による *Col2a1*、*Acan*、*Col10a1* の発現がさらに増加した (Fig. 25A - 25C)。これは、Dox 依存的に発現が誘導された ALK2 の R206H 変異体が、細胞内の BMP シグナルを亢進させた結果と予想された。そこで、クローン RH#2 を TGF- β 1 だけで刺激した培養系で軟骨分化能を検討した。Dox 存在下で R206H 変異体の発現が抑制された細胞では、TGF- β 1 刺激のみでは顕著な軟骨分化は誘導されなかった (Fig. 25D - 25F)。しかし、Dox 非存在下でクローン RH#2 を培養すると、TGF- β 1 刺激のみでも *Col2a1*、*Acan*、*Col10a1* の発現が誘導された (Fig. 25D - 25F)。これらの結果は、培養系に添加した TGF- β 1 によって誘導された軟骨細胞分化が、Dox 依存的に誘導された R206H 変異体を介した BMP シグナルによって、さらに亢進されたものと考えられる。しかし、そのとき発現した軟骨細胞分化マーカー遺伝子の発現量は、TGF- β 1 と BMP4 添加時より少なかった。これは、外来性の BMP 添加によるシグナルの活性化と、R206H 変異体の発現による BMP シグナルの活性化の、シグナル活性化強度の違いによって生じるものと考えられた。

クローン RH#2 を TGF- β 1 と BMP4 で刺激すると、Dox 非存在下では、中心

部までアルシアンブルーに染色される均一な軟骨組織が形成された (Fig. 26A)。一方、TGF- β 1 のみで刺激した場合は、Dox 非存在下で細胞塊の一部にアルシアンブルー陽性の軟骨組織を認めた (Fig. 26B)。形態的には Dox 非存在下で培養した TGF- β 1 刺激群で、最も典型的な肥大軟骨様細胞が認められたが、肥大軟骨細胞の分化マーカーとして知られる *Col10a1* の発現は、TGF- β 1 と BMP4 で刺激した細胞の方が高かった。この原因の1つとして、軟骨細胞分化を強力に誘導する BMP を *in vitro* で培地に添加した場合には、*in vivo* の成長板軟骨で見られるような軟骨細胞分化における形態変化と遺伝子発現の相関関係が見られず、遺伝子発現がより早く亢進した可能性が考えられる。この可能性を検証するためには、クローン RH#2 をヌードマウスに移植して *ex vivo* でテラトーマを形成させるような実験を行い、軟骨細胞分化における形態変化と遺伝子発現の関連をさらに詳細に解析する必要がある。

樹立したマウス ES 細胞株の応用

本研究では、Tet-Off システムで野生型 ALK2 あるいは FOP の変異型 R206H の発現を制御し、Dox 依存的な BMP シグナルの活性化が起こる ES 細胞を樹立した。さらに、R206H 変異型を発現するクローン RH#2 を用いて、R206H 変異体を介した BMP シグナルによる軟骨分化誘導系の確立に成功した。本研究で樹立した ES 細胞から軟骨組織への分化誘導系を用いて、FOP の異所性骨化における軟骨細胞前駆細胞の性状を解析することが可能と考えられる。また、R206H 変異体を発現する ES 細胞の BMP シグナル活性は、BMP の I 型受容体

に特異的な低分子キナーゼ阻害剤である LDN-193189 で抑制された (Fig. 24A, 24B)。これまでに、*in vitro* の細胞分化モデルを用いて、LDN-193189 以外にも複数の BMP シグナル阻害剤が報告されている^{85,111-116}。本研究において樹立した実験系は、R206H 変異体を介した軟骨細胞分化を標的とした新規阻害物質のスクリーニングに用いることが可能であり、今後、FOP の治療薬の開発に貢献することが期待される。

結論

我々は、FOP から同定されたヒト変異型 ALK2 の発現を、Tet-Off システムで制御できるマウス ES 細胞を樹立した。さらに、この ES 細胞を用いて、Dox 依存的な *in vitro* における軟骨分化誘導系を確立した。これは、FOP における異所性骨化の初期段階と考えられる前駆細胞から軟骨細胞への分化を反映した *in vitro* の病態モデルと考えられる。本実験系は、FOP の異所性骨化の分子メカニズムの解明や、変異型 ALK2 による軟骨形成を抑制する生理活性物質のスクリーニングにも有用であると考ええる。

まとめ

我々は、典型的 FOP 症例の R206H 変異体と、遅発性 FOP 症例の G325A 変異体という異なる表現系を示す 2 つの変異体の活性化機構の解析を行うことで、FOP の異所性骨化のメカニズムを明らかとした。本研究では、FOP の ALK2 変異体が BMP の II 型受容体 (BMPR-II と ActR-IIB) によって活性化されやすく、ALK2 の変異体により活性化される II 型受容体が異なることを示した。これらは FOP の臨床症状の違いに影響する可能性が示唆された。II 型受容体による FOP の ALK2 変異体の活性化は、II 型受容体のキナーゼ活性に依存して惹起された。この II 型受容体による ALK2 の活性化には、ALK2 の T203 残基が重要であることを示した。ALK2 の T203 残基は、自身がリン酸化されるのではなく、ALK2 分子全体のリン酸化レベルを亢進させてシグナルを活性化する可能性が示唆された。この ALK2 の T203 は、すべての I 型 BMP 受容体で保存されたスレオニン残基で、これらはリガンド刺激による BMP シグナルの活性化にも必須であることを明らかにした。我々は、II 型受容体による T203 を介した ALK2 の活性化という新たなメカニズムを提唱し、これは新規の FOP 治療法の開発に寄与すると考えられる。

さらに我々は、FOP から同定されたヒト変異型 ALK2 の発現を、Tet-Off システムで制御できるマウス ES 細胞を樹立した。さらに、この ES 細胞を用いて、*in vitro* における軟骨分化誘導系を確立した。これは、FOP における変異 ALK2 による内軟骨性骨化の初期段階を反映した *in vitro* の病態モデルであると考えられる。本実験系は、FOP の異所性骨化発症の分子メカニズムの解明や、FOP

の治療薬のスクリーニングに有用であることが示された。

謝辞

本論文を執筆するにあたり、全過程において御指導いただきました明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野 須田直人教授、ならびに、埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病態生理部門 片桐岳信教授に深く感謝申し上げます。また、本研究に対して多くのご協力をいただいた明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野の教室員の皆様、並びに埼玉医科大学ゲノム医学研究センター病態生理部門の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は、JSPS 科研費 (25293326、25861339、24592278)、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の助成を受けた。また、2014 年度、宮田研究奨励金 E (研究代表者、藤本舞) の助成を受けた。

参考文献

1. Kitterman JA, Kantanie S, Rocke DM, Kaplan FS. Iatrogenic harm caused by diagnostic errors in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Pediatrics*. 2005;116(5):e654-661.
2. Katagiri T. Heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein signaling : Fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Oral Biosci*. 2010;52(1):33-41.
3. Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva: diagnosis, management, and therapeutic horizons. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2013;10 Suppl 2:437-448.
4. Katagiri T. Recent topics in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Oral Biosci*. 2012;54:119-123.
5. Kaplan FS, Shen Q, Lounev V, Seemann P, Groppe J, Katagiri T, Pignolo RJ, Shore EM. Skeletal metamorphosis in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Metab*. 2008;26(6):521-530.
6. Nakashima Y, Haga N, Kitoh H, Kamizono J, Tozawa K, Katagiri T, Susami T, Fukushi J, Iwamoto Y. Deformity of the great toe in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Orthop Sci*. 2010;15(6):804-809.
7. Kaplan FS, Hume D, Westermark A, Shore EM. The craniofacial phenotype of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Rev Bone Miner Metab*.

- 2005;2(3-4):209-212.
8. Pignolo RJ, Suda RK, Kaplan FS. The fibrodysplasia ossificans progressiva lesion. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2005;3(3-4):195-200.
 9. Nussbaum BL, Grunwald Z, Kaplan FS. Oral and dental health care and anesthesia for persons with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2005;3(3-4):239-242.
 10. Chichareon V, Arpornmaeklong P, Donsakul N. Fibrodysplasia ossificans progressiva and associated osteochondroma of the coronoid process in a child. *Plast Reconstr Surg.* 1999;103(4):1238-1243.
 11. Gerlach LM, Hutson MR, Germiller JA, Nguyen-Luu D, Victor JC, Barald KF. Addition of the BMP4 antagonist, noggin, disrupts avian inner ear development. *Development.* 2000;127(1):45-54.
 12. Nussbaum BL, O'Hara I, Kaplan FS. Fibrodysplasia ossificans progressiva: report of a case with guidelines for pediatric dental and anesthetic management. *ASDC J Dent Child.* 1996;63(6):448-450.
 13. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965;150(3698):893-899.
 14. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res.* 1971;50(6):1392-1406.
 15. Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(4):1828-1832.
 16. Urist MR, Mikulski AJ. A soluble bone morphogenetic protein extracted from

- bone matrix with a mixed aqueous and nonaqueous solvent. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1979;162(1):48-53.
17. Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(12):7599-7603.
 18. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 1988;242(4885):1528-1534.
 19. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(24):9843-9847.
 20. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann H. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J.* 1990;9(7):2085-2093.
 21. Mueller TD, Nickel J. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett.* 2012;586(14):1846-1859.
 22. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(6):2220-2224.

23. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH, et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem.* 1992;267(28):20352-20362.
24. Daluiski A, Engstrand T, Bahamonde ME, Gamer LW, Agius E, Stevenson SL, Cox K, Rosen V, Lyons KM. Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nat Genet.* 2001;27(1):84-88.
25. Katagiri T, Tsukamoto S. The unique activity of bone morphogenetic proteins in bone: a critical role of the Smad signaling pathway. *Biol Chem.* 2013;394(6):703-714.
26. Katagiri T, Osawa K, Tsukamoto S, Fujimoto M, Miyamoto A, Mizuta T. Bone morphogenetic protein-induced heterotopic bone formation: What have we learned from the history of a half century? *Jpn Dent Sci Rev.* 2014.
27. Blau HM, Chiu CP, Webster C. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell.* 1983;32(4):1171-1180.
28. Miller JB. Myogenic programs of mouse muscle cell lines: expression of myosin heavy chain isoforms, MyoD1, and myogenin. *J Cell Biol.* 1990;111(3):1149-1159.
29. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V,

- Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol.* 1994;127(6 Pt 1):1755-1766.
30. Sampath TK, Muthukumaran N, Reddi AH. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(20):7109-7113.
31. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 1994;370(6488):341-347.
32. Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH, Miyazono K. Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell.* 1993;75(4):681-692.
33. ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene.* 1993;8(10):2879-2887.
34. Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FM, Massague J, Wrana JL. Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell.* 1993;75(4):671-680.
35. Ebner R, Chen RH, Shum L, Lawler S, Zioncheck TF, Lee A, Lopez AR, Derynck R. Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor. *Science.* 1993;260(5112):1344-1348.

36. Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell*. 1992;68(4):775-785.
37. Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell*. 1991;65(6):973-982.
38. Wrana JL, Tran H, Attisano L, Arora K, Childs SR, Massague J, O'Connor MB. Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol*. 1994;14(2):944-950.
39. Wang T, Donahoe PK, Zervos AS. Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science*. 1994;265(5172):674-676.
40. Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*. 1989;341(6244):758-760.
41. Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*. 1989;341(6244):755-757.
42. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 1991;66(4):807-815.

43. Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, Cohen P, MacKintosh C, Klee CB, Schreiber SL. Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry*. 1992;31(16):3896-3901.
44. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*. 1992;357(6380):695-697.
45. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994;369(6483):756-758.
46. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994;78(1):35-43.
47. Brown EJ, Beal PA, Keith CT, Chen J, Shin TB, Schreiber SL. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature*. 1995;377(6548):441-446.
48. Zheng XF, Florentino D, Chen J, Crabtree GR, Schreiber SL. TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell*. 1995;82(1):121-130.
49. Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell*. 1996;86(3):435-444.
50. Groppe JC, Wu J, Shore EM, Kaplan FS. In vitro analyses of the dysregulated

- R206H ALK2 kinase-FKBP12 interaction associated with heterotopic ossification in FOP. *Cells Tissues Organs*. 2011;194(2-4):291-295.
51. Chaikuad A, Alfano I, Kerr G, Sanvitale CE, Boergermann JH, Triffitt JT, von Delft F, Knapp S, Knaus P, Bullock AN. Structure of the bone morphogenetic protein receptor ALK2 and implications for fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem*. 2012;287(44):36990-36998.
52. van Dinther M, Visser N, de Gorter DJ, Doorn J, Goumans MJ, de Boer J, ten Dijke P. ALK2 R206H mutation linked to fibrodysplasia ossificans progressiva confers constitutive activity to the BMP type I receptor and sensitizes mesenchymal cells to BMP-induced osteoblast differentiation and bone formation. *J Bone Miner Res*. 2010;25(6):1208-1215.
53. Shen Q, Little SC, Xu M, Haupt J, Ast C, Katagiri T, Mundlos S, Seemann P, Kaplan FS, Mullins MC, Shore EM. The fibrodysplasia ossificans progressiva R206H ACVR1 mutation activates BMP-independent chondrogenesis and zebrafish embryo ventralization. *J Clin Invest*. 2009;119(11):3462-3472.
54. 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, Katagiri T. Constitutively activated ALK2 and increased

- SMAD1/5 cooperatively induce bone morphogenetic protein signaling in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem.* 2009;284(11):7149-7156.
55. 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(3):905-909.
56. Akiyama S, Katagiri T, Namiki M, Yamaji N, Yamamoto N, Miyama K, Shibuya H, Ueno N, Wozney JM, Suda T. Constitutively active BMP type I receptors transduce BMP-2 signals without the ligand in C2C12 myoblasts. *Exp Cell Res.* 1997;235(2):362-369.
57. Aoki H, Fujii M, Imamura T, Yagi K, Takehara K, Kato M, Miyazono K. Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 8):1483-1489.
58. Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev.* 1997;11(8):984-995.
59. Katagiri T, Suda T, Miyazono K. *The bone morphogenetic proteins.* New York: Cold Spring Harbor Press; 2008.
60. 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, Katagiri T. Dual roles of smad proteins in the conversion from myoblasts to osteoblastic cells by bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*. 2010;285(20):15577-15586.
61. Tsukamoto S, Mizuta T, Fujimoto M, Ohte S, Osawa K, Miyamoto A, Yoneyama K, Murata E, Machiya A, Jimi E, Kokabu S, Katagiri T. Smad9 is a new type of transcriptional regulator in bone morphogenetic protein signaling. *Sci Rep*. 2014;4:7596.
62. Katagiri T, Imada M, Yanai T, Suda T, Takahashi N, Kamijo R. Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells*. 2002;7(9):949-960.
63. Nakahiro T, Kurooka H, Mori K, Sano K, Yokota Y. Identification of BMP-responsive elements in the mouse Id2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;399(3):416-421.
64. Shepherd TG, Theriault BL, Nachtigal MW. Autocrine BMP4 signalling regulates ID3 proto-oncogene expression in human ovarian cancer cells. *Gene*. 2008;414(1-2):95-105.
65. Shin M, Ohte S, Fukuda T, Sasanuma H, Yoneyama K, Kokabu S, Miyamoto A, Tsukamoto S, Hohjoh H, Jimi E, Katagiri T. Identification of a novel bone morphogenetic protein (BMP)-inducible transcript, BMP-inducible transcript-1, by utilizing the conserved BMP-responsive elements in the Id genes. *J Bone*

