

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10439

研究課題名(和文)メクロジンによるFGFR3シグナル抑制効果の動物モデルにおける検討

研究課題名(英文)Animal study for evaluating the effect of meclozine on FGFR3 signaling

研究代表者

松下 雅樹(Matsushita, Masaki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：60721115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨無形成症(achondroplasia：ACH)は線維芽細胞増殖因子受容体3(fibroblast growth factor receptor 3：FGFR3)の機能獲得型変異により、低身長に加えて脊柱管狭窄症や大後頭孔狭窄の合併症が生じる。我々は乗り物酔い防止薬であるメクロジンがFGFR3シグナルを抑制することをすでに見出した。本研究では、メクロジン1または2 mg/kg/dayの連日投与は、ACHマウスの骨伸長と骨質を改善することを示した。また、乗り物酔い止め薬としての効能を発揮するメクロジン25 mg/bodyの連日投与によりACHの低身長を改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Achondroplasia (ACH) is characterized by short stature associated with severe complications such as stenoses of foramen magnum and spinal canal due to the gain-of-function mutation in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3). We have already found that meclozine, an anti-histamine drug that has long been used for motion sickness, inhibited FGFR3 signaling. In the current study, the 1 or 2 mg/kg/day of meclozine increased the bone length of 7-day-old Ach mice for 10 days, but did not rescue the foramen magnum stenosis. Meclozine administration would be commenced immediately after birth since the synchondroses around the foramen magnum was closed at the age of 4.5 days. On the other hand, the 1 or 2 mg/kg/day of meclozine increased the bone volume and bone mineral density in addition to the bone length in growing Ach mice.

研究分野：整形外科

キーワード：軟骨無形成症 FGFR3 低身長 メクロジン 骨密度 骨質 大後頭孔

1. 研究開始当初の背景

軟骨無形成症(achondroplasia : ACH)は骨の成長抑制因子である線維芽細胞増殖因子受容体 3 (fibroblast growth factor receptor 3 : FGFR3)の機能獲得型変異による過剰な FGFR3 の活性化が原因である。低身長に加えて頭蓋底や脊椎の骨伸長も障害されることにより脊柱管狭窄症・大後頭孔狭窄などの重篤な合併症も生じる。また、ACH と同様に FGFR3 の恒常的活性化変異により発症するタナトホリック骨異形成症(Thanatophoric dysplasia : TD)は四肢短縮のみならず肋骨の短縮に起因する胸郭形成による呼吸障害のため、多くは新生時期および乳児期に死亡する重度な疾患であり、死産の原因として最も多い(引用文献 1)。近年、新生児医療の発達により TD の生存例が報告されているが、人工呼吸管理が必要で四肢の骨伸長はほとんどみられない。

ACH の低身長に対し成長ホルモン投与と骨延長が行われているが、FGFR3 を抑える根本的治療法はない。これまでに FGFR3 シグナルを抑制するインヒビターが複数同定され ACH モデル動物において骨伸長促進効果が示されてきたが、大後頭孔狭窄や脊柱管狭窄、および TD において有効性は示されていない(引用文献 2)。また、いずれの FGFR3 インヒビターも臨床応用には至っていない。我々は既存薬のスクリーニングにより、一般用医薬品(OTC 医薬品)の乗り物酔い防止薬で抗ヒスタミン薬であるメクロジンが異常に活性化した FGFR3 シグナルを抑制し、成長期の ACH モデルマウスの骨伸長を促進することをすでに見出した(引用文献 3)。

2. 研究の目的

本研究では、ACH に合併する大後頭孔狭窄や脊柱管狭窄および ACH よりも重篤な表現系を呈する TD へのメクロジンの適応拡大の可能性を検討することである。また、骨伸長効果を発揮するメクロジンの至適投与量や投与タイミングを評価し臨床応用への可能性を検討する。

3. 研究の方法

まず Ach マウスにおける大後頭孔の発育に関して、生後 4.5 日齢マウスの大後頭孔周辺の頭蓋底軟骨結合の骨性架橋の形成の有無を評価した。また、生後 17 日齢のマウスを用いてマイクロ CT により大後頭孔の面積を測定した。以上を野生型マウスと Ach マウスで比較検討を行った。

