

令和元年9月10日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15617

研究課題名(和文) FOP病態初期線維性細胞増殖機構の解明及び治療候補化合物の評価

研究課題名(英文) Drug development of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) focused on constitutive activation of FOP-ACVR1

研究代表者

趙成珠(ZHAO, CHENGZHU)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：50778678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1.希少遺伝性疾患である進行性骨化性線維異形成症(FOP)を抑える新たな候補物質の薬効評価及びメカニズム解明を行なった。その結果、AZD0530やTAK165にはFOPで生じる異所性骨化を抑える効果があることがわかった。さらに、TAK165はmTORシグナル経路を調節する作用があり、直接ではないもののmTORシグナルを阻害していることを明らかにした。複数の薬剤を組み合わせることにより高い効果が得られる場合もあるため、今回の成果は、別の候補物質を提示することで、薬剤開発の可能性を高めるとともに、FOPが起こる分子メカニズムのさらなる解明につながると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FOP病態の進行には長年進行を止める根本的な治療法が存在しない。本研究では先行研究のin vitro病態再現系の解析で得られた治療薬候補化合物の異所性骨形成に対する治療効果をFOPモデルマウスを用いて評価した。さらに、治療効果を示した候補化合物の作用機序の解明を行い、新しい病態メカニズム発見および治療薬の開発に資することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a rare disease characterized by progressive heterotopic ossification (HO) of soft tissues. Most people with FOP carry an activating mutation in the gene ACVR1, which encodes a type I receptor for bone morphogenetic proteins. In this study, we established a phenotypic assay-based high-throughput screening (HTS) system utilizing a chondrogenic ATDC5 cell line that stably expresses FOP-ACVR1. After HTS of 5,000 small-molecule compounds, we identified two hit compounds that are effective at suppressing the enhanced chondrogenesis of FOP patient-derived induced pluripotent stem cells (FOP-iPSCs) and suppressed the heterotopic ossification (HO) of multiple model mice. Furthermore, we revealed that one of the hit compounds is an mTOR signaling modulator that indirectly inhibits mTOR signaling. Our results demonstrate that these hit compounds could contribute to future drug repositioning and the mechanistic analysis of mTOR signaling.

研究分野：分子生物学

キーワード：進行性骨化性線維異形成症 FOP mTOR

1. 研究開始当初の背景

進行性骨化性線維異形成症 (FOP) は骨格筋ないに出現する異所性骨を主徴とする極めて稀な遺伝性疾患で、罹患率は 200 万人に 1 人、本邦での罹患者は約 70 人とされている。また外傷を起因として骨化が進行するため、骨化巣を外科的に取り除くことは禁忌であり、そのため病態の進行過程の解析、特に骨化巣出現前の線維性組織出現時の組織学的解析は、過去誤診のため生検により得られた数少ないサンプルからの限られた情報しか存在しない。申請者の所属研究室では、FOP の原因遺伝子である ACVR1 (骨形成因子 BMP の I 型受容体) の経配偶性点突然変異を導入し、ドキシサイクリン (Dox)-誘導性 hACVR1 (R206H) をトランスジェニックした FOP モデルマウスを作製した。さらに、骨化誘導刺激から約 2 週間という短期間で最初の骨化を示すことを、キメラマウスを用いた予備実験の解析により見出した。このモデルマウスを用いて、FOP 病態進行のうち、特にこれまで明らかにされてこなかった初期の解析が可能になった。

一方、現在 FOP には進行を止める薬が存在しない。NSAIDs、ステロイド、ビスフォスフォネート剤の投与、あるいは骨髄移植が行われたという報告もあるが、いずれも効果は限定的である。申請者の所属研究室ではこれまでに、FOP 患者由来 iPS 細胞 (FOP-iPS) を用いて、独自開発した分化誘導法を適用し、FOP-iPS 細胞から骨軟骨前駆細胞の作製、及び *in vitro* 病態再現に成功した (Hino et al., PNAS, 2015)。上述の *in vitro* 病態再現系を用いた既存薬の探索により、市販薬 (1 化合物)、第 III 相試験 (1 化合物)、第 II 相試験 (1 化合物)、第 I 層試験 (2 化合物) まで進んでいる 5 つの治療薬候補化合物を同定した。

2. 研究の目的

FOP には長年適切なモデルマウスが存在せず、最近アメリカのグループにより発表されたタモキシフェン誘導により全身性に ACVR1 (R206H) を発現するマウスは現在最も適切なモデルと考えられている (Hatsell et al., Sci. Transl. Med. 2015)。これとは別に、申請者の所属研究室では、独自に同様のドキシサイクリン誘導型 hACVR1 (R206H) トランスジェニックマウスを開発しており、骨化刺激に応じて異所性骨が形成されることまでを確認している。このマウスの解析により、これまで明らかにされてもなかった FOP 病態進行の初期過程を解明することが可能である。また、申請者の所属研究室が独自に開発した希少疾患特異的 iPS 細胞 (FOP-iPS) を用いて構築した *in vitro* 病態再現系を活用することによって、異所性骨形成前に患部で起こる線維性細胞の増殖機構を明らかにすることを目指している。

現在 FOP の進行を止める根本的な治療法が存在しない。先行研究では 3 種類の *in vitro* 病態再現系を用いて、スクリーニングから治療薬候補化合物の同定にまで至っている。実際のところ同定された 5 化合物は、市販薬 (1 化合物)、第 III 相試験 (1 化合物)、第 II 相試験 (1 化合物)、第 I 層試験 (2 化合物) までに進んでいる。本申請の解析より、異所性骨形成に対する治療効果の *in vitro*、*in vivo* 薬効評価及び作用機序の解明を目指し、新薬の開発に資することが期待される。

