

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07683

研究課題名（和文）アクチビン選択的阻害剤の開発と担がんマウスモデルでの応用

研究課題名（英文）Development of a selective inhibitor of Activin and its application in a cancer-bearing mouse model

研究代表者

森川 真大（Morikawa, Masato）

帝京大学・先端総合研究機構・准教授

研究者番号：80775833

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、トランスフォーミング増殖因子（TGF- β ）ファミリーのアクチビンや類似リガンドの阻害薬を開発し、マウスモデルで治療効果を評価した。具体的には、アクチビンの生理的アンタゴニストFSTL3に注目し、アクチビン阻害による腫瘍細胞への治療効果の他、ミオスタチン（GDF8とも呼ばれる）阻害による骨格筋肥大効果を評価した。本研究期間中に、タンパク質工学の手法を活用して血中安定性を改善した1価FSTL3-Fcを開発し、若齢正常マウスや筋ジストロフィーモデルマウスで骨格筋肥大と筋力増大効果を確認した。1価FSTL3-Fcの骨格筋肥大効果に関して、成果をまとめ国際誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミオスタチン経路を阻害することで骨格筋の増加・肥大を目指す「ミオスタチン阻害薬」の開発が積極的に行われてきたが、効果不十分であったり標的外の副作用を生じたため、臨床応用された製剤はない。本研究の成果である1価FSTL3-Fcは、マウスモデルで先行製剤と同等の骨格筋肥大効果を認めた。また、骨格筋に関係するミオスタチン、アクチビン、GDF11に選択性が高いことから、先行製剤の問題点を解消した新たなミオスタチン阻害薬となりうる。副作用の可能性の低いミオスタチン阻害薬は、進行したがんでは認められる悪液質の他、高齢者におけるサルコペニア（加齢性筋肉減弱症）などの骨格筋萎縮症の治療法として有望である。

研究成果の概要（英文）：In this research, I have developed a ligand trap against activin and its relatives in the transforming growth factor beta (TGF- β) family, and have evaluated the therapeutic effects in mouse models. I focused on follistatin-like 3 (FSTL3), one of endogenous antagonists against activin, which mainly binds and neutralizes activin and myostatin (also known as GDF8). Using the knobs-into-holes technology, I developed monovalent FSTL3-Fc (mono-FSTL3-Fc) with longer serum half-life. I confirmed that systemic administration of mono-FSTL3-Fc induced muscle fiber hypertrophy and increased muscle mass in young wild-type mice and C57BL/10-mdx mice (a model mouse for human Duchenne muscular dystrophy). Targeting the signaling pathway of myostatin has been regarded as a promising strategy to increase muscle mass in the elderly and in patients. We thus reported that the mono-FSTL3-Fc can be a novel anti-myostatin agent.

研究分野：病態医化学

キーワード：アクチビン ミオスタチン フォリスタチン FSTL3 筋ジストロフィー Fc融合蛋白

1. 研究開始当初の背景

(1) トランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β)ファミリーは、哺乳類では30種類以上の構造の類似した蛋白質が含まれ、代表的なものとしてTGF- β 、アクチビン、増殖分化因子 (GDF)、骨形成因子 (BMP) がある。TGF- β ファミリーは、発生・分化、創傷治癒、免疫応答など、生命を維持する上で重要と考えられる生物現象の多くに関与し、このシグナルの異常は発がん、線維化、心血管系異常、自己免疫疾患などの多彩な病態に関与することが示され、注目されてきた。これまでの研究の結果、哺乳類で30種類以上存在するTGF- β ファミリー分子が細胞膜上に存在する受容体 (7種類のI型受容体、5種類のII型受容体) を介してシグナルを伝達し、主に転写因子SMADを用いて標的遺伝子の転写を調節する、というシグナル伝達経路の基本的な分子機構が明らかにされてきた。

(2) がん研究の分野ではTGF- β の解析が先行していたが、近年、これまであまり注目されていなかったTGF- β ファミリーメンバーの重要性について注目が集まりつつある。代表的因子であるTGF- β は、I型受容体ALK5とII型受容体TGF β RIIを介してAR-SMAD (SMAD2とSMAD3) を活性化する。一方、アクチビンと総称されるアクチビンA、B、C、Eのうち、少なくともアクチビンA/Bや類似するミオスタチン (GDF8とも呼ばれる) は、I型受容体ALK4、ALK7やII型受容体ActRIIA、ActRIIBを介してシグナル伝達する。ただし、使用する受容体はTGF- β と異なるが、TGF- β 同様にAR-SMADを活性化する。

