

平成30年5月23日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15548

研究課題名(和文) ドラッグリポジショニング戦略による進行性骨化性線維異形成症治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic drugs for fibrodysplasia ossificans progressiva by drug repositioning strategies

研究代表者

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：40291174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：進行性骨化性線維異形成症(FOP)は骨形成タンパクの受容体であるALK2の活性型変異により発症し、全身の軟部組織に進行性の異所性骨化をきたす難病である。我々はC2C12細胞に変異型ALK2ベクター、レニラ・ルシフェラーゼベクターおよびId1プロモータールシフェラーゼベクターを遺伝子導入したスクリーニング系を確立した。この系を用いて既存薬のドラッグ・スクリーニングを実施し、アゼプチン(抗ヒスタミン薬)、ローコール(高脂血症薬)、トリミプラミン(抗うつ薬)の3薬剤でルシフェラーゼ活性の低下および標的遺伝子(アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンなど)発現の低下を確認した。

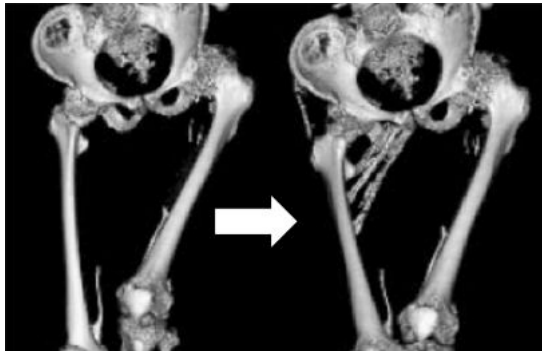
研究成果の概要(英文)：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a severely disabling heritable disorder of connective tissue characterized by progressive heterotopic ossification in various extraskeletal sites. FOP is caused by a gain-of-function mutation in ALK2, which causes up regulation of a transcriptional factor, Id1. We screened FDA-approval drugs for suppression of the Id1 promoter activated by the mutant ALK2 in C2C12 myogenic cells. We found that azelastine HCl (anti-histamine), Fluvastatin sodium salt (ant-hyperlipidemia), and Trimipramine maleate salt (anti-depressant) suppressed the Id1 promoter activity in a dose-dependent manner. These drugs also downregulated the expressions of the Id1-target osteoblastic genes such as alkaline phosphatase and osteocalcin.

研究分野：整形外科

キーワード：進行性骨化性線維異形成症 ドラッグ・リポジショニング 異所性骨化 Id1 ALK2

### 1. 研究開始当初の背景

進行性骨化性線維異形成症 (fibrodysplasia ossificans progressiva : FOP) は骨形成タンパク (bone morphogenetic protein : BMP) の受容体である ALK2 の活性型変異により発症し、全身の軟部組織に進行性の異所性骨化をきたす難病である。四肢における異所性骨化の進行により関節の不動化が生じて ADL が著しく障害されるとともに、脊柱や肋骨における異所性骨化により脊柱・胸郭変形が進行すると呼吸不全のため死亡する (下図)。



異所性骨化は外傷や手術侵襲などで急激に増悪するため、外科的治療の適応はなく、むしろ禁忌とされている。現在、進行性の骨化を抑制する有効な内科的治療法はない。ALK2 の blocker である dorsomorphin および類似の低分子化合物 (LDN-193189) や核内レチノイン酸受容体 アゴニストが FOP における BMP シグナルを抑制し、動物実験レベルでは異所性骨化を抑制するという報告がなされたが、これら化合物の毒性プロファイルはわかっていない。我々は変異型 ALK2 強制発現ベクターおよび BMP シグナルの標的遺伝子である Id1 プロモーターのレポーターベクターをマウス筋芽細胞株 C2C12 に導入して、ルシフェラーゼ活性にて Id1 プロモーター活性を低下させる薬剤を検索するスクリーニング系を確立した