- Miner Metab.* 2013;31(1):34-43.
66. Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho TJ, Choi IH, Connor JM, Delai P, Glaser DL, LeMerrer M, Morhart R, Rogers JG, Smith R, Triffitt JT, Urtizberea JA, Zasloff M, Brown MA, Kaplan FS. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet.* 2006;38(5):525-527.
67. Kaplan FS, Xu M, Seemann P, Connor JM, Glaser DL, Carroll L, Delai P, Fastnacht-Urban E, Forman SJ, Gillessen-Kaesbach G, Hoover-Fong J, Koster B, Pauli RM, Reardon W, Zaidi SA, Zasloff M, Morhart R, Mundlos S, Groppe J, Shore EM. Classic and atypical fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) phenotypes are caused by mutations in the bone morphogenetic protein (BMP) type I receptor ACVR1. *Hum Mutat.* 2009;30(3):379-390.
68. Mishima K, Kitoh H, Katagiri T, Kaneko H, Ishiguro N. Early clinical and radiographic characteristics in fibrodysplasia ossificans progressiva: a report of two cases. *J Bone Joint Surg Am.* 2011;93(10):e52.
69. Bridges AJ, Hsu KC, Singh A, Churchill R, Miles J. Fibrodysplasia (myositis) ossificans progressiva. *Semin Arthritis Rheum.* 1994;24(3):155-164.
70. Hebela N, Shore EM, Kaplan FS. Three pairs of monozygotic twins with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Rev Bone Miner Metab.* 2005;3(3-4):205-208.
71. Smith KA, Joziassse IC, Chocron S, van Dinther M, Guryev V, Verhoeven MC,

- Rehmann H, van der Smagt JJ, Doevendans PA, Cuppen E, Mulder BJ, Ten Dijke P, Bakkers J. Dominant-negative ALK2 allele associates with congenital heart defects. *Circulation*. 2009;119(24):3062-3069.
72. Joziase IC, Smith KA, Chocron S, van Dinther M, Guryev V, van de Smagt JJ, Cuppen E, Ten Dijke P, Mulder BJ, Maslen CL, Reshey B, Doevendans PA, Bakkers J. ALK2 mutation in a patient with Down's syndrome and a congenital heart defect. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(4):389-393.
73. Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, Butterfield YS, Morozova O, Philippe C, Castel D, Grasso CS, Vinci M, Carvalho D, Carcaboso AM, de Torres C, Cruz O, Mora J, Entz-Werle N, Ingram WJ, Monje M, Hargrave D, Bullock AN, Puget S, Yip S, Jones C, Grill J. Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Genet*. 2014;46(5):457-461.
74. Fontebasso AM, Papillon-Cavanagh S, Schwartzentruber J, Nikbakht H, Gerges N, Fiset PO, Bechet D, Faury D, De Jay N, Ramkissoon LA, Corcoran A, Jones DT, Sturm D, Johann P, Tomita T, Goldman S, Nagib M, Bendel A, Goumnerova L, Bowers DC, Leonard JR, Rubin JB, Alden T, Browd S, Geyer JR, Leary S, Jallo G, Cohen K, Gupta N, Prados MD, Carret AS, Ellezam B, Crevier L, Klekner A, Bognar L, Hauser P, Garami M, Myseros J, Dong Z, Siegel PM, Malkin H, Ligon AH, Albrecht S, Pfister SM, Ligon KL, Majewski J, Jabado N, Kieran MW. Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nat Genet*. 2014;46(5):462-466.

75. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, Zhu X, Qu C, Chen X, Zhang J, Easton J, Edmonson M, Ma X, Lu C, Nagahawatte P, Hedlund E, Rusch M, Pounds S, Lin T, Onar-Thomas A, Huether R, Kriwacki R, Parker M, Gupta P, Becksfort J, Wei L, Mulder HL, Boggs K, Vadodaria B, Yergeau D, Russell JC, Ochoa K, Fulton RS, Fulton LL, Jones C, Boop FA, Broniscer A, Wetmore C, Gajjar A, Ding L, Mardis ER, Wilson RK, Taylor MR, Downing JR, Ellison DW, Zhang J, Baker SJ. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* 2014;46(5):444-450.
76. Buczkowicz P, Hoeman C, Rakopoulos P, Pajovic S, Letourneau L, Dzamba M, Morrison A, Lewis P, Bouffet E, Bartels U, Zuccaro J, Agnihotri S, Ryall S, Barszczyk M, Chornenkyy Y, Bourgey M, Bourque G, Montpetit A, Cordero F, Castelo-Branco P, Mangerel J, Tabori U, Ho KC, Huang A, Taylor KR, Mackay A, Bendel AE, Nazarian J, Fangusaro JR, Karajannis MA, Zagzag D, Foreman NK, Donson A, Hegert JV, Smith A, Chan J, Lafay-Cousin L, Dunn S, Hukin J, Dunham C, Scheinemann K, Michaud J, Zelcer S, Ramsay D, Cain J, Brennan C, Souweidane MM, Jones C, Allis CD, Brudno M, Becher O, Hawkins C. Genomic analysis of diffuse intrinsic pontine gliomas identifies three molecular subgroups and recurrent activating ACVR1 mutations. *Nat Genet.* 2014;46(5):451-456.
77. Whyte MP, Wenkert D, Demertzis JL, DiCarlo EF, Westenberg E, Mumm S.

- Fibrodysplasia ossificans progressiva: middle-age onset of heterotopic ossification from a unique missense mutation (c.974G>C, p.G325A) in ACVR1. *J Bone Miner Res.* 2012;27(3):729-737.
- 78.** Goldman LA, Cutrone EC, Kotenko SV, Krause CD, Langer JA. Modifications of vectors pEF-BOS, pcDNA1 and pcDNA3 result in improved convenience and expression. *Biotechniques.* 1996;21(6):1013-1015.
- 79.** Ohte S, Shin M, Sasanuma H, Yoneyama K, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Maruki Y, Matsuoka M, Namba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Furuya H, Kamizono J, Kitoh H, Nakashima Y, Susami T, Haga N, Komori T, Katagiri T. A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407(1):213-218.
- 80.** Kodaira K, Imada M, Goto M, Tomoyasu A, Fukuda T, Kamijo R, Suda T, Higashio K, Katagiri T. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345(3):1224-1231.
- 81.** Ohte S, Kokabu S, Iemura S, Sasanuma H, Yoneyama K, Shin M, Suzuki S, Fukuda T, Nakamura Y, Jimi E, Natsume T, Katagiri T. Identification and functional analysis of Zranb2 as a novel Smad-binding protein that suppresses BMP signaling. *J Cell Biochem.* 2012;113(3):808-814.
- 82.** Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T. Separation and detection of large

- phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat Protoc.* 2009;4(10):1513-1521.
- 83.** Iguchi M, Kujuro Y, Okatsu K, Koyano F, Kosako H, Kimura M, Suzuki N, Uchiyama S, Tanaka K, Matsuda N. Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.* 2013;288(30):22019-22032.
- 84.** Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, Tani N, Kimura M, Go E, Koyano F, Funayama M, Shiba-Fukushima K, Sato S, Shimizu H, Fukunaga Y, Taniguchi H, Komatsu M, Hattori N, Mihara K, Tanaka K, Matsuda N. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun.* 2012;3:1016.
- 85.** Cuny GD, Yu PB, Laha JK, Xing X, Liu JF, Lai CS, Deng DY, Sachidanandan C, Bloch KD, Peterson RT. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18(15):4388-4392.
- 86.** Ventura F, Doody J, Liu F, Wrana JL, Massague J. Reconstitution and transphosphorylation of TGF-beta receptor complexes. *EMBO J.* 1994;13(23):5581-5589.
- 87.** Gregson CL, Hollingworth P, Williams M, Petrie KA, Bullock AN, Brown MA, Tobias JH, Triffitt JT. A novel ACVR1 mutation in the glycine/serine-rich domain found in the most benign case of a fibrodysplasia ossificans progressiva

- variant reported to date. *Bone*. 2011;48(3):654-658.
88. Petrie KA, Lee WH, Bullock AN, Pointon JJ, Smith R, Russell RG, Brown MA, Wordsworth BP, Triffitt JT. Novel mutations in ACVR1 result in atypical features in two fibrodysplasia ossificans progressiva patients. *PLoS One*. 2009;4(3):e5005.
 89. Ratbi I, Borcciadi R, Regragui A, Ravazzolo R, Sefiani A. Rarely occurring mutation of ACVR1 gene in Moroccan patient with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Clin Rheumatol*. 2010;29(1):119-121.
 90. Carvalho DR, Navarro MM, Martins BJ, Coelho KE, Mello WD, Takata RI, Speck-Martins CE. Mutational screening of ACVR1 gene in Brazilian fibrodysplasia ossificans progressiva patients. *Clin Genet*. 2010;77(2):171-176.
 91. Furuya H, Ikezoe K, Wang L, Ohyagi Y, Motomura K, Fujii N, Kira J, Fukumaki Y. A unique case of fibrodysplasia ossificans progressiva with an ACVR1 mutation, G356D, other than the common mutation (R206H). *Am J Med Genet A*. 2008;146A(4):459-463.
 92. Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*. 1992;71(6):1003-1014.
 93. Suzuki A, Kaneko E, Ueno N, Hemmati-Brivanlou A. Regulation of epidermal induction by BMP2 and BMP7 signaling. *Dev Biol*. 1997;189(1):112-122.
 94. Zhang D, Schwarz EM, Rosier RN, Zuscik MJ, Puzas JE, O'Keefe RJ. ALK2

- functions as a BMP type I receptor and induces Indian hedgehog in chondrocytes during skeletal development. *J Bone Miner Res.* 2003;18(9):1593-1604.
95. Wieser R, Wrana JL, Massague J. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J.* 1995;14(10):2199-2208.
96. Le VQ, Wharton KA. Hyperactive BMP signaling induced by ALK2(R206H) requires type II receptor function in a Drosophila model for classic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Dev Dyn.* 2012;241(1):200-214.
97. Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, Boussein ML, Hong DW, McManus PM, Katagiri T, Sachidanandan C, Kamiya N, Fukuda T, Mishina Y, Peterson RT, Bloch KD. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nat Med.* 2008;14(12):1363-1369.
98. Bagarova J, Vonner AJ, Armstrong KA, Borgermann J, Lai CS, Deng DY, Beppu H, Alfano I, Filippakopoulos P, Morrell NW, Bullock AN, Knaus P, Mishina Y, Yu PB. Constitutively active ALK2 receptor mutants require type II receptor cooperation. *Mol Cell Biol.* 2013;33(12):2413-2424.
99. Simic P, Culej JB, Orlic I, Grgurevic L, Draca N, Spaventi R, Vukicevic S. Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovariectomized rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25509-25521.

100. Nemeth E. Iron regulation and erythropoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(3):169-175.
101. Ebisawa T, Tada K, Kitajima I, Tojo K, Sampath TK, Kawabata M, Miyazono K, Imamura T. Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 20):3519-3527.
102. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明, 田中栄, 中村浩彰, 森諭史 : 歯と骨の形づくりの分子メカニズムと, 組織発生ならびに成長. In : 新 骨の科学. 須田立雄, 第 2 版, 医歯薬出版, 東京, pp59-62, 2007
103. Kaplan FS, Shore EM. Progressive osseous heteroplasia. *J Bone Miner Res.* 2000;15(11):2084-2094.
104. Chakkalakal SA, Zhang D, Culbert AL, Convente MR, Caron RJ, Wright AC, Maidment AD, Kaplan FS, Shore EM. An *Acvr1* R206H knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Bone Miner Res.* 2012;27(8):1746-1756.
105. Masui S, Shimosato D, Toyooka Y, Yagi R, Takahashi K, Niwa H. An efficient system to establish multiple embryonic stem cell lines carrying an inducible expression unit. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(4):e43.
106. Nakayama N, Duryea D, Manoukian R, Chow G, Han CY. Macroscopic cartilage formation with embryonic stem-cell-derived mesodermal progenitor cells. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 10):2015-2028.
107. Kato Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuki F, Takano Y. Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation

- by transforming growth factor beta and serum factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(24):9552-9556.
- 108.** Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Shin M, Yoneyama K, Murata E, Kanomata K, Nojima J, Ono Y, Yoda T, Fukuda T, Katagiri T. Suppression of BMP-Smad signaling axis-induced osteoblastic differentiation by small C-terminal domain phosphatase 1, a Smad phosphatase. *Mol Endocrinol*. 2011;25(3):474-481.
- 109.** Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M, Okuda A. Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms. *Cell Stem Cell*. 2011;9(1):37-49.
- 110.** Noth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, Schutze N, Jakob F, Eulert J. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2007;83(3):626-635.
- 111.** Hao J, Ho JN, Lewis JA, Karim KA, Daniels RN, Gentry PR, Hopkins CR, Lindsley CW, Hong CC. In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem Biol*. 2010;5(2):245-253.
- 112.** Mohedas AH, Xing X, Armstrong KA, Bullock AN, Cuny GD, Yu PB. Development of an ALK2-biased BMP type I receptor kinase inhibitor. *ACS Chem Biol*. 2013;8(6):1291-1302.
- 113.** Sanvitale CE, Kerr G, Chaikuad A, Ramel MC, Mohedas AH, Reichert S, Wang

- Y, Triffitt JT, Cuny GD, Yu PB, Hill CS, Bullock AN. A new class of small molecule inhibitor of BMP signaling. *PLoS One*. 2013;8(4):e62721.
- 114.** Mohedas AH, Wang Y, Sanvitale CE, Canning P, Choi S, Xing X, Bullock AN, Cuny GD, Yu PB. Structure-Activity Relationship of 3,5-Diaryl-2-aminopyridine ALK2 Inhibitors Reveals Unaltered Binding Affinity for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva Causing Mutants. *J Med Chem*. 2014;57(19):7900-7915.
- 115.** 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 cells and heterotopic ossifications in mice. *J Bone Miner Metab*. 2013;31(1):26-33.
- 116.** Fukuda T, Uchida R, Ohte S, Inoue H, Yamazaki H, Matsuda D, Nonaka K, Masuma R, Katagiri T, Tomoda H. Trichocyalides A and B, new inhibitors of alkaline phosphatase activity in bone morphogenetic protein-stimulated myoblasts, produced by *Trichoderma* sp. FKI-5513. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012;65(11):565-569.

