

新規ミオスタチン阻害薬である 1 価 FSTL3-Fc の開発  
～ 先行製剤の問題点を改善して骨格筋肥大や代謝改善の効果に期待 ～

1. 発表者：

森川 真大（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学 助教）  
小澤 崇之（研究当時：東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 博士課程／  
研究当時：日本学術振興会 特別研究員）  
鯉沼 代造（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学 准教授）  
宮園 浩平（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ 骨格筋の肥大や筋力の増大を促進するミオスタチン阻害薬の新規製剤として、1 価 Follistatin-Like-3 (FSTL3) -Fc を開発しました。
- ◆ 1 価 FSTL3-Fc は、標的と考えられる因子を過不足なく阻害し、マウスに投与した時に十分な効果が認められ、かつ先行製剤で問題となった副作用を認めませんでした。
- ◆ 有効でかつ副作用の可能性の低いミオスタチン阻害薬は、進行したがんで見られる悪液質や高齢者に見られるサルコペニア（骨格筋減弱症）などの骨格筋萎縮や神経筋疾患の治療薬として有望です。また骨格筋の持つ代謝機能を改善することで、肥満や 2 型糖尿病の治療にもつながることも期待されます。

3. 発表概要：

これまで、ミオスタチン（注 1）の機能を抑制することで骨格筋の肥大や筋力の増大を目指す、ミオスタチン阻害薬の開発が活発に行われてきました。臨床試験まで進み、実際の患者さんで骨格筋肥大効果が評価された製剤もありますが、効果が不十分であったり、副作用が明らかになったりしたため開発が中断され、現在までのところ臨床応用された製剤はありません。

今回、東京大学大学院医学系研究科の森川真大助教、小澤崇之博士課程大学院生（研究当時）、宮園浩平教授らの研究グループは、東京薬科大学生命科学部の伊東史子准教授、スウェーデン王立工科大学の Per-Åke Nygren（ペールオーケ・ニグレン）教授との国際共同研究で、新規ミオスタチン阻害薬として 1 価 Follistatin-Like-3 (FSTL3) -Fc を開発しました。研究グループは、標的と考えられる因子を過不足なく阻害しうる点から FSTL3（注 2）に注目し、タンパク質工学の手法を活用して血中安定性を改善しました。さらに、マウスにおいて先行製剤と同等の骨格筋肥大効果があり、逆に先行製剤で問題となった副作用を認めないことを明らかにしました。有効でかつ副作用の可能性の低いミオスタチン阻害薬は、進行したがんで見られる悪液質や高齢社会で今後大きな問題となるサルコペニアなどの骨格筋萎縮や神経筋疾患の治療薬として有望と考えられます。また骨格筋の持つ代謝機能を改善することで、肥満や 2 型糖尿病の治療につながることも期待されます。

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業（15H05774、19K07683）、文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御」（17H06326）などの支援を受けて行われました。

#### 4. 発表内容：

##### ① 研究の背景

1990年代後半に骨格筋の成長を負に制御する因子としてミオスタチンが同定されて以来、ミオスタチンの機能を抑制することで骨格筋の肥大や筋力の増大を目指す、ミオスタチン阻害薬の開発が活発に行われてきました。これまで、ミオスタチン中和抗体（注3）やミオスタチンと結合する受容体（アクチビン IIB 型受容体）の配列を使った Fc 融合タンパク質（注4）である ActRIIB-Fc 製剤（注5）など、様々な製剤が開発され臨床試験で治療効果が評価されてきました。しかし研究が進むにつれて、骨格筋を肥大させるためには、ミオスタチンを含む TGF- $\beta$ ファミリー（注6）の複数因子を過不足なく阻害する必要があることが分かってきました。前述の先行製剤に関しては、ミオスタチン中和抗体によるミオスタチン単独の阻害では効果が不十分であり、逆に複数因子を一括して阻害する ActRIIB-Fc 製剤では必要以上の因子を阻害することで出血等の副作用を認め、これらの製剤の開発は現時点では中断されています。特に、ActRIIB-Fc 製剤では、血管内皮細胞の機能に重要な骨形成因子（BMP）9、BMP10（注7）を阻害してしまうことが問題です。最近 TGF- $\beta$ ファミリーの内在性アンタゴニスト（注8）として知られるフォリスタチン（FST）（注2）の配列を用いた FST-Fc 製剤が開発され、BMP9、BMP10を阻害しないため有望と考えられていました。しかし、FST-Fc 製剤は全身投与後すぐに血中から排除されてしまうため局所注射でしか用いることができませんでした。一方、受容体側を標的とした治療法についても開発が進み、アクチビン II 型受容体の機能を阻害する抗体の臨床試験が行われています。このようにミオスタチンを含む TGF- $\beta$ ファミリーの阻害薬は骨格筋の肥大や筋力の増大をもたらすことが期待されてきましたが、副作用を回避するためにも標的と考えられる因子を過不足なく阻害し、全身投与可能な新たな製剤の開発が待たれていました。