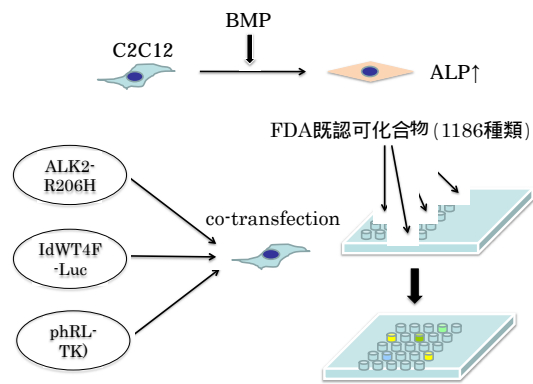
### 2. 研究の目的

ドラッグ・リポジショニング戦略に基づいた既存薬の網羅的スクリーニングにより、Id1 プロモーター活性を抑制して、FOP の異所性骨化を抑制する可能性のある薬剤を同定することを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ALK-R206H、IdWT4F-Luc による薬効スクリーニング法の実施

C2C12 に ALK-R206H、IdWT4F-Luc、phRL-TK を transient transfection し、24 時間後に 1186 種類の FDA 認可化合物を 24 時間添加して、Dual-Luciferase Reporter Assay により一次スクリーニングを行う (右図)。カットオフ値を設定して、上位 50-70 種類の化合物を選択して二次スクリーニン



グへ移行する。二次スクリーニングの結果、および Id1 プロモーター活性を抑制した薬剤の毒性や長期投与可能かどうかなどを総合的に判断し、数種類の化合物を選択して三次スクリーニングにより薬剤濃度依存性を検討して候補薬を決定する。

#### (2) 候補薬による Id1 および各種骨形成マーカー発現の検討

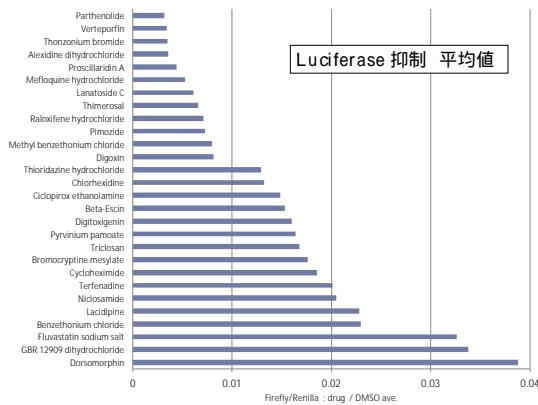
Id1 mRNA の発現を RT-PCR で、Id1 タンパクの発現を Western blotting 法にて評価し、候補薬による Id1 活性抑制効果における濃度依存性を検討する。同様に、Id1 の標的遺伝子である各種骨形成マーカー (アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンなど) の mRNA およびタンパクの発現を評価する。また、BMP シグナルで活性化する細胞内 Smad1/5/8 のリン酸化抑制作用についても検討する。これら in vitro における骨芽細胞分化抑制能を総合的に判断して有力な候補薬を絞る。

#### (3) FOP 動物モデルの確立と in vivo における骨形成抑制作用の検討

(2) で同定した候補薬の in vivo における効果を検討するために、Cre-Lox システムを用いた筋肉内に異所性骨化をきたす FOP モデルマウス (ALK2 Q107D) を確立する。また、FOP 以外の異所性骨化を生じる疾患も標的とするために、crude BMP の筋肉内移植による異所性骨化モデルも同時に作製する。それら動物モデルに候補薬を投与し、定期的なレントゲンおよびマイクロ CT により異所性骨化を定量化して in vivo における骨化抑制効果を検討する。効果を認められた場合には、さらに最適な薬剤の投与量を検討する。

### 4. 研究成果

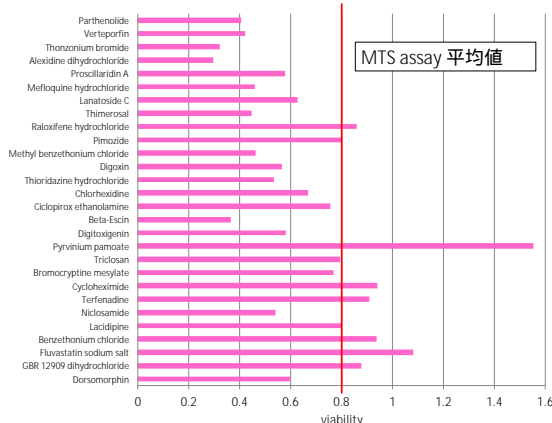
ファーストスクリーニングにてカットオフ値を vehicle 比 0.3 以下とし、抗がん剤や抗生剤、免疫抑制剤など長期投与が困難な薬剤を除外してセカンドスクリーニングを行った (次項図)。細胞増殖能の低下に基づくルシフェラーゼ活性の低下をルールアウトするため、MTS アッセイにより細胞増殖能も併せて評価した。セカンドスクリーニングにてカットオフ値 0.2 以下であった 4 種類の抗うつ薬 (ノ



