

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02928

研究課題名(和文) 進行性骨化性線維異形成症の治療法開発に向けた病態解析

研究課題名(英文) Mechanism analysis of heterotopic ossification formation in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP)

研究代表者

金 永輝 (Jin, Yonghui)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：90620344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：進行性骨化性線維異形成症(FOP)における異所性骨(HO)形成過程の全貌を解明すると共に、開発中のシロリムスを用いた治療法をより有効にするために、FOP患者由来iPS細胞とFOPモデルマウスを駆使して、実験を行った。その結果、mTOR機能の一つである翻訳制御がFOP病態に重要な役割を担うことを判明した。更に、シロリムスの投与により、HO切除後の再発に予防効果があり、予防的投与がさらなる治療効果をもたらすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は基礎生物学的な理解と臨床への応用の両者を対象にした研究である。学術的意義として、FOP疾患における未解決の課題に取り込み、mTORシグナルを介したHO形成過程を解明することは病態の理解を深めるという意味で重要である。社会的意義として、シロリムスの至適な投与段階および再発予防薬としての意義を明らかにすることで、FOP患者の臨床病態の改善に貢献できる研究である。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the whole process of heterotopic ossification (HO) in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) and to make the sirolimus-based therapy under development more effective, we conducted experiments using FOP patient-derived iPS cells and FOP model mice. As a result, we found that translational regulation, one of the mTOR functions, plays an important role in the pathogenesis of FOP. Furthermore, administration of sirolimus had a preventive effect on recurrence after HO resection, and prophylactic administration can bring about further therapeutic effects.

研究分野：幹細胞生物学、整形外科学

キーワード：進行性骨化性線維異形成症 FOP 異所性骨化 mTOR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

異所性骨化 (Heterotopic Ossification, HO) とは、本来骨組織が存在しない軟部組織に骨組織が形成される過程であり、内軟骨性骨化の過程を経て骨組織が形成される。外傷後の血腫などの後天的要素により発生するが、遺伝性要因により発生する場合があり、その一つが進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva, FOP) である。FOP の原因は I 型 BMP 受容体の一つである ACVR1 遺伝子の変異 (FOP-ACVR1) であり、幼少期より全身性に HO が出現する希少難病である。研究代表者の所属する研究室では FOP 患者由来 iPS 細胞 (FOP-iPSC) を用いた解析により、骨および軟骨細胞への分化能が亢進していることを明らかにした (Matsumoto, et al. Orphanet J Rare Dis 2014)。更に、ゲノム編集により変異を修復した iPSC (resFOP-iPSC) を対象とした実験により、FOP-iPSC では外来性のリガンドを添加しない状態でも TGF と BMP の両者のシグナルが亢進していることが判明した (Matsumoto, et al. Stem Cells 2015)。BMP シグナルを伝達するリガンドのスクリーニングにより変異 ACVR1 に本来のリガンドとは異なるアクチビン A を同定し、アクチビン A により FOP 細胞の *in vitro* での軟骨分化能が亢進し、更に *in vivo* において HO 形成を誘導することを明らかにした (Hino, et al. PNAS 2015)。アクチビン A の作用を阻害する化合物のスクリーニングの結果、アクチビン A が変異型 ACVR1 に結合することで mTOR が活性化され HO が発生することを明らかにし (Hino, et al. J Clin Invest 2017)、その研究結果に基づいて mTOR 阻害剤であるシロリムスを用いた治療を計画し、医師主導治験を開始した。

2. 研究の目的

mTOR は複数の細胞内シグナル伝達のハブ蛋白として様々な細胞において増殖、分化、アポトーシスなど重要な機能に関与しており、アクチビン A により活性化された mTOR はどのような下流因子を動かして内軟骨骨化を誘導するのかわからない。さらに、アクチビン A が TGF と BMP の両者のシグナルを同時に伝達することの意義も解明されていない。また、mTOR の阻害剤であるシロリムスは *in vivo* において HO の形成を抑制するが、本疾患に対する根本的治療法である外科的骨切除後の HO 再発における予防効果を検討する必要がある。

これらの FOP の病態や治療に残された「問い」に答えることにより、FOP の病態を更に理解し、よりよい治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 軟骨分化誘導法および評価

FOP-iPSC と resFOP-iPSC から神経堤細胞を経由する誘導法を用いて、間葉系間質細胞 (iMSC) を誘導した。得られた iMSC を高密度で培養し、アクチビン A による軟骨分化誘導を行った。軟骨分化能の評価はアルシアンブルー陽性を示す軟骨様結節の形成、軟骨性細胞外基質の産生、SOX9 など軟骨関連遺伝子の発現の解析により行った。この分化誘導法により、FOP-iMSC は resFOP-iMSC に比べて顕著な軟骨分化能を示しており、*in vitro* における病態再現や生化学実験が容易になった。

