

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：83915

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03063

研究課題名（和文）軟骨無形成症に対する治療薬の開発研究 塩酸メクリジンのFGFR3抑制作用の検討

研究課題名（英文）Development of therapeutic drugs for achondroplasia-Examination of FGFR3 inhibitory effects of meclizine hydrochloride

研究代表者

鬼頭 浩史（Kitoh, Hiroshi）

あいち小児保健医療総合センター（臨床研究室）・臨床研究室・副センター長

研究者番号：40291174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：作用機序に関する研究では、メクリジンは軟骨細胞内のMAPK経路において、MAP3K3を抑制することを示した。また、MAP3K3とメクリジンのドッキングシミュレーションにより、2つの共結合構造を同定した。In vivo研究では、2mg/kg/dayのメクリジンがACHモデルマウスにおいて最も骨伸長効果を示した。また、メクリジンの長期投与により脊柱管狭窄症がレスキューされ、生存率が改善した。Hypマウスへの投与では、Hypマウスの骨石灰化を促進し、成長軟骨における組織学的構造を改善した。ゼブラフィッシュを用いた研究では、FGFシグナルにより活性化した脊椎や頭蓋骨の骨石灰化をメクリジンは抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨無形成症（ACH）に対する病態に即した治療薬であるボソリチドが2022年に本邦でも承認され、多くのACH患者に投与されている。しかし連日の皮下注射による長期にわたる投与は小児にとっては負担が大きい。塩酸メクリジンは経口内服剤であり、小児患者における長期投与のコンプライアンスが期待できる。我々は実用化に向け、メクリジンをACH小児に投与する第2相医師主導治験をすでに実施したが、本研究ではメクリジンの分子レベルでのFGFR3に対する抑制作用を明らかにする基礎研究と、モデルマウスを用いた動物実験を組み合わせ、メクリジンによるFGFR3抑制作用に関する基礎的エビデンスを蓄積した。

研究成果の概要（英文）：From mechanism of action studies, meclizine suppressed FGFR3 signaling through inhibition of intracellular MAP3K3 pathway in chondrocytes. We next performed docking simulations of MAP3K3 and meclizine and identified the two co-binding structures. From in vivo studies, we identified that 2mg/kg/day of meclizine provided the greatest effect on longitudinal bone growth in ACH mice. In addition, we performed long-term administration of meclizine and demonstrated that the survival rate of model mice was improved by spinal canal stenosis being rescued. Meclizine also enhanced mineralization and improved histological structure in growth plates of Hyp mice. From zebrafish experiments, meclizine inhibited bone calcification in the spine and skull that was activated by the FGF signaling.

研究分野：整形外科学

キーワード：軟骨無形成症 FGFR3 塩酸メクリジン 骨伸長

1. 研究開始当初の背景

ACH は最も頻度の高い四肢短縮型低身長をきたす骨系統疾患で、骨伸長に対して抑制的に働く **FGFR3** の恒常的活性型変異により発症する。成人の最終身長は 124~130cm であり、日常生活に多大な支障をきたす。低身長に加え、脊椎や頭蓋底の骨伸長が抑制されることにより脊柱管狭窄症や大後頭孔狭窄などの重篤な合併症を伴うこともある。低身長に対する治療として、成長ホルモン治療や四肢の骨延長術がなされるが、前者は効果不十分、後者は治療期間が 1 年近くに及ぶ極めて侵襲的な治療であることが問題である。我々は ACH のモデル細胞を用いた既存薬の網羅的スクリーニングにより、乗り物酔い防止薬の成分であるメクリジンが過剰に活性化した **FGFR3** シグナル下流の **MAPK** 経路において、**ERK** のリン酸化を抑制する作用を有することを見出した。次いで、成長期の ACH モデルマウスに乗り物酔い防止薬で得られる血漿中濃度の範囲内のメクリジンを混餌投与して、モデルマウスの骨伸長を促進させた。さらに、2mg/kg/day のメクリジンを幼若なモデルマウスに 10 日間強制経口投与して、骨伸長が促進するとともに骨幹端部の骨密度や骨梁が改善することを示した。また、胎児期よりメクリジンを母体マウスに投与することにより、仔の頭蓋底の軟骨結合早期癒合を防止した。メクリジンの臨床応用を目指すにあたり、メクリジンの **FGFR3** 抑制作用に関する基礎的なエビデンスを蓄積する必要があるため、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、①メクリジンの **FGFR3** 抑制作用機序を分子レベルで検討し、分子作用点を解明する ②ACH モデルマウスの骨伸長促進作用におけるメクリジンの至適投与量を決定する ③ACH のゼブラフィッシュモデルを用い、胚から成体に至るまでのメクリジンの **FGFR3** 抑制作用を経時的に検討する、ことを目的とする。