リトレン、アナフラニール、プロチアデン、トリミプラミン、3種類の抗ヒスタミン薬(ヒスマナール、アゼブチン、クラリチン)、3種類の抗精神病薬(スピペロン、ロドピン、インプロメン)、その他ジヒデルゴット(セロトニン作動薬)、ペルジピン(高血圧薬)、オーラノフィン(抗リウマチ薬)、ローコール(高脂血症薬)、エピスタ(骨粗鬆症薬)を候補薬として絞り込んだ(下図)。

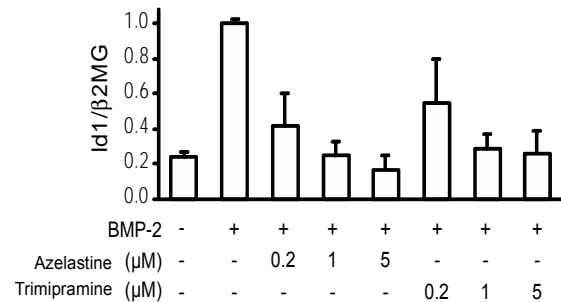
1	B11	2	F07	1-2	Astemizole	「ヒスマナール」	抗ヒスタミン薬	0.05364	0.89096
1	C05	2	G11	1-3	Dihydroergotamine tartrate	「ジヒデルゴット」	セロトニン作動薬	0.15069	0.978918
1	C11	4	B05	1-4	Nortriptyline hydrochloride	「リトレン」	三環系抗うつ薬	0.09313	0.868931
1	D08	4	C10	1-5	Clomipramine hydrochloride	「アナフラニール」	抗鬱抗うつ薬	0.13087	1.068348
1	E04	4	E08	1-6	Sipiperone	「スピペロン」	抗精神病薬	0.18529	1.006888
1	F04	5	G04	1-7	Nicardipine hydrochloride	「ペルジピン」	高血圧 高血圧薬	0.14994	0.882551
1	F08	6	C03	1-8	Zotepine	「ロドピン」	抗精神病薬	0.11115	0.860885
1	G05	7	A09	1-9	Dosulepin hydrochloride	「プロチアデン」	三環系抗うつ薬	0.19115	0.958919
1	G11	7	C10	1-10	Bromperidol	「インプロメン」	抗精神病薬	0.11467	0.937904
2	C02	8	C10	1-11	Azelastine HCl	「アゼブチン」	抗ヒスタミン薬	0.16074	1.090812
2	C07	9	C05	2-2	Loratadine	「クラリチン」	抗ヒスタミン薬	0.13979	0.96813
2	D09	11	A07	2-3	Trimipramine maleate salt	「トリミプラミン」	三環系抗うつ薬	0.14217	1.026828
2	D10	11	B02	2-4	Auranofin	「オーラノフィン」	金製抗リウマチ薬	0.07465	0.942293
2	D11	11	F10	2-5	Fluvestatin sodium salt	「ローコール」	スタチン系高脂血症薬	0.03261	1.082283
2	E02	11	G03	2-6	Raloxifene hydrochloride	「エピスタ」	SERM 骨粗鬆症薬	0.00709	0.858946

このうち、MTSアッセイにより細胞増殖能を評価したところ、アゼブチン、ローコール、アナフラニール、トリミプラミン、スピペロンの5薬剤が細胞増殖能を保ちながらルシフェラーゼ活性を低下させた(下図)。