図の説明

Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers.

Table 2. Nucleotide sequences of qRT-PCR primers.

Figure 1. Over-expression of ALK2(G325A) in C2C12 cells induces BMP specific luciferase activity via the phosphorylation of Smad1/5.

(A) BMP-specific luciferase reporter activity induced by mutant ALK2. C2C12 cells were co-transfected with increasing amounts of wild-type ALK2, ALK2(G325A) or ALK2(R206H) and a BMP-specific reporter plasmid, Id1WT4F-luc. After 24 hr, the activities of firefly and renilla luciferase were determined. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ versus ALK2(WT) transfected cells [Student's t-test]. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

(B) Inhibition of mutant ALK2 activity by a kinase inhibitor of BMP receptors. C2C12 cells transfected with ALK2 (150 ng) and the Id1WT4F-luc reporter were treated overnight with or without increasing amounts of LDN-193189 (0 to 100 nM). *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ versus without LDN-193189 cells [Student's t-test]. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

Figure 2. ALK2(G325A) in C2C12 cells induces ALP activity weaker than

ALK2(R206H).

(A) Western blot analysis of phosphorylated Smad1/5. C2C12 cells were co-transfected with V5 tagged wild-type (WT) or mutant ALK2 (100 ng) and FLAG-Smad1 (100 ng). Whole-cell lysates were analyzed with antibodies against phospho-Smad1/5, V5-tag, FLAG-tag, Smad1 and tubulin. The data are representative of N = 4 blots.

(B) ALP activity induced by the co-operative activity of ALK2 and Smad1. C2C12 cells were co-transfected with WT or mutant ALK2 (100 ng) and Smad1 (100 ng). After 3 days, ALP activity was determined by measuring the absorbance at 405 nm. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). *, p < 0.05 and **, p < 0.01 versus mock-transfected cells [ANOVA].

Figure 3. BMPR-II and ActR-IIB, but not ActR-IIA or Tbr-II, enhance ALP activity in C2C12 cells in co-operation with mutant ALK2.

(A-D) BMPR-II and ActR-IIB induced ALP activity in co-operation with mutant ALK2. C2C12 cells were co-transfected with 100 ng of WT ALK2 (closed triangles), ALK2(R206H) (open circles), ALK2(G325A) (closed squares) or a mock vector (x) and with increasing amounts (0 to 100 ng) of BMPR-II (A), ActR-IIA (B), ActR-IIB (C) or Tbr-II (D). The total amount of transfected DNA was adjusted to 200 ng/well using an empty vector. ALP activity was determined on day 3. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

Figure 4. BMPR-II and ActR-IIB enhance mutant ALK2 associated with FOP but not mutant ALK2 associated with heart disease.

(A-D) The effects of BMPR-II and ActR-IIB on ALK2 mutants identified in FOP and heart disease patients were examined. C2C12 cells were co-transfected with 100 ng of an ALK2 vector carrying mutations identified in FOP (A and B) or heart disease patients (C and D) and 100 ng of BMPR-II (A and C) or ActR-IIB (B and D). ALP activity was determined on day 3. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). *, p < 0.05 and **, p < 0.01 versus BMPR-II or ActR-IIB transfected cells [ANOVA]. The expression levels of mutant ALK2 were determined through Western blot analysis using antibodies against V5-tag and tubulin. The data are representative of N = 4 blots.

Figure 5. The kinase activity of BMPR-II and ActR-IIB is essential for the enhancement of mutant ALK2.

(A-D) Kinase activity-deficient type II receptors failed to enhance mutant ALK2. ALK2(R206H) (A) and ALK2(G325A) (B) (100 ng) were co-transfected in C2C12 cells with wild-type (WT) or kinase activity-deficient (KR) BMPR-II (A) and ActR-IIB (B) (100 ng), respectively. ALP activity was determined on day 3. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). *, p < 0.05 and **, p < 0.01 [ANOVA]. Whole-cell lysates prepared from the transfected cells were analyzed via Western blot analysis using antibodies against phospho-Smad1/5, V5-tag (ALK2), FLAG-tag (type II receptors), Smad1 and tubulin (C and D). The data are representative of N = 4 blots.

Figure 6. ALK2(Q207D) is activated by BMPR-II and ActR-IIB, but not ActR-IIA or TbR-II.

(A-D) The effect of type II receptors on ALK2(Q207D) was examined. ALK2(Q207D) (100 ng) was co-transfected into C2C12 cells with increasing amounts (0 to 100 ng) of BMPR-II (A), ActR-IIA (B), ActR-IIB (C) and TbR-II (D). ALP activity was determined on day 3. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

Figure 7. BMPR-II and ActR-IIB activate ALK2(Q207D) in a kinase activity-independent manner.

(A and B) ALK2(Q207D) (100 ng) was co-transfected in C2C12 cells with wild-type (WT) and kinase activity-deficient (KR) BMPR-II (A) and ActR-IIB (B) (100 ng), and ALP activity was determined on day 3. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

*, p < 0.05 and **, p < 0.01 [ANOVA].

(C and D) Whole-cell lysates prepared from the transfected cells were analyzed through Western blot analysis with antibodies against phospho-Smad1/5, V5-tag (ALK2), FLAG-tag (type II receptors), Smad1 and tubulin. The data are representative of N = 4 blots.

Figure 8. A schematic of GS domain of ALK2 (9AV, 7AV, 2AV)

Amino acid sequences of the GS domains of wild-type (WT) and mutant ALK2. Of the

nine Ser and Thr residues (in bold) present in WT ALK2, nine, seven and two residues were mutated to Ala and Val residues in the 9AV, 7AV and 2AV constructs, respectively. These mutations were introduced in ALK2(R206H) and ALK2(G325A), and their activity was analyzed.

Figure 9. Functional analysis of the role of the ALK2 GS domain in type II receptor-dependent enhancement.

(A and B) Co-operative induction of ALP activity in C2C12 cells by mutant ALK2 carrying mutations in the GS domain plus type II receptors. ALK2(R206H) (A) and ALK2(G325A) (B) carrying the 9AV, 7AV and 2AV mutations (or empty vector) (100 ng) were co-transfected with BMPR-II (A) and ActR-IIB (B) (100 ng), respectively. ALP activity was determined on day 3. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). *, p < 0.05 and **, p < 0.01 versus mock-transfected cells [Student's t-test].

(C and D) Whole-cell lysates from cells transfected with the indicated ALK2 and BMPR-II (C) or ActR-IIB (D) constructs were analyzed via Western blot analysis with antibodies against phospho-Smad1/5, V5-tag (ALK2), FLAG-tag (type II receptors), Smad1 and tubulin. The data are representative of N = 4 blots.

Figure 10. Schema of GS domain of ALK2 (T203V, T209V, 8AV)

Amino acid sequences of the GS domains of wild-type (WT) and mutant ALK2. Of the nine Ser and Thr residues (in bold) present in WT ALK2, Thr203, Thr209 or the eight

residues other than Thr203 were mutated to Ala and Val residues in the T203V, T209V and 8AV mutants, respectively. These mutations were introduced in ALK2(R206H) and ALK2(G325A), and their activity was analyzed.

Figure 11. Thr203 of ALK2 is a crucial residue for the type II receptor-dependent enhancement of ALK2.

(A and B) Co-operative induction of ALP activity in C2C12 cells by type II receptors and mutant ALK2 constructs bearing mutations in the GS domain. ALK2(R206H) (A) and ALK2(G325A) (B) carrying the T203V, T209V and 8AV mutations (or empty vector) (100 ng) were co-transfected with BMPR-II (A) and ActR-IIB (B) (100 ng), respectively. ALP activity was determined on day 3. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). *, p < 0.05 and **, p < 0.01 versus mock-transfected cells [Student's t-test].

(C and D) Whole-cell lysates from C2C12 cells transfected with the indicated ALK2 and BMPR-II (C) or ActR-IIB (D) constructs were analyzed via Western blot analysis with antibodies against phospho-Smad1/5, V5-tag (ALK2), FLAG-tag (type II receptors), Smad1 and tubulin. The data are representative of N = 4 blots.

Figure 12. The Thr residue at position 203 in ALK2 is conserved in various species and BMP type I receptors.

(A) Alignment of the GS domains of ALK2 of *Homo sapience*, *Mus musculus*, *Rattus*

norvegicus, *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, and *Fugu rubripes*. The Thr residue at position 203 in human ALK2 is conserved in all of the various species.

(B) Alignment of the GS domains of BMP type I receptors human ALK2, murine ALK1, ALK3 and ALK6. The Thr residue at position 203 in ALK2 is conserved in all of the receptors; these residues are mutated to Val residues in ALK1(T197V), ALK3(T229V) and ALK6(T199V).

Figure 13. The conserved Thr residues are crucial for ligand-induced signal transduction.

(A-D) Effect of substitution mutations at positions of the conserved BMP type I receptor Thr residues on ligand-induced signaling. HEK 293A cells were co-transfected with wild-type (WT) or mutant type I receptors (T197V, T203V, T229V and T199V in murine ALK1 (A), human ALK2 (B), murine ALK3 (C) and murine ALK6 (D), respectively) (100 ng) and a BMP-specific Id1WT4F-luc reporter plasmid (40 ng). The cells were stimulated overnight with 1.0 ng/ml GDF2/BMP9 (A), 10 ng/ml BMP7 (B), 10 ng/ml BMP4 (C) or 10 ng/ml GDF5 (D). Luciferase activity was measured on day 1. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). *, p < 0.05; **, p < 0.01 [ANOVA].

Figure 14. T203 in ALK2 enhances BMP signaling in an unphosphorylated state.

(A and B) The T203D and T203E ALK2 mutants did not induce ALP activity, even in the presence of type II receptors. C2C12 cells were co-transfected with ALK2(R206H)

(A) or ALK2(G325A) (B) (100 ng), either without or with one of mutations indicated in the figure, and with BMPR-II (A) and ActR-IIB (B) (100 ng), respectively. ALP activity was determined on day 3. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). **, p < 0.01 versus mock-transfected cells [Student's t-test].

Figure 15. T203 in ALK2 regulates the type II receptor-dependent phosphorylation levels of ALK2.

(A and B) Phosphorylation levels of ALK2 without (A) and with (B) T203V mutation. C2C12 cells were co-transfected with ALK2 wild-type, R206H and G325A (100 ng) with BMPR-II or ActR-IIB (100 ng). Whole cell lysates were separated in SDS-PAGE with and without a Phos-tag reagent followed by Western blot analysis with antibodies against V5-tag (ALK2) and FLAG-tag (type II receptors). The amount of phosphorylated ALK2 was expressed as percentage of total (phosphorylated and unphosphorylated) ALK2. The data are representative of N = 4 blots.

Figure 16. LDN-193189 inhibited activity induced by the over-expression of ActR-IIA in C2C12 cells.

Inhibition of activity induced ActR-IIA by a kinase inhibitor of BMP receptors. C2C12 cells were co-transfected with 100 ng of ALK2(R206H) (open circles) or a mock vector (x) and with increasing amounts (0 to 100 ng) of ActR-IIA. After transfection, C2C12 cells were treated with or without LDN-193189 (100 nM). ALP activity was determined

on day 3. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3).

Figure 17. FKBP12 inhibited activity induced by the over-expression of mutant ALK2.

Inhibition of mutant ALK2 activity by FKBP12. C2C12 cells transfected with ALK2 (75 ng) and the Id1WT4F-luc reporter (40 ng) were treated overnight with or without FKBP12 (75 ng). The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). *, p < 0.05 and **, p < 0.01 versus mock-transfected cells [Student's t-test].

Figure 18. Establishment of murine ES cell lines carrying mutant FOP-associated ALK2.

A schematic representation of the ROSA26 locus and exchange vector for V5-tagged human ALK2(WT) and ALK2(R206H).

Figure 19. Selection of ES cells which induce ALK2(WT) or ALK2 (R206H) in Dox dependently.

(A) Immunohistochemical staining of ALK2(WT) and ALK2(R206H) using an antibody against the V5-tag. ES cells were cultured for 2 days in the presence [Dox(+)] and absence [Dox(-)] of 1 mg/ml Dox. The colonies that were formed were stained with an antibody against the V5-tag.

(B) Colonies formed in parental ES cells and their subclones carrying ALK2(WT) or

ALK2(R206H). Phase contrast views.

Figure 20. The 6 subclones expressed human ALK2 mRNA absence of Dox.

(A) The specific induction of ALK2 mRNA in ES cells under the control of the Tet-Off system. The ES cells were cultured for 2 days in the presence (open bars) and absence (closed bars) of 1 mg/ml Dox. The expression levels of the mRNA of *ALK2*(A), *Alk1*(B), *Alk3*(C), *Alk6*(D) were determined by qRT-PCR. Data were expressed in fold induction in the absence of Dox compared to the presence of Dox.

Figure 21. ALK2(WT) and ALK2(R206H) proteins were expressed on the cell surface in the absence of Dox.

Flow cytometry analysis of ALK2(WT) and ALK2(R206H) in ES cells. The ES cells that had been cultured for 2 days in the presence (blue areas) and absence (green lines) of 1 mg/ml Dox were stained with an antibody against ALK2 and analyzed by FACSCalibur.

Figure 22. Induction of ALK2(R206H) activates intracellular signal transduction of BMPs in ES cells.

(A) Western blot analysis of V5-tagged ALK2 and phosphorylated Smad1/5. ES cells were cultured for 2 days in the presence (+) and absence (-) of 1 mg/ml Dox. Whole-cell lysates were analyzed by western blotting using antibodies against the V5-tag (ALK2-V5), phosphorylated Smad1/5 (P-Smad1/5) and tubulin. The data are

representative of N = 4 blots.

(B) Luciferase reporter assay in ES cells. The ES cells were transfected with a BMP-specific luciferase reporter, Id1WT4F-luc (40 ng), and cultured overnight in the presence (open bars) and absence (closed bars) of 1 mg/ml Dox.

Figure 23. ALK2(R206H) activates Id1 and Id2 genes expression.

(A and B) Expression of endogenous Id1 and Id2 mRNAs in ES cells carrying ALK2(R206H). The ES cells were cultured for 2 days in the presence (open bars) and absence (closed bars) of 1 mg/ml Dox. The expression levels of *Id1*(A) and *Id2*(B) mRNAs were determined by qRT-PCR. Data were expressed in fold induction in the absence of Dox compared to the presence of Dox.