##### ② 研究内容

今回、研究グループは TGF- $\beta$ ファミリーの内在性アンタゴニストの中で、骨格筋に関係した作用を持つ因子に対して選択性が高い Follistatin-Like-3（FSTL3）に注目しました。特に、FSTL3は血液中に存在することが報告されていたため、全身投与に適していると考えられました。まず、先行薬である ActRIIB-Fc や FST-Fc 同様、一般的に用いられている方法で FSTL3-Fc 融合タンパク質を作成しました（以下、2価 FSTL3-Fc、図1）。2価 FSTL3-Fc は、骨格筋を負に制御するミオスタチン、アクチビン、GDF11と結合しましたが、副作用に関係する BMP9を含む他の TGF- $\beta$ ファミリー分子を阻害しないことを確認しました。しかし、2価 FSTL3-Fc は、マウスへの全身投与後すぐに血中から排除されてしまい、局所投与でしか骨格筋肥大効果を認めませんでした。

一般的に用いられている方法で Fc 融合タンパク質を作成した場合、2つの FSTL3-Fc 分子が二量体を作り2本腕の FSTL3-Fc（2価 FSTL3-Fc）になります。研究グループは、この2本腕の状態が血中半減期に悪影響を与えていると考え、タンパク質工学の手法を駆使して1本腕の FSTL3-Fc（1価 FSTL3-Fc）を作成しました（図1）。1価 FSTL3-Fc は、マウス血中での安定性が改善し、先行製剤である ActRIIB-Fc と同等の骨格筋肥大効果を全身的に認めました（図2）。また、ActRIIB-Fc で問題となった膵臓や脾臓での副作用を認めませんでした。

### ③ 社会的意義・今後の予定

有効でかつ副作用の可能性の低いミオスタチン阻害薬は、進行したがんで見られる悪液質や高齢者におけるサルコペニアなどの骨格筋萎縮症、また筋ジストロフィーなどの神経筋疾患の治療薬として有望です。さらに、既にミオスタチン阻害薬の先行製剤で効果が検討されているところですが、骨格筋のもつ代謝機能を改善することで肥満や2型糖尿病といった疾患の治療につながることも期待されます。

研究グループは、1価 FSTL3-Fc で得た知見をもとに Fc 融合以外の方法で作成した FSTL3 製剤を評価中です。また、ドラッグデリバリーシステムの技術を活用して、骨格筋でのみ効果を発揮する方法を検討しています。今後、さらに副作用の可能性の低いミオスタチン阻害薬を開発し、臨床への還元を目指したいと考えています。

### 5. 発表雑誌：

雑誌名：「*iScience*」 (オンライン版：5月14日)

論文タイトル：Systemic administration of monovalent follistatin-like 3-Fc-fusion protein increases muscle mass in mice

著者：Takayuki Ozawa, Masato Morikawa\*, Yasuyuki Morishita, Kazuki Ogikubo, Fumiko Itoh, Daizo Koinuma, Per-Åke Nygren, and Kohei Miyazono\*  
(\*は責任著者)

DOI 番号：10.1016/j.isci.2021.102488

アブストラクト URL：https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102488

### 6. 問い合わせ先：

東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻 分子病理学  
助教 森川 真大 (もりかわ まさと)

TEL: 03-5841-3356

FAX: 03-5841-3354

E-mail address: morikawa@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻 分子病理学  
教授 宮園 浩平 (みやぞの こうへい)

