

## 論文の内容の要旨

論文題目 筋萎縮症に対する新規ミオスタチン阻害薬開発

氏名 小澤 崇之

### 背景

筋萎縮症には、本邦で難病に指定されている筋ジストロフィー症、治療薬が十分に開発されていないがん悪液質、サルコペニア等がある。筋ジストロフィー症は、筋細胞内外で筋収縮に重要な遺伝子の変異に起因する事が多く、進行性の筋力の低下を示す疾患である。がん悪液質は進行がん患者の3〜8割が陥るとされ、急激な体重減少、骨格筋の萎縮や食欲不振、呼吸障害を起こし得る深刻な病態である。がん細胞が過剰に産生する形質転換増殖因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ファミリー分子や炎症性サイトカイン等の液性因子が、全身を巡る事で多臓器にわたる代謝異常を招くと考えられている。サルコペニアは筋量が進行性かつ全身性に低下し、身体機能の障害をはじめ、QOLの低下や転倒の原因になりうる病態である。サルコペニアの原因は、加齢による場合や加齢以外の疾患による場合と多岐に渡り、個々の病態の解明が課題である。患者数が多く、進行も早いデュシェンヌ型筋ジストロフィー症 (DMD) やがん悪液質、サルコペニア等の筋萎縮症に対する予防法や治療薬の開発は喫緊の課題といえる。

増殖分化因子8 (GDF8、ミオスタチン) は、骨格筋の肥大や再生に対し抑制的に機能する TGF- $\beta$  ファミリーに属する分子である。GDF8 のシグナル伝達は他の TGF- $\beta$  ファミリー分子と同様に、まず細胞膜上に存在する2つの膜貫通型セリン/スレオニンキナーゼ受容体 (I 型受容体と II 型受容体) によって受容される。GDF8 と受容体は複合体を形成し、細胞質内に存在する転写因子 SMAD2 及び SMAD3 のリン酸化を行う。リン酸化 SMAD2/3 は SMAD4 と複合体を形成して細胞質から核内へ移行し、骨格筋萎縮に関わる分子等の標的遺伝子の転写調節領域へ結合して標的遺伝子の発現を調整する。

これまでの治療薬開発の戦略は、①抗 GDF8 抗体 (中和抗体)、②II 型受容体 activin receptor type IIB (ActRIIB、ACVR2B) を標的とした製剤、③GDF8 類似分子に対する選択性を高めた製剤の3つに、変遷してきたと思われる。①について GDF8 の中和抗体単剤では筋ジストロフィー症患者の筋線維変性と筋力の低下の改善が認められなかった。原因として、GDF8 と同様の筋萎縮作用を有するターゲット分子、GDF11、Activin による代償作用が考えられた。②について複数のターゲット分子の同時阻害を念頭に、共通の受容体である ActRIIB が注目された。ActRIIB の細胞外ドメインに IgG 抗体の Fc 領域を融合したデコイ受容体製剤 ActRIIB-Fc 等が開発された。臨床試験に進んだ Acceleron Pharma 社のデコイ受容体製剤 ACE-031 は、DMD 患者で治療効果は認められたが副作用と考えられる出血 (鼻出血、歯肉出血)、皮膚血管の拡張が認められ、安全性を理由に Phase II で開発が打ち切られた。これらの副作用は、ActRIIB が結合する骨形成因子 (BMP) 9 の阻害のために生じたと考えられている。次に③について特異性の高い抗 GDF8 抗体及び抗 Activin A 抗体の2製剤を併用した研究では、マウス及びサル骨格筋肥大効果を認め、明らかな副作用が認められなかった。しかしながら、複数

