



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ALK2の異常を有する細胞増殖性疾患において、KDM6B又はANKS1Bの発現抑制もしくは活性低下により、疾患における細胞の異常増殖を抑制し治療を行うことを特徴とする薬剤

## 【請求項 2】

前記細胞増殖性疾患が、骨芽細胞の増殖性疾患であることを特徴とする請求項 1 に記載の薬剤

## 【請求項 3】

前記骨芽細胞の増殖性疾患において、異所性骨化を症状として有することを特徴とする請求項 2 に記載の薬剤

10

## 【請求項 4】

前記骨芽細胞の増殖性疾患が、進行性骨化性線維形成症、又は、黄色靭帯骨化症であることを特徴とする請求項 2 に記載の薬剤

## 【請求項 5】

前記細胞増殖性疾患が、癌細胞の増殖性疾患であることを特徴とする請求項 1 の薬剤

20

## 【請求項 6】

前記癌細胞の増殖性疾患が、グリオーマであることを特徴とする請求項 5 に記載の薬剤

## 【請求項 7】

癌において、ANKS1Bの異常発現または変異を調べることにより、ヒストンH3K27のメチル化・脱メチル化を作用機序とする癌治療薬剤の有効性を評価することを特徴とするインビトロ診断方法

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ALK2に異常を有する細胞増殖性疾患の治療薬剤、ならびに、ANKS1Bの異常発現ないし変異を調べることにより、癌治療薬剤の有効性を評価するインビトロ診断方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia ossificans progressiva, 以下、「FOP」) は、全身の軟部組織や筋肉が進行性に骨化する疾患である。FOPでは、この進行性の骨化により、四肢における関節の可動性が低下したり、背中の変形などが生じる。

40

## 【0003】

最近の研究によりFOPは、ALK2 (activin receptor-like kinase 2) における遺伝子の点変異により惹起される疾患であることが明らかとなってきた。

ALK2は、骨誘導因子として知られるBMP (bone morphogenetic protein) の1回膜貫通型受容体として機能するリン酸化酵素である。通常、ALK2は、細胞外領域でBMPと結合することにより活性化され、細胞内に骨形成シグナルを伝達する。FOP患者では、このALK2の遺伝子に点変異が起こり、R206HやG356Dと呼ばれる変異型のALK2タンパクが生じる。これらの変異型ALK2は、細胞外領域におけるBMPと結合しなくても活性化されており、常に、骨形成シグナルを伝達してしまう。結果として、骨誘導が異常に促進され、軟部組織や筋肉等の骨化が進行してしまうことが明らかとなっている。

50

## 【 0 0 0 4 】

このように、FOPの原因ならびにその病態メカニズムは、少しずつ明らかになってきており、研究は着実に進展している。しかしながら、FOPでは、未だ、有効な治療法が確立されていないのが現状である。そのため、FOPでは、乳児期から学童期にかけて発症し、40歳ぐらいまでには拘束性の呼吸障害によって高い確率で死亡してしまう。このような事情から、FOPは、難治性疾患として指定されている。

## 【 0 0 0 5 】

一方、KDM6B (Lysine (K)-Specific Demethylase) は、ヒストンH3の27番目のリジン (以下、リジンのアミノ酸一文字表記を用いて「ヒストンH3K27」と略する。以降においてKの後に続く数字は、ヒストンH3における配列順を示す。) の脱メチル化を担う酵素であり、

10

エピジェネティックに遺伝子制御を行う機能を有する。  
また、ANKS1B (Ankyrin Repeat And Sterile Alpha Motif Domain Containing 1B) は、複数のサブタイプが報告されており、腎臓癌やオリエール病などの関与が明らかとなっている (非特許文献1, 非特許文献2)。

これらKDM6BとANKS1Bの関連性、およびこれら分子とFOPとの関連性については、これまで明らかとなっていなかった。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 1 3 / 0 3 9 0 8 7 号

20

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Eckel Passow et al. BMC Urol. Jan 31;14:14. doi: 10. 1186 / 1471-2490-14-14.

【 非特許文献 2 】 Pansuriya TC et al. Orphanet J Rare Dis. 2011 Jan 14;6:2. doi: 10.1186 / 1750-1172-6-2.

【 非特許文献 3 】 Hamasaki M, Era T. et al. Stem Cells. 2012 Nov;30(11):2437-49. doi: 10.1002 / stem.1221.

