

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）進行性骨化性線維異形成症に対する新規治療薬の開発  
（英 語）Development of new therapeutic drug for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva

研究開発実施期間：2015年11月10日～2018年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）戸口田淳也  
（英 語）Toguchida, Junya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）京都大学ウイルス・再生医科学研究所/iPS細胞研究所  
（英 語）Institute for Frontier Life and Medical Sciences/Center for iPS Cell Research and Application,  
Kyoto University

## II 研究開発の概要

【背景】進行性骨化性線維異形成症(Fibrodysplasia Ossificans Progressiva、FOP)は、進行性の異所性骨化を特徴とする疾患であり、本邦の患者数は約 70 名という極めて希な遺伝性疾患である。病態はフレアアップと呼ばれる有痛性の炎症性腫脹の出現を起点に段階的に悪化する。原因遺伝子は骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein、BMP)の I 型受容体の一つである ACVR1/ALK2 遺伝子であり、患者の約 95%が R206H という同一のアミノ酸置換型変異を有している。原因遺伝子は解明されているが、発症機構が解明されていないために、進行を抑制する治療法は無く、現在可能な治療は全て対症療法である。そこで我々は FOP 患者の体細胞から iPS 細胞を樹立し、病態の解明から創薬を目指して研究を行い、フレアアップの際に異所性骨を誘導する因子としてアクチビン A を同定した。アクチビン A は正常細胞においては TGF $\beta$  シグナルを伝達し、BMP シグナルは伝達しないが、FOP 細胞では変異 ACVR1/ALK2 受容体を介して BMP シグナルを伝達することが判明し、その結果、in vitro では未分化間葉系間質細胞から軟骨細胞への分化が亢進し、in vivo では異所性骨が形成された。更にその過程において mTOR 蛋白複合体が活性されること、そして mTOR 阻害剤の 1 つであるシロリムスが、アクチビン A による異所性骨化を in vitro 及び in vivo で抑制することを報告した。

【目的】本事業では上記の成果に基づいて、FOP に対する治療法を開発することを目的とし、下記の 2 課題に取り組んだ。

課題 1. 変異 ACVR1/ALK2 から mTOR 活性亢進を介して異所性骨化に至る分子機構を解明し、FOP 治療薬としてのシロリムスの科学的根拠を確立する。

課題 2. FOP に対するシロリムスの医師主導治験を計画・実践し、有効性・安全性の結果に基づいて、適応追加を申請する。

### 【成果】

#### 課題 1.

##### 1) 変異 ACVR1/ALK2 による mTOR 活性亢進の分子機構の解明

FOP 由来細胞と対照細胞を用いた培地を共有する培養実験系から、変異 ACVR1/ALK2 を介したアクチビン刺激により FOP-iPSC 由来の未分化間葉系間質細胞が mTOR 活性を亢進する蛋白を分泌していることを示唆する結果を得た。そこで網羅的遺伝子発現解析によりアクチビン刺激により FOP 細胞で特異的に発現が亢進している遺伝子群を同定し、その中の分泌蛋白をコードする遺伝子より、解析候補となる ENPP2 を選出した。ENPP2 は別名 Autotaxin と呼ばれる LPA の産生に関わる酵素である。ENPP2 の活性を阻害剤で阻害、あるいは遺伝子発現を siRNA で阻害すると、mTOR の活性が低下し、LPA を添加すると mTOR の活性が亢進した。これらのことから、ENPP2 がアクチビンによる mTOR 活性化に係わる因子の 1 つであることが判明した。

