

# News Release



2017年8月1日

京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

大日本住友製薬株式会社

## FOP における骨化を抑える方法の発見

### ～FOP の異所性骨形成のシグナル伝達メカニズムの解明～

#### ポイント

- 著者らの先行研究により、アクチビン A<sup>注1)</sup>による BMP<sup>注2)</sup>シグナルの異常活性化が進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia Ossificans Progressiva; FOP) の異所性骨化の原因であることがわかっていました
- FOP 患者さん由来の細胞とアクチビン A を用いたハイスループットスクリーニングを実施し、mTOR<sup>注3)</sup>シグナルの活性化が異所性骨化を惹き起こすことを見出した
- 異所性骨化を抑える薬の候補としてラパマイシン<sup>注4)</sup>を同定した

#### 1. 要旨

日野恭介研究員 (CiRA 増殖分化機構研究部門、大日本住友製薬株式会社)、戸口田淳也教授 (CiRA 増殖分化機構研究部門)、池谷真准教授 (CiRA 未来生命科学開拓部門)らの研究グループは、FOP 患者さん由来の iPS 細胞を使い、FOP の異所性骨形成のメカニズムを解明し、治療薬候補を見出しました。

これまでの研究から FOP は ACVR1<sup>注5)</sup> という遺伝子の突然変異がおこっており、そこにアクチビン A の刺激が加わると異常な骨形成シグナル (BMP シグナル) が伝わり、異所性骨化が生じることがわかっていました。本研究ではアクチビン A の刺激からなぜ異所性骨化が生じるのか、その分子メカニズムを解明するとともに、治療薬候補を探索するために、FOP 患者さん由来の細胞から作った iPS 細胞を利用し、ハイスループットスクリーニング<sup>注6)</sup>を実施しました。約 7,000 の化合物をスクリーニングし、mTORシグナルが重要であることを突き止めました。また、異所性骨化のモデルマウスでも mTORシグナルの重要性を確認しました。さらに、ACVR1 変異と mTORシグナルを結びつける分子として、ENPP2 を同定しました。これらの結果から、FOP の異所性骨化は、アクチビン A、ACVR1、ENPP2、mTOR の経路が主要因であることがわかりました。また、骨化を抑えるためにはラパマイシンという薬剤が有効である可能性を示しました。

この研究成果は 2017 年 7 月 31 日 16 時 (米国東部時間) に「The Journal of Clinical Investigation」で公開されます。

#### 2. 研究の背景

FOP は筋肉や腱、靭帯などの軟部組織の中に異所性骨とよばれる骨組織ができてしまう病気で、200 万人に 1 人程度の割合、本邦内には約 80 名の患者さんがいると言われている希少難病の一つです。著者

らのこれまでの研究により、この病気は骨形成を司る増殖因子である BMP の受容体の1つである ACVR1 遺伝子に突然変異が生じて変異型 ACVR1 へと変化することが原因であることがわかっています。

これまでに研究グループは、FOP 患者さん由来の iPS 細胞 (FOP-iPS 細胞) や、変異型 ACVR1 遺伝子を修復した対照 iPS 細胞 (resFOP-iPS 細胞) の作製に成功しています。また、iPS 細胞から間葉系間質細胞 (induced mesenchymal stromal cells; iMSC) を経て軟骨へと分化させる方法も確立しており、FOP 細胞では軟骨への分化能が亢進していることを確認していました (参照: [CiRA プレスリリース 2015/03/13](#))。

さらにこれらの細胞を用いて、本来は別のシグナルを伝えるアクチビン A が、FOP 細胞では BMP シグナルを異常に伝達していることを明らかにしました。また、FOP-iPS 細胞から作製した間葉系間質細胞 (FOP-iMSC) をアクチビン A 発現細胞と共に免疫不全マウスに移植することで、患者さん由来細胞を用いた異所性骨形成モデルの作製にも成功していました (参照: [CiRA プレスリリース 2015/12/01](#))。