乳腺上皮細胞や乳がん細胞では、アクチビンは腫瘍抑制因子として機能することが知られ、これはTGF- β の機能に類似している。近年、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の詳細な解析結果が報告され、乳がんや婦人科系がんではII型受容体ActRIIAに変異が認められ、腫瘍抑制因子として機能することに矛盾しない (Berger et al., Cancer Cell, 2018)。一方、悪性度の高い乳がんでは腫瘍抑制因子として機能する場合と腫瘍促進因子の場合の両者の報告がなされ、評価は一定していない。

現在、TGF- β 経路の阻害薬としてI型受容体キナーゼ阻害薬の開発が進められている。ただ、受容体キナーゼ阻害薬はALK5だけではなくALK4/7もある程度阻害するため、腫瘍抑制因子としてのアクチビン経路をも阻害する可能性を考慮する必要がある。このように、単なる知識の拡充という面を超え、病態におけるTGF- β ファミリー分子の挙動を精確に把握することは、臨床応用上重要である。

(3) TGF- β ファミリーメンバーが中心的役割を果たす病態は数多く知られているが、阻害薬などが臨床応用された例はそれほど多くない。その理由として、①受容体キナーゼ阻害薬では、複数のファミリー分子のシグナルを阻害することになるため、標的外の組織・臓器で予期しない作用 (副反応) を生じる、②TGF- β のように複数の組織・臓器で重要な役割を果たしている場合、中和抗体の全身投与で単独のリガンドを阻害した場合でも標的外の組織・臓器で副反応を生じる、③逆にTGF- β ファミリー分子の冗長性 redundancy のため、中和抗体による阻害では代償作用のため効果が不十分のこともある、④受容体の細胞外ドメインなどを利用し複数分子を一括で阻害するリガンドトラップでは、阻害すべきではないファミリー分子まで阻害し、標的外の組織・臓器で副反応を生じる。

阻害薬開発の一例として、骨格筋萎縮症に対するミオスタチン阻害薬の開発がある。進行がん患者で認められがん悪液質も骨格筋萎縮症の一つであり、患者の生活の質 (QOL) を低下させ予後不良と関係している。TGF- β ファミリーの中で、ミオスタチンや類似するGDF11、アクチビンなどは骨格筋の成長を負に制御する。ミオスタチン経路は骨格筋萎縮に関して介入可能な標的と考えられ、この経路を阻害することで骨格筋肥大や筋力増大を目指す、ミオスタチン阻害薬の開発が活発に行われてきた。その一つがActRIIB-Fcによるリガンドトラップである。しかしActRIIBはアクチビン、ミオスタチンの他に、血管内皮細胞の機能に重要なBMP9をも阻害する。これに関係してか、ActRIIB-Fcは第2相試験で鼻出血などの血管の副作用を認め開発が中断している (Campbell et al., Muscle Nerve, 2017)。

(4) このように、TGF- β ファミリーに対する阻害薬を臨床の場で有効に利用するためには、それぞれの病態で阻害すべきリガンドを過不足なく精密に阻害する必要がある。そこで、選択性が高く単剤でアクチビンやミオスタチンを阻害可能な方法を開発することは、臨床応用を考慮した場合に重要な意味を持つ。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、アクチビンの生理的アンタゴニストである Follistatin-Like-3 (FSTL3) に注目した。FSTL3 は、TGF- β ファミリーの生理的アンタゴニストであるフォリスタチンファミリーの1つで、follistatin-related gene (FLRG) としても知られる。FSTL3 は、フォリスタチンファミリーの中で特にアクチビン/ミオスタチン/GDF11 への選択性が高く、代表的な BMP リガンドとは結合しないことが報告されている。そこで、アクチビンや類似リガンドの阻害薬を用いることで、乳がんの発がん過程におけるこれらのシグナルの役割を詳細に解明すること、特に、アクチビン阻害による腫瘍細胞への治療効果の他、ミオスタチン阻害による骨格筋肥大効果を評価することを当初の研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) FSTL3-Fc 融合蛋白を発現する HEK293T の安定発現株を作成する。またプロテイン A カラムを用い、FSTL3-Fc を精製・調整する系も立ち上げ、試験管レベルでリガンド結合能を確認した。また、培養細胞を用いた系を利用し、リガンド阻害活性も評価した。

