

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable diseases

研究開発課題名：(日本語) デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する革新的筋萎縮阻害医薬の実用化
(英語) Clinical realization of an evolutionary drug for muscular atrophy in patients with Duchenne muscular dystrophy

研究開発担当者 (日本語) 学校法人川崎学園 川崎医科大学 神経内科学 教授 砂田芳秀
所属 役職 氏名：(英語) Prof. Yoshihide Sunada, Department of Neurology, Kawasaki Medical School. Kawasaki Gakuen Educational Foundation.

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究開発課題名：(日本語)

砂田芳秀：デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する革新的筋萎縮阻害医薬の実用化(総括)

大澤 裕：ペプチド医薬の有効性の非臨床 POC 取得/企業連携体制の確立

西松伸一郎：モニタリングマウスによるペプチド医薬の安全性の非臨床 POC 取得

萩原宏毅：骨格筋幹細胞によるペプチド医薬の有効性の非臨床 POC 取得/GLP 試験

分担研究開発課題名：(英語)

Prof. Yoshihide Sunada, Clinical realization of an evolutionary drug for muscular atrophy in patients with Duchenne muscular dystrophy

Yutaka Ohsawa, Efficacy assessment of the peptide drug for nonclinical POC

Shin-ichiro Nishimatsu, Safety assessment of the peptide drug for nonclinical POC

Prof. Hiroki Hagiwara, Analysis of muscle precursor satellite cells

研究開発分担者所属 役職 氏名：(日本語)

川崎医科大学神経内科学 教授 砂田芳秀

川崎医科大学神経内科学 講師 大澤 裕

川崎医科大学自然科学 准教授 西松伸一郎
帝京科学大学医療科学部 教授 萩原宏毅

研究開発分担者所属 役職 氏名：(英語)

Prof. Yoshihide Sunada, Department of Neurology, Kawasaki Medical School. Kawasaki Gakuen Educational Foundation.

Yutaka Ohsawa, Department of Neurology, Kawasaki Medical School. Kawasaki Gakuen Educational Foundation.

Shin-ichiro Nishimatsu, Department of Natural Science, Kawasaki Medical School. Kawasaki Gakuen Educational Foundation.

Prof. Hiroki Hagiwara, Department of Medical Science, Teikyo University of Science.

II. 成果の概要（総括研究報告）

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、ジストロフィン遺伝子変異によって、骨格筋のジストロフィー性変化（筋線維壊死・不完全再生・線維化・脂肪化）から筋萎縮・筋力低下を惹起する希少難病で、一刻も早い治療法の開発が待望されている。現在、アンチセンス核酸によるエキソンスキップ、低分子医薬によるリードスルーといった変異ジストロフィン mRNA 修復療法の治験が進行中である。ところが、その対象は、特定の欠損や点変異患者に限定される。マイオスタチンは骨格筋量を負に制御する TGF- β 分子で、われわれは、マイオスタチンの活性亢進から筋萎縮が惹起される筋ジストロフィー病態を世界に先駆け報告した (Ohsawa, *J Clin Invest* 116, 2006)。また、ステロイドによる DMD 運動障害の部分的な改善効果が、マイオスタチンおよび関連 TGF- β 分子の阻害蛋白質である LTBP4 の遺伝子多型に起因することも明らかとなった。DMD における TGF- β /マイオスタチン活性亢進は、DMD の直接の原因ではないものの、disease modifier として世界的に注目されている (Flanigan, *Ann Neurol* 73, 2013)。最近われわれは、マイオスタチンの N-末端に存在する生理的な阻害領域であるプロドメインからその活性阻害中心配列を同定し、相当するペプチドペプチドが、これまで知られていた血中リガンドの阻害ばかりでなく、細胞表面のリガンド-受容体結合を特異的に阻害する新たな薬理機構を発見した(Ohsawa,*PLoS One* 10:e0133713, 2015)。

本研究は、このマイオスタチン阻害ペプチドを、DMD モデルマウスへ全身投与し、筋萎縮・筋力低下の改善効果について非臨床 POC (proof-of-concept) の取得を目指す。平成 27 年度から平成 28 年度は、ペプチドの体内動態を検討し、これまでに体内安定性を増強する最適化マイオスタチン阻害ペプチドの候補を絞り込んだ。また、ペプチド医薬の N 末端側、および C 末端側をそれぞれ認識する特異抗体の作製に成功し、ELISA によるペプチド医薬の定量解析に取り組んだ。平成 29 年度は、DMD モデルマウスへの最適化ペプチド医薬を投与し、そのジストロフィー性変化および筋萎縮への有効性を検証するとともに、用量漸増試験により安全性を検証して非臨床 POC を取得する。平成 29 年度末までに、企業連携による GMP 基準試験薬製造・GLP 試験・患者登録による、ペプチド医薬の医師主導治験届けの提出を目指している。

米国 FDA は、2013 年マイオスタチン II 型受容体抗体医薬 (Bimagrumab) を孤発性封入体筋炎の "break-through therapy" に指定し、進行中の治験では 6 分間歩行距離の改善が発表された (Amato, *Neurology* 83, 2014)。この競合品は非生理的な抗体医薬であり、マイオスタチン以外の各種 TGF- β 分子で共用される受容体を標的とする。一方、われわれのペプチド医薬は元来血中に存在する生理的蛋白質のペプチド配列であり、血中ではマイオスタチンリガンドの高選択的阻害、細胞表面ではマイオスタチンリガンド-受容体結合の特異的阻害という革新的な薬理作用により、より高い安全性と卓越した有効性が期待される。この独創的なシーズを基盤に、希少難病 DMD の国際標準化医療を発信することを最終目標とする。

