

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) 疾患特異的 iPS 細胞を用いて同定した FGFR3 異常症の治療薬候補スタチンの治験に必要な非臨床試験と病態解明  
(英語) Preclinical study and elucidation of the mechanism of statin found by screening using iPS cells as therapeutic drug for FGFR3 disorders.

研究開発担当者 (日本語) 兵庫医科大学医学部 教授 澤井 英明  
所属 役職 氏名： (英語) Hyogo College of Medicine, School of Medicine, Professor, Hideaki Sawai

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

1)

分担研究 (日本語) 非臨床試験 (特に有効性試験) と病態解明研究の実施  
開発課題名： (英語) Preclinical tests and analysis of disease mechanisms

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所 教授 妻木 範行  
所属 役職 氏名： (英語) Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Professor, Noriyuki Tsumaki

2)

分担研究 (日本語) ACH 治験プロトコールの作成  
開発課題名： (英語) To design a clinical trial for achondroplasia

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院医学系研究科小児科学 教授 大菌 恵一  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Pediatrics Osaka University, Graduate School of Medicine, Professor, Keiichi Ozono

3)

分担研究 (日本語) 疾患特異的 iPS 細胞の提供

開発課題名: (英語) Provision iPS cells

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所 教授 戸口田淳也

所属 役職 氏名: (英語) Junya Toguchida, M.D., Ph. D. Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University

4)

分担研究 (日本語) 非臨床試験と治験プロトコールについての助言

開発課題名: (英語) Assistance of preclinical study planning and clinical protocol

研究開発分担者 (日本語) 兵庫医科大学 教授 大門貴志

所属 役職 氏名: (英語) Hyogo College of Medicine, Professor, Takashi Daimon,

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 【概要】

骨系統疾患の一つである軟骨無形成症 (ACH と略) とタナトフォリック骨異形成症 (TD と略) は FRGR3 遺伝子変異で起こり、成長軟骨の異常により骨幹端異形成を示す、現在は有効な治療薬がない疾患である。妻木グループは、患者の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を分化誘導して軟骨組織を形成し、疾患特異的 iPS 細胞による in vitro の FRGR3 異常症疾患モデルを構築した。また、この細胞モデルを用いて、スタチンが FGFR3 異常症の治療に有効である可能性を示した。

FGFR3 異常症の治療薬の候補として、スタチンを開発することを目的に、基礎研究と薬剤のレビューから、候補薬をピタバスタチンと決定した。そしてピタバスタチンを用いた非臨床試験を実施した。スタチンの治験を実施できるようになれば、ドラッグ・リポジショニングとして効率的な開発となる。スタチンの作用機序の解明を並行して進めて、コレステロール代謝に影響しない、薬剤の探索を行った。また並行して治験のプロトコールの検討を行った。それらのデータをもとに第 1 回の PMDA の対面助言を実施できた。その結果を踏まえて非臨床試験の追加と作用機序解明の研究を実施継続した。

### 【PMDA 対面助言】

PMDA の対面助言にて、最大の問題となったのが、安全性試験である。ピタバスタチンは日本では 10 歳以上の小児で家族性高コレステロール血症の治療薬として承認されている。しかし、本研究で予定している治験は軟骨無形成症であれば 4 歳、遅くとも 6 歳、タナトフォリック骨異形成症では出生直後からの投与を考えている。その場合に PMDA より大型動物を用いた安全性試験の実施を求められている。これについてはビーグル犬を想定しているが、実施費用が極めて高額となり、本研究の予算では対応困難である。

この高額な研究費を別予算より充当する場合には、治験での効果が間違いなく示されることをより確実にする必要があるので、非臨床試験の有効性試験でより確実に効果が示されることを目標に有効性試験を中心に実施し、並行して病態解明を実施した。

#### 【非臨床試験と作用機序解明】

非臨床試験については、スタチン暴露量をヒトと揃えたときに、マウスに対してどのような作用が生じるかを調べる必要がある。暴露量は血中濃度とした。そのために、ヒトでの有効血中濃度と同等の血中濃度をマウスで得るのに必要なスタチンの投与量を知るために、マウスに対して種々の量のスタチンを経口または皮下または腹腔内投与し、その時々々の血中濃度を調べた。これにより得られた投与量の下で、モデルマウスにスタチンを投与し、有効性を調べた。また、より正確な非臨床試験を行うために、既存のモデルマウスよりも疾患の病態をより忠実に再現するモデルマウスの作製を計画した。

スタチンの作用機序については、スタチンがHMG-CoA還元酵素を阻害することにより、それによる代謝産物が減少することを考えた。そこで、HMG-CoA還元酵素の活性を制御する分子の阻害剤、代謝産物の活性を阻害する化合物を候補に挙げた。疾患 iPS 細胞由来軟骨の系に、これらの阻害剤や化合物を添加し、軟骨形成が回復するか否かを評価した。代謝産物の一つの阻害剤を添加することにより、疾患 iPS 細胞由来軟骨が回復した。そこで、産物の転移酵素をコードする遺伝子のノックアウトマウスを入手し、軟骨無形成症モデルマウスと交配して、表現型の回復が認められるかの実験を行った。これらの阻害剤や化合物の評価を通して、より選択的に代謝物の産生を制御することで副作用が少なくなると見込まれる新規治療薬の探索に必要な情報を得ていく。