3. 研究の方法

メクリジンの分子作用点を解明する目的で、ACH モデル細胞に対して **Lentivirus-shRNA** を用いて、**MEK1/2** をノックダウンしてメクリジンの効果を評価する。また、メクリジンによる **MEK1/2** のキナーゼ活性の変化を *in vitro* kinase assay により明らかにする。メクリジンの **STAT** 経路への関与の有無について、抗リン酸化 **STAT1** 抗体を用いてウェスタンブロッティング法で検討する。それら研究でメクリジンの分子作用ターゲットを絞り、軟骨細胞を用いた **Gene set enrichment analysis (GSEA)** や **Cell free kinase assay** などによりさらに検討を深める。モデルマウスにおける至適有効用量を検討するため、1mg/kg/day、4mg/kg/day、8mg/kg/day のメクリジン投与を追加し、有効性および安全性を評価する。これまでの研究と同様、体長、尾長を経時的に測定し、エンドポイントでマイクロ CT を実施して、三次元再構成した画像から各骨（頭蓋骨、大腿骨、脛骨、上腕骨、橈骨、尺骨、脊椎）の長さおよび骨量（全身骨、頭蓋骨、上肢、下肢および脊椎）を測定する。また、成長軟骨帯を中心とした組織標本作製し、静止・増殖・肥大の各軟骨細胞層の幅を計測して骨伸長を組織学的に検討する。次いで、同様に **FGFR3** シグナルが亢進している低リン血症性くる病モデルマウス (**Hyp** マウス) において、メクリジンの骨伸長作用を検討する。

ACH 遺伝子改変ゼブラフィッシュは、ヒトにおける ACH の common mutation (**G380R**) を有するヒト **FGFR3 (FGFR3^{G380R})** をゼブラフィッシュの **fgfr3** あるいは **col2a1a** プロモータ下で発現させるコンストラクトを用いて作成する。次いで、ACH ゼブラフィッシュモデルの胚や個体に対し、**GFP** 蛍光観察することにより生涯にわたって **FGFR3^{G380R}** の発現する時期や場所を同定する。次いで初期発生期、器官形成期、成長期などさまざまな段階においてメクリジンを投与し、メクリジンの **FGFR3^{G380R}** 抑制に関する薬剤効果を *in vivo* で評価する。

4. 研究成果

- ACH モデル細胞を用いたリン酸化実験により、メクリジンは **MAPK** 経路における **ERK** のリン酸化を抑制することを明らかにした。
- 軟骨細胞を用いた **GSEA** により、メクリジンは **MAPK** 経路のうち **ERK** と **p38** は抑制したが、**JNK** には影響しないことを確認した。したがって、メクリジンのターゲットは **MAP3K** 以上のレベルであることが示唆された。
- **MAP3K cascade assay (cell free kinase assay)** により、メクリジンは **MAP3K3** のリン酸化を抑制することが確認され、**MAP3K3** が分子ターゲットであることがわかった。
- **MAP3K3** とメクリジンの **binding site** を検索するためにドッキングシミュレーションを行ったところ、フラグメント精製タンパクを用いたサーマルシフトアッセイにより、メクリジンと **MAP3K3** の間で 2 つの共結合構造を同定した。
- 生後 7 日齢の ACH モデルマウスに 10 日間各種濃度のメクリジンを経口投与したところ、2mg/kg/day が最も骨伸長作用を示した。
- 同様のプロトコールで **Hyp** マウスにメクリジンを投与したところ、メクリジンは **Hyp** マ