3. 研究の方法

FOP 患者には骨化巣出現前に、熱感と疼痛を伴う腫脹が生じるフレア・アップと呼ばれる症状が出現する。生検のサンプルから、この時期の生体内では、骨格筋の退縮、炎症性細胞の侵入および線維性細胞の増殖が起こると推測される。従って、FOP モデルマウスに、カルディオトキシンによる筋肉破壊などの骨化刺激を人為的に加え、経時的にサンプルを得ることにより、異所性骨化の開始過程の解明が可能となる。具体的には、i. 化学染色によって、異所性骨形成の過程、期間を確認する。ii. 筋細胞死、炎症細胞侵入、及び線維性細胞増殖マーカー免疫染色を行い、異所性骨できる前の病態生理過程を解明する。iii. FOP-iPS や、変異型 ACVR1 遺伝子を修復した対照 iPS 細胞 (resFOP-iPS) から誘導された間葉系間質細胞を用いて、増殖速度を比較し、グローバルな遺伝子発現解析を行う。その破綻による各種シグナル伝達経路との関わりを検討し、異所性骨形成初期の線維性細胞増殖のメカニズムを解明する。iv. FOP モデルマウスを用いて、*in vivo* で線維性細胞増殖シグナルが異所性骨の形成に寄与しているかを検証する。

また、先行研究の *in vitro* 病態再現系の解析から得られた治療薬候補化合物の異所性骨形成阻害能を評価するため、FOP モデルマウスに 5 つの治療薬候補化合物を投与し、異所性骨形成の阻害効果をマウス体内で検証する。具体的には、i. 単純 X 線像および μ CT による画像解析、ii. 切片作製後に化学染色や免疫抗体染色などの手法を用い、骨分化の程度を比較する。iii. 治療効果のある候補化合物に対して、*in vitro* 病態再現系における Luciferase アッセイ、マイクロアレイなどの手法を用いて、作用機序を探る。iv. 副作用の少ない、より良い治療薬の開発のために、5 つの候補化合物の低濃度添加、および相乗効果のある薬剤を *in vitro* 病態再現系でスクリーニングにより得て、*in vivo* で FOP モデルマウスに対する薬剤併用の効果を検討する。

4. 研究成果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

本研究では、Dox-誘導性 hACVR1 (R206H) トランスジェニックマウスの生殖細胞系列への伝達の確認、ライン化、ホモマウス化およびコロニー拡大を行った上に、ホモマウスにおいて異所性骨の形成の誘発条件を検討するため、Dox 及び刺激薬物の投与量、投与時間などの誘導条件を単純 X 線および μ CT 分析結果によって最適化した。無刺激 (Dox 誘導のみ)、アクチビン A (FOP 細胞で BMP シグナルを異常に伝える)、およびカルディオトキシン (筋損傷を誘発する) 刺激による筋肉破壊を加えることにより、病態進行初期におけるフレア・アップ、および異所性骨形成の発生および時間経過を確認できた。

また、本研究は希少遺伝性疾患である進行性骨化性線維異形成症 (FOP) を抑える新たな候補物質の薬効評価及びメカニズム解明を、FOP の患者さんの細胞から作製した FOP-iPS 細胞を用いた *in vitro* 実験系、および 3 種類のマウスモデルを用いた *in vivo* 実験系で行った。その結果、Rapamycin (雑誌論文 3)、AZD0530 や TAK165 には FOP で生じる異所性骨化を抑える効果があることがわかった。また、AZD0530 は BMP 及び TGF- β シグナル経路を調節していることを明らかにした。さらに、TAK 165 は mTOR シグナル経路を調節する作用があり、直接ではないものの mTOR シグナルを阻害していることを明らかにした (雑誌論文 1、学会発表 1)。2017 年 8 月からは Rapamycin を使った治験がスタートした。AZD0530 や TAK165 は医薬品として市販されているものではないため、Rapamycin のように、すぐに臨床で効果を確認する段階に進められるわけではないが、複数の候補物質を提示することで、薬剤開発の可能性を高めるとともに、FOP が起こる分子メカニズムのさらなる解明につながると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Hino K†, Zhao C†, Horigome K, Nishio M, Okanishi Y, Nagata S, Komura S, Yamada Y, Toguchida J, Ohta A, Ikeya M*. An mTOR signaling modulator suppressed heterotopic ossification of fibrodysplasia ossificans progressiva. *Stem Cell Reports*. 11(5): 1106-1119, 2018 (†, Co-first author)
2. Zhao C, Ikeya M. Generation and applications of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int*. 2018:9601623; Jul, 2018.
3. Hino K, Horigome K, Nishio M, Komura S, Nagata S, Zhao C, Jin Y, Kawakami K, Yamada Y, Ohta A, Toguchida J, Ikeya M. Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Clin Invest*. Vol. 127, No. 9, pp. 3339-3352. Sep, 2017.

〔学会発表〕(計 1 件)

Drug development of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) focused on constitutive activation of FOP-ACVR1 ; 第 92 回日本薬理学会年会 ; 2019 年

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

FOP における骨化を抑える方法の発見 ~FOP の遺書整骨形成のシグナル伝達メカニズムの解明
~ <https://www.ci.ra.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/170801-091500.html>

FOP における骨化を抑える新たな候補物質の同定 ~治療法探索へ新しい戦略への可能性を拓く
~ <http://www.ci.ra.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/181102-000000.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。