Figure 24. LDN-193189, a specific small molecule chemical inhibitor of BMP type I receptors, inhibits Dox-dependent BMP signaling in ES cells carrying ALK2(R206H).

(A) Western blot analysis of phosphorylated Smad1/5. ES cells carrying ALK2(R206H) were cultured for 2 days in the presence (+) and absence (-) of 0.1 mM LDN-193189 and 1 mg/ml Dox. Whole-cell lysates were analyzed by western blotting using antibodies against phosphorylated Smad1/5 (P-Smad1/5), the V5-tag (ALK2-V5) and tubulin. The data are representative of N = 4 blots.

(B) Luciferase reporter assay in ES cells carrying ALK2(R206H). The ES cells were

transfected with a BMP-specific luciferase reporter, Id1WT4F-luc (40 ng), and cultured overnight in the presence (+) and absence (-) of 0.1 mM LDN-193189 (hatched bars) and 1 mg/ml Dox (open bars).

Figure 25. Chondrogenic differentiation of RH#2 cells carrying ALK2(R206H).

Chondrogenesis of RH#2 cells was induced as described in the Materials and Methods section. The cells were maintained with 10 ng/ml of TGF- β 1 and 50 ng/ml of BMP-4 (A - C) or 10 ng/ml of TGF- β 1 alone (E - G) in the presence (open bars) or absence (closed bars) of 1 mg/ml Dox. The expression of *Col2a1* (A and E), *Acan* (B and F) and *Coll10a1* (C and G) mRNA was determined by qRT-PCR. The relative mRNA levels were expressed in comparison to the control cultures in the presence of Dox.

Figure 26. Histological analysis of RH#2 chondrogenic differentiation.

The cells were maintained with 10 ng/ml of TGF- β 1 and 50 ng/ml of BMP-4 (A) or 10 ng/ml of TGF- β 1 alone (B) in the presence or absence of 1 mg/ml Dox. Macroscopic chondrogenesis of the pellets was evaluated by alcian blue staining of paraffin sections. Scale bars indicate 200 μ m.

Figure 27. EBRTch3 cells showed higher expression level of ActR-IIB than C2C12 cells.

The ES cells and C2C12 cells were cultured for 2 days. The expression levels of the

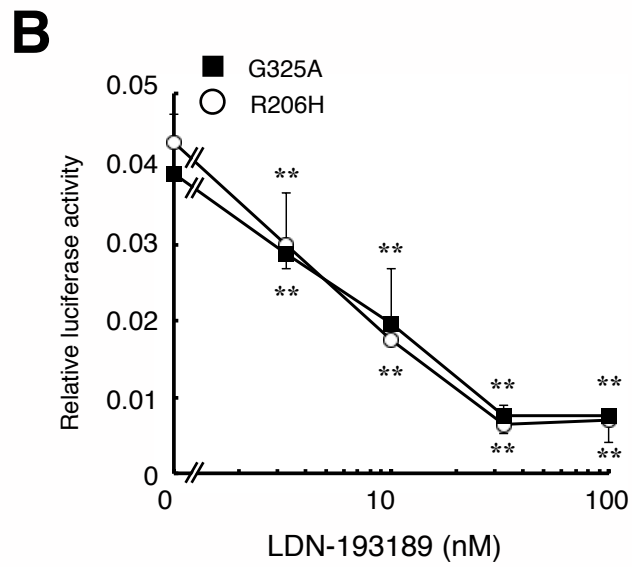
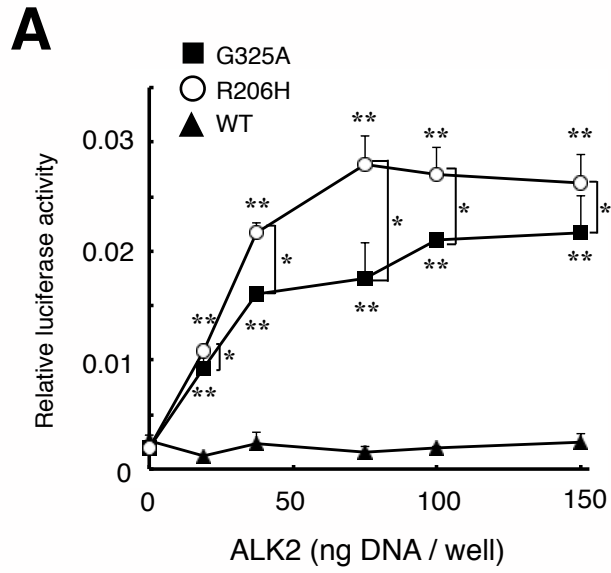
mRNA of *Acvr2b* were determined by qRT-PCR. Data were expressed in fold induction in the level of C2C12 cells. The data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). *, p < 0.05 and **, p < 0.01 versus mock-transfected cells [ANOVA].

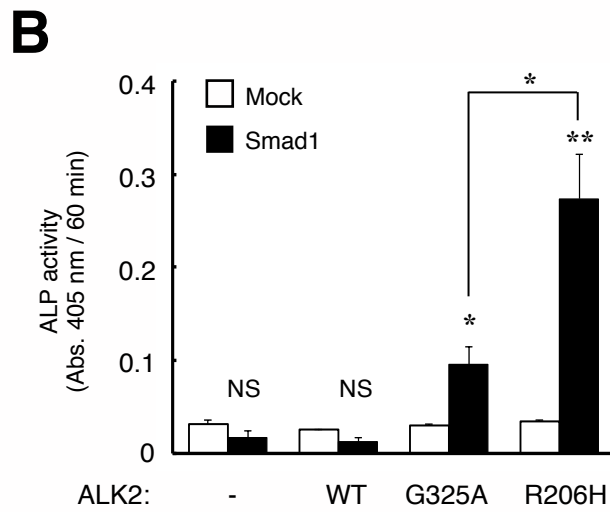
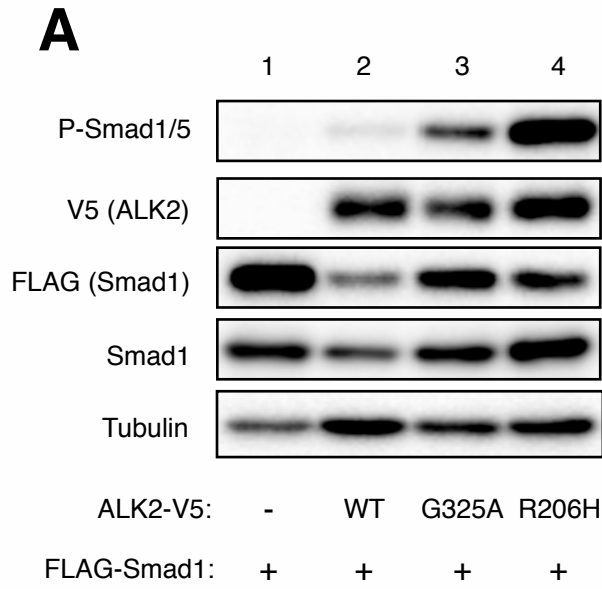
Table 1. Nucleotide sequences of PCR primers.

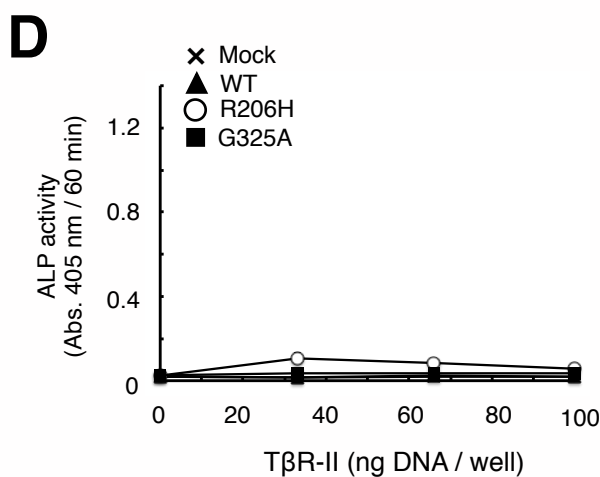
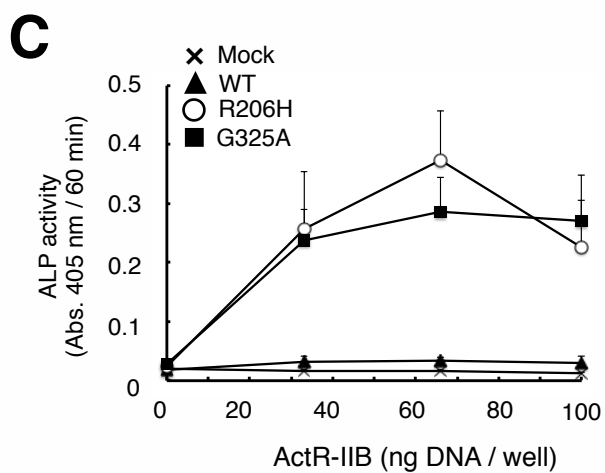
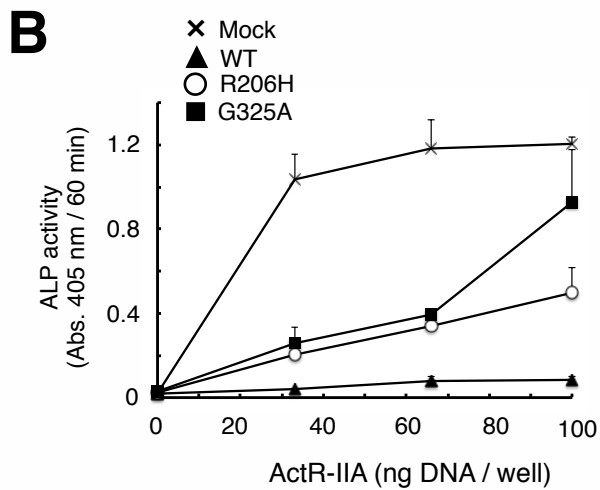
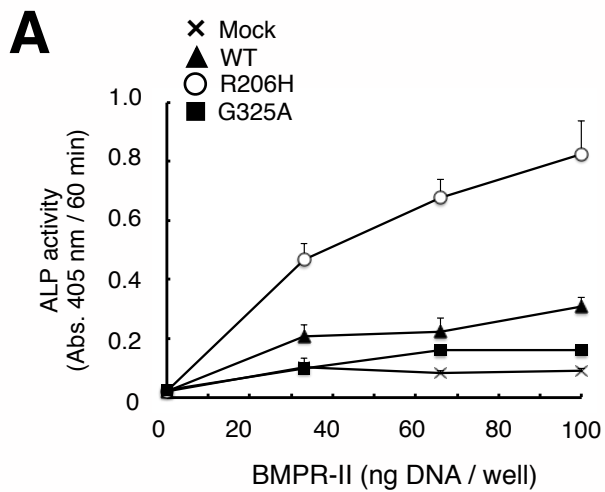
Primer	Sequence (5' > 3')
R206H-Fw	GGTACAAAGAACAGTGGCTCACCAGATTACACTG
R206H-Rev	CAGTGTAATCTGGTGAGCCACTGTTCTTTGTACC
G325A-Fw	ATTGCACATAGAGATATTTGCGACCCAAG
G325A-Rev	CTTGGGTCGCAAATATCTCTATGTGCAAAT
L196P-Fw	CAGGAAGTGGCTCTGGTCCTCCTTTTCTGGTAC
L196P-Rev	GTACCAGAAAAGGAGGACCAGAGCCACTTCCTG
R202I-Fw	CCTTTTCTGGTACAAATAACAGTGGCTCGCCAG
R202I-Rev	CTGGCGAGCCACTGTTATTTGTACCAGAAAAGG
PF197-8L-Fw	GTGGCTCTGGTCTTCTTCTGGTACAAAGAA
PF197-8L-Rev	GTTCTTTGTACCAGAAGAAGACCAGAGCCA
Q207E-Fw	CAAAGAACAGTGGCTCGCGAGATTACACTGTTGGAGTG
Q207E-Rev	CACTCCAACAGTGTAATCTCGCGAGCCACTGTTCTTTG
R258S-Fw	CAACACTGTGATGCTGAGCCATGAAAATATCTTAGGTTTC
R258S-Rev	GAAACCTAAGATATTTTCATGGCTCAGCCACAGTGTTG
G328R-Fw	GATATTTGGGACCCAAGGAAACCAGCCATTGCCC
G328R-Rev	GGGCAATGGCTGGTTTCCTTTGGGTCCCAAATATC
G328W-Fw	GATATTTGGGACCCAATGGAAACCAGCCATTGCCC
G328W-Rev	GGGCAATGGCTGGTTTCATTGGGTCCCAAATATC
G328E-Fw	GATATTTGGGACCCAAGAGAAACCAGCCATTGCCC
G328E-Rev	GGGCAATGGCTGGTTTCTCTTGGGTCCCAAATATC
G356D-Fw	CATAGCAGATTTGGACCTGGCAGTCATGCATTCC
G356D-Rev	GGAATGCATGACTGCCAGGTCCAAATCTGCTATG
R375P-Fw	GCGCTTGGTGCCACAGGGGGATTGTTCCC
R375P-Rev	GGGAACAATCCCCCTGTGGGCACCAAGCGC
ALK1(T197V)-Fw	CCTTCTTGGTGCAGAGGGTGGTAGCTCGG
ALK1(T197V)-Rev	CCGAGCTACCACCCTCTGCACCAAGAAGGG
ALK3(T229V)-Fw	CCTTTATTGGTTCAGCGAGTTATTGCCAAA
ALK3(T229V)-Rev	TTTGGAATAACTCGCTGAACCAATAAAGG
ALK6(T199V)-Fw	CCTCTGCTGGTCCAAAGGGTAATAGCTAAG
ALK6(T199V)-Rev	CTTAGCTATTACCTTTGGACCAGCAGAGG
ActR-IIB KR-Fw	CGACTTTGTGGCTGTGAGGATCTTCCCCTTC
ActR-IIB KR-Rev	GAAGTGGGAAGATCCTCACAGCCACAAAGTCG