ウスの骨石灰化を促進し、くる病所見を改善した。また、成長軟骨の組織学的構造を改善した。骨伸長に関しては促進する傾向はあったが、有意な効果は認めなかった。

- 成長ホルモンとメクリジンの併用効果を検討したが、それぞれ単独では骨伸長作用を示したが、2つの薬剤による相乗効果は認められなかった。一方、骨密度に関してはメクリジン、成長ホルモン、2剤併用のいずれにおいても増加した。
- 7日齢より56日齢までメクリジンを長期投与し、安全性と脊柱管狭窄症への薬理効果を検討した。体長はメクリジン投与により有意に伸長し、第7頸椎の脊柱管容積もメクリジン投与により増大した。モデルマウスの生存率も改善し、脊柱管狭窄をレスキューすることにより麻痺の出現頻度が減少していることを示した。
- 骨延長モデルマウスにメクリジンを投与したところ、骨髄間葉系細胞の石灰化が促進した。
- ゼブラフィッシュにメクリジンを投与したところ、FGFシグナルで亢進した脊椎の石灰化はメクリジンにより抑制された。頭蓋骨においても同様に、メクリジンは石灰化を抑制した。
- ACH 遺伝子改変ゼブラフィッシュモデルの作成には成功しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 20件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamiya Yasunari, Matsushita Masaki, Mishima Kenichi, Ohkawara Bisei, Michigami Toshimi, Imagama Shiro, Ohno Kinji, Kitoh Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Meclizine ameliorates bone mineralization and growth plate structure in a mouse model of X-linked hypophosphatemia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2022.11738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsushita Masaki, Kitoh Hiroshi, Mishima Kenichi, Kamiya Yasunari, Kato Daisaku, Takemoto Genta, Sawamura Kenta, Ueno Shinji, Yasuhiro Nakai, Nishida Kazuki, Imagama Shiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Phase 1b study on the repurposing of meclizine hydrochloride for children with achondroplasia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0283425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0283425	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 Funahashi Hiroto, Matsushita Masaki, Esaki Ryusaku, Mishima Kenichi, Ohkawara Bisei, Kamiya Yasunari, Takegami Yasuhiko, Ohno Kinji, Kitoh Hiroshi, Imagama Shiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Long-term oral meclizine administration improves survival rate and spinal canal stenosis during postnatal growth in a mouse model of achondroplasia in both sexes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jbmrpl/ziae018	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 Kato D, Matsushita M, Takegami Y, Mishima K, Kamiya N, Osawa Y, Imagama S, Kitoh H	4. 巻 111
2. 論文標題 Gain-of-function of FGFR3 accelerates bone repair following ischemic osteonecrosis in juvenile mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Calcif Tissue Int	6. 最初と最後の頁 622-633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-022-01019-2.	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 Kitoh H, Matsushita M, Mishima K, Kamiya Y, Sawamura K	4. 巻 40
2. 論文標題 Disease-specific complications and multidisciplinary interventions in achondroplasia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Bone Miner Metab	6. 最初と最後の頁 189-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01298-z.	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 Takemoto G, Matsushita M, Okamoto T, Ito T, Matsuura Y, Takashima C, Chen-Yoshikawa TF, Ebi H, Imagama S, Kitoh H, Ohno K, Hosono Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Meclozine attenuates the MAPK pathway in mammalian chondrocytes and ameliorates FGF2-induced bone hyperossification in larval zebrafish.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.694018.	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 -

〔学会発表〕 計31件（うち招待講演 17件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Hiroshi Kito
2. 発表標題 Pediatric orthopaedist perspective: Steps to diagnose and surgical management of skeletal dysplasia in Japan
3. 学会等名 The 2nd Korea Skeletal Dysplasia Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鬼頭浩史
2. 発表標題 治療可能な骨系統疾患
3. 学会等名 第39回九州小児整形外科集談会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hiroshi Kitoh
2. 発表標題 Bone dysplasias -An overview-
3. 学会等名 23rd Asia Pacific Orthopaedic Association Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鬼頭浩史
2. 発表標題 軟骨無形成症における整形外科的な問題
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下雅樹、三島健一、神谷庸成、加藤大策、竹本元大、今釜史郎、鬼頭浩史
2. 発表標題 軟骨無形成症患者を対象としたFGFR3シグナル抑制薬投与第1相治験
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鬼頭浩史
2. 発表標題 骨系統疾患 最新の話
3. 学会等名 第10回中国四国小児整形外科学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下雅樹、鬼頭浩史、三島健一、神谷庸成、澤村健太、今釜史郎
2. 発表標題 軟骨無形成症患児を対象としたFGFR3シグナルを抑制する内服薬の14日間投与治験
3. 学会等名 第33回日本小児整形外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Funahashi H, Matsushita M, Mishima K, Okawara B, Kamiya Y, Ohno K, Kitoh H, Imagama S
2. 発表標題 Long-term administration of meclozine for the treatment of achondroplasia using a mouse model
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2023 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kitoh H
2. 発表標題 Raising clinical suspicion of skeletal dysplasia: The application of gene panel testing to facilitate early diagnosis, Case study sharing from Japan.
3. 学会等名 BioMarin Expert Meeting (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鬼頭浩史、松下雅樹、三島健一、神谷庸成、金子浩史、北村暁子、澤村健太
2. 発表標題 ドラッグリポジショニングによる軟骨無形成症に対する治療薬開発.
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鬼頭浩史、三島健一、松下雅樹、神谷庸成、金子浩史、北村暁子、澤村健太
2. 発表標題 小児難治性運動器疾患に対する薬物アプローチ.
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 鬼頭浩史	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 219
3. 書名 骨系統疾患マニュアル	

〔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	三島 健一 (Mishima Kenichi) (40646519)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	松下 雅樹 (Matsushita Masaki) (60721115)	名古屋大学・医学系研究科・特任助教 (13901)	
研究分担者	細野 祥之 (Hosono Yasuyuki) (60820363)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

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
---------	---------