今回の研究では、FOP-iPS 細胞を用いて化合物を探索するハイスループットスクリーニングシステムを構築し、アクチビン A によって引き起こされるシグナルがどのように伝達されているのか調べるとともに、治療薬候補の探索を試みました。

### 3. 研究結果

#### 1. ハイスループットスクリーニングによる薬剤候補物質の絞込

FOP-iPS 細胞にアクチビン A のシグナルに反応して誘導される軟骨分化の程度を発光で検出する仕掛けを施した細胞 (FOP-5xA-Luc-iPSC) を用意しました。その細胞を間葉系間質細胞へと分化させ、そこに 6809 種類の化合物を与えて発光強度を測定し、アクチビン A 添加後の軟骨分化をそれぞれの化合物がどの程度阻害しているのか調べました。すると、40%以上阻害した化合物が 549 種類ありました (Fig. 1)。そこからさらに、細胞毒性が低く、阻害作用が強いもの 76 種類に絞り込みました。それらの化合物を機能から 18 のグループに分け、特に 5 種類の化合物が含まれる mTOR 阻害剤のグループに着目して研究を進めました。

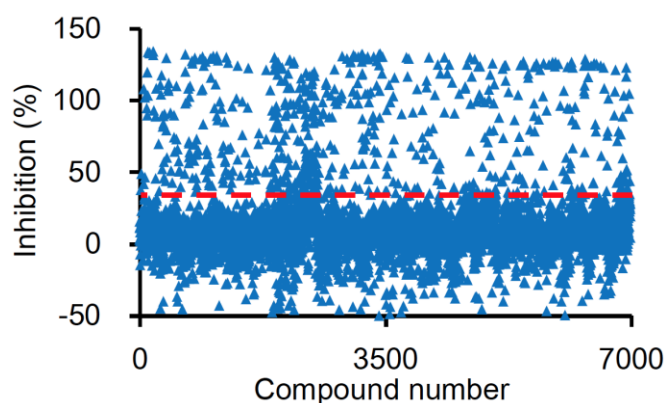


Fig.1 一次スクリーニング

各化合物がどの程度軟骨分化阻害作用があるのかを示している。

#### 2. ラパマイシンが異所性骨化を抑制する

FOP-iPS 細胞から作製した間葉系間質細胞 (FOP-iMSC) をマウスに移植した異所性骨を形成するモデルを使い、mTOR シグナルを抑制する化合物の効果について調べました。アクチビン A 刺激により作られる異所性骨の形成は、mTOR の阻害剤であるラパマイシン (Rapamycin) を投与することで抑えられました (Fig. 2)。