TEL: 03-5841-3356

FAX: 03-5841-3354

E-mail address: miyazono@m.u-tokyo.ac.jp

### 7. 用語解説：

注1：ミオスタチン

増殖・分化因子 (GDF) 8 とも呼ばれるタンパク質で、骨格筋の成長を負に制御する因子と考えられています。ミオスタチン/GDF8 の機能を失ったマウス、ウシなどの動物では骨格筋量が倍増することが報告されています。また、ヒトでもミオスタチン遺伝子の機能欠損により骨格筋が異常に肥大するミオスタチン関連筋肉肥大が報告されています。現在、世界アンチ・ドーピング機関 (WADA) は、ミオスタチン阻害薬を禁止薬物としています。

注2：フォリスタチン (Follistatin、FST)、フォリスタチン様因子3 (FSTL3)

ともに TGF- $\beta$ ファミリー（注 6）に対する内在性アンタゴニスト（注 8）で、アクチビンやミオスタチン、ミオスタチンに類似する GDF11 と結合してその機能を阻害することが知られています。FST と FSTL3 の構造は似ており、両者ともフォリスタチンファミリーと呼ばれるグループに属します。ただし、FSTL3の方が結合する因子の数は少なく、FSTは BMP6、BMP7 など他の TGF- $\beta$ ファミリー分子とも結合することが知られています。

#### 注 3：中和抗体

抗体は免疫グロブリンと呼ばれるタンパク質で、侵入してきた病原体（抗原）に対して体内で作られる物質です。抗原を特異的に認識する性質を利用し、バイオ医薬品として応用されています。抗体のなかで、特定タンパク質の活性・機能を中和して機能を失わせることができる抗体のことを中和抗体と呼びます。

#### 注 4：Fc 融合タンパク質

受容体と呼ばれるタンパク質は、成長因子などの分泌タンパク質（細胞外シグナル分子、リガンド）と結合することで、細胞の内側に向けて新しい情報を伝えます。リガンドと結合する細胞外の部分と免疫グロブリンの Fc ドメインと呼ばれる部分を融合した人工的なタンパク質は、Fc 融合タンパク質と呼ばれます。Fc ドメインとの融合により血中半減期の延長を期待できる、というメリットもあります。

Fc 融合タンパク質は、細胞外で標的リガンドと結合することができますが、細胞内に情報を伝達することはありません。従って、Fc 融合タンパク質は、標的リガンドを捕まえることで（リガンドトラップ）、そのリガンドが関係する経路の邪魔をする阻害剤として機能します。

#### 注 5：ActRIIB-Fc 製剤

ミオスタチン阻害薬として有望視されていたのが、ActRIIB-Fc 製剤（ACE-031）です。ActRIIB-Fc 製剤は、アクチビン IIB 型受容体のリガンド結合部位を用いた Fc 融合タンパク質ですが、ミオスタチンだけではなく、アクチビン、GDF11、BMP9、BMP10 など複数の因子と結合し、その機能を阻害することが知られています。骨格筋機能に関係しない因子、特に BMP9、BMP10 の機能を阻害したためと考えられる鼻出血や毛細血管拡張が認められたため、現時点では ActRIIB-Fc 製剤の開発は中断されています。

#### 注 6：TGF- $\beta$ ファミリー

トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ （TGF- $\beta$ ）や、TGF- $\beta$ と構造が似た BMP、アクチビン、GDF などの一群の分泌タンパク質を、TGF- $\beta$ ファミリーと呼んでいます。TGF- $\beta$ ファミリーの分子は細胞増殖抑制、アポトーシス誘導、細胞分化、血管新生、免疫抑制、細胞遊走など、生体内で多彩な機能を発揮していることが知られています。これまで、哺乳類では 30 種類を超える TGF- $\beta$ ファミリーの分子が報告されています。

#### 注 7：BMP9、BMP10

TGF- $\beta$ ファミリーの受容体の中で、ALK1 と呼ばれる受容体は主に血管内皮細胞だけに存在しています。BMP9、BMP10 は ALK1 と結合できるリガンドで、主に血管内皮細胞の機能を調節します。ALK1 や BMP9 をコードする遺伝子の変異が、鼻出血や毛細血管拡張を特徴と