次に Ach マウス母体にメクロジン混餌(餌 1kg 中、メクロジン 0.4g を混ぜた)を投与し、Ach マウスに合併する大後頭孔狭窄をレスキューできるかどうか検討するために、頭蓋底軟骨結合の骨性架橋の有無を評価した。骨性架橋なしを 0 点、架橋はないが骨性組織が認められる場合を 1 点、不完全骨性架橋を 2 点、完全骨性架橋を 3 点とし、蝶後頭軟骨結合および 2 つの前後頭内軟骨結合、計 3 箇所を評価し、合計点を比較した。

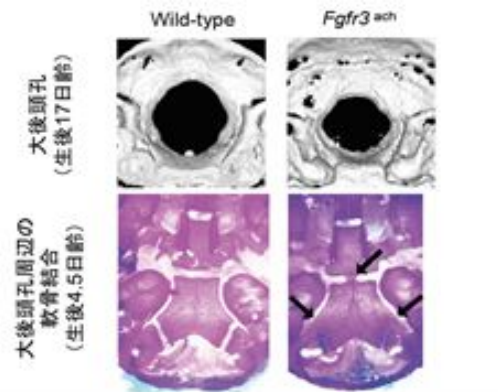
さらに、メクロジンの胎盤移行性と母乳移行性を検討するために、野生型マウス母体にメクロジン混餌を 72 時間投与した後に、仔の組織中メクロジン濃度を測定した。

メクロジンの臨床使用濃度を決定するために、野生型マウスにメクロジン 2 mg/kg、6 mg/kg、または 20 mg/kg を単回投与し、投与後 24 時間までの血漿中濃度を測定し、1 日 2 回 7 日間連続投与したときのメクロジン血漿中濃度の変化をシミュレーションした。

次に、7 日齢の Ach マウスにメクロジン 1、2、または 20 mg/kg/day を 10 日間 1 日 2 回連続投与し、投与期間中マウスの全長を系時的に測定した。また、10 日間の投与終了後にマイクロ CT 撮影し、骨の長さ(頭蓋骨、上腕骨、橈骨、尺骨、大腿骨、脛骨、脊椎骨)、骨の体積(全身、頭蓋骨、上肢、下肢、脊椎)および大後頭孔の面積を計測した。さらに、大腿骨遠位骨幹端部における、Bone mineral density (BMD)、Bone volume/tissue volume (BV/TV)、Trabecular thickness (Tb.Th)、Trabecular number (Tb.N)、Trabecular separation (Tb.Sp) を計測した。

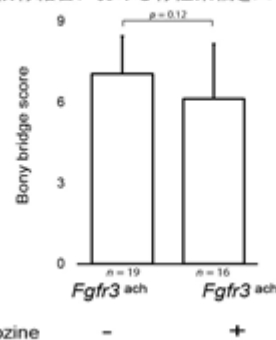
4. 研究成果

生後 17 日齢の Ach マウスの大後頭孔は野生型と比較して狭窄していることを確認した。また、生後 4.5 日齢野生型マウスにおいて大後頭孔周辺の後頭骨は軟骨性に結合しているが、Ach マウスにおいては骨性架橋がすでに認められた。



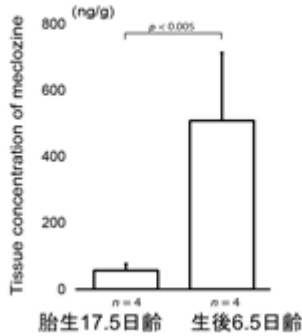
次に、Ach マウス母体にメクロジンを投与すると大後頭孔周囲の軟骨結合における骨性架橋のスコアは低下傾向であったが、有意差は認められなかった。

メクロジン母体投与後におけるBony bridge score (軟骨結合における骨性架橋をスコア化)



