

進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化に対する既認可カルシウムチャンネルブロッカーの骨化抑制効果に関する研究

研究分担者 鬼頭 浩史 名古屋大学大学院医学系研究科整形外科 講師

研究要旨 変異型 *ALK2* 強制発現ベクター、および *Id1* (BMP シグナルの標的遺伝子) プロモーターのレポーターベクターを遺伝子導入したマウス筋芽細胞株に、1040 種類の米国食品医薬品局 (FDA) 認可薬を添加したところ、2 種類のカルシウムチャンネルブロッカーが *Id1* のプロモーター活性を濃度依存性に低下させることを確認した。

A. 研究目的

進行性骨化性線維異形成症 (FOP) では、炎症などを契機として骨形成タンパク (BMP) のレセプターである *ALK2* の恒常的活性化が生じ、その標的遺伝子である *Id1* の発現が促進することにより異所性骨化が進行する。現在のところ、FOP における進行性の骨化を抑制する有効な治療法はない。本研究の目的は、*Id1* 遺伝子のプロモーター領域に作用し、その発現を抑制する薬剤を薬効スクリーニング法により同定することである。

B. 研究方法

マウス筋芽細胞株 C2C12 は BMP 刺激によりアルカリフォスファターゼ (ALP) 陽性の骨芽細胞様細胞に分化する。変異型 *ALK2* ベクター、*Id1* の promoter を結合したルシフェラーゼレポーターベクター、転写調節ベクターを C2C12 に co-transfection した後、1040 種類の米国食品医薬品局 (FDA) 認可薬を添加して *Id1* promoter に対するルシフェラーゼアッセイを行い、*Id1*

promoter 活性を低下させる薬剤の同定を試みた。同定した薬剤の in vitro における骨芽細胞への分化抑制効果は、ALP の測定により評価した。また、薬剤による BMP シグナルの細胞内発現の抑制効果は、BMP の細胞内シグナル分子 Smad の Western blotting 法にて評価した。

C. 研究結果

複数回にわたりスクリーニングを施行して結果を統計的に解析したところ、2 種類のカルシウムチャンネルブロッカーが *Id1* のプロモーターを抑制する薬剤であることを確認した。両薬剤ともに、濃度依存性に *Id1* のプロモーター活性および mRNA の発現を抑制した。また ALP 活性も同様に、これらの薬剤により濃度依存性に低下した。さらに、Smad のリン酸化を Western blotting で検討したところ、一方の薬剤は Smad のリン酸化を抑制したのに対し、他方ではリン酸化抑制作用は認めなかった。

D. 考察

FOP における異所性骨化予防薬に関する研究では、dorsomorphin という BMP 特異

的 blocker や、それより毒性が低く阻害効果が強い LDN-193189 という低分子化合物などの報告があるが、臨床応用には安全性が問題となる。本研究では、既存の薬剤の持つ未知の薬効に期待するスクリーニング法により、心血管疾患で使用実績のある2種類のカルシウムチャンネルブロッカーが細胞レベルで FOP における骨化シグナルを抑制しうることを示した。これら薬剤の安全性は担保されているため、研究成果の臨床応用が早期に可能となる。

一方の薬剤は Smad のリン酸化を抑制したのに対し、他方ではリン酸化に影響を及ぼさなかったため、これら薬剤は異なる作用機序を有すると思われる。今後、これらの薬剤の作用機序を細胞レベルで明らかにするとともに、動物実験により in vivo における骨組織形成抑制効果の検討をさらに進める必要がある。

FOP では外科的侵襲は炎症を惹起するため禁忌とされているが、FOP における異所性骨化を抑制する薬剤が同定されれば、新たな骨化の予防に役立つだけでなく、その薬剤の術前投与により、異所性骨化の外科的切除が可能になるかもしれない。また、異所性骨化による開口障害や胸郭運動制限を予防することで、FOP 患者の予後改善に結びつく可能性もある。

E. 結論

2 種類の既認可カルシウムチャンネルブロッカーは、FOP の遺伝子変異を導入したマウス筋芽細胞株において、*Id1* 遺伝子のプロモーター活性および ALP 活性を抑えた。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

- 山本隆一郎、鬼頭浩史、石黒直樹、増田章男、大野欽司. 進行性骨化性線維異形成症における骨化予防薬の検討—薬効スクリーニング法を用いて— 第24回東海小児整形外科懇話会 2009. 2. 14 (名古屋)
- 山本隆一郎、鬼頭浩史、石黒直樹、増田章男、大野欽司、片桐岳信. 進行性骨化性線維異形成症における骨化予防薬の検討. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会 2009. 11. 5-6 (横浜)
- 鬼頭浩史、山本隆一郎、片桐岳信、大野欽司、石黒直樹. 進行性骨化性線維異形成症における骨化予防薬の検討. 第21回日本整形外科学会骨系統疾患研究会 2009. 12. 5 (松山)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他