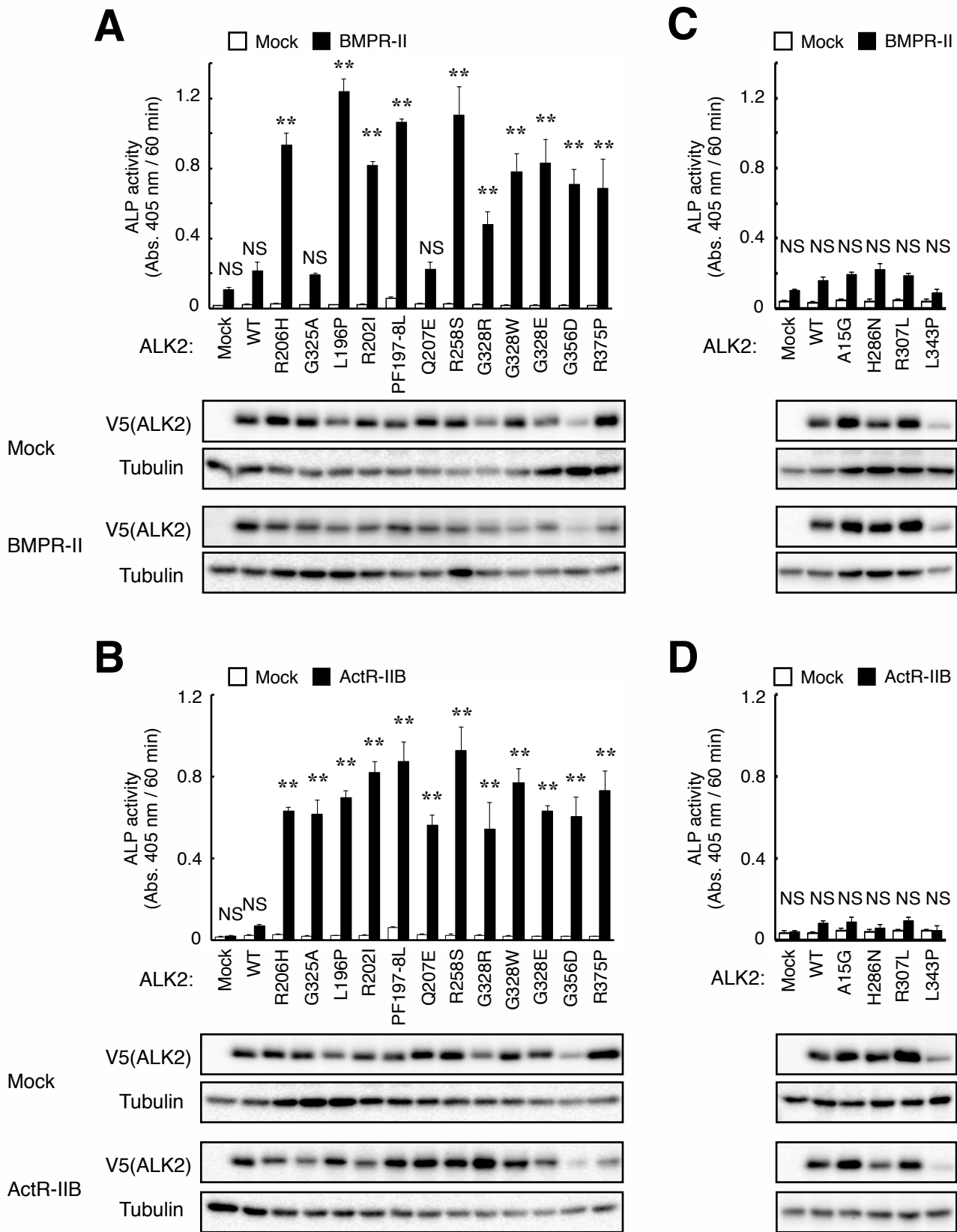
Table 2. Nucleotide sequences of qRT-PCR primers.

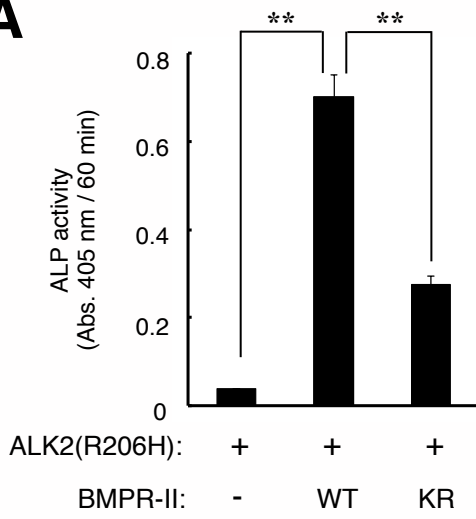
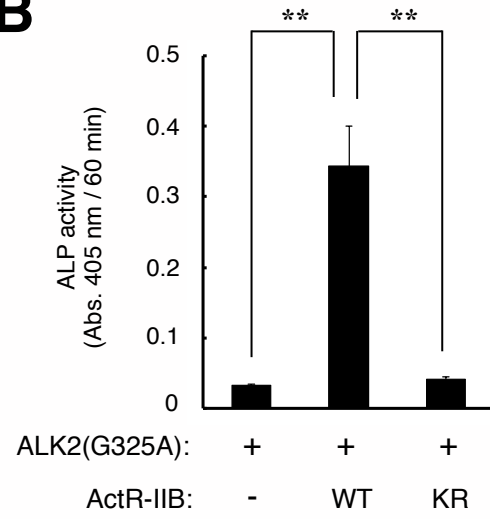
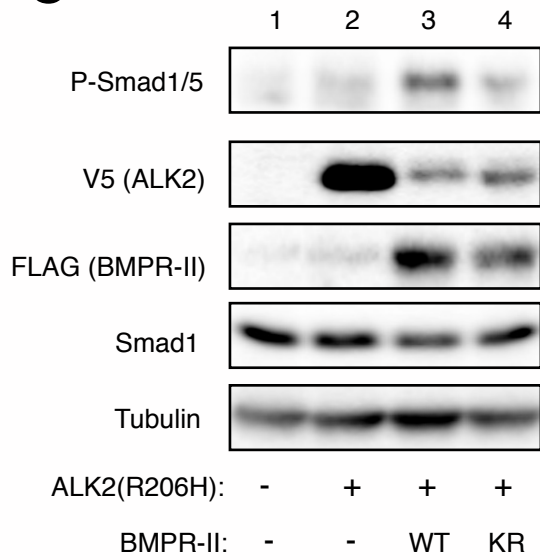
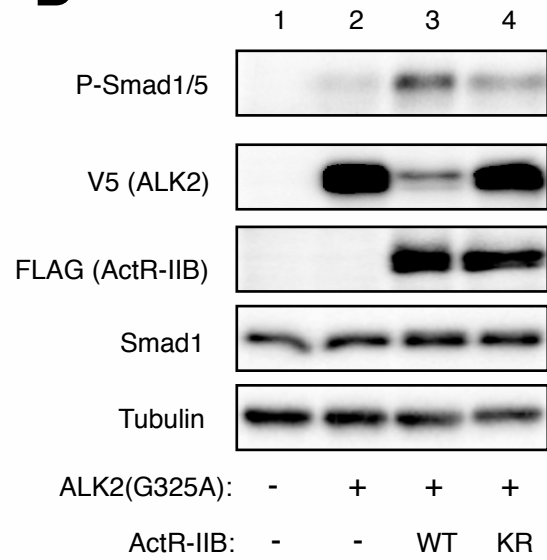
Primer	Sequence (5' > 3')
ALK2-Fw	ACATACCCAACAGATGGTTCTC
ALK2-V5-Rev	AGAGGGTTAGGGATAGGCTT
Alk1-Fw	CCAGCTTCAGCAGACATTCCAC
Alk1-Rev	AGGTACCGCCTGTCCCAAGA
Alk3-Fw	GTGGTGTAGCCCTTGTGGTAATGA
Alk3-Rev	CCTCTGTGGACTGATACTGCTTG
Alk6-Fw	GGACATGCTGGACTTGGCTTC
Alk6-Rev	TTATTAGGGACTTGTGAGCCTGGAC
Id1-Fw	GCGAGATCAGTGCCTTGGCG
Id1-Rev	CTCCTGAAGGGCTGGAGTCC
Id2-Fw	GGACATCAGCATCCTGTCCTTG
Id2-Rev	CTCCTGGTGAAATGGCTGATAAC
Col2a1-Fw	AGGGCAACAGCAGGTTACACATAC
Col2a1-Rev	TCCATGGGTGCGATGTCAATA
Aggrecan-Fw	GATCTGGCATGAGAGAGGCG
Aggrecan-Rev	GCCACGGTGCCCTTTTTAC
Col10a1-Fw	TTCTCCTACCACGTGCATGTG
Col10a1-Rev	AGGCCGTTTGATTCTGCATT
ActR-IIB-Fw	GCACCATCGAGCTGGTGAAG
ActR-IIB-Rev	TGAAGCGCTCGTTGCAGAA
Atp5f1-Fw	AACATGATGCGTCGCAAGGA
Atp5f1-Rev	CAATGCACTTGGCAATGGTCTC

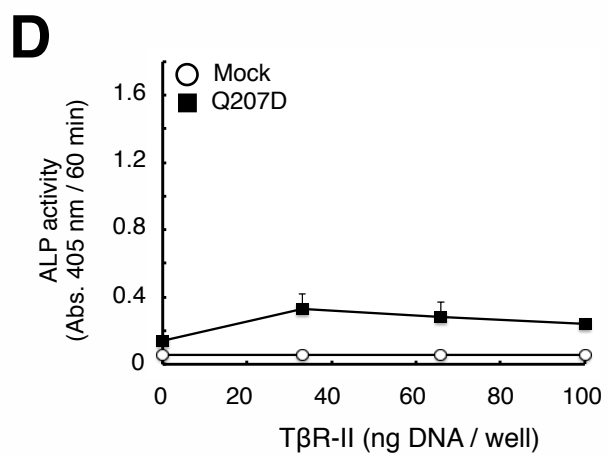
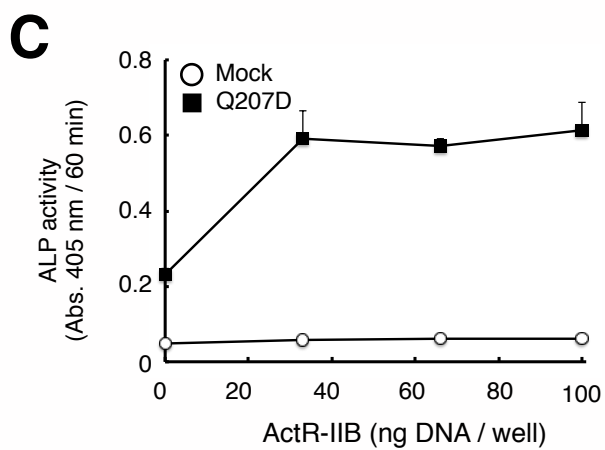
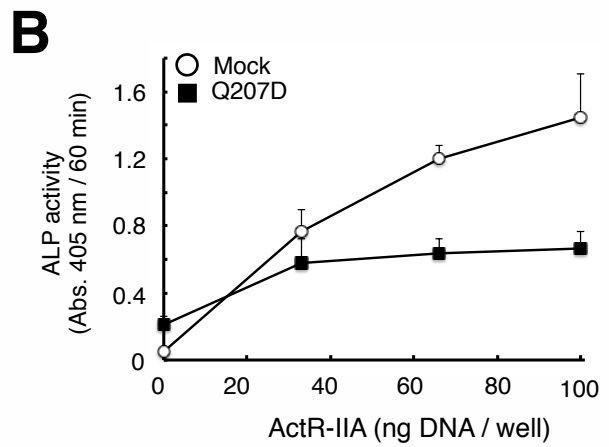
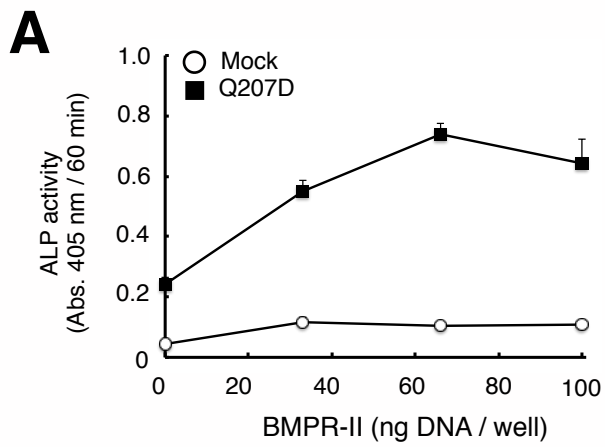


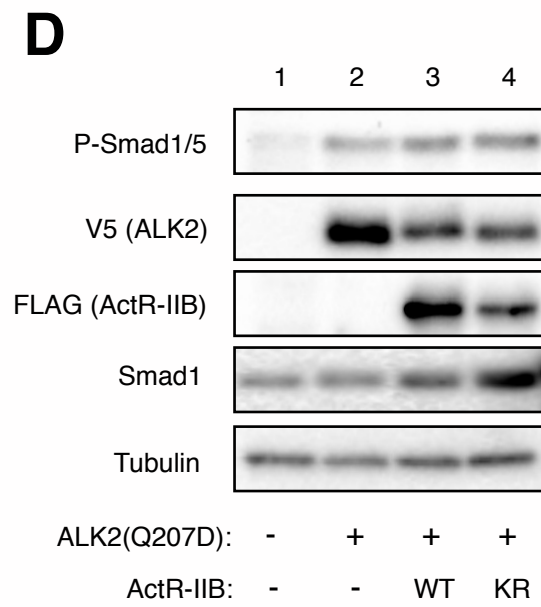
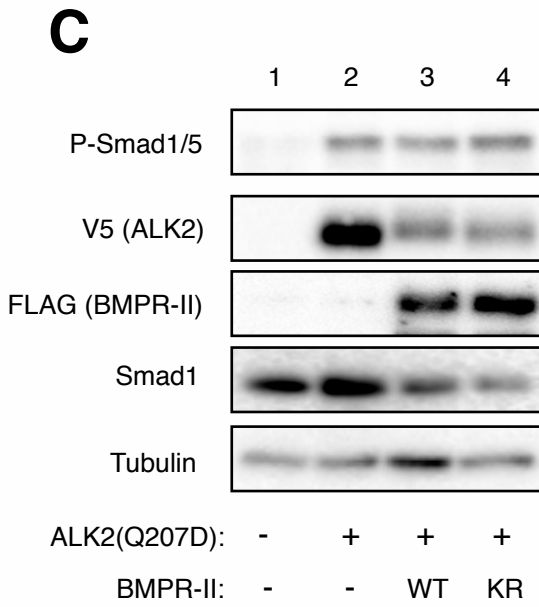
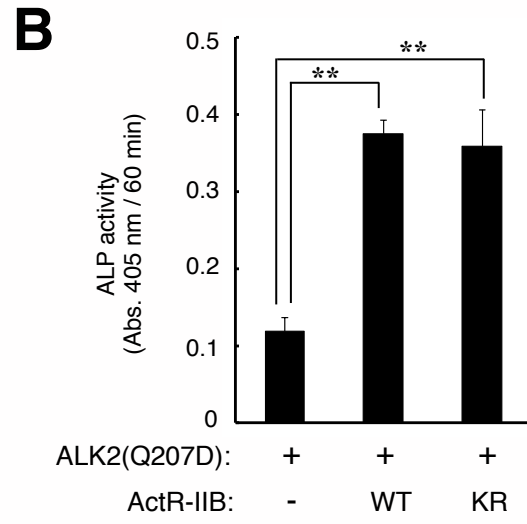
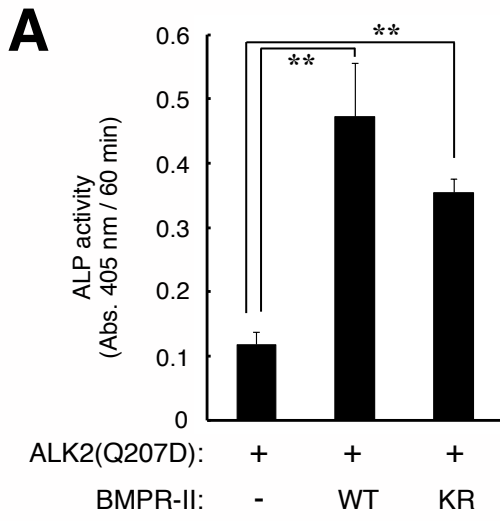