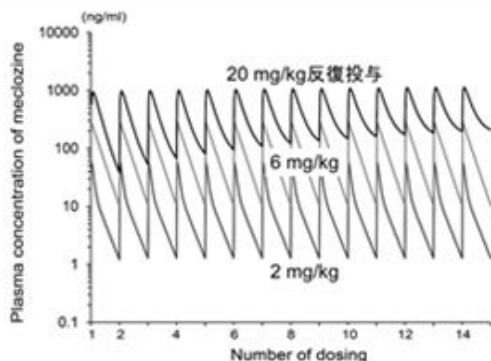
またマウス母体にメクロジン投与後の胎仔および産仔のメクロジン濃度を測定した。胎生 17.5 日齢マウスのメクロジン組織中濃度は生後 6.5 日齢マウスの組織中濃度に比較して著しく低かったことから、メクロジンの胎盤移行性は低いことが推測された。メクロジンは大後頭孔周辺の軟骨結合の早期閉鎖を抑制する傾向は示唆されたが、その胎盤移行性が低いことから本実験系においては有意差が認められなかった可能性がある。

メクロジン母体投与後における胎仔のメクロジンの組織中濃度

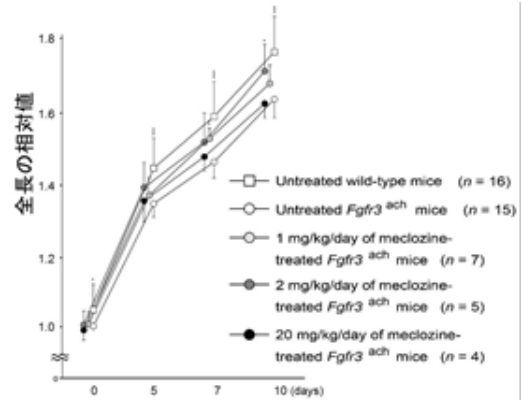


Ach マウスに合併した大後頭孔狭窄をレスキューするためには、頭蓋底軟骨結合の早期閉鎖を抑制する必要がある。生後 4.5 日齢の Ach マウスにおいて軟骨結合に骨性架橋がすでに認められたため、大後頭孔狭窄をレスキューするためには生後早期または胎生期よりメクロジンを投与開始し頭蓋底軟骨結合の早期閉鎖を抑制する必要がある。今回の結果から正確なメクロジンの胎盤移行率を算出することはできないが、メクロジンの胎盤移行は母乳移行に比較して著しく低いことが分かった。よって、今回のメクロジン投与量においては母体投与により Ach の合併症や TD の表現系をレスキューすることは困難であることが予測された。

これまでの混餌投与によるデータでは正確な投与量の決定は困難であり、各種濃度のメクロジンを強制経口投与することにより有効投与量を検討した。マウスにメクロジン 2 mg/kg を単回投与した時の薬物動態はヒトにメクロジン 25 mg/body を単回投与した時の薬物動態に類似していた。また、連続投与における血中濃度変化のシミュレーションを行うと、20 mg/kg では蓄積性が認められたが 2 mg/kg では認められなかった。

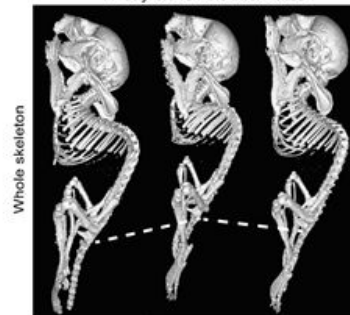


次に Ach マウスに連日強制経口投与を行なった。メクロジン 1 または 2 mg/kg/day を投与すると Ach マウスの全長が有意に増加した。一方、20 mg/kg/day の連日投与では効果が認められなかった。



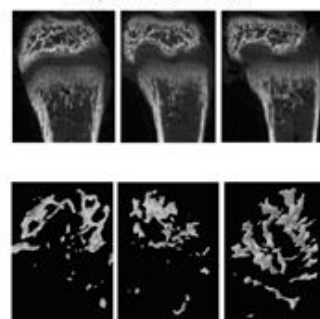
次にマイクロ CT により各骨長、骨量、および大後頭孔の面積を計測した。メクロジン 1 または 2 mg/kg/day の投与により上腕骨、橈骨、尺骨、大腿骨、脛骨、および脊椎骨 (L1-L5) の骨長は増加し、頭蓋骨、上肢骨、下肢骨、脊椎骨 (L1-L5) の骨量は有意に増加した。一方、メクロジン 20 mg/kg/day には骨伸長および骨量促進効果は認められなかった。