のタンパク質性の製剤を用いるため、製造や供給における品質の安定性や医療経済的問題が残る。そのため、筋萎縮作用を有するターゲット分子への選択的阻害効果が大きく、かつ単剤で作用できる治療薬の開発を目標にした。この目標に対し期待される分子としてフォリスタチン（FST）を利用したものが報告されている。FST は TGF- $\beta$ ファミリー分子の生理的アンタゴニストとして同定され、ターゲット分子に対する高い結合性を示す。これまでに FST や FST を改変した様々な分子が開発され、効果的に骨格筋の萎縮を抑制出来ている。しかし FST-Fc は局所投与のみであり、効果が限定的である可能性がある。また、FST は BMP9/10 に結合性を示さないが、BMP6/7 に対しての結合性や阻害活性を有する。本研究ではより BMP への結合性が低い FST ファミリー分子のフォリスタチンライク 3（FSTL3）に注目した。

FSTL3 は FST に比べターゲット分子に対する阻害作用が弱い傾向にあるが、十分な阻害作用を示し、BMP6/7 及び BMP9/10 に阻害作用を殆ど示さない特徴を持つ事が分かっている。この特徴から、FSTL3 はこれまでの治療薬候補薬の欠点や将来的に生じる可能性がある BMP6/7 に関連した副作用の可能性を小さくできると考えられた。がん悪液質や DMD は全身性の疾患であるため FSTL3 の効果が全身性に発揮される事、臨床試験に既に進んでいるモダリティ、精製法が確立している事からヒト IgG1 の Fc 領域を FSTL3 の C 末端に融合した FSTL3-Fc を作製した。1 分子の FSTL3-Fc にターゲット分子への結合領域が 2 つ存在する bivalent-FSTL3-Fc (bi-FSTL3-Fc) と 1 つ存在する monovalent-FSTL3-Fc (mono-FSTL3-Fc) の 2 つの型を開発し、筋萎縮症への治療薬としての可能性を検証する目的で、本研究を開始した。

## 結果

### 第一章 bi-FSTL3-Fc のマウスにおける局所的な骨格筋肥大効果

FSTL3-Fc もしくは Fc 組換えタンパク質を発現させるコンストラクトをレンチウイルスベクターで HEK293T 細胞に導入し、安定発現株を作製した。安定発現株の培養上清に対し、Fc 領域に対するアフィニティー精製を行い精製した。結合実験の結果、bi-FSTL3-Fc は Activin A、GDF8、GDF11 に対して良好な結合を示し、BMP9 には結合しない事が明らかになった。阻害活性の評価は SMAD2/3 の活性を評価する 9 $\times$ CAGA-luc assay、SMAD1/5/8 の活性を評価する BRE-luc assay を用いた。その結果 Activin A、Activin B、GDF8、GDF11 に対して良好な阻害効果を認め、TGF- $\beta$ 3、BMP6 及び BMP9 の活性を阻害しなかったため、良好な選択的阻害作用を有する事が強く示唆された。

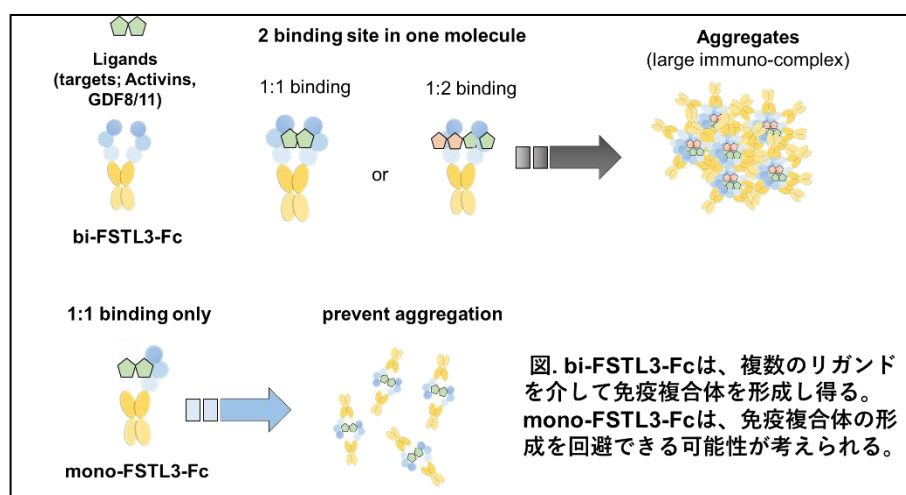
bi-FSTL3-Fc を腹腔内投与（i.p.）、静脈内投与（i.v.）で健常マウスに投与した結果、血中における半減期は投与後 1 時間程度であると考えられた。投与 5 時間後に免疫組織化学染色法で検出した結果、肝臓に集中的に強いシグナルを検出し、bi-FSTL3-Fc は投与後早期に肝臓に集積する事が示唆された。