#### 【治験プロトコール】

ACHモデルマウスを対象とする非臨床試験の研究デザインのコンサルテーションを行っている。まだ、臨床試験に進めないで、スタチンと他の薬剤の併用による効果などを、*in vitro*, *in vivo* で検証した。

#### 【Summary】

Achondroplasia (abbreviated as ACH) and Thanatophoric dysplasia (abbreviated as TD), one of the skeletal dysplasias, occur in the *FRGR3* gene mutation and show metaphyseal dysplasia due to abnormal growth cartilage and is a disease without an effective therapeutic agent. The Tsumaki group developed iPS cells from the patient's skin fibroblasts to form cartilage tissue and constructed an *in vitro* *FRGR3* abnormality disease model with disease-specific iPS cells. In addition, using this cell model, it was shown that statins may be effective for treating *FGFR3* abnormality.

As a candidate for a therapeutic drug for *FGFR3* abnormality disease, candidate drug was determined as pitavastatin from basic research and drug review with the aim of developing statins. We conducted nonclinical studies using pitavastatin. If it becomes possible to conduct a statin trial, it will be an efficient development as drug repositioning. In parallel with the elucidation of the mechanism of action of statins, we searched for drugs that do not affect cholesterol metabolism. In parallel, we examined protocols for clinical trials. Based on these data, PMDA's face-to-face advisory of the first round could be carried out.

### **【PMDA face-to-face advise】**

In PMDA's face-to-face counseling, the biggest problem was safety testing. Pitavastatin is approved as a treatment for familial hypercholesterolemia in children older than 10 years in Japan. However, the trial planned in this study is 4 years old at the age of 4 years, 6 years old at the latest if it is achondroplasia, we are considering administration immediately after birth in Thanatophoric dysplasia. In that case, PMDA is required to conduct safety testing using large animals. Although this is assumed to be a Beagle dog, implementation cost is extremely high, and it is difficult to deal with this research budget.

Where this expensive research fee is to be applied from another budget, it is necessary to make sure that the effect in the trial will definitely be shown more reliably, so it will be more effective in the effectiveness test of nonclinical trials. We focused on efficacy testing with the goal of doing things, and clarified the pathology in parallel.

### **【Nonclinical study and action mechanism clarification】**

For nonclinical studies, it is necessary to investigate what action is taken on mice when aligning statin exposure with humans. The exposure level was taken as blood concentration. Therefore, in order to know the dose of the statin necessary for obtaining in the mouse the blood concentration equivalent to the effective blood concentration in humans, various amounts of statin are orally or subcutaneously or intraperitoneally administered to mice. And examined the blood concentration at each occasion. Statins were administered to the model mice under the dosage obtained thereby, and the effectiveness was examined. In addition, in order to conduct more accurate nonclinical studies, we planned to prepare model mice that reproduce disease pathology more faithfully than existing model mice.

Regarding the mechanism of action of statins, we considered that statins inhibit HMG-CoA reductase, thereby reducing metabolites. Therefore, candidates include inhibitors of molecules that control the activity of HMG-CoA reductase, and compounds that inhibit the activity of metabolites. These inhibitors and compounds were added to diseased iPS cell derived cartilage system to evaluate whether cartilage formation recovered or not. By adding one inhibitor of the metabolite, diseased iPS cell derived cartilage was recovered. Therefore, knockout mice of the gene encoding the transferase of the product were obtained and crossed with achondroplasia model mouse to examine whether phenotypic recovery was observed. Through evaluation of these inhibitors and compounds, we will obtain information necessary for searching for new therapeutic agents that are expected to reduce side effects by controlling the production of metabolites more selectively.

### **【Clinical Protocol】**

We are consulting research design of nonclinical studies targeting ACH model mice. We still can not proceed to clinical trials, so we validated the effects of combined use of statins and other drugs in vitro and in vivo.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 8 件、国際誌 9 件）