(2) マウスモデルを使用して、FSTL3-Fc 融合蛋白の個体レベルでの作用を評価する。例えば、正常マウスを用い、投与方法（尾静注、腹腔注、皮下注、局所投与＝骨格筋への注射など）と血中濃度、血中半減期を評価した。また、当初は乳がん細胞の移植モデル、がん悪液質のモデルとして確立しているマウス大腸がん colon 26 細胞を用いた移植モデルなどを利用する予定とした。しかし、特に骨格筋肥大効果に注目した解析を行うため、同目的で一般に用いられているデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス (C57BL/10-mdx、または mdx マウス) を用い、FSTL3-Fc の骨格筋肥大効果や握力改善効果を評価した。

(3) 既に有効性が報告されている ActRIIB-Fc と比較し、少なくとも非劣性であるか評価した。

4. 研究成果

(1) 2 価 FSTL3-Fc の作成・評価

Fc 融合蛋白はホモ二量体を形成するため、通常の方法で FSTL3-Fc 融合蛋白を作成すると、2 価 (2 本腕) の Fc 融合蛋白となる (図 1A)。2 価 FSTL3-Fc は既報通りアクチビン/ミオスタチン/GDF11 と結合し、BMP や TGF- β とは結合しないことを確認した。しかし、正常マウスに全身投与しても、血中濃度が高くならなかった (図 1B)。このため、2 価 FSTL3-Fc は局所投与 (筋注) では骨格筋肥大効果を認めたが、全身投与できないことが問題となった。

(2) 1 価 FSTL3-Fc の作成・評価

通常用いられる 2 価 Fc 融合蛋白ではなく、Knobs-into-Holes 法を利用して 1 価 (1 本腕) の Fc 融合蛋白を作成した (図 1A)。1 価 FSTL3-Fc も、アクチビン/ミオスタチン/GDF11 と結合し、BMP や TGF- β とは結合しないことを確認した。正常マウスに全身投与した場合、1 価 FSTL3-Fc の血中濃度が上昇することを確認した (図 1B)。

また、1 価 Fc 融合蛋白を正常マウスに腹腔注後、用量依存的に全身の骨格筋肥大を確認した。さらに、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルである mdx マウスに 1 価 Fc 融合蛋白を投与した (図 2)。陽性対照として ActRIIB-Fc、陰性対照としてコントロール Fc を用いた。1 価 FSTL3-Fc 投与群で骨格筋肥大と前肢握力の改善を認め、その効果は副作用のために開発が中断している ActRIIB-Fc と同等だった。さらに、1 価 FSTL3-Fc 投与群では、マクロ解剖所見や組織学的所見で明らかな異常を認めなかった。

(3) 成果報告

ミオスタチン阻害薬として有望と考えられていた ActRIIB-Fc 製剤は、臨床試験で副作用が認められたために開発が中断している。1 価 FSTL3-Fc は、アクチビン/ミオスタチン/GDF11 に対して選択性が高く、副作用の可能性を低減できており、臨床応用が期待できると考えられた。以上の結果をもとに、成果の取りまとめを行い論文発表した。また、1 価 FSTL3-Fc 蛋白の精製法について、プロトコル論文を発表した。