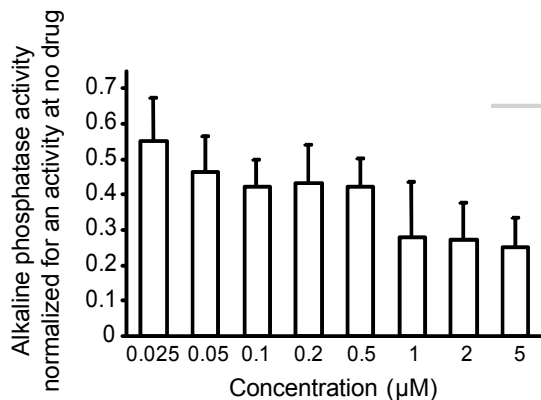


これら5薬剤に対してサードスクリーニングにてルシフェラーゼ活性の薬剤濃度依存性を検討したところ、アナフラニールとスピペロ

ンでは濃度依存性を認めなかった。そこでアゼブチン、ローコール、トリミプラミンの3薬剤に対し、Id1のmRNAの発現をRT-PCR法で、Id1タンパクの発現をWestern blotting法にて評価したところ、アゼブチンおよびトリミプラミンでId1のmRNAレベルでの抑制が濃度依存性に認められた。Western blotting



では、それら3薬剤によるタンパクレベルでのId1の抑制に関しては、必ずしも均一ではなかったものの、Id1の標的遺伝子である各種骨形成マーカー(アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、オステオポンチンなど)のmRNAおよびタンパク発現を検討したところ、トリミプラミンなど一部では抑制効果を認められた(下図)。



In vivo実験としては、crude BMPの筋肉内移植による異所性骨化モデルマウスを確立し、アゼブチン、ローコール、トリミプラミンの3薬剤を経口投与して、in vivoにおける骨形成抑制効果をレントゲンとマイクロCTにて評価した。6週齢のddYマウスに対し、コントロール、アゼブチン、ローコール、トリミプラミンをそれぞれ投与した計4群を作成し、5mgのcrude BMPをゼラチンゲルに包埋して、大腿後面に移植した。各薬剤を混餌投与し、30日後にマイクロCTにて異所性骨化を定量した。各群4匹ずつ評価可能なモデルを獲得したが、それぞれの薬剤投与にてコントロールと比較して軽度の異所性骨化抑制効果(65.8%~88.2%)を認めただけで、統計学的有意差を認めるまでには至らなかった。

以前、我々は同様のスクリーニング系を用いて、2種類のカルシウム拮抗薬(マレイン酸ペルヘキシリンおよびフェンデリン塩酸塩)

のId1抑制作用に関しては検討した。本研究では、さらに種類を増やした薬剤パネルを用い、in vitroでのId1抑制作用に関しては、両カルシウム拮抗薬よりも強力な抑制作用を確認できたものの、crude BMPを用いたin vivoのモデルでは明らかな骨形成抑制作用までは認めることができなかった。本研究では混餌投与を採択したため、決まった濃度の薬剤が確実に取り入れられているかどうかは確証がない。また、in vivoにおける至適な薬剤濃度を決定するまでには至っていないため、さらなる追加研究が必要である。

ACVR1/ALK2シグナル阻害剤に関する研究として、抗ALK2抗体、ALK2核酸医薬、キナーゼ阻害薬、smad阻害薬、細胞分化阻害薬などの開発が試みられている。レチノイン酸受容体 作動薬であるパロバルテンは、smadのリン酸化を抑制することにより活性化したACVR1/ALK2シグナルを抑制することによりFOPの異所性骨化を予防するとして、欧米で国際共同治験を実施中である。一方、FOPにおける異所性骨化発症のメカニズムとして、受容体の恒常的な活性化だけでなく、通常はBMPシグナルを生じないリガンド(アクリピンA)が、変異受容体に結合することにより異常なBMPシグナルを導いてしまうという新たなメカニズムが提唱されている。そこで、アクチピンAの阻害薬としてmTOR阻害剤であるラパマイシンを用いた医師主導治験が本邦でも開始された。様々な角度からFOPの治療薬が開発されつつある現状は好ましいことであるが、本研究におけるId1阻害薬もFOPにおける異常に活性化したBMPシグナルを抑制しうる可能性があるため、今後も引き続きvivoを中心とした研究を遂行する必要がある。