Wild-type Fgfr3^{ach} Fgfr3^{ach}
Meclozine - - 2 mg/kg/day
17-day-old female littermates



最後にマイクロ CT および組織学的評価により大腿骨遠位骨幹端部の骨質を検討した。メクロジン 1 または 2 mg/kg/day の投与により BMD、BV/TV、Tb.Th、Tb.N、Tb.Sp の改善を認めた。組織学的に骨梁を定量すると、メクロジン 1 または 2 mg/kg/day の投与により有意に骨梁は増加した。

Wild-type Fgfr3^{ach} Fgfr3^{ach}
Meclozine - - 2 mg/kg/day
17-day-old female littermates



メクロジン1または2 mg/kg/dayの投与は骨伸長だけでなく骨質を改善することが示唆された。一方、メクロジン 20 mg/kg/dayは、薬物動態シミュレーションにより蓄積性が認められ、骨伸長改善効果が得られなかった原因として毒性が懸念される。メクロジン 2 mg/kgの薬物動態はヒトにメクロジン 25 mg/bodyを単回投与した時の薬物動態に類似していたことから、乗り物酔い止め薬としての効能を発揮するメクロジン 25 mg/bodyの連日投与により軟骨無形成症における低身長を改善する可能性がある。

引用文献

1. Martínez-Frías, et al. Review of the recently defined molecular mechanisms underlying thanatophoric dysplasia and their potential therapeutic implications for achondroplasia. *Am J Med Genet A*. 152A:245-255, 2010
 2. Lorget, et al. Evaluation of the therapeutic potential of a CNP analog in a Fgfr3 mouse model recapitulating achondroplasia. *Am J Hum Genet* 91:1108-1114, 2012
 3. Matsushita, et al. Meclozine facilitates proliferation and differentiation of chondrocytes by attenuating abnormally activated FGFR3 signaling in achondroplasia. *PLoS One* 8:e81569, 2013
5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
〔雑誌論文〕(計12件全て査読あり)
- 1 Okura T, Matsushita M, Mishima K, Esaki R, Seki T, Ishiguro N, Kitoh H. Activated FGFR3 prevents subchondral bone sclerosis during the development of osteoarthritis in transgenic mice with achondroplasia. *J Orthop Res*. 2018;36:300-308. doi: 10.1002/jor.23608.
 - 2 Hasegawa S, Kitoh H, Matsushita M, Mishima K, Kadono I, Sugiura H, Kitamura A, Ishiguro N. Chronic lateral epiphyseal separation of the proximal tibia causes late-onset tibia vara. *J Pediatr Orthop B*. 2018;27:31-34. doi: 10.1097/BPB.0000000000000430.
 - 3 Osawa Y, Matsushita M, Hasegawa S, Esaki R, Fujio M, Ohkawara B, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Activated FGFR3 promotes bone formation via accelerating endochondral ossification in mouse model of distraction osteogenesis. *Bone*. 2017;105:42-49. doi: 10.1016/j.
 - 4 Matsushita M, Esaki R, Mishima K, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Clinical