##### 2) 活性化 mTOR による内軟骨性骨化促進機構の解明

種々のシグナルによって活性化された mTOR 蛋白複合体は、下流の蛋白を活性化させることで、オートファジーの抑制、血管新生、細胞増殖等、様々な生物学的機能を果たすことが知られている。そこで mTOR の活性亢進から軟骨形成に至る分子機構を明らかにするために、個々の下流因子の in vitro における軟骨形成における役割を解析した。FOP 由来未分化間葉系間質細胞をアクチビン A で刺激した状態で、各因子の機能を阻害剤等で阻害したところ、X 遺伝子の発現を siRNA で阻害することにより、アクチビン A による軟骨基質形成が著しく低下することが判明した。X 遺伝子の発現阻害は同時に複数の軟骨関連遺伝子の発現低下を伴っており、X 遺伝子の機能が mTOR の活性亢進から軟骨形成に至る機構において必要な役割を果たしていることを示唆する結果が得られた。現在、更に詳細な解析を進めている。

## 課題 2.

### 1) FOP 患者の病歴データの収集・分析

FOP 患者の自然経過に関する情報は治験を計画する上で重要な点であるが、極めて限定されたものしかなかった。そこで事業参画機関である京都大学、東京大学及び名古屋大学において診療を受けている患者に関して 6 か月間の自然経過を観察する観察研究を計画した。内容は治験を念頭において、定期的に診察を行い、日常生活における活動性を評価する指標である Health Assessment Questionnaire (HAQ) を用いた身体機能の評価と CT により全身の異所性骨を定量的に評価することとし、それぞれの倫理委員会へ計画を申請し承認を受けた。承認取得後、京都大学では 3 名、名古屋大学では 6 名の患者を登録し、いずれも 1 年間の観察研究を終了することが出来たこれらの機関に加えて、東北大学医学部附属病院および鹿児島共済会南風病院で承認が得られ、それぞれ 2 名の患者が登録され、1 年間の観察研究を終了した。最終的に 13 例の観察研究が終了し、現在そのデータの解析を進めている。また同時に進めた患者由来 iPS 細胞の樹立に関しては、13 例中 6 例から iPS 細胞を樹立した。今後は、それぞれの経過と iPS 細胞を用いたアクチビン A に対する反応の相関を解析する予定である。

### 2) 治験計画の立案・申請

まず京都大学医学部附属病院臨床総合研究センター及び治験薬提供企業であるノーベルファーマ社の協力の基に、医師主導治験計画書を策定し、概要に関して事前面談を繰り返すことで PMDA との協議を進めた。当初は 24 週間の観察期間ののちに、24 週間の治験薬投与期間を設けるというプロトコルを計画していたが、やはり自然経過が多様であることから比較試験が必要との指示があり、プラセボを用いた 24 週間の二重盲検比較試験期とその後の 52 週まで全員に治験薬を投与する非盲検持続投与期の二段階のプロトコルへと変更となった。そのため、できるだけ多くの症例、特に予防薬という薬効を考慮した場合、今後異所性骨化が進行していく可能性のある小児を対象としたいと考え、本事業に参画した東京大学と名古屋大学に加えて、九州大学医学部附属病院整形外科に治験実施機関としての参画を依頼し、4 機関で 24 例を目標として実施することとした。エンドポイントに関しては、身体機能の維持が最も重要であることを考慮し、観察研究で用いた Health Assessment Questionnaire による評価を主要エンドポイントとして、CT 画像による定量的な新規骨化巣の評価等を副次エンドポイントに設定した。最終的に平成 26 年 8 月 5 日の段階で対面助言へと進むことの承諾を得た。その後、対面助言を受け最終的な治験計画書を作製し、平成 29 年 6 月 5 日京都大学医学部附属病院医薬品等臨床研究審査委員会に申請、6 月 19 日の審査会で一部修正要求があり、6 月 30 日に承認を受けた。それに基づいて 7 月 13 日に PMDA に治験届を提出、7 月 28 日調査が終了し、治験実施が可能となった。その後他機関での申請承認も進み、4 機関全てで治験審査委員会の承認が取得され治験を開始できる体制が整備され、まず京都大学において 9 月 7 日から治験を開始するに至った。