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

30

## 【 0 0 0 8 】

発明者は、FOPの治療法として、iPS細胞 (induced pluripotent stem cells) を用いた研究を行い、FOP患者の皮膚線維芽細胞からはiPS細胞の樹立が困難なことを明らかにしている (特許文献1, 非特許文献3)。発明者は、この知見により、物質のスクリーニング方法にかかる発明を完成させたが、FOP患者の皮膚線維芽細胞において、なぜ、iPS細胞の樹立が困難であるかの根本的な原因は不明であった。

## 【 0 0 0 9 】

上記事情を背景として本発明では、FOP患者の皮膚線維芽細胞からiPS細胞の樹立が困難であることの原因を解明し、FOP患者における病態メカニズムをより明らかにするとともに、得られた知見を活かした新たな治療薬や治療方法、診断方法等の開発を課題とする。

40

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 0 】

発明者は、鋭意研究の結果、FOP患者においては、iPS細胞誘導時、ヒストンH3のK4ならびにK27におけるメチル化が低下していることを発見した。

さらに検討を行ったところ、このメチル化低下は変異型ALK2により引き起こされるBMPのシグナル異常によって惹起されること、および、ALK2の下流分子としてKDM6BおよびANKS1Bが関与していることを発明者は明らかにした。

また、発明者は、KDM6BないしANKS1B、これら分子の発現を抑制することにより、ヒストンH3K27のメチル化低下が抑制され、FOPにおけるiPS細胞誘導異常が回復すること、ならびに、骨芽細胞への分化が抑制されることを確認した。

50

これらより発明者は、KDM6BないしANKS1Bが、FOP治療等におけるターゲット分子となることを明らかにしたものである。

【0011】

また、発明者は、FOPと同じく、ALK2の遺伝子異常が知られているグリオーマ（主に、小児脳幹グリオーマ、Diffuse Intrinsic Pontine Glioma, DIPG）について、その異常を持つ細胞株を用いて同様の検討を行った。その結果、ANKS1Bの発現を抑制することにより、細胞増殖活性が低下すること、ならびにBMPシグナル活性を低下させること、そしてKDM6Bの発現低下が起こることを発明者は確認した。これにより発明者は、ANKS1BないしANKS1Bを介したKDM6Bの制御が、DIPGを含むグリオーマの治療等のターゲットになり得ることを明らかにした。

10

【0012】

これらの知見から発明者は、ALK2の異常を有する細胞増殖性疾患においてヒストンH3のK4ないしK27のメチル化が低下していること、そして、このメチル化低下のうち、K27におけるメチル化低下は、KDM6B直接、もしくはANKS1Bを介したKDM6Bの発現抑制もしくは機能阻害により、ヒストンH3K27のメチル化低下の抑制をメカニズムとした細胞増殖性疾患の治療を可能とする薬剤等の発明を完成させたものである。

【0013】

さらに発明者は、ANKS1BがKDM6Bの発現を調整することで、ヒストンH3K27の脱メチル化をコントロールしていることから、ANKS1Bが癌治療薬剤の有効性を評価しうるマーカーになりうることに着想したものである。

20

これまで、ANKS1Bの発現異常と遺伝子変異が、腎臓癌や肺癌、白血病などの疾患で起こることが報告されていたが、その生理学的意義は不明であった。上記知見より、発明者は、ANKS1Bの発現異常や遺伝子変異を有する疾患において、下記の事象が起こっていることに着想したものである。

(1) ANKS1Bの過剰発現や機能獲得型変異 (gain of function mutation) が生じる疾患では、ヒストンH3K27の脱メチル化が亢進している。

(2) 一方、ANKS1Bの発現低下や機能喪失型変異 (loss of function mutation) が生じる疾患では、ヒストンH3K27の脱メチル化が抑制されており、結果として、ヒストンH3K27のメチル化が亢進している。

【0014】

30

ヒストンH3K27のメチル化異常は、特に癌研究の分野において、癌の増殖と進展に強く関連していることがこれまで知られている。これより発明者は、ANKS1Bの発現異常や遺伝子変異を調べることにより、脱メチル化が亢進する異常ならば、脱メチル化酵素であるKDM6Bの阻害剤、メチル化が亢進する異常ならばメチル化酵素であるEzh2の阻害剤が適用となるといった、癌治療薬剤の有効性を評価しうるマーカーとなりうることに着想し、癌治療薬剤の有効性を評価するインビトロ診断方法にかかる発明を完成させたものである。

【0015】

加えて発明者は、ヒストンH3K27のメチル化低下を抑制することにより、FOP患者の皮膚線維芽細胞由来のiPS細胞樹立方法にかかる発明を完成させたものである。

【0016】

40

本発明は、下記の構成からなる。

本発明の第一の構成は、ALK2の異常を有する細胞増殖性疾患において、KDM6B又はANKS1Bの発現を抑制することにより、細胞増殖を抑制し治療を行うことを特徴とする薬剤である。

【0017】

本発明の第二の構成は、前記細胞増殖性疾患が、骨芽細胞の増殖性疾患であることを特徴とする第一の構成に記載の薬剤である。

本発明の第三の構成は、前記骨芽細胞の増殖性疾患において、異所性骨化を症状として有することを特徴とする第二の構成に記載の薬剤である。

本発明の第四の構成は、前記骨芽細胞の増殖性疾患が、進行性骨化性線維形成症、又は

50

、黄色靱帯骨化症であることを特徴とする第二の構成に記載の薬剤である。

【0018】

本発明の第五の構成は、前記細胞増殖性疾患が、癌細胞の増殖性疾患であることを特徴とする第一の構成の薬剤である。

本発明の第六の構成は、前記癌細胞の増殖性疾患が、グリオーマであることを特徴とする第五の構成に記載の薬剤である。

【0019】

本発明の第七の構成は、癌において、ANKS1Bの異常発現または変異を調べることにより、ヒストンH3K27のメチル化・脱メチル化を作用機序とする癌治療薬剤の有効性を評価することを特徴とするインビトロ診断方法である。

10

【発明の効果】

【0020】

本発明により、FOP患者における病態メカニズムがより明らかになり、治療薬剤の提供が可能となった。加えて、これにより得られたKDM6BならびにANKS1Bに関する新たな知見により、癌における治療薬剤ならびにインビトロ診断方法の提供が可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】FOP患者のiPS細胞誘導時におけるヒストンH3のメチル化の様子を示した図

【図2】各種遺伝子に対するshRNAを用いて、FOPのiPS細胞誘導頻度を比較検討した図

【図3】R206HならびにANKS1Bに対するshRNAを用いて、FOPのiPS細胞誘導頻度を比較検討した図

20

【図4】各種遺伝子に対するshRNAを用いて、骨芽細胞の分化度を比較した図

【図5】KDM6BならびにANKS1Bに対するshRNAを用いて、グリオーマ細胞株における増殖を比較した図

【図6】R206HならびにANKS1Bに対するshRNAを用いて、グリオーマ細胞株における各タンパクの発現を調べた図

【図7】ANKS1Bに対するshRNAを用いて、グリオーマ細胞株における各タンパク質の発現を調べた図

【図8】ANKS1Bの発現抑制等による治療効果を検討した結果を示した図

【発明を実施するための形態】

30

【0022】

以下、本発明の薬剤等について説明を行う。

【0023】

本発明は、下記の一連の知見に基づくものである。

(1) ALK2の異常を有する細胞増殖性疾患では、ヒストンH3K4ならびにK27のメチル化低下が起こっている。

(2) ヒストンH3K27のメチル化低下は、KDM6Bの過剰発現ないし異常活性化により、惹起される。また、KDM6Bの過剰発現を抑制等することにより、ヒストンH3K27のメチル化低下が抑制された結果、疾患における細胞の異常増殖も抑制される。

(3) KDM6Bの発現上昇等の現象は、ANKS1Bの過剰発現ないし異常活性化により、惹起される。また、ANKS1Bの過剰発現を抑制等することにより、KDM6Bの発現抑制等を介して、ヒストンH3K27のメチル化低下が抑制された結果、疾患における細胞の異常増殖も抑制される。

40

(4) ANKS1Bの過剰発現や機能獲得型変異 (gain of function mutation) が生じる疾患では、ヒストンH3K27の脱メチル化が亢進している。一方、ANKS1Bの発現低下や機能喪失型変異 (loss of function mutation) が生じる疾患では、ヒストンH3K27の脱メチル化が抑制されており、結果として、ヒストンH3K27のメチル化が亢進している。