(2) 遺伝子発現のノックダウン実験

FOP-iMSC の軟骨分化誘導と同時に、mTOR シグナルの下流因子を siRNA によりそれぞれをノックダウンし、FOP-iMSC の軟骨分化における抑制効果を検討した。更に同定された mTOR 下流因子である翻訳開始因子に発現が依存する遺伝子を siRNA によりノックダウンし、FOP-iMSC の軟骨分化への関与を確かめた。

(3) 翻訳開始因子に結合が増加した mRNA の同定

同定された翻訳開始因子に対する抗体を用いて、RIP アッセイ (RNA binding protein immunoprecipitation assay) を行い、当翻訳開始因子に結合した RNA を回収した。回収された RIP-RNA と全 RNA の RNA シークエンシングを行い、当翻訳開始因子に結合が増加した mRNA を同定した。

(4) 蛋白質発現の確認

当翻訳開始因子を siRNA によりノックダウンし、当翻訳開始因子に結合が増加した mRNA (遺伝子) の蛋白質での発現をウェスタンブロットングにより確認した。さらに、マイクロアレイおよびプロテオーム解析を行い、当翻訳開始因子の発現抑制により蛋白質レベルで低下した遺伝子を調べた。

(5) mRNA の 5' UTR に依存する翻訳制御の検討

2 種類のルシフェラーゼのオープンリーディングフレームの間に IRES (Internal Ribosome Entry Site) を挿入し、バイシストロニックベクターを作製した。作製したベクターに同定された候補遺伝子の 5' UTR を挿入し、翻訳効率における影響を調べた。

(6) 細胞のエネルギー代謝経路の解析

細胞外フラックスアナライザー XF96 を用いて、酸素消費速度 (OCR) と細胞外酸性化速度 (ECAR) を測定した。その結果により、FOP-iMSC と resFOP-iMSC の軟骨分化誘導前後において、エネルギー代謝であるミトコンドリア代謝と解糖系の状態を解析した。

(7) 異所性骨形成モデルマウス

HO 形成における候補遺伝子の関与を検討するために、薬剤誘導型 shRNA を導入した FOP-iPS 細胞を樹立し、分化誘導した FOP-iMSC とアクチビン A 遺伝子を導入した C3H10T1/2 細胞を NOD-SCID マウスの筋肉に移植し、ヒト細胞による HO 形成モデルを作製した。HO 形成における影響をマイクロ CT による定量により評価した。

HO 再発におけるシロリムスの予防効果を検討するために、FOP-ACVR1 トランスジェニックマウスの筋肉を Pinch Injury 法により損傷させ、形成された HO の外科的切除を行い、シロリムスの投与による HO 再発への予防効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 異所性骨化を誘導する mTOR シグナルについて

mTOR シグナルは下流因子を介していくつかの細胞生物学的機能を持つ。アクチビン A により活性化された mTOR シグナルが HO 形成を誘導する過程を解析するために、siRNA により mTOR シグナルの下流因子のノックダウンを行った。FOP-iMSC の軟骨分化における影響をアルシアンブルー染色や軟骨性細胞外基質の産生の定量により評価した。その結果、他の下流因子に比べて、mRNA の翻訳に関わる翻訳開始因子の一つが FOP-iMSC の軟骨分化に重要であることが示された。当翻訳開始因子に対する薬剤誘導型 shRNA を持つ FOP-iPS 細胞を樹立し、HO 形成への関与を検討した。shRNA を持つ FOP-iMSC とアクチビン A 遺伝子を導入した C3H10T1/2 細胞をマウス筋肉に移植し、ドキシサイクリン投与により shRNA の発現を *in vivo* で誘導することにより、HO 形成が顕著に抑制された。

当翻訳開始因子の HO への関与を深めるために、RIP アッセイにより当翻訳開始因子に結合した RNA を回収し、RNA シークエンシングを行った。全 RNA と比較することにより、当翻訳開始因子に結合が増加した mRNA を同定し、FOP-iMSC の軟骨分化におけるこれらの候補遺伝子の関与を検討した。これらの候補遺伝子の発現を siRNA によりノックダウンさせることで、FOP 細胞の軟骨分化における関与を実証した。