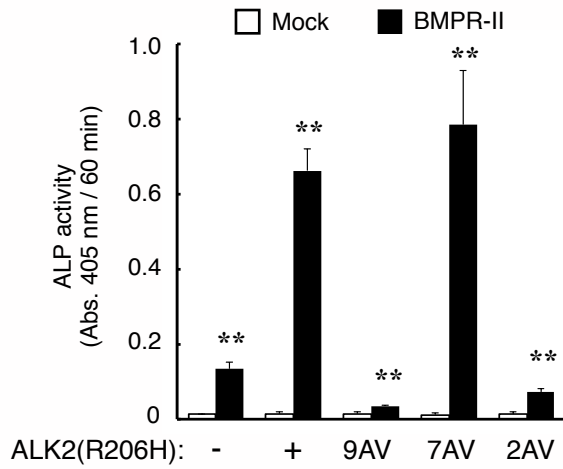
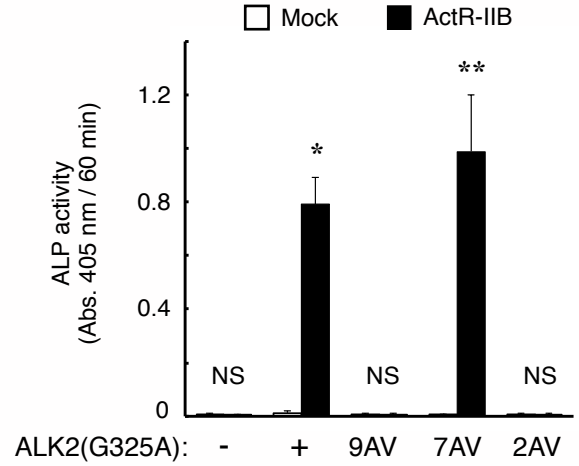
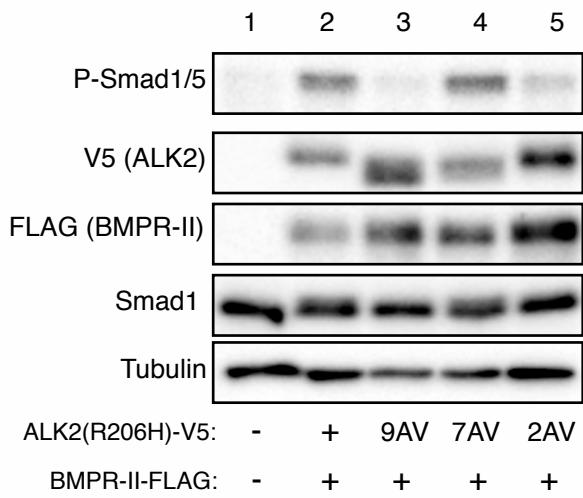
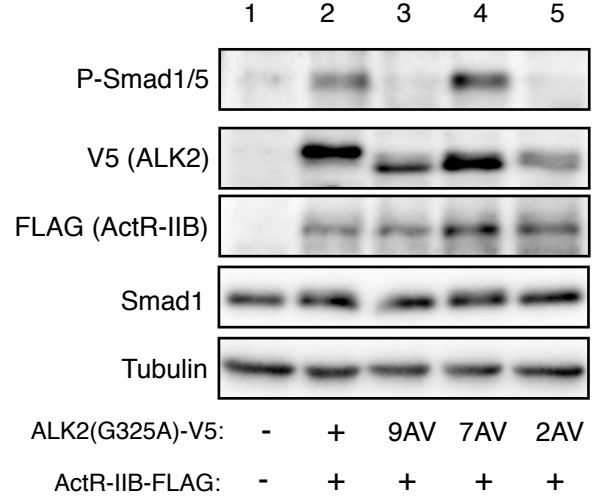


A**B****C****D**

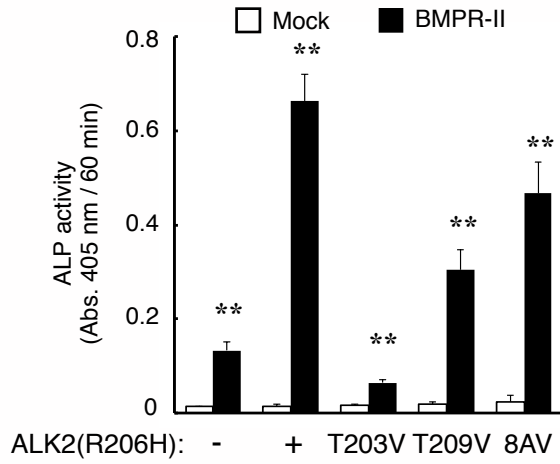
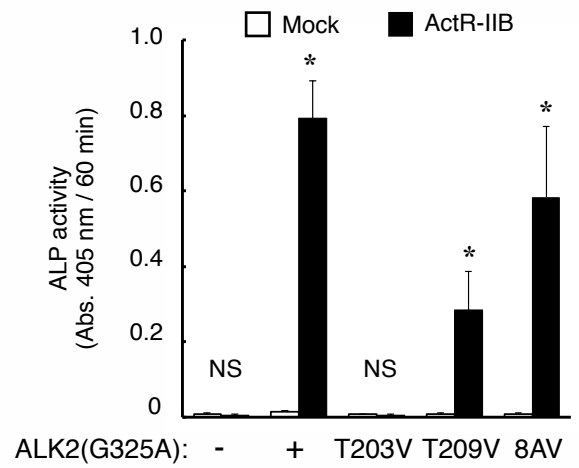
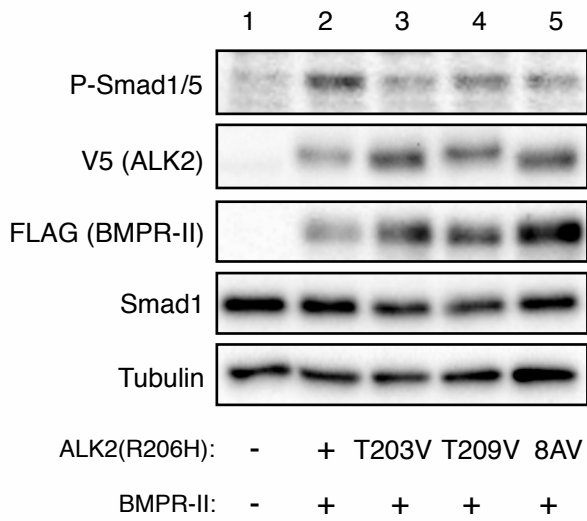
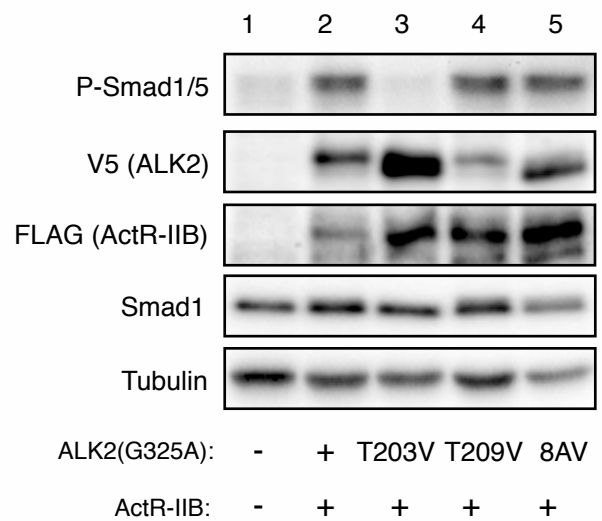




		178						203	206	209
GS domain	WT:	S	T	L	A	D	L	L	D	H
		S	C	T	S	G	S	G	S	G
		L	P	F	L	V	Q	R	T	V
		A	R	Q	I	T				
		↓↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	9AV:	AV	A	VA	A	A		V		V
	7AV:	AV	A	VA	A	A		-		-
	2AV:	--	-	--	-	-		V		V

A**B****C****D**

		178						203	206	209
GS domain	WT:	S	T	L	A	D	L	L	D	H
		S	C	T	S	G	S	G	S	G
		L	P	F	L	V	Q	R	T	V
		A	R	Q	I	T				
		↓↓		↓	↓	↓	↓	↓		↓
	T203V:	--		-	--	-	-	V		-
	T209V:	--		-	--	-	-	-		V
	8AV:	AV		A	VA	A	A	-		V

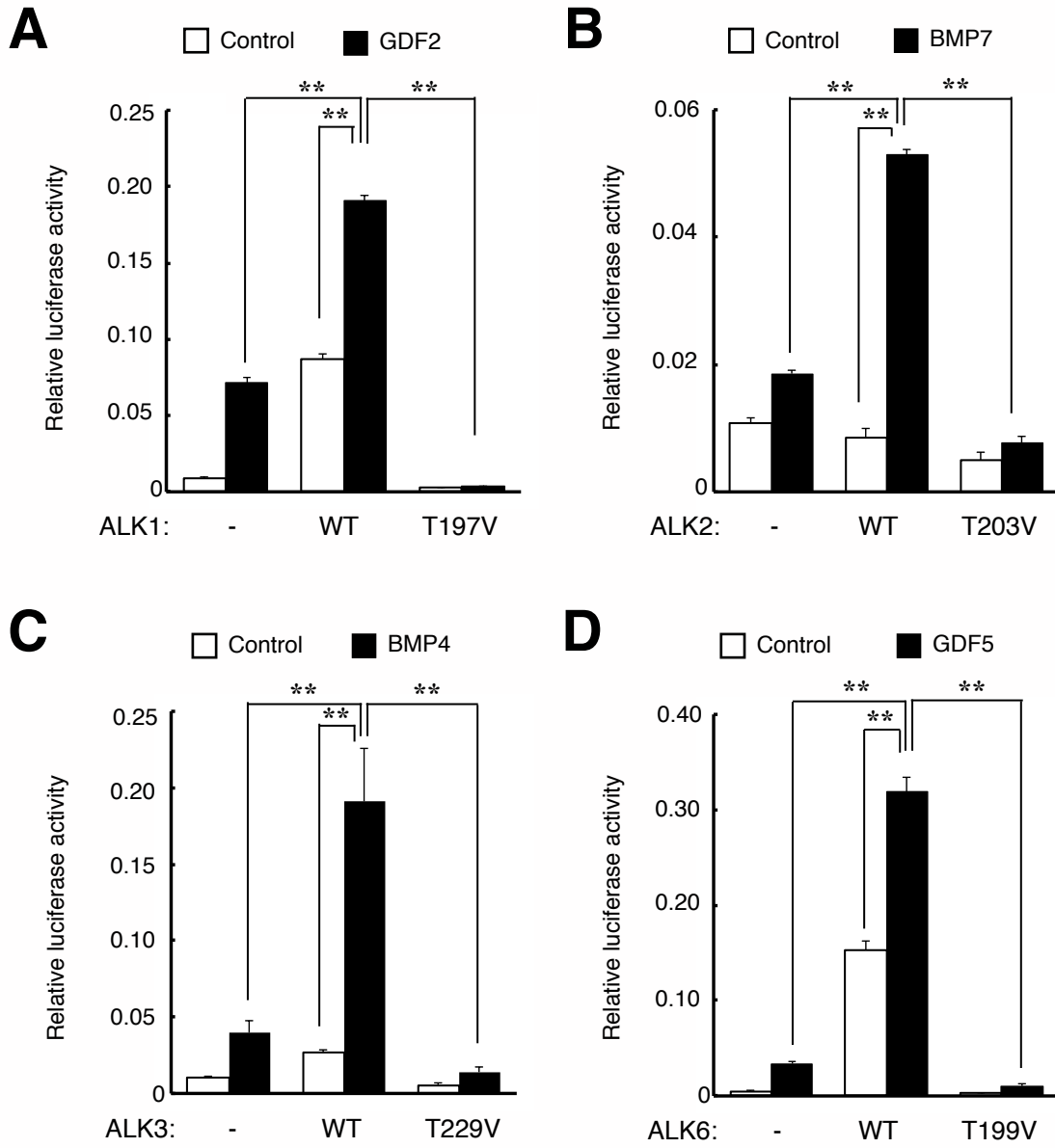
A**B****C****D**

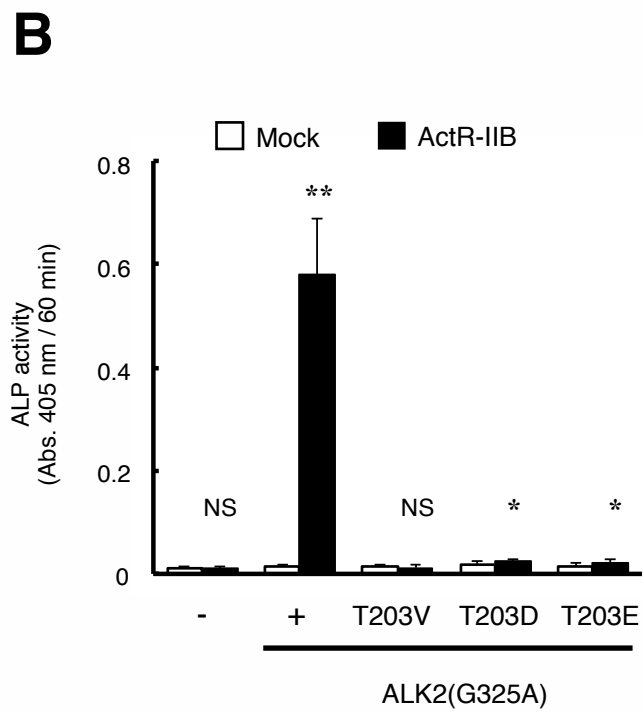
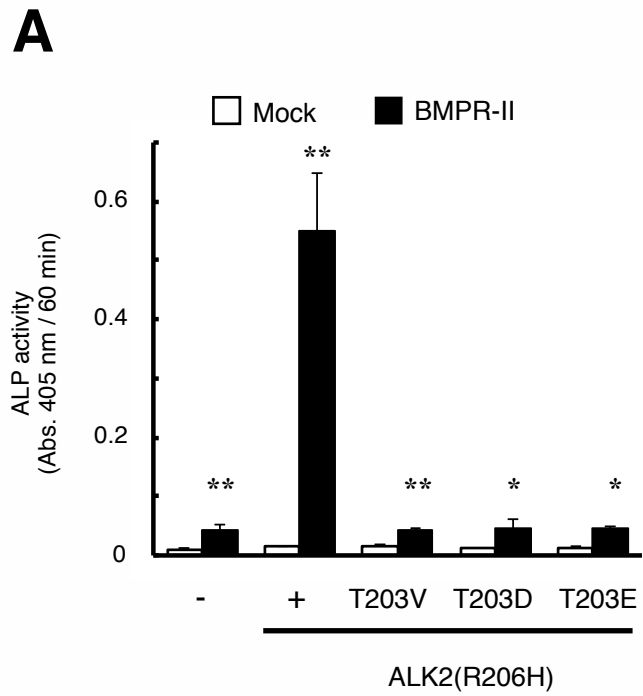
A