(5) ヒストンH3K4ないしK27のメチル化低下を抑制することにより、FOP患者の皮膚線維芽細胞由来のiPS細胞の樹立が可能となる。

本発明についてはそれぞれ、薬剤が上記(1)から(3)、診断方法が(4)に基づくものであ

50

る。

【0024】

本発明の薬剤は、ALK2の異常を有する細胞増殖性疾患において、KDM6B又はANKS1Bの発現抑制もしくは活性低下により、細胞増殖を抑制し治療を行うことを特徴とする。

【0025】

ALK2の異常を有する細胞増殖性疾患とは、ALK2そのものの変異もしくは過剰発現により、細胞が異常に増殖する疾患として定義される。このような疾患としては、骨芽細胞が増殖する疾患、ないし癌細胞が増殖する疾患などが挙げられる。

骨芽細胞が増殖する疾患としては、異所性骨化を症状として有する疾患が挙げられ、具体的には、進行性骨化性線維形成症、又は、黄色靭帯骨化症などが挙げられる。

癌細胞が増殖する疾患としては、グリオーマ、ないし小児性グリオーマなどが挙げられる。

【0026】

KDM6B又はANKS1Bの発現抑制もしくは活性低下については、特に限定する必要はなく、種々の手法を採用することができる。例えば、KDM6BやANKS1Bに対するshRNAや抗体を用いたり、又は、これらの機能を阻害する低分子化合物など、種々の手法を用いて、KDM6B又はANKS1Bの発現抑制もしくは活性低下を行うことができる。また、これらshRNAや抗体、低分子化合物等が薬剤として機能する。

なお、本発明において、薬剤とは、KDM6B又はANKS1Bの発現抑制もしくは活性低下を効能・効果として発揮する、核酸や抗体、低分子などの化合物、もしくはこの化合物を有効成分として含む組成物として定義される。また、かかる化合物については、化合物分子そのものが有効成分として機能する場合に加え、投与後、生体内において分子形を変化させて有効成分として機能する、いわゆるDDS化された化合物も含まれるものとする。

【0027】

本発明の診断方法は、癌において、ANKS1Bの異常発現または変異を調べることにより、ヒストンH3K27のメチル化・脱メチル化を作用機序とする癌治療薬剤の有効性を評価することを特徴とする。

【0028】

ANKS1Bの異常発現または変異を調べる方法については、特に限定する必要はなく、種々の手法を採用することができる。

ANKS1Bの異常発現を調べる方法として、典型的には、目的とする癌組織の病理切片を作製し、抗ANKS1B抗体にて免疫染色を行うなどすることができる。その他、RT-PCRを用いて核酸を定量的に測定する手法やANKS1Bそのもののアミノ酸配列を調べる手法などが挙げられる。

調べた結果、ANKS1Bの過剰発現や機能獲得型変異 (gain of function mutation) が生じている疾患では、ヒストンH3K27の脱メチル化が亢進している。この場合、KDM6Bの阻害剤などの脱メチル化を薬理機序とする薬剤を選択すればよい。

一方、ANKS1Bの発現低下や機能喪失型変異 (loss of function mutation) が生じる疾患では、ヒストンH3K27の脱メチル化が抑制されており、結果として、ヒストンH3K27のメチル化が亢進している。この場合、Ezh2の阻害剤などのメチル化を薬理機序とする薬剤を選択すればよい。

【0029】

本発明のiPS細胞作製方法は、FOP患者の皮膚線維芽細胞において、ヒストンH3K4またはヒストンH3K27のメチル化低下を抑制することにより、iPS細胞を作製することを特徴とする。

ヒストンH3K4ないしK27のメチル化低下を抑制する手法については特に限定する必要はなく、種々の手法を採用することができる。典型的には、iPS細胞誘導時に、ヒストンH3K4の脱メチル化酵素であるLSD1のshRNAや、ヒストンH3K27の脱メチル化酵素であるKDM6BのshRNA、このKDM6Bの下流分子であるANKS1BのshRNAなどを存在下、iPS細胞の誘導を行えばよい。

10

20

30

40

50

## 【実施例】

## 【0030】

以下、本発明について、実施例を用いて、詳述する。

## 【0031】

<< I . 実験材料ならびに実験方法 >>

< 1 . 皮膚由来の線維芽細胞の生成 >

(1) 倫理委員会に承認されたプロトコールにより、インフォームドコンセントの下、FOP患者及び健常者の皮膚生検の外植片から線維芽細胞を作出した。

(2) 患者及び健常者からの皮膚試料を細かく刻み、10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加したDMEM培地で培養した。