また、これらの候補遺伝子の翻訳が当翻訳開始因子に依存することを検討するために、当翻訳開始因子の発現をノックダウン後、ウェスタンブロッティングとプロテオーム解析を行った。さらに、候補遺伝子の中から代表的な遺伝子の 5'UTR をバイシストロニックベクターに挿入し、翻訳効率を調べた。その結果、5'UTR の挿入により、翻訳が著しく上昇したが、当翻訳開始因子のノックダウンにより翻訳の低下がみられた。

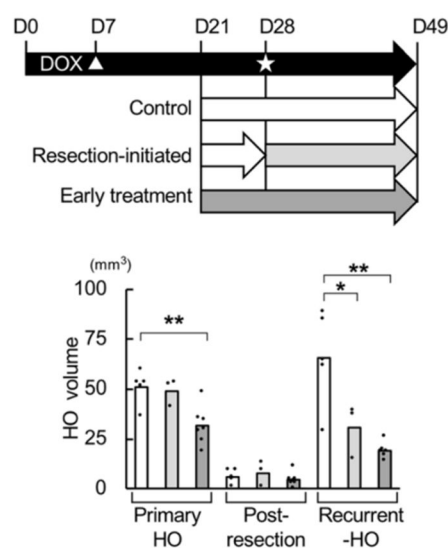
(2) アクチビン A による Dual シグナルの意義について

ACVR1 の変異を修復した *resFOP-iMSC* にそれぞれのリガンドを添加することにより、mTOR の活性を誘導する因子を高いレベルで維持するために、TGF β シグナルと BMP シグナルの両方が必要であることが示された。さらに、本研究で注目した翻訳開始因子の発現や活性に関与する結果も得られた。また、興味深いことに、アクチビン A による Dual シグナルが FOP 細胞特異的なエネルギー代謝リプログラミングを引き起こす現象を発見した。FOP 細胞の軟骨分化後、阻害剤を用いてこのエネルギー代謝リプログラミングを抑制することにより、細胞死が誘導されることから、FOP 細胞の軟骨分化にこの代謝リプログラミングが必須であることが示された。さらに、軟骨分化の初期から阻害剤を添加することにより、FOP-iMSC の軟骨分化が抑制された。FOP モデルマウスにおいても、阻害剤の投与により HO の形成が顕著に抑えられた。この FOP 細胞特異的なエネルギー代謝の新規治療法の標的としての可能性や機序の解析を進めている。

(3) シロリムスの HO 再発における予防効果について

当初の研究計画では、FOP-ACVR1 トランスジェニックマウスの筋肉に cardiotoxin を注射して、筋損傷により HO が発生するモデルを用いる予定だった。しかしながら、この方法を用いて発症した HO は広い範囲で形成されるため、完全な外科的切除は不可能だった。幾つかの損傷モデルを検討した結果、HO の発生および外科的切除が再現よくできる Pinch Injury 方法を採用し、シロリムスの再発予防効果および投与タイミングによる効果を検討した。その結果、シロリムスの投与により HO の再発が顕著に抑えられており、外科的切除による機能改善という治療が可能であると考えられる(図1)。更に、Pinch Injury により反対側にも HO が形成されるが、シロリムスの投与時期による効果を調べた結果、同時投与に比べて予防的投与が反対側の HO 形成を有意に抑制した。この結果により予防的投与がさらなる HO 形成抑制効果をもたらすことが示された。得られた研究成果をまとめて Maekawa et al. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2020) 15:122 に報告した。