bi-FSTL3-Fc を健常マウスの右脛脛に骨格筋投与（i.m.）した結果、投与した付近の腓腹筋（GC）、ハムストリングス（Ham）の重量が増加し、組織学的な解析により筋線維の肥大を認めた。ただし、対側や大腿四頭筋（QF）等の遠位の後肢骨格筋は Fc 投与群と有意な変化を認めなかった。DMD のモデルマウスである mdx マウスにおいても同様に局所的な骨格筋の肥大

を認めた。bi-FSTL3-Fc 投与群は Fc 投与群と同様、血糖値や脾臓の重量に副作用と考えられる異常は認められなかった。

## 第二章 mono-FSTL3-Fc のマウスにおける全身性の骨格筋肥大効果

bi-FSTL3-Fc がマウス体内で安定性に乏しい理由として、ターゲット分子と bi-FSTL3-Fc による免疫複合体の形成が考えられた。1 分子の bi-FSTL3-Fc にはターゲット分子と結合できる領域が 2 つあり、ターゲット分子自体にも結合できる領域が 2 つある事で両者の間で複雑な複合体が形成され、Fc を介した安定性向上効果が損なわれている可能性を考えた。ターゲット分子との結合を単純にする目的で、mono-FSTL3-Fc を開発した (図)。mono-FSTL3-Fc は Fc 領域内のアミノ酸の立体的な反発を利用した knobs-into-holes 技術を用いて、HEK 293T 細胞で産生させ同様の手技で精製した。ターゲット分子との阻害活性の評価を行った結果、mono-FSTL3-Fc においても良好な選択阻害性を認めた。



mono-FSTL3-Fc を健常マウスに i.p.及び i.v.で投与した結果、血清中の半減期は bi-FSTL3-Fc に比べて延長され、i.p.後の血清を Fc に対する ELISA 法で解析した結果、Fc を投与した場合と同等以上の体内安定性が示唆された。また、健常個体に 2 週間投与した結果、Fc 投与群に比べ投与後の体重増加の割合が有意に大きく、広範な骨格筋重量の増加及び筋線維の肥大効果を認めた。mdx マウスも同様に広範な骨格筋重量の増加及び筋線維の肥大を認め、GC、Ham、QF の筋重量の増加及び前肢の握力の増加は、ACE-031 のマウス用の製剤である RAP-031/ActRIIB-Fc 投与群と同程度であった。健常マウス及び mdx マウスで血糖値や脾臓重量、脾臓重量に副作用を認めなかった。

## 結論

本研究では bi-FSTL3-Fc 及び mono-FSTL3-Fc を開発した。健常マウス及び mdx マウスにおいて bi-FSTL3-Fc は局所的に、mono-FSTL3-Fc は全身性に、それぞれ骨格筋肥大効果を有する事が明らかになった。その骨格筋肥大効果は既存の治療薬候補の効果に劣らず、十分な効果であったと考察された。本研究は、がん悪液質や筋ジストロフィー症、サルコペニアに代表される有効な治療薬が十分に開発されていない筋萎縮症に対し、患者の骨格筋の筋量を保つ事

で、自立した生活を支える新規治療薬としての可能性を示唆した。