(3) 線維芽細胞が出現したことを確認した後、初期化遺伝子を導入するために線維芽細胞を増殖させ、その後、10%DMSO+90%FBSからなる凍結溶液に入れ、凍結保存した。

## 【0032】

< 2 . iPS細胞の維持及び生成 >

(1) 20%のKNOCKOUT (商標) 血清置換物 (KSR, インビトロゲン), 2mMのL-グルタミン,  $1 \times 10^{-4}$ Mの非必須アミノ酸 (NEAA, シグマ),  $1 \times 10^{-4}$ Mの2-メルカプトエタノール (シグマ), 0.5%のペニシリンとストレプトマイシン (日本, ナカライテスク), 及び5ng/mLの基本線維芽細胞増殖因子 (bFGF, 和光, 日本) を添加したDMEM/F12 (シグマ) を含有するヒトiPS培地において、マイトマイシンC (MMC) 処理したMEF支持細胞上でヒトiPS細胞を維持した。

(2) N. Fusaki, H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki, M. Hasegawa, Proc. Jpn. Acad. Ser., B. Phys. Biol. Eci., 85, 348 (2009)に記載される方法により、ヒト由来の線維芽細胞からiPS細胞を生成した。

(3) 感染1日前に、6穴プレートにおいてウエル当たり $5 \times 10^5$ 個のヒト線維芽細胞を播種し、その後、感染多重度 (multiplicity of infection; MOI) 3にて、下記センダイウイルス (SeV) ベクターを細胞に感染させた。すなわち、Oct3/4遺伝子, Sox2遺伝子, Klf4遺伝子及びc-Myc遺伝子を含むSeVベクターについて、N. Fusaki, H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki, M. Hasegawa, Proc. Jpn. Acad. Ser., B. Phys. Biol. Eci., 85, 348 (2009)に記載される方法に従い、作成を行った。

(4) 感染の7日後、トリプシンによって感染させた線維芽細胞を回収し、60mmのシャーレ当たり $5.4 \times 10^4$ 個の細胞、或いは100mmのシャーレ当たり $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞をMMC処理したMEF支持細胞上に播種した。翌日、ヒトiPS細胞培地に置き換え、感染の30日後まで培養を継続し、コロニーを観察した。

(5) iPS細胞の生成に対する骨形成タンパク質 (BMP-4, 6, 及び7) の影響は、感染8日目に置き換える上記ヒトiPS細胞培地に、それぞれ、BMP-4 (10ng/mL), BMP-6 (50ng/mL), 及びBMP-7 (10ng/mL) を添加した培地を用い、30日目まで培養することにより確認した。また、一部の実験では、ALK2キナーゼ阻害剤であるLDN-193189 (STEMGENT; ステムジェント) を200nMの濃度で上記ヒトiPS培地に添加した。

## 【0033】

< 3 . 免疫プロット及び免疫沈降解析 >

(1) 免疫プロットにおいては、細胞を溶解バッファー (62.5mM Tris-HCl, pH 7.4, 2% SDS, 0.05% 2ME, 10% グリセロール, 0.00125%臭素) にて溶解し、超音波を当て、4, 15000rpm, 条件下で10分間遠心分離を行った。

(2) 得られた上清をSDS-PAGEにより、目的タンパクをPVDFメンブレン上にて分離した。

(3) メンブレンを抗血清と共にインキュベートし、免疫反応バンドをEnhanced Chemiluminescence detection (PerkinElmer社) を用いて可視化した。バンドの濃さはImage J software (米国NIH) を用いて評価した。

(4) 免疫沈降は、Smadsを過剰発現させた293T細胞とKDM6B又はLSD1を、RIPAバッファー (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 150mM NaCl, 1% NP-40, protease/phosphatase inhibitor cocktail) に溶解し、必要な抗体と共に、4 下で回転台にて一晩インキュベ

10

20

30

40

50

トした。その後、プロテインG樹脂を加え、4 下で回転台にて2時間インキュベートした。樹脂を3回PMSで洗浄し、ウェスタンブロット用のバッファーに溶解させた。

【0034】

< 4 . クロマチン免疫沈降及びChIP-ChIP解析 >

(1) 細胞を1%ホルムアルデヒドに作用させ、タンパク質のDNAへの固定化(クロスリンク)を行った。得られた溶解液を抗ヒストンメチル抗体と共にインキュベートした。精製したDNA断片はPCR増幅を行った。