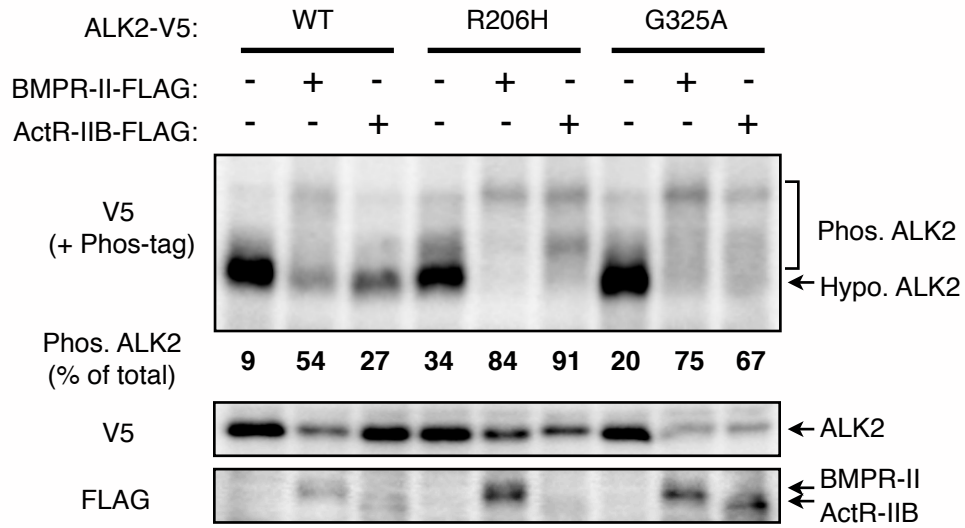
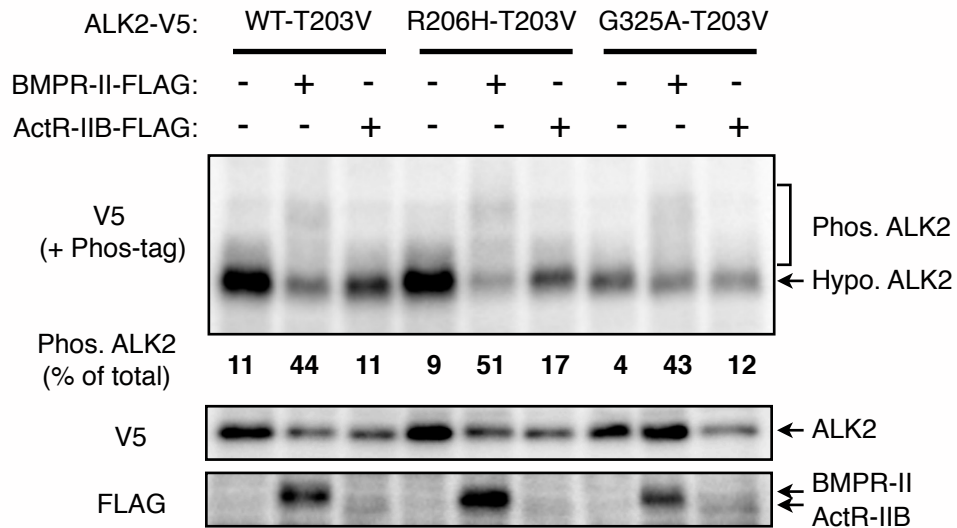
H. sapiens: STLADLLDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQI
M. musculus: STLAELLDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQI
R. norvegicus: STLAELLDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQI
C. familiaris: STLADLLDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQI
B. taurus: STLADLLDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQI
G. gallus: STLADLLDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQI
X. laevis: STLAEMLDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQI
D. rerio: STLADLMDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQI
F. rubripes: STLADLLDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQI

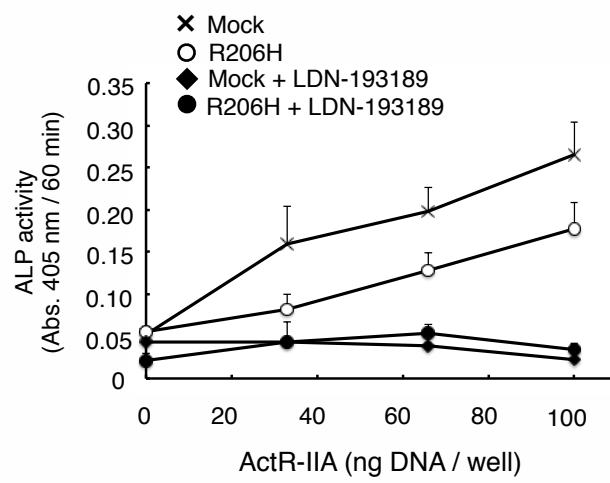
B

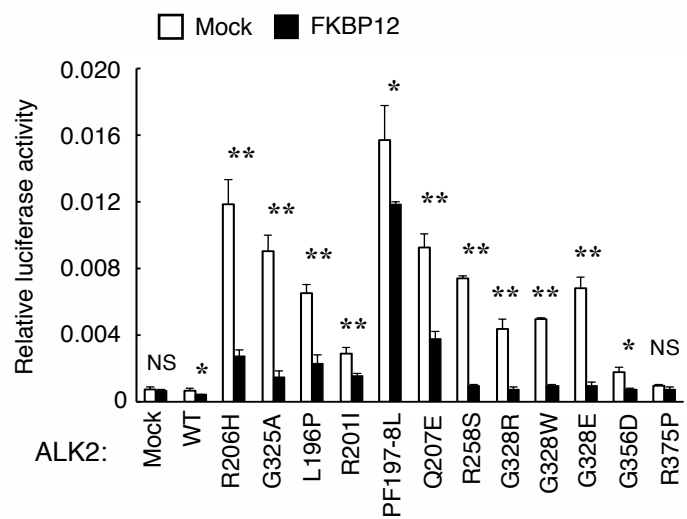
ALK2: 178 STLADLLDHSCTSGSGSGLPFLVQR**T**VARQIT 203 209
ALK1: 172 SMLGDLSDSDCTTGSGSGLPFLVQR**T**VARQVA 197 203
ALK3: 204 ESLKDLIDQSQSSGSGSGLPLLVR**T**IAKQIQ 229 235
ALK6: 174 ESLRDLIEQSQSSGSGSGLPLLVR**T**IAKQIQ 199 205

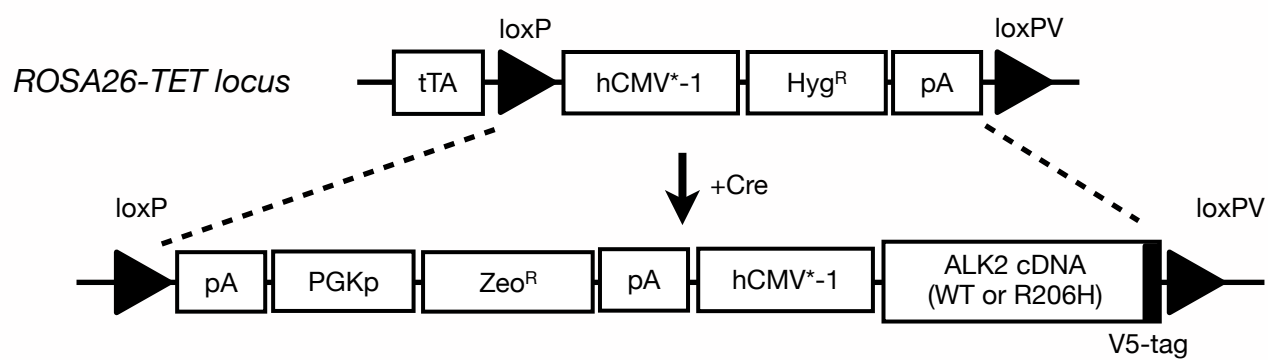


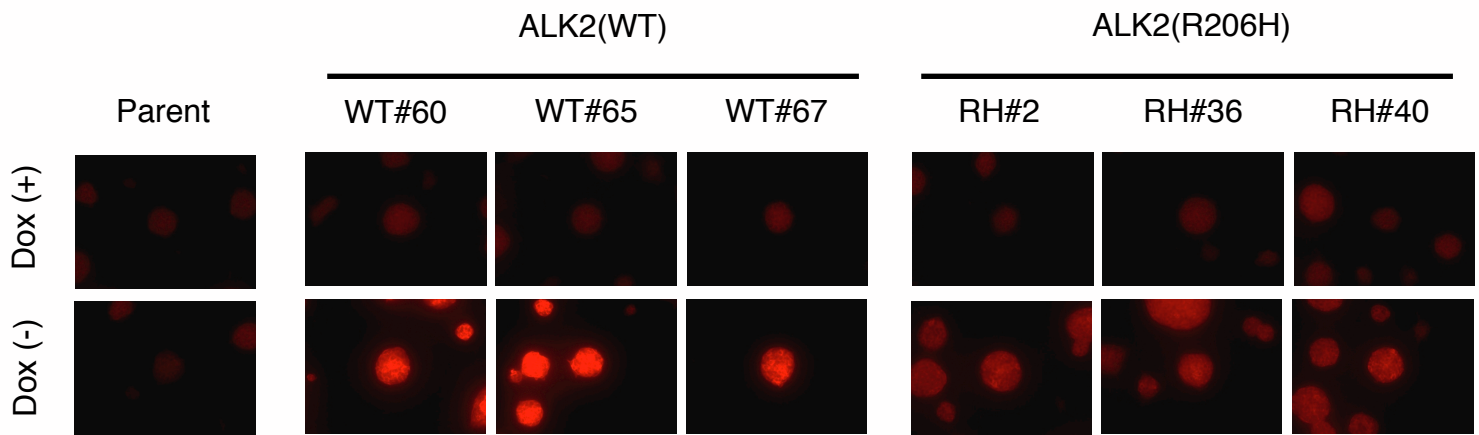
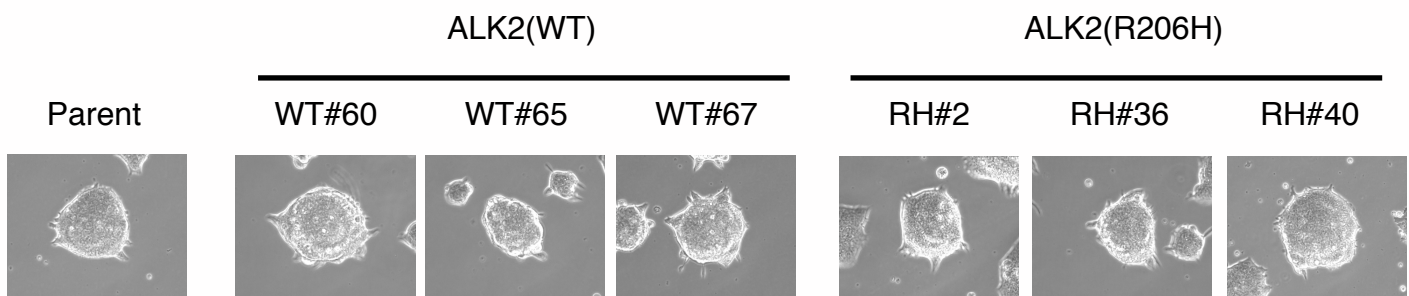


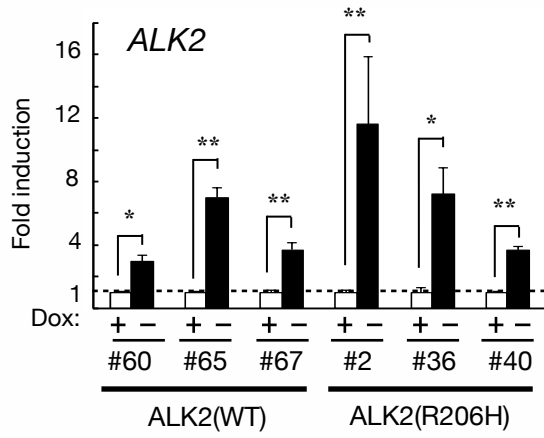
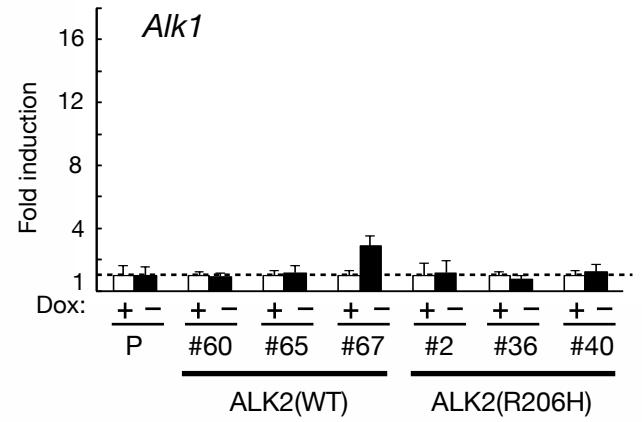
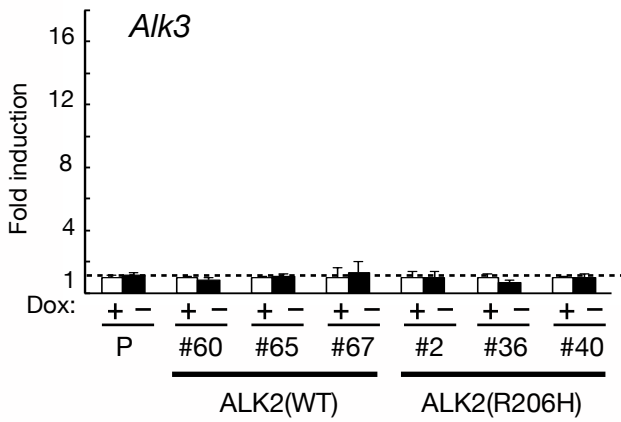
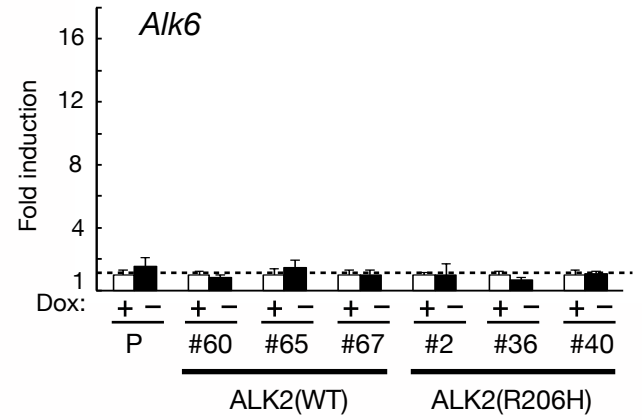
A**B**