図1：シロリムスのHO再発予防効果



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maekawa Hirotsugu, Kawai Shunsuke, Nishio Megumi, Nagata Sanae, Jin Yonghui, Yoshitomi Hiroyuki, Matsuda Shuichi, Toguchida Junya	4. 巻 15
2. 論文標題 Prophylactic treatment of rapamycin ameliorates naturally developing and episode -induced heterotopic ossification in mice expressing human mutant ACVR1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orphanet Journal of Rare Diseases	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13023-020-01406-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawai Shunsuke, Yoshitomi Hiroyuki, Sunaga Junko, Alev Cantas, Nagata Sanae, Nishio Megumi, Hada Masataka, Koyama Yuko, Uemura Maya, Sekiguchi Kazuya, Maekawa Hirotsugu, Ikeya Makoto, Tamaki Sakura, Jin Yonghui, Harada Yuki, Fukiage Kenichi, Adachi Taiji, Matsuda Shuichi, Toguchida Junya	4. 巻 3
2. 論文標題 In vitro bone-like nodules generated from patient-derived iPSCs recapitulate pathological bone phenotypes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 558 ~ 570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41551-019-0410-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hino Kyosuke, Zhao Chengzhu, Horigome Kazuhiko, Nishio Megumi, Okanishi Yasue, Nagata Sanae, Komura Shingo, Yamada Yasuhiro, Toguchida Junya, Ohta Akira, Ikeya Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 An mTOR Signaling Modulator Suppressed Heterotopic Ossification of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1106 ~ 1119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2018.10.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Taiki, Shibata Mitsuaki, Nishio Megumi, Nagata Sanae, Alev Cantas, Sakurai Hidetoshi, Toguchida Junya, Ikeya Makoto	4. 巻 145
2. 論文標題 Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.165431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川井俊介, 日野恭介, 池谷真, 戸口田淳也	4. 巻 33
2. 論文標題 骨芽細胞に関する最新のトピック (2) - FOPの発症メカニズムと分子治療薬への展開	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 THE BONE	6. 最初と最後の頁 45 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Toguchida J
2. 発表標題 Disease-specific iPS cells disclose the novel pathomechanism and provide a platform for clinical trial for patients with FOP
3. 学会等名 12th International BMP Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toguchida J, Hino K, Horigome K, Nishio M, Komura S, Nagata S, Jin Y, Kawakami K, Yamada Y, Ohta A, Ikeya M
2. 発表標題 Enhanced mTOR signaling triggered by Activin-A in chondrogenesis of fibrodysplasia ossificans progressive
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 整形外科基礎領域へのiPS細胞の応用
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸口田淳也、日野恭介、池谷真、関口和也、金永輝、岡本健、吉富啓之、松田秀一
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を活用した病態解析から創薬
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を活用した病態解析から創薬
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maekawa H, Kawai S, Nshio M, Nagata S, Jin Y, Yoshitomi H, Matsuda S, Toguchida J
2. 発表標題 Prophylactic treatment of rapamycin ameliorates naturally developing and episode-induced heterotopic ossification in mice expressing human mutant ACVR1
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toguchida J
2. 発表標題 Using iPSC for understanding skeletal diseases
3. 学会等名 ASBMR 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌倉武史、金永輝、玉置さくら、渡辺真、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也
2. 発表標題 変異型IDH1は通常酸素下において癌遺伝子誘導性細胞老化を引き起こす
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tamaki S, Nagata S, Jin Y, Yoshitomi H, Toguchida J
2. 発表標題 Application of pluripotent stem cells for in vitro sarcomagenesis
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸口田淳也、金永輝、川井俊介、前川裕継
2. 発表標題 骨再生機構へのアプローチとしての異所性骨化の解析
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toguchida J
2. 発表標題 Investigation of Rare Diseases using Patient Derived iPS Cells
3. 学会等名 India-Japan Webinar on Rare Genetic Disorders
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸口田淳也、金永輝、孫麗萍、川井俊介、前川裕継
2. 発表標題 異所性骨化のメカニズムとその制御
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川裕継、川井俊介、金永輝、西尾恵、永田早苗、古庄知己、道上敏美、池川志郎、松田秀一、戸口田淳也
2. 発表標題 患者由来iPS細胞を用いたCamurati-Engelmann病の病態解析
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鎌倉武史、金永輝、玉置さくら、渡辺真、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也
2. 発表標題 変異型IDH1は通常酸素下において癌遺伝子誘導性細胞老化を引き起こす
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 孫麗萍、金永輝、鎌倉武史、玉置さくら、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症におけるミトコンドリアのエネルギー代謝を標的とした新規治療法の検討
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金永輝、吉富啓之、西尾恵、鎌倉武史、玉置さくら、孫麗萍、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化形成機構の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川裕継、吉富啓之、川井俊介、金永輝、松田秀一、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症に対するmTOR阻害剤の有効性の検討
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川裕継、吉富啓之、川井俊介、金永輝、西尾恵、永田早苗、松田秀一、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症に対するmTOR阻害剤の有効性の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金永輝、吉富啓之、西尾恵、鎌倉武史、玉置さくら、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化形成機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 iPS細胞の医療応用：現状と展望
3. 学会等名 第30回 メデック・ハイデック交流会（神戸医療産業都市クラスター交流会）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 疾患特異的iPS細胞を活用した病態解明から創薬
3. 学会等名 第30回日本小児科医会総会フォーラムin京都（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸口田淳也
2. 発表標題 細胞製品を用いた再生医療の展開
3. 学会等名 第56回日本リハビリテーション医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金永輝、吉富啓之、戸口田淳也
2. 発表標題 進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化形成機構の解析
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 戸口田 淳也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学のあゆみ274巻4号	

1. 著者名 戸口田 淳也	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 BIO Clinica 2020年 7月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸口田 淳也 (Toguchida Junya) (40273502)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授 (14301)	
研究分担者	吉富 啓之 (Yoshitomi Hiroyuki) (50402920)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------