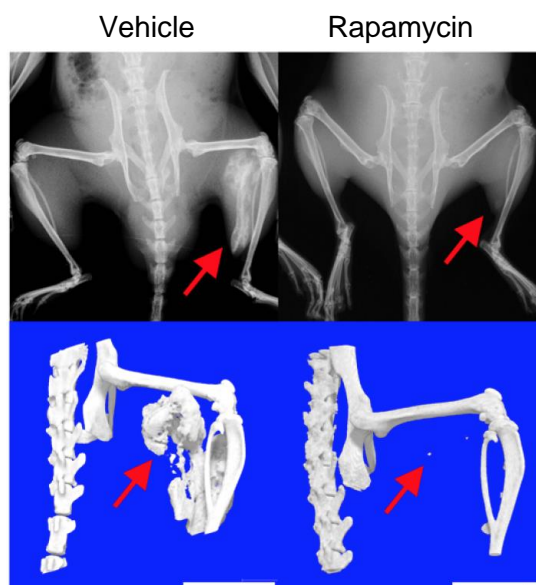


Fig. 2 マウスでの異所性骨形成の様子

Vehicle: アクチビン A 刺激のみ

Rapamycin: アクチビン A 刺激に加えラパマイシンを投与  
矢印の付近にアクチビンの刺激を与えた。

3. アクチビン A の刺激は ENPP2 を介して mTOR シグナルを活性化する

DNA マイクロアレイ解析を用いて、FOP-iMSC での遺伝子発現量の変化を調べました。アクチビン A の刺激により発現量が大きく変化した遺伝子のうち、もともとの骨形成に関与している BMP-7 や TGF-β3 により発現量が影響を受けていない 70 種の遺伝子 (Fig. 3) に注目して、その発現量を調べたところ、ENPP2 という遺伝子が最も大きく変動していました。ENPP2 は mTOR シグナルを活性化することが知られています。さらに、アクチビン A によって高まった mTOR シグナルは ENPP2 阻害剤や RNA 干渉により抑制されました。以上の結果から、アクチビン A によって FOP 患者さんの ACVR1 が活性化され、ENPP2 というタンパク質を介して mTOR シグナルを活性化し、異所性骨を作らせるという分子メカニズムがわかりました (Fig. 4)。

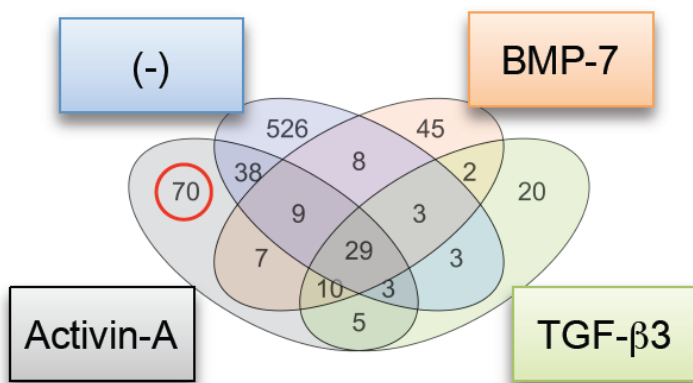


Fig. 3 FOP-iMSC で resFOP-iMSC より発現量が多い遺伝子の数

(-): 刺激なし

Activin-A: アクチビン A 刺激した場合

BMP-7: BMP-7 で刺激した場合

TGF-β3: TGF-β3 で刺激した場合

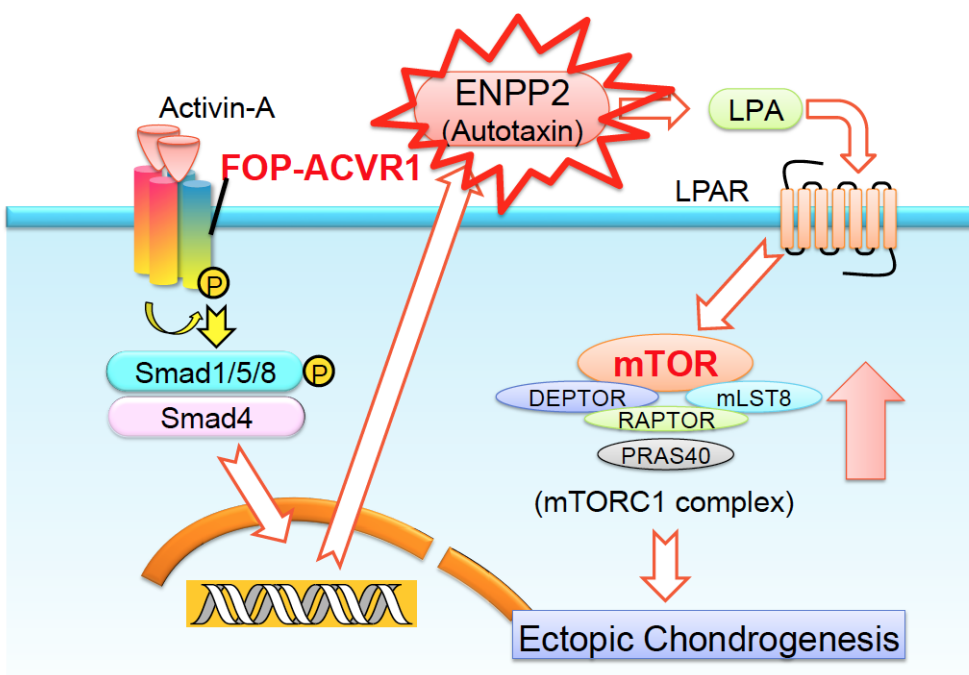


Fig. 4 今回の結果から考えられる分子メカニズムのモデル

#### 4. まとめ

今回の成果により、FOPにおける異所性骨化は、アクチビン A が変異型 ACVR1 に作用し、ENPP2 というタンパク質が作られ、mTOR のシグナルを活発にすることが原因であるという分子メカニズムが明らかになりました。また異所性骨化を抑える薬剤として mTOR 阻害剤であるラパマイシンが有効である可能性が示されました。