- dosage of meclozine promotes longitudinal bone growth, bone volume, and trabecular bone quality in transgenic mice with achondroplasia. *Sci Rep*. 2017;7:7371. doi: 10.1038/s41598-017-07044-8.
- 5 Matsushita M, Mishima K, Iwata K, Hattori T, Ishiguro N, Kitoh H. Percutaneous pinning after prolonged skeletal traction with the hip in a flexed position for unstable slipped capital femoral epiphysis: A case series of 11 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96:e6662. doi: 10.1097/MD.0000000000006662.
 - 6 Matsushita M, Mishima K, Esaki R, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Maternal administration of meclozine for the treatment of foramen magnum stenosis in transgenic mice with achondroplasia. *J Neurosurg Pediatr*. 2017;19:91-95. doi: 10.3171/2016.7.PEDS16199.
 - 7 Kohno Y, Nakashima Y, Kitano T, Irie T, Kita A, Nakamura T, Endo H, Fujii Y, Kuroda T, Mitani S, Kitoh H, Matsushita M, Hattori T, Iwata K, Iwamoto Y. Is the timing of surgery associated with avascular necrosis after unstable slipped capital femoral epiphysis? A multicenter study. *J Orthop Sci*. 2017 Jan;22(1):112-115. doi: 10.1016/j.jos.2016.08.012.
 - 8 Mishima K, Kitoh H, Iwata K, Matsushita M, Nishida Y, Hattori T, Ishiguro N. Clinical Results and Complications of Lower Limb Lengthening for Fibular Hemimelia: A Report of Eight Cases. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e3787. doi: 10.1097/MD.0000000000003787.
 - 9 Hasegawa S, Kitoh H, Ohkawara B, Mishima K, Matsushita M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Tranilast stimulates endochondral ossification by upregulating SOX9 and RUNX2 promoters. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470:356-361. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.044.
 - 10 Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Kadono I, Sugiura H, Hasegawa S, Nishida Y, Ishiguro N. Low bone mineral density in achondroplasia and hypochondroplasia. *Pediatr Int*. 2016;58:705-8. doi: 10.1111/ped.12890.
 - 11 Shibata A, Machida J, Yamaguchi S, Kimura M, Tatematsu T, Miyachi H, Matsushita M, Kitoh H, Ishiguro N,

Nakayama A, Higashi Y, Shimozato K, Tokita Y. Characterisation of novel RUNX2 mutation with alanine tract expansion from Japanese cleidocranial dysplasia patient. *Mutagenesis*. 2016;31:61-7. doi: 10.1093/mutage/gev057.

12. Mishima K, Kitoh H, Kadono I, Matsushita M, Sugiura H, Hasegawa S, Kitamura A, Nishida Y, Ishiguro N. Prediction of Clinically Significant Leg-Length Discrepancy in Congenital Disorders. *Orthopedics*. 2015;38:e919-24. doi: 10.3928/01477447-20151002-60.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Masaki Matsushita, Yusuke Ohsawa, Kenichi Mishima, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno, Hiroshi Kitoh. Bone formation was promoted in mouse model of distraction osteogenesis with gain-of-function mutation in FGFR3. *Fibroblast Growth Factors in Development and Disease Gordon Research Conference 2018*.3.25-30 (Ventura, CA)
2. 松下 雅樹、鬼頭 浩史、三島 健一、長田 侃、金子 浩史、岩田 浩志、服部 義、石黒 直樹. MAC 創外固定器による下腿変形矯正 第 28 回日本小児整形外科学会学術集会 2017.12.7-8 (東京)
3. 松下 雅樹、鬼頭 浩史、三島 健一、北村 暁子、長田 侃、西田 佳弘、石黒 直樹、大野 欽司 Meclozine 投与による軟骨無形成症モデルマウスにおける骨伸張と骨質の検討 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017.10.26-27 (那覇)
4. Masaki Matsushita, Kenichi Mishima, Akiko Kitamura, Tadashi Nagata, Tadashi Hattori, Hiroshi Kaneko, Naoki Ishiguro, Hiroshi Kitoh. Treatment of the lower limb deformities by a multi-axial correction (MAC) system. The 61st Korean Orthopaedic Association Annual Meeting 2017.10.19-21 (Seoul, Korea)
5. 松下 雅樹、鬼頭 浩史、三島 健一、北村 暁子、長田 侃、西田 佳弘、石黒 直樹、大野 欽司 Meclozine 投与による軟骨無形成症モデルマウスにおける骨伸張と骨質の検討 第 35 回日本骨代謝学会学術集会 2017.7.27-29 (福岡)
6. Masaki Matsushita, Kenichi Mishima, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno, Hiroshi Kitoh. Clinically Feasible Dose of

Meclozine Improves Bone Growth, Bone Volume, and Bone Quality in Mouse Model with Achondroplasia. The 27th Korean-Japanese Combined Orthopaedic Symposium 2017.5.25-26 (Incheon, Korea)