する遺伝病、遺伝性出血性末梢血管拡張症（HHT、オスラー病）、を引き起こすことが知られています。

注8：内在性アンタゴニスト

生体内にもともと存在する阻害物質（アンタゴニスト）。

## 8. 添付資料：

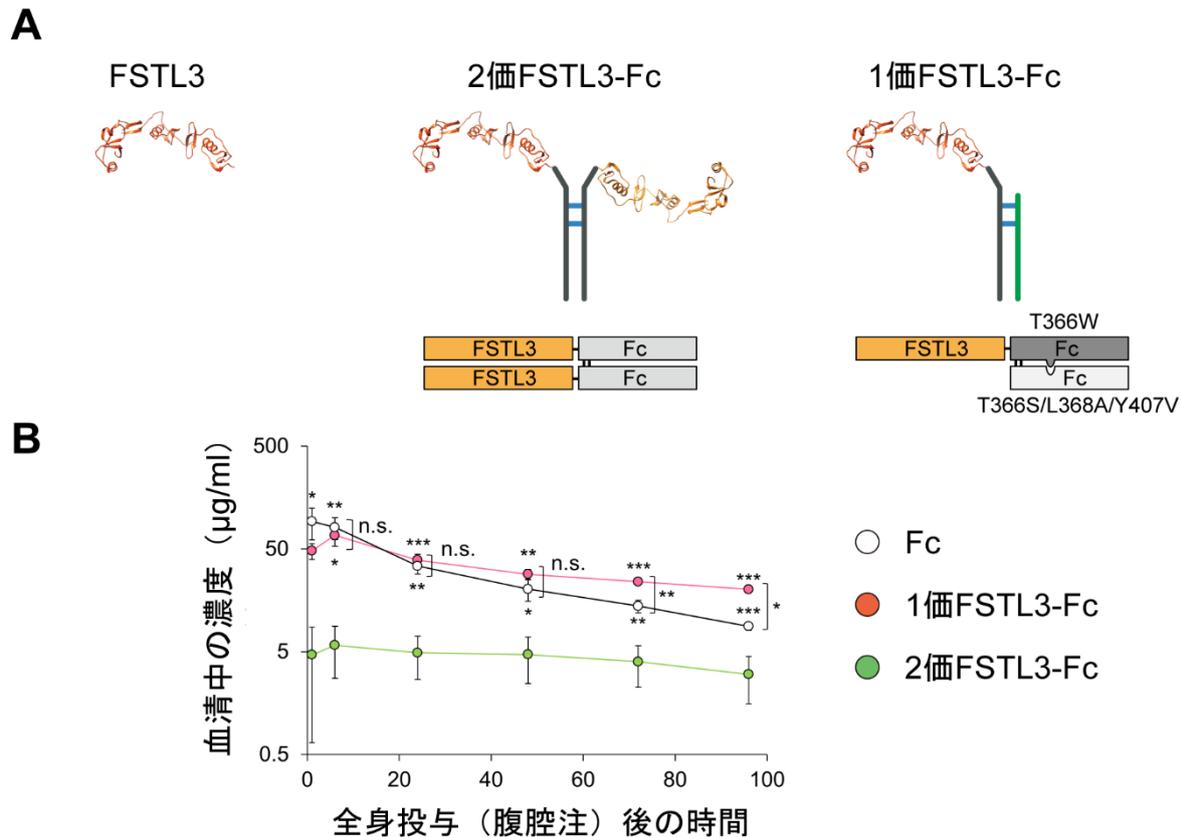


図1 FSTL3-Fcの模式図とマウス投与後の血清中濃度

- (A) FSTL3-Fcの模式図。FSTL3の立体構造（上）に関しては、Protein Data Bankのデータを参照しました（PDB ID: 3SEK）。通常の方法で作成した場合、FSTL3-Fcは2量体を形成するため、2本腕の2価FSTL3-Fcとなります。一方、Knobs-into-Holes (KiH) 法という技術を用いると、1本腕の1価FSTL3-Fcを作成可能です。
- (B) 1価FSTL3-Fc投与後の血中濃度。Fcタンパク質と比較して、2価FSTL3-Fcは投与後も血中濃度が高くないため、注射した局所でしか作用しません。一方、1価FSTL3-Fcは、Fcと同等の血中濃度を維持でき、全身の骨格筋に効果を及ぼすことが可能になりました。