(2) ChIP-ChIP解析においては、FOP由来線維芽細胞をRIPAバッファーにより溶解し、抗FLAGアフィニティゲル(シグマ社A2220)と共に4 下で回転台にて一晩インキュベートした。得られたゲルを5回TBSで洗浄し、100ng/mLのFLAGペプチド(シグマ社F3290)を含むRIPAバッファーを加え、4 下で回転台にて2時間インキュベートした。得られた混合物をTBSで3回洗浄し、500ng/mLの3 x FLAGペプチド(シグマ社F4799)を含むTBSバッファーを加え、4 下で回転台にて2時間インキュベートした。この作業を3回繰り返した。

10

【0035】

<< II . 実験結果 >>

< 1 . FOP由来線維芽細胞におけるヒストンH3のメチル化の検討 >

(1) FOP由来線維芽細胞のiPS細胞誘導を行い、ヒストンH3のメチル化の様子を調べた。比較対象として、正常線維芽細胞を用いた。

(2) 図1に結果を示す。正常線維芽細胞(N3)において、iPS細胞への誘導がすすむとともに、ヒストンH3のK4ならびにK27のバンドが濃くなっていった。

20

(3) 一方、FOP由来線維芽細胞(F1, F2)においては、ヒストンH3のK4ならびにK27のバンドの様子に変化はみられなかった。

(4) また、K9, K36, K79においては、正常線維芽細胞とFOP由来線維芽細胞の間でのバンドの違いはみられなかった。

(5) これらの結果から、FOP由来線維芽細胞のiPS細胞誘導の樹立が困難な理由として、ヒストンH3のK4ならびにK27のメチル化異常が原因の一つであることが示唆された。

【0036】

< 2 . FOP由来線維芽細胞のiPS細胞誘導における各種遺伝子の抑制の影響 >

(1) 各種遺伝子に対するshRNAを用いて、FOP由来線維芽細胞のiPS細胞誘導への影響を調べた。

30

(2) 図2に結果を示す。ALK2の変異型であるR206H、ヒストンH3K4の脱メチル化酵素であるLSD1と同様、KDM6Bにおいても、shRNAによる抑制により、iPS細胞誘導の低下が回復していた。

(3) また、LSD1とKDM6Bをともに抑制した場合は、iPS細胞誘導の低下が、ほぼ完全に回復していた。

(4) LSD1, KDM6B, これらの分子は、BMPシグナルが活性化している際、いずれの分子もSmadsとコンプレックスを形成する。そして、LSD1はヒストンH3K4, KDM6BはヒストンH3K27の脱メチル化酵素であり、ヒストンH3K4, ないしヒストンH3K27のメチル化を抑制する。これらの結果から、FOP由来線維芽細胞のiPS細胞誘導は、ヒストンH3K4およびヒストンH3K27, これらのメチル化低下を抑制することにより、十分回復しうることを示唆された。

40

【0037】

< 3 . FOP由来線維芽細胞のiPS細胞誘導における、R206HならびにANKS1Bの抑制の影響 >

(1) R206H, およびANKS1BのshRNAを用いて、これらを抑制した場合におけるFOP由来線維芽細胞のiPS細胞誘導への影響を調べた。

(2) 図3に結果を示す。FOP由来線維芽細胞のiPS細胞誘導異常は、ALK2の変異型であるR206Hの抑制により、回復することが分かった。また、R206Hと同様、ANKS1Bの抑制でも部分的に回復することが分かった。

【0038】

< 4 . BMP6存在下における、各種分子の骨芽細胞分化への影響 >

(1) FOP由来線維芽細胞の骨芽細胞への分化に、各分子の抑制がどのような影響を与える

50



かについて、検討を行った。

(2) R206H, KDM6Bいずれの抑制によっても、骨芽細胞への分化が大きく抑制されていることが分かった(図4A)。

(3) また、ALK2, ANKS1Bいずれの抑制によっても、骨芽細胞への分化が抑制されていることが分かった(図4B)。

(4) これらの結果から、ANKS1Bが、FOPにおける骨芽細胞分化に関与していること、そして、FOPの病因として重要な因子であることが示唆された。

#### 【0039】

< 5. グリオーマ細胞株における、KDM6BならびにANKS1Bの抑制の影響 >

(1) Diffuse intrinsic pos glioma (小児脳幹グリオーマ, DIPG) において、ALK2の変異が生じることが報告されている。このALK2変異型(R206H)を発現させたグリオーマ細胞株(U87-ALK2/R206H)を用いて、KDM6B又はANKS1B、これらのshRNAによる発現抑制を行い、グリオーマ細胞株の増殖にどのような変化がみられるかを調べた。