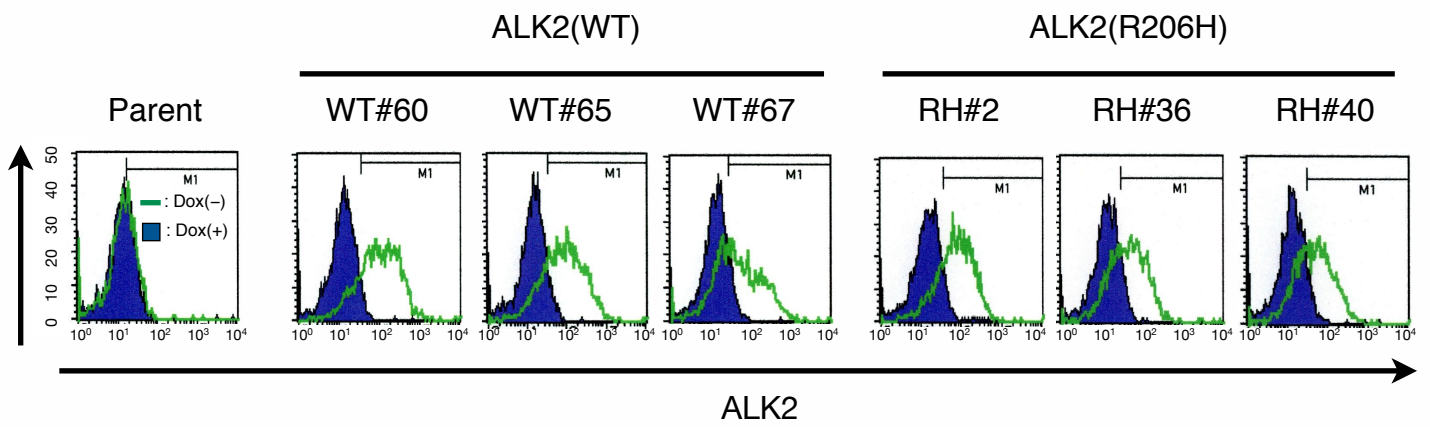


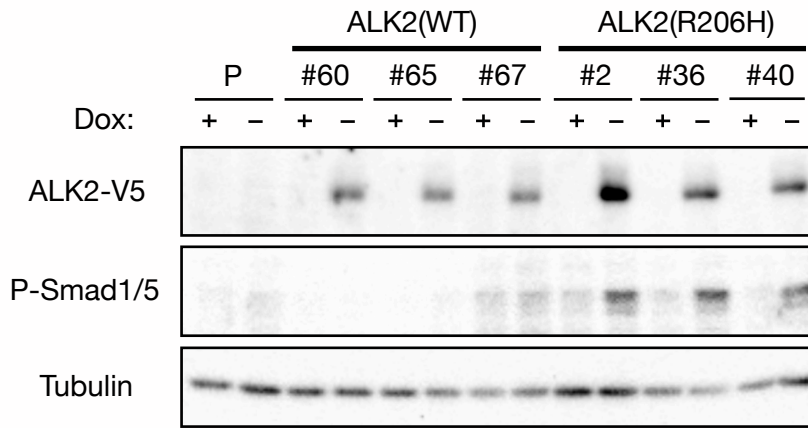
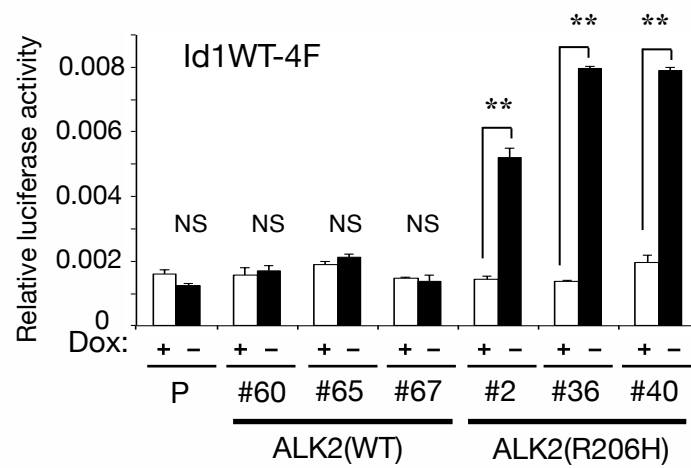


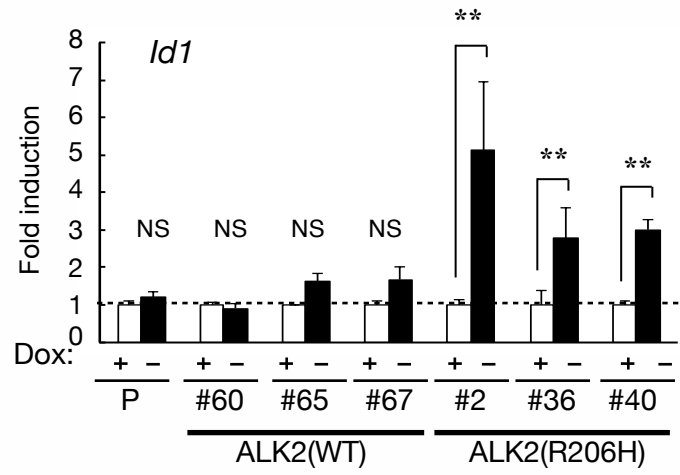
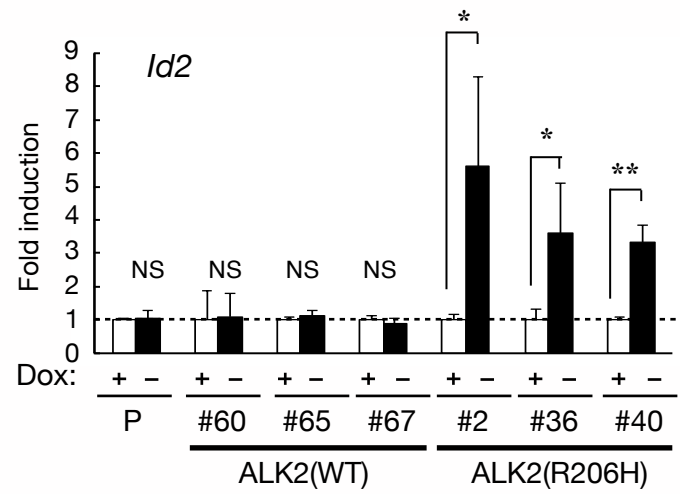


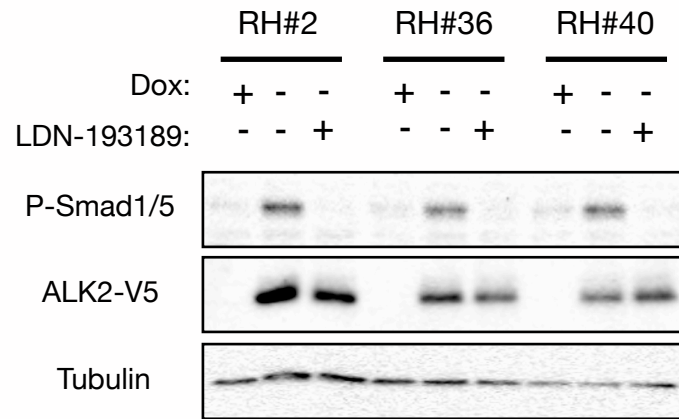
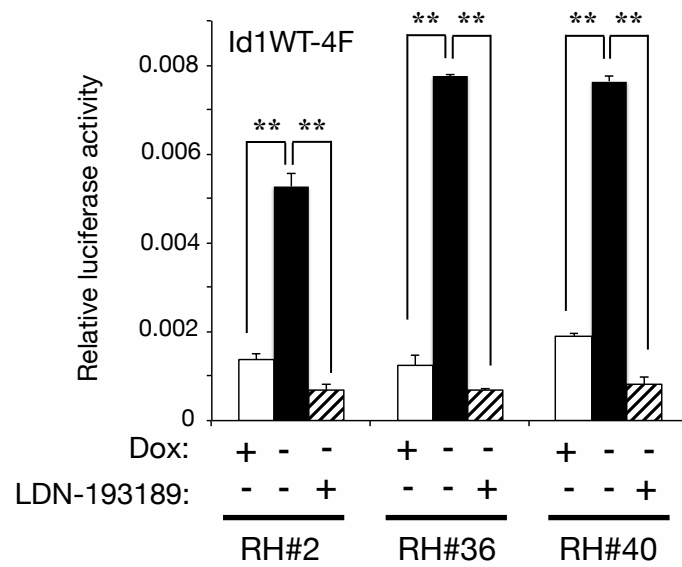
A**B**

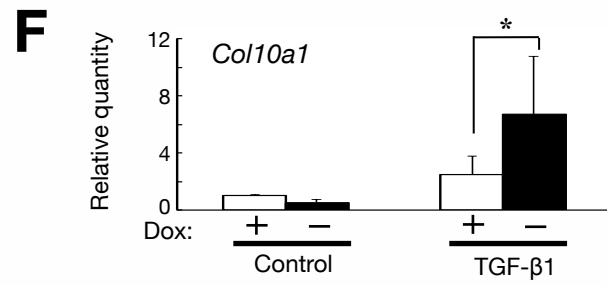
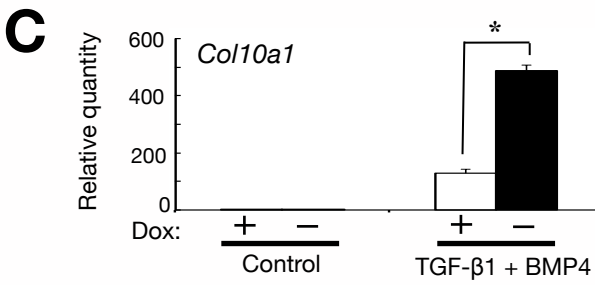
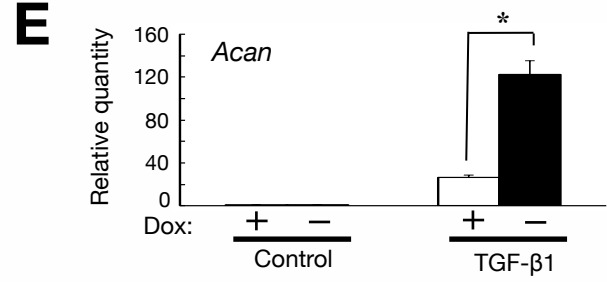
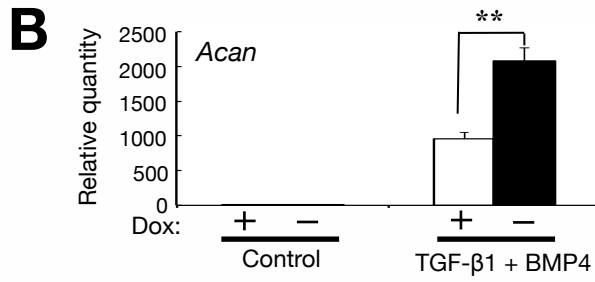
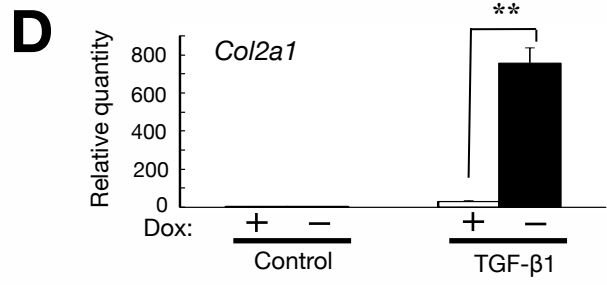
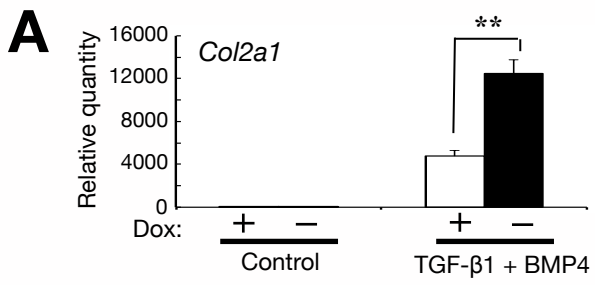
A**B****C****D**



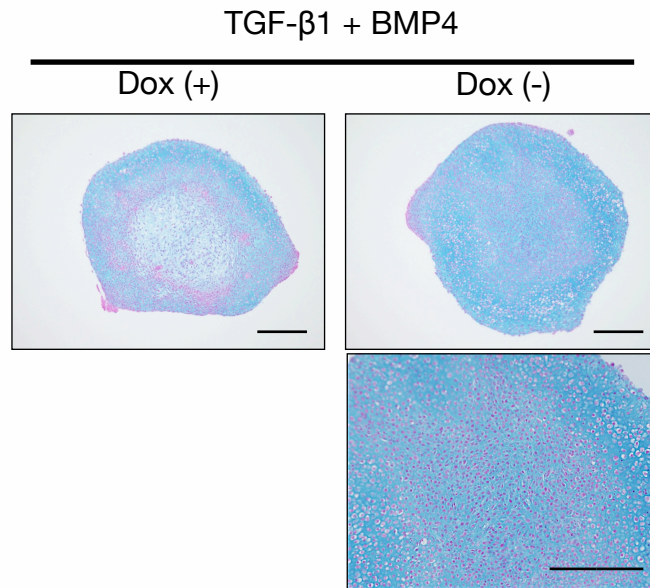
A**B**

A**B**

A**B**



A



B