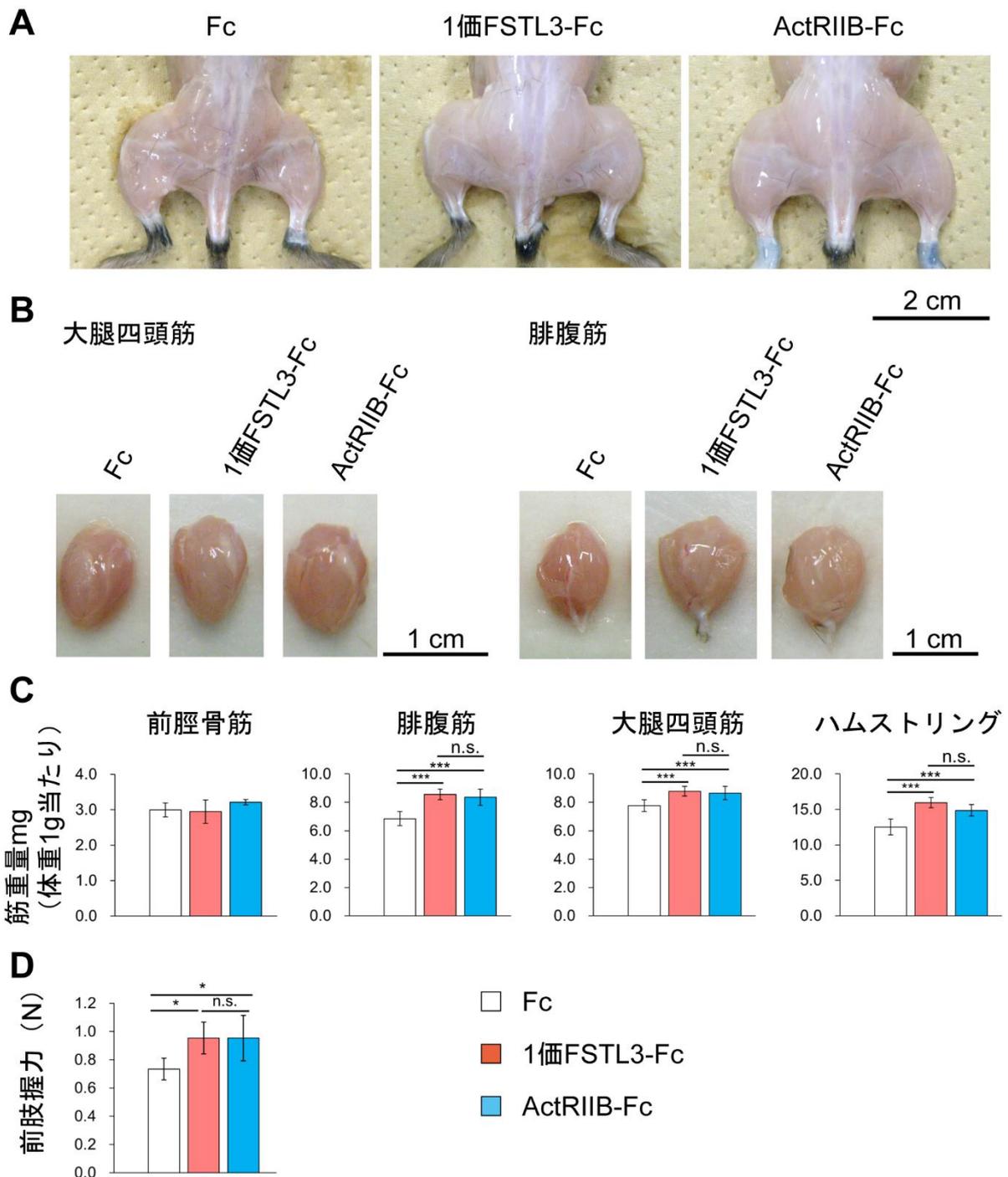


図2 1価 FSTL3-Fc による骨格筋肥大と筋力増大効果

- (A) デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス (mdx マウス) に 1 価 FSTL3-Fc、または対照実験として他の Fc タンパク質を 2 週間投与後、マウスの後肢骨格筋を観察しました。Fc が陰性対照、ActRIIB-Fc が先行製剤であり陽性対照になります。
- (B) Fc タンパク質投与後の mdx マウスの後肢骨格筋の肉眼的所見。
- (C) Fc タンパク質投与後の mdx マウスの後肢骨格筋の重量。左右両側の平均値に関して、マウス体重 1 g あたりの筋重量 mg として提示しています。
- (D) Fc タンパク質投与後の mdx マウスの前肢握力。