#### 【意義】

iPS 細胞の医療応用の大きな柱の 1 つが、遺伝性疾患の罹患者から iPS 細胞を樹立し、適切な分化誘導系を用いることで疾患の病態を *in vitro* で再現し、分子機構を解明するとともに、創薬への基盤を形成するという応用である。特に難治性の希少疾患に対する応用が進められており、本事業は其中で医師主導治験の開始まで至った最初の例である。また既に薬事承認が取得されている薬剤を他の疾患に応用するドラッグリパーパシグの実施例でもあり、今後の iPS 細胞を活用した難治性希少疾患の病態解明・創薬研究の指標となるものであり、大きな意義をもつ成果であると考えられる。

一方、アクチビン A による変異受容体の活性化から異所性骨形成過程の全貌は未だ明らかではない。本事業において、創薬の手がかりとなった mTOR 蛋白複合体は様々な細胞内シグナルの伝達因子であることから、同定した ENPP2 による活性化以外の機構の関与も考えられる。更に下流因子としても複数に関与していることが想定される。今回確立できた iPS 細胞を用いた *in vitro* のアッセイ系は、これらの課題に対する今後の研究において意義あるものと考えられる。

## <Background and Objectives>

Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) is a very rare genetic disease characterized by progressive general heterotopic ossification. The cause of this disease is a missense mutation of ACVR1/ALK2 gene encoding one of type I BMP receptors. There are no effective therapeutic drugs to prevent disease progression. To explore disease-mechanism and develop treatments, we have established iPS cells from FOP patients. We found that Activin-A erroneously transduces BMP signal through mutant ACVR1/ALK2 in FOP cells, which is transmitted via mTOR protein complex and induces heterotopic ossification in vivo. We also found that sirolimus, one of mTOR inhibitors, effectively inhibits the Activin-A-induced phenotype in vitro and also in vivo. The objectives of this project are to disclose the molecular pathway from the activation of mutant ACVR1/ALK2 to heterotopic ossification and to plan and perform the investigator initiated clinical trial of sirolimus for FOP.

## <Results>

### 1) Molecular mechanism of the activation of mTOR by Activin-A via mutant ACVR1/ALK2

Comprehensive gene expression analyses identified ENPP2 (autotaxin) as one of down-stream factor of Activin-A. ENPP2 produces LPA, which binds its receptor and activate mTOR via PI3K to AKT signal. Inhibition of ENPP2 significantly inhibited Activin-A induced chondrogenic differentiation, suggesting ENPP2 is one of important factors involving the mTOR activation by Activin-A in FOP cells.

### 2) Molecular mechanism of chondrogenesis by activated mTOR

We inhibited the function of each down-stream factor of mTOR and found that siRNA against gene X effectively inhibited the chondrogenesis triggered by Activin-A. Inhibition of gene X was associated with down-regulation of several genes related chondrogenesis, suggesting that the function of gene X plays an important role in chondrogenesis by activated mTOR.

### 3) Data collection and analyses of natural history of FOP patients

Natural course of FOP patients are important information for planning clinical trial, but only few data have been reported. Therefore we designed an observation study in which patients were checked once in every three months for one year and physical activity was scored by health assessment questionnaire and heterotopic ossification was measured by whole body CT scan. A total of 13 patients in four institutes participated this study, and we are now analyzing the data.

### 4) Planning and application of investigator initiated clinical trial.

With the help of Institute for Advancement of Clinical and Translation Science, Kyoto University Hospital, we have designed the clinical trial and negotiated with PMDA. The final version of protocol consisted of two stages: the first stage is placebo-control randomized double-blind comparison test for 24 weeks and the second stage is open-label continuous administration stage until 52 weeks. The final form of application was approved by the IRB for clinical trials in Kyoto University Hospital, and submitted to PMDA and finally the clinical trial started in September 2017.

## <Significance>

This is the first clinical trial of therapeutic drug that is identified by the basic research using patient-derived iPSCs. It is also one of examples of drug repurposing approach for intractable rare diseases, and therefore the process of this project provided important information for future similar studies. Although precise mechanisms how Activin-A induces heterotopic ossification is still to be investigated, we have found that mTOR plays a central role and our system using patient-derived iPSCs is useful for further investigation.