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a rare and devastating muscle wasting disorder caused by mutations in the dystrophin gene, resulting in so-called dystrophic pathology, including the necrosis and the incomplete regeneration of myofibers with fibrous and fatty replacement. At present, several clinical trials targeting to the mutated dystrophin mRNA are ongoing, including the exon-skip therapy using antisense nucleotides, and the read-through therapy using

antibiotics. However, the participants in these clinical trials are strictly restricted in the certain deletions or the point mutations in the dystrophin gene. Myostatin, a muscle-specific transforming growth factor-beta (TGF-beta) family member negatively regulates skeletal muscle mass. The N-terminal prodomain of myostatin has been known to bind and suppress the C-terminal mature domain (ligand) as an inactive circulating complex. We previously showed that overexpression of the prodomain reverses myostatin-induced muscular atrophy in a rodent model of muscular dystrophy (Ohsawa, *J Clin Invest* 116, 2006). In addition, the activity of myostatin-inhibiting protein (LTBP4) negatively correlates with the severity of motor impairment in patients with DMD (Franigan, *Ann Neurol* 73, 2013). Thus, the activation of myostatin/TGF-beta in dystrophic muscles has been now drawn attention as a disease modifier and a therapeutic target of DMD without restriction of the types of mutation in the dystrophin gene. Recently, we identified the inhibitory core (IC) from the myostatin prodomain. The IC inhibited myostatin-induced transcriptional activity by 79% compared with the full-length prodomain. We found that the IC suppresses not only the ligand, but also prevents two distinct membrane receptors from binding to the ligand. Indeed, the IC inhibits myostatin, but not TGF-beta 1, or activin (Ohsawa, *PLoS One* 10:e0133713, 2015). In this study, we aim to acquire the non-clinical proof-of-concept (POC) of the efficiency of the IC peptide to treat DMD model mice. From 2017-2018, we examined the pharmacokinetics of the IC peptide using a wild-type mice and subsequently modified the IC peptide to increase the stability in the mouse body. To establish the ELISA system measuring the concentration of the IC peptide, we developed the antibody which recognizes the N-terminal, or the C-terminal IC peptide, respectively. In 2019, we inject the optimal IC peptide to the DMD model mouse and investigate the effectiveness on the muscle atrophy and the dystrophic pathology in the model mouse. The final goal is to produce the GMP-grade optimal IC peptide. In 2013, FDA approved a type II receptor antibody (Bimagrumab) as a break-through therapy of myostatin inhibition for inclusion body myositis (Amato, *Neurology* 83, 2014). This competitor is a non-physiological antibody and potentially inhibits several TGF-beta family members, other than myostatin. On the other hand, the IC peptide functions fundamentally as a circulating physiological inhibitor of the myostatin ligand, and suppresses specifically the myostatin ligand-receptor binding on the cell surface. Thus, the IC would be expected to be a more safe and a more effective treatment for DMD by specific inhibition of myostatin. We are now aiming for international expansion of the IC peptide therapy for DMD patients harboring any types of the the dystrophin mutations.

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者： 砂田 芳秀 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

1. 砂田芳秀, 抗マイオスタチン療法. 医学のあゆみ. 2016, 259, 23-28
2. 砂田芳秀, 筋強直性ジストロフィー. 今日の治療指針 2017 年版私はこう治療している. 2017, 947-948
3. 永井太士, 砂田芳秀, 8.筋力低下. 第3章 神経疾患を病歴聴取と身体所見で鑑別する!. レジデントノート増刊 神経内科がわかる、好きになる 今日から実践できる診察・診断・治療のエッセンス. 2017, 3079-3083

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. マイオスタチン阻害活性中心ペプチドによる筋萎縮治療法, 口頭, 大澤 裕, 砂田芳秀, 深井雄太, 村上龍文, 第 57 回日本神経学会学術大会, 神戸, 2016/5/18, 国内.
2. Dynamics of myokines in the process of muscle atrophy and reloading in the mouse disuse model, ポスター, Hagiwara H, Aihara M, Hirose N, Ohkuma H, Masaki T, Matsumura K, Sonoo M, Saito F, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/ 5/20, 国内.
3. 筋肉の病気:どのように診断するのか?, 口頭, 砂田芳秀, 第 57 回日本神経学会学術大会, 神戸, 2016/5/21, 国内.
4. ギプス固定による廃用性筋萎縮と再荷重のプロセスにおけるマイオカインの変動, ポスター, 相原正博, 勝田若奈, 森優樹, 廣瀬昇, 斉藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅, 第 51 回日本理学療法学術大会, 2016/ 5/28, 国内.
5. マイオスタチンプロドメインによる骨格筋量制御機構, ポスター, 大澤 裕, 第 2 回日本筋学会学術集会, 東京, 2016/8/6, 国内.
6. ギプス固定による廃用性筋萎縮と再荷重のプロセスにおけるサイトカインと酸化ストレスマーカーの動態, ポスター, 相原正博, 廣瀬昇, 勝田若奈, 斉藤史明, 丸山仁司, 萩原宏毅, 第 2 回日本筋学会学術集会, 2016/8/6, 国内.
7. マイオスタチンプロドメインによる骨格筋量の新たな制御機構, ポスター, 大澤 裕, 第 34 回日本神経治療学会総会, 鳥取, 2016/11/5, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 筋肉は使わないとどうなるか?, 萩原宏毅, 平成 28 年度吉田高等学校理数科課題研究, 2016/ 7/26, 国内
2. サルコペニアとフレイル どう診断し対処するか, 砂田芳秀, 第 186 回倉敷内科医会, 倉敷, 2017/2/3, 国内

(4) 特許出願

なし。