(2) KDM6BならびにANKS1Bの抑制により、グリオーマ細胞株の細胞増殖が抑制されることが分かった(図5)。

#### 【0040】

< 6. ALK2変異型(R206H)を持つグリオーマ細胞株における、R206HならびにANKS1Bの発現抑制がもたらすタンパク発現への影響 >

(1) R206H, ならびにANKS1BのshRNAを用いて、グリオーマ細胞株における各種タンパクの発現変化について調べた。

(2) 図6に結果を示す。BMP4又はBMP6により、Smadのリン酸化が促進されることが確認された。

(3) このSmadのリン酸化は、R206Hの発現抑制により、リン酸化が部分的に抑制されることが分かった。一方、ANKS1Bの抑制では、Smadのリン酸化が大きく抑制されることが分かった。

(4) このことから、ANKS1BはSmadのリン酸化を安定化させており、ANKS1Bの発現抑制が、BMPのシグナル伝達を低下させることが示唆された。

#### 【0041】

< 7. グリオーマ細胞株における、ANKS1B発現抑制の影響 >

(1) DIPGグリオーマにおいて、ヒストンH3.3に変異が生じることが報告されている。このH3.3K27M変異を持つグリオーマ細胞株において、ANKS1Bの発現抑制により、各種タンパクの発現がどのように変化するかを調べた。

(2) ANKS1Bの抑制により、KDM6Bの発現が低下していることが分かった(図7, 上)。

(3) さらに、ANKS1Bの抑制により、ヒストンH3K27のメチル化が上昇していることが分かった(図7, 下)。

#### 【0042】

< 8. 各阻害剤を用いた治療効果の検討 >

(1) KDM6BやANKS1Bなどの阻害剤が、FOPにおいて治療効果を示すかどうかについて、FOP由来線維芽細胞ならびにFOPモデル動物を用いて調べた。

(2) 図8に結果を示す。KDM6Bの阻害剤であるGSK-J4の添加により、FOP由来線維芽細胞の骨芽細胞への分化が、濃度依存的に抑制されていることが分かった(図8A)。

#### 【0043】

(3) ヒトFOP患者由来線維芽細胞を用いてFOPモデル動物の作製を行い、ピボでの検討を行った。

FOPモデル動物では、ALK2の阻害剤であるLDN-193189の存在下、ヒトFOP患者由来線維芽細胞から樹立したFOP由来線維芽細胞を用いた。作製されたFOPモデル動物では、FOP由来線維芽細胞により、免疫不全マウスへの移植後5-6日で、テラトーマが形成される。加えて、FOPモデル動物では、ヒト健常者由来線維芽細胞の移植と比較して、より効率的に異所性骨化を示す。

(4) 2週間かけてFOP由来線維芽細胞の移植を行った後、LDN-193189ならびにGSK-J4、こ

10

20

30

40

50

れらをそれぞれ腹腔内投与した結果を示す(図8B)。

LDN-193189ならびにGSK-J4, いずれにおいても, 投与を行っていない個体(Mock)と比較して, 異所性骨化が抑制されており, 骨容量についても少ないことが分かった(図8B)。

(5) 同様に, 変異型ALK2(R206H)ないしANKS1BのsiRNAを腹腔内投与したところ, いずれにおいても, コントロールsiRNAを投与した個体と比較して, 異所性骨化が抑制されており, 骨容量についても少ないことが分かった(図8C)。

【0044】

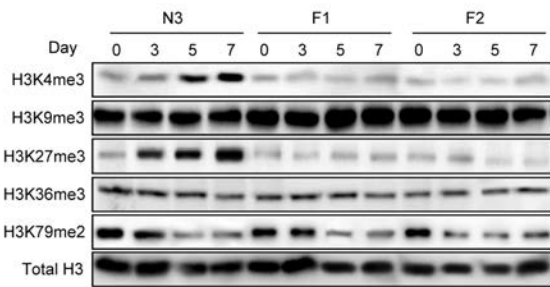
(6) また, ALK2変異型のグリオーマ細胞株(U87-ALK2/R206H)をヌードマウスに移植して作製したモデル動物において, ANKS1BのsiRNAを投与したところ, コントロールのsiRNAを投与した個体と比較して, 腫瘍の容量が抑制されており, ANKS1Bの抑制により, 腫瘍の成長が抑制されていることが確認された(図8D)。