結語。C2C12細胞に変異型ALK2ベクター、レニラ・ルシフェラーゼベクターおよびId1プロモータールシフェラーゼベクターを遺伝子導入したスクリーニング系において、アゼプチン(抗ヒスタミン薬)、ローコール(高脂血症薬)、トリミプラミン(抗うつ薬)がId1のルシフェラーゼ活性、mRNA発現、および標的遺伝子の発現を低下させたものの、異所性骨化モデルマウスを用いたin vivoにおける骨形成抑制作用を獲得するまでには至らなかった。

## 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28件)

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* 36(1):300-308, 2018 査読有り
2. 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* 19(1):91-95, 2017 査読有り
3. Osawa Y, Matsushita M, Hasegawa S, Esaki R, Fujio M, Ohgasawara B, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Activated FGFR3 promotes bone formation via accelerating endochondral ossification in mouse model of distraction osteogenesis. *Bone* 105:42-49, 2017 査読有り
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* 7(1):7371, 2017 査読有り
5. 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* 470(2):356-361, 2016 査読有り
6. 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* 58(8):705-708, 2016 査読有り
7. Misima 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* 95(21):e3787, 2016 査読有り
8. Hasegawa S, Victoria T, Kayserili H, Zackai E, Nishimura G, Haga N, Nakashima Y, Miyazaki O, Kitoh H. Characteristic calcaneal ossification: an additional early radiographic finding in infants with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Ped Radiol* 46(11):1568-1572, 2016 査読有り
9. Matsushita M, Kitoh H, Subasioglu A, Colak FK, Dundar M, Mishima K, Nishida Y, Ishiguro N. A glutamine repeat variant of the RUNX2 gene causes cleidocranial dysplasia. *Mol Syndromol* 6(1):50-53, 2015 査読有り
10. Matsushita M, Hasegawa S, Kitoh H, Mori K, Ohkawara B, Yasoda A, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine promotes longitudinal skeletal growth in transgenic mice with

achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the FGFR3 gene. *Endocrinology* 156(2):548-554, 2015 査読有り

11. 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* 38(10):e919-924, 2015 査読有り
12. Mishima K, Kitoh H, Ohkawara B, Okuno T, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Lansoprazole upregulates polyubiquitination of TRAF6 and facilitates Runx2-mediated osteoblastogenesis. *EBioMedicine* 2(12):2046-2061, 2015 査読有り

〔学会発表〕(計 46 件)

1. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Ishiguro N. Treatment of deformities in lower extremity by a multi-axial external fixation system. 61st Korean Orthopaedic Association 2017.10.19-21 (Seoul)
2. Kitoh H, Matsushita M, Mishima K, Ishiguro N, Ohno K. Oral administration of meclozine for the treatment of short stature in achondroplasia. 13<sup>th</sup> International Skeletal Dysplasia Meeting 2017.6.21-23 (Bruges)
3. Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. Transplantation of autologous culture-expanded bone marrow cells and platelet rich plasma during lower limb lengthening. The 27<sup>th</sup> Korean-Japanese Combined Orthopaedic Symposium. 2017.5.26-26 (Incheon)
4. Matsushita M, Mishima K, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Clinically feasible dose of meclozine improves bone growth, bone volume, and bone quality in mouse model with achondroplasia. The 27<sup>th</sup> Korean-Japanese Combined Orthopaedic Symposium. 2017.5.26-26 (Incheon)
5. Osawa Y, Matsushita M, Ishiguro N, Ohno K, Kitoh H. Activated FGFR3 promotes bone formation via accelerating endochondral ossification in mouse model of distraction osteogenesis. The 27<sup>th</sup> Korean-Japanese Combined Orthopaedic Symposium. 2017.5.26-26 (Incheon)
6. Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Sugiura H, Kitamura K, Ishiguro N. Transplantation of autologous

culture-expanded bone marrow cells and platelet rich plasma for bone regeneration. Comprehensive clinical study of the lower limb lengthening. EPOS/POSNA combined annual meeting 2017.5.3-6 (Barcelona)

7. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Sugiura H, Kitamura A, Ishiguro N. Clinical feasibility of meclozine for improvement of short stature in achondroplasia. EPOS/POSNA combined annual meeting 2017.5.3-6 (Barcelona)
8. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Yamashita S, Sugiura H, Kitamura A, Ishiguro N. Long term health-related quality of life in achondroplasia. EPOS/POSNA combined annual meeting 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. Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. Gradual reduction using overhead traction for developmental dysplasia of the hip after walking age. International Joint Symposium Lund University & Nagoya University 2016.11.21 (Lund)
11. Kitoh H, Matsushita M, Mishima K, Ishiguro N. FGFR3-targetted therapy for short stature in achondroplasia. 60th Korean Orthopaedic Association 2016.10.19-22 (Incheon)
12. Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro. Transplantation of culture-expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in limb lengthening –Clinical trial and further improvement. 60th Korean Orthopaedic Association 2016.10.19-22 (Incheon)
13. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K, Ishiguro N, Ohno K. 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. Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Sugiura H, Hasegawa S, Ishiguro N. Genu varum in achondroplasia and hypochondroplasia Annual meeting of Pediatric Orthopedic Society of North America 2016.4.27-30 (Indianapolis)
15. Matsushita M, Kitoh H, Mishima K,

Sugiura H, Hasegawa S, Kitamura A, Ishiguro N, Ohno K. Radical therapeutic strategy for foramen magnum stenosis and spinal canal stenosis in achondroplasia. Annual meeting of Orthopaedic Research Society 2016.3.5-8 (Orland)

16. Kitoh H, Ishiguro N, Ohno K, Mishima K, Matsushita M. Treatment strategies for short stature in achondroplasia. International Joint Symposium Lund University & Nagoya University 2016.1.18 (Nagoya)

17. Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro. Transplantation of culture-expanded bone marrow cells and platelet rich plasma during distraction osteogenesis of the long bones. 4<sup>th</sup> Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society. 2015.9.8-11 (Boston)

18. Kitoh H, Mishima K, Matsushita M, Ishiguro N. Transplantation of culture-expanded bone marrow cells and platelet rich plasma in lower limb lengthening for short stature patients. The 7<sup>th</sup> International Conference on Children's Bone Health 2015.6.27-30 (Salzburg)

〔図書〕(計10件)

1. 鬼頭浩史 FGFR3 グループ概説 今日の整形外科治療指針 7 版(医学書院)第 7 版 919(231-232,) 2016

2. 鬼頭浩史 軟骨無形成症 今日の整形外科治療指針 7 版(医学書院)第 7 版 919(232-233,) 2016

3. 鬼頭浩史 軟骨低形成症 今日の整形外科治療指針 7 版(医学書院)第 7 版 919(233-234,) 2016

4. 鬼頭浩史 濃化異骨症 今日の整形外科治療指針 7 版(医学書院)第 7 版 919(252-253,) 2016

5. 鬼頭浩史 弯曲骨異形成症概説 今日の整形外科治療指針 7 版(医学書院)第 7 版 919(249-250,) 2016

6. 鬼頭浩史 培養骨髄細胞移植による骨延長術 骨系統疾患 今日の整形外科治療指針 7 版(医学書院) 919(242,) 2016

7. 鬼頭浩史 画像診断のピットフォール 小児整形外科テキスト改訂第 2 版(メジカルビュー社) 381(58-63,) 2016

8. 鬼頭浩史 先天性股関節脱臼 今日の治療指針 2015 年(医学書院) 1973(1042-1043,) 2015

9. 鬼頭浩史 軟骨無形成症(整形外科的治療) 今日の小児治療指針(医学書院) 第 16 版 1006(821-822,) 2015

10. 鬼頭浩史 骨系統疾患 肢体不自由児の医療・療育・教育(金芳堂) 263(63-73,) 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 1 件)

名称:骨系統疾患治療薬及びその用途  
発明者:大野欽司、石黒直樹、鬼頭浩史、松下雅樹  
権利者:名古屋大学  
種類:特許  
番号:特許第 06232630 号  
取得年月日:2017 年 11 月 2 日  
国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

鬼頭 浩史 (Kitoh Hiroshi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号:40291174

(2)研究分担者

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

杉浦 洋 (Sugiura Hiroshi)  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号:40750477