7. Masaki Matsushita, Hiroshi Kitoh, Kenichi Mishima, Satoshi Yamashita, Hiroshi Sugiura, Akiko Kitamura, Naoki Ishiguro. Long term health-related quality of life in achondroplasia. Annual meeting combined European Paediatric Orthopaedic Society (EPOS)/ Paediatric Orthopaedic Society of North America (POSNA) 2017.5.3-6 (Barcelona)
8. Masaki Matsushita, Hiroshi Kitoh, Kenichi Mishima, Hiroshi Sugiura, Akiko Kitamura, Naoki Ishiguro. Clinical feasibility of meclozine for improvement of short stature in achondroplasia. Annual meeting combined European Paediatric Orthopaedic Society (EPOS)/ Paediatric Orthopaedic Society of North America (POSNA) 2017.5.3-6 (Barcelona)
9. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Sugiura H, Hasegawa S, Kitamura A, Ishiguro N, Ohno K. Clinically feasible dose of meclozine promotes bone growth in mouse model with achondroplasia. Annual meeting of Orthopaedic Research Society 2017.3.19-22 (San Diego)
10. 松下雅樹、鬼頭浩史、三島健一、杉浦洋、北村暁子、西田佳弘、石黒直樹、大野欽司. 軟骨無形成症の根本的治療法を目指した meclozine の有効投与量の検討. 第 30 回日本軟骨代謝学会 2017.3.3-4 (京都)
11. 松下雅樹、鬼頭浩史、三島健一、杉浦洋、長谷川幸、北村暁子、石黒直樹. 軟骨無形成症に対する根本的治療の開発. 第 27 回日本小児整形外科学会 2016.12.1-2 (仙台) シンポジウム
12. 松下雅樹、鬼頭浩史、三島健一、杉浦洋、西田佳弘、石黒直樹、大野欽司. Meclozine は乗り物酔い止め薬としての効能を発揮する用量の連続投与により軟骨無形成症における骨伸長を促進しうる 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016.10.13-14 (福岡)
13. Masaki Matsushita, Hiroshi Kitoh, Kenichi Mishima, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno. Clinical feasibility of oral administration of meclozine for the treatment of short stature in achondroplasia. Annual meeting of the

- American Society for Bone and Mineral Research. 2016.9.16-19 (Atlanta)
14. Masaki Matsushita, Hiroshi Kitoh, Kenichi Mishima, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno. Clinically attainable concentration of meclozine has a potent effect on promoting bone growth in achondroplasia. The annual scientific meeting of the endocrine society of Australia, the Society for Reproductive Biology and the Australia and New Zealand Bone and Mineral Society. 2016.8.21-24 (Gold Coast)
 15. 松下雅樹、鬼頭浩史、三島健一、杉浦洋、西田佳弘、石黒直樹、大野欽司. Meclozine による軟骨無形成症の根本的治療の可能性と限界. 第34回日本骨代謝学会・第3回アジア太平洋骨代謝学会. 2016.7.20-23 (大阪)
 16. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Nishida Y, Ishiguro N, Ohno K. Clinically attainable concentration of meclozine promotes bone growth in transgenic mice with achondroplasia. Gordon Research Conference 2016.6.5-10 (Hong Kong)
 17. Masaki Matsushita, Hiroshi Kitoh, Kenichi Mishima, Hiroshi Sugiura, Sachi Hasegawa, Akiko Kitamura, Naoki Ishiguro, Kinji Ohno. Radical therapeutic strategy for foramen magnum stenosis and spinal canal stenosis in achondroplasia. Annual meeting of Orthopaedic Research Society 2016.3.5-8 (Orland)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松下 雅樹 (MATSUSHITA, Masaki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：6 0 7 2 1 1 1 5

(2)研究分担者

鬼頭 浩史 (KITOH, Hiroshi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：4 0 2 9 1 1 7 4

三島 健一 (MISHIMA, Kenichi)
名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教
研究者番号：4 0 6 4 6 5 1 9

杉浦 洋 (SUGIURA, Hiroshi)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：4 0 7 5 0 4 7 7