【0045】

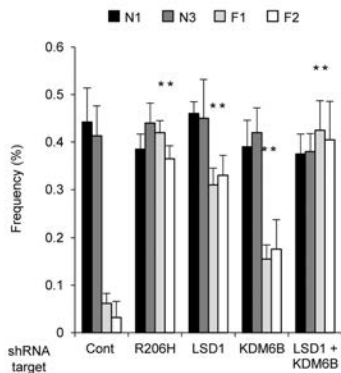
(7) これらの結果から, ALK2に異常を有する細胞増殖性疾患において, ANKS1Bが関与する類似のメカニズムにより, ヒストンH3K27のメチル化低下が生じており, ANKS1Bの発現抑制などにより, 細胞増殖が抑制され, 治療効果の発揮が期待されることが示された。

10

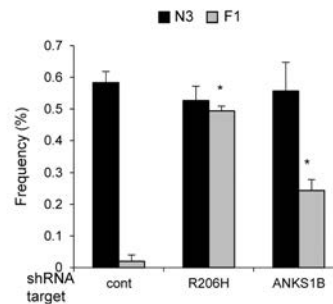
【図1】



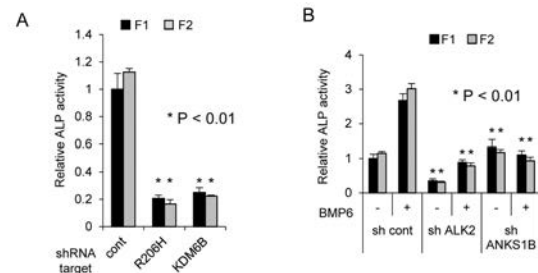
【図2】



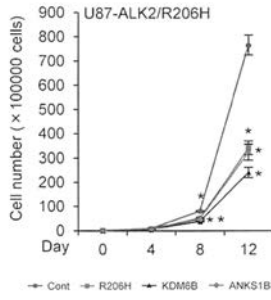
【図3】



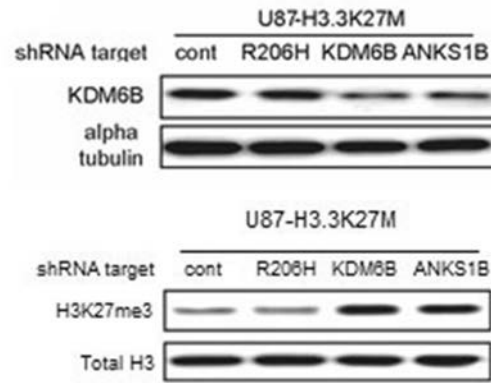
【図4】



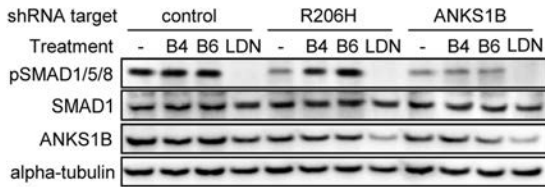
【 図 5 】



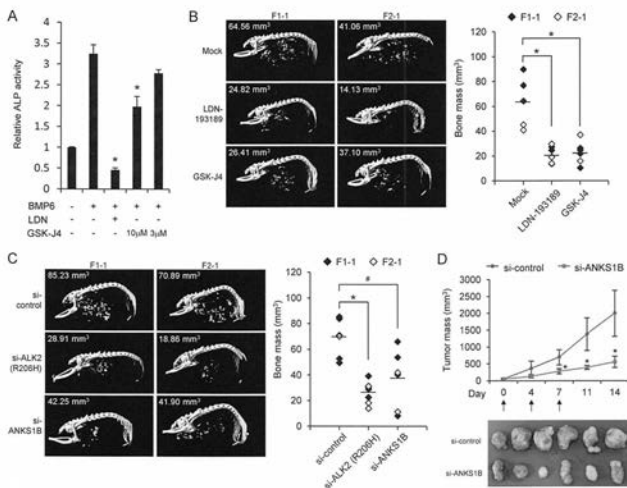
【 図 7 】



【 図 6 】



【 図 8 】



---

 フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	Z
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 K 39/395	P
	A 6 1 K 31/519	
	A 6 1 K 48/00	

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 CB06 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA96 ZB21  
ZB26 ZC41