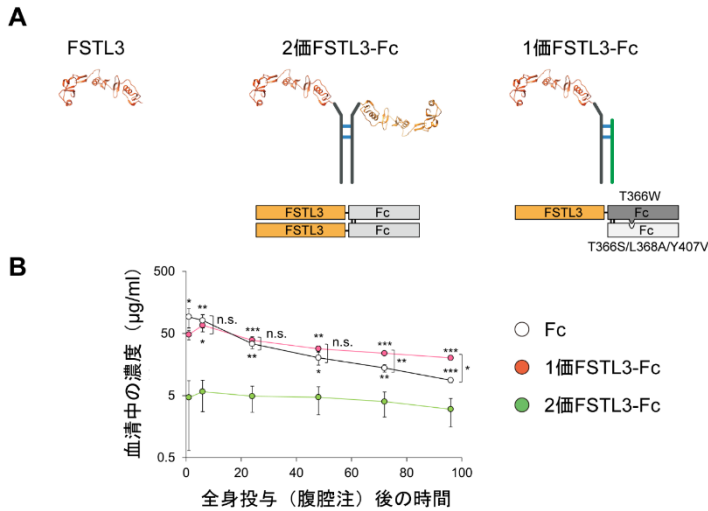


図1 FSTL3-Fc の模式図とマウス投与後の血清中濃度

- (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 となる。また、Knobs-into-Holes (KiH) 法を用い、1 本腕の 1 価 FSTL3-Fc を作成した。
- (B) 1 価 FSTL3-Fc 投与後の血中濃度。Fc タンパク質と比較し、2 価 FSTL3-Fc は投与後も血中濃度が高くなる。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期待された。

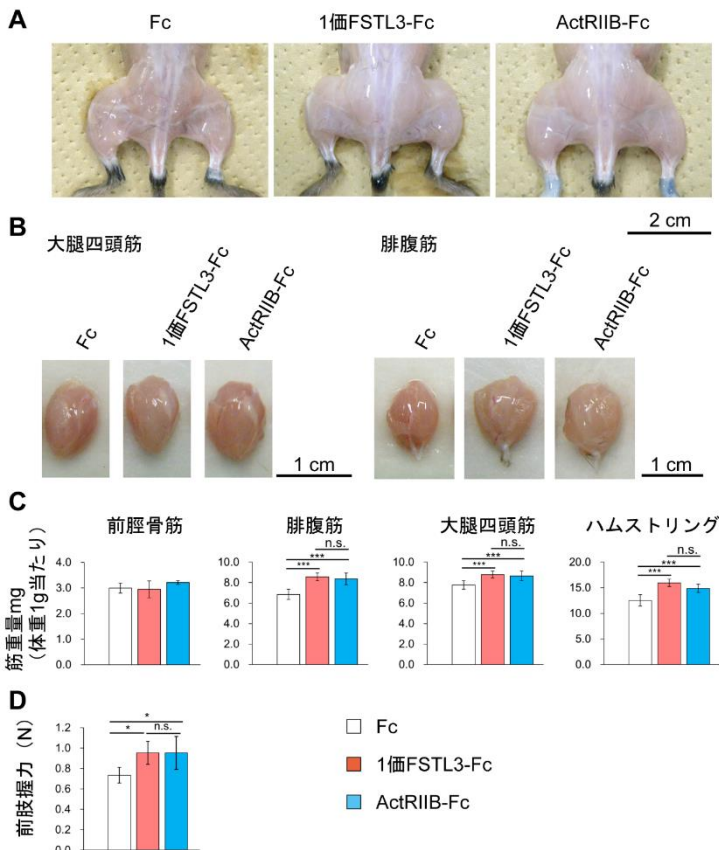


図2 1 価 FSTL3-Fc による骨格筋肥大と筋力増大効果

- (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た。Fc が陰性対照、ActRIIB-Fc が先行製剤であり陽性対照。
- (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 と提示した。
- (D) Fc タンパク質投与後の mdx マウスの前肢握力。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ozawa T., Morikawa M., Morishita Y., Ogikubo K., Itoh F., Koinuma D., Nygren P.-A., Miyazono K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Systemic administration of monovalent follistatin-like 3-Fc-fusion protein increases muscle mass in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102488 ~ 102488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ozawa T., Miyazono K., Morikawa M.	4. 巻 2
2. 論文標題 Preparation of monovalent follistatin-like 3-Fc-fusion protein and evaluation of its effects on muscle mass in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100839 ~ 100839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Morikawa M., Ozawa T., Miyazono K.
2. 発表標題 Systemic administration of monovalent follistatin-like 3-Fc-fusion protein increases muscle mass in mice
3. 学会等名 virtual FASEB Science Research Conference, The TGF- Superfamily Conference: Signaling in Development and Disease (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Morikawa M., Miyazono K.
2. 発表標題 Follistatin-like 3-based ligand trap increases muscle mass in mice
3. 学会等名 13th International BMP Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

個人ページ https://plaza.umin.ac.jp/morikawa/index.html https://researchmap.jp/morikawa-ky 東京大学大学院医学系研究科分子病理学 / 応用病理学 http://beta-lab.umin.ac.jp/index.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スウェーデン	王立工科大学 (KTH)	ウプサラ大学	