#### 5. 論文名と著者

##### ○ 論文名

“Enhanced mTOR signaling triggered by Activin-A in chondrogenesis of fibrodysplasia ossificans progressive”

##### ○ ジャーナル名

The Journal of Clinical Investigation

##### ○ 著者

Kyosuke Hino<sup>1,2</sup>, Kazuhiko Horigome<sup>1,2</sup>, Megumi Nishio<sup>3</sup>, Shingo Komura<sup>1,4</sup>, Sanae Nagata<sup>1</sup>, Chengzhu Zhao<sup>1</sup>, Yonghui Jin<sup>3,5</sup>, Koichi Kawakami<sup>6,7</sup>, Yasuhiro Yamada<sup>1,8</sup>, Akira Ohta<sup>1</sup>, Junya Toguchida<sup>1,3,5,9</sup> and Makoto Ikeya<sup>1</sup>

##### ○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)
2. 大日本住友製薬株式会社
3. 京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
4. 岐阜大学大学院医学系研究科
5. 京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター (iACT)
6. 国立遺伝学研究所
7. 総合研究大学院大学
8. 京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS)
9. 京都大学大学院医学研究科

#### 6. 本研究への支援

本研究は、下記機関より資金的支援を受けて実施されました。

- 日本学術振興機構 科学研究費補助金
- 文部科学省「再生医療の実現化プロジェクト」
- JST/AMED 「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」
- JST/AMED 「iPS 細胞研究中核拠点」
- AMED 「創薬基盤推進研究事業」
- iPS 細胞研究基金
- JST 研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP)
- AMED 「難治性疾患実用化研究事業」

## 7. 用語説明

### 注 1) アクチビン A

TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ; トランスフォーミング増殖因子  $\beta$ )ファミリーに属するタンパク質で、細胞増殖や分化など多くの生理機能を調節する作用を持つ。

### 注 2) BMP (Bone Morphogenetic Protein; 骨形成因子)

骨組織や軟骨組織の分化を誘導、促進するタンパク質。TGF- $\beta$  スーパーファミリー<sup>注 7)</sup>に属する。

### 注 3) mTOR (mechanistic target of rapamycin)

免疫抑制剤ラパマイシンの標的分子として発見されたタンパク質。哺乳類などの動物で細胞内シグナル伝達に関与するタンパク質の一種。活性化するとタンパク質の合成を増加させたり、分解を抑制したり、細胞分裂などの調節に中心的な役割を果たすと考えられている。

### 注 4) ラパマイシン

移植した臓器が拒絶される事を防ぐため等に使われている薬。免疫抑制機能を持っている。細胞内では mTOR の活性を阻害する効果がある。

### 注 5) ACVR1 (Activin receptor type-1)

BMP 受容体の一部を構成するタンパク質で、BMP と結合することにより骨形成のシグナルを伝達する。アクチビン A とは、結合はするがシグナルは伝えないことが知られていた。FOP 罹患者は ACVR1 遺伝子の変異により、ACVR1 タンパク質の 206 番目のアルギニンがヒスチジンに変化し、アクチビン A との結合で本来伝えないはずの BMP シグナルを伝えるということが、同グループの先行研究でわかっていた。

### 注 6) ハイスループットスクリーニング

多数の化合物の中から有効な化合物を見つけるための手法。

### 注 7) TGF- $\beta$ スーパーファミリー

TGF- $\beta$ 、BMP、アクチビンなど構造上類似した因子で構成される集合体の総称。スーパーファミリーには他に、免疫グロブリンスーパーファミリー、核ホルモン受容体スーパーファミリーなどが存在する。