1. Takahashi Y, Sawai H, Murotsuki J, Satoh S, Yamada T, Hayakawa H, Kouduma Y, Sase M, Watanabe A, Miyazaki O, Nishimura G. Parental serum alkaline phosphatase activity as an auxiliary tool for prenatal diagnosis of hypophosphatasia. *Prenat Diagn.* 2017 May;37(5):491-496.
2. Miyazaki O, Sawai H, Yamada T, Murotsuki J, Nishimura G. Follow-Up Study on Fetal CT Radiation Dose in Japan: Validating the Decrease in Radiation Dose. *AJR Am J Roentgenol.* 2017 Apr;208(4):862-867.
3. Saito T, Nagasaki K, Nishimura G, Wada M, Nyuzuki H, Takagi M, Hasegawa T, Amano N, Murotsuki J, Sawai H, Yamada T, Sato S, Saitoh A. Criteria for radiologic diagnosis of hypochondroplasia in neonates. *Pediatr Radiol.* 2016 Apr;46(4):513-8.
4. Calongos G, Hori M, Ogino M, Sawai H. A Case of Thanatophoric Dysplasia Type I with Fetal Hydrops in the First Trimester. *Case Rep Obstet Gynecol.* 2016;2016:1821230.
5. 妻木範行,細胞変換技術による軟骨疾患研究の進展開, 大阪医学第 47 巻第 1 号 (通称第 77 号) ,2016,9-15.
6. 妻木範行,iPS 細胞技術を使った軟骨疾患研究, 最新医学第 71 巻・第 8 号 (通巻 913 号) ,2016,132-7.
7. 大藪恵一,大理石骨病,今日の整形外科治療指針,2016,P251.
8. Ohata Y,Ozono K,Michigami T, Current concepts in perinatal mineral metabolism, *Clin Pediatr Endocrinol* 2016,25 (1) : 9-17.
9. 大藪恵一, 低ホスファターゼ症, 小児科,2016, 57 (3) : 225-261.
10. 大藪恵一, 低ホスファターゼ症の治療薬開発, 内分泌・糖尿病・代謝内科, 2016, 42 (3) : 203-207.
11. Bishop N, Munns CF, Ozono K, Transformative therapy in hypophosphatasia, *Arch Dis Child* ,2016, 101(6) : 514-5.
12. 大藪恵一, 低ホスファターゼ症, 最新医学, 2016, 71 (10) : 57-62.
13. 大藪恵一, 骨発育, 小児疾患診療のための病態生理, 2016,48 (601) : 584-588.
14. 河野智敬, 鈴木秀一, 小澤綾子, 会津克哉, 道上敏美, 大藪恵一, 望月弘, 経過良好な低ホスファターゼ症の臨床像と遺伝学的診断, 日本小児科学会雑誌 2016,120 (7) : 1066-1071.
15. Okazaki Y, Kitajima H, Mochizuki N, Kitaoka T, Michigami T, Ozono K, Lethal hypophosphatasia successfully treated with enzyme replacement from day 1 after birth, *Eur J Pediatr*, 2016,175:433-437.
16. Whyte MP, Rockman-Greenberg C, Ozono K, Riese R, Moseley S, Melian A, Thompson DD, , Bishop N, Hofmann C,Asfotase alfa treatment improves survival for perinatal and infantile hypophosphatasia, *J Clin Endocrinol Metab*, 2016
17. Kimura T, Yamashita A, Ozono K, Tsumaki N, Limited immunogenicity of human induced pluripotent stem cell-derived cartilages, *Tissue Eng Part A.* 2016 Oct 31.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Application of iPSC technology to disease modeling for chondrodysplasia,口頭, Noriyuki Tsumaki, The 5th International Research Conference on Multiple Hereditary Exostoses (MHE Research Foundation), 2016/5/19-22,国外.
2. Application of iPS cell technologies to cartilage regeneration and disease modeling, 口頭, Noriyuki Tsumaki, Swiss-Kyoto Joint Symposium, 2016/6/13,国外.
3. iPS 細胞を使った軟骨疾患研究の新展開, 口頭,妻木範行,昭和大学歯学部口腔生化学講座セミナー, 2016/7/7,国外.
4. 疾患 iPS 細胞モデルを使った骨系統疾患の治療薬の探索, 口頭, 妻木範行,第 50 回日本小児内分泌学会学術集会 [JSPE] 第 9 回 アジア太平洋小児内分泌学会 [APPES] 総会, 2016/11/17,国内.
5. Establishment of a human growth plate model with iPS Cell-derived cartilage, 口頭,木村武司, 妻木範行, 第 50 回日本小児内分泌学会学術集会 [JSPE] 第 9 回 アジア太平洋小児内分泌学会 [APPES] 総会,2016/11/18-19,国内.
6. ラット骨端線への iPS 細胞由来軟骨 particle 移植, ポスター, 小林与人, 妻木範行,第 7 回 Orthopedic Research Club, 2016/11/19,国外.
7. 骨系統疾患の疾患 iPS 細胞モデルと創薬研究, 口頭, 妻木範行,第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30,国内.
8. iPS 細胞を用いた骨系統疾患研究, 口頭,妻木範行,第 24 回母子医療センターシンポジウム, 2017/2/17,国内.
9. 骨系統疾患の治療の現状と今後の薬剤開発,口頭, 大藪恵一,第 89 回日本内分泌学会学術総会,2016.04.21-23,国内
10. 骨系統疾患の診断と治療の最前線,口頭, 大藪恵一, 第 40 回日本口蓋裂学会総会・学術集会, 2016.05.26-27,国内
11. 石灰化障害を伴う疾患の病態と治療,口頭, 大藪恵一,第 11 回しまなみ骨・関節フォーラム,16.06.30,国内
12. Sawai H. Survey of long survival cases of thanatophoric dysplasias.(General Lecture) 20th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy 2016.7 Berlin 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし