

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 10 月 8 日(08.10.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/152183 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/060015
- (22) 国際出願日: 2015 年 3 月 30 日(30.03.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-071461 2014 年 3 月 31 日(31.03.2014) JP
- (71) 出願人: 大日本住友製薬株式会社 (SUMITOMO DAINIPPON PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418524 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 6 番 8 号 Osaka (JP). 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 日野 恭介 (HINO Kyoosuke); 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 大日本住友製薬株式会社内 Osaka (JP). 戸口田 淳也 (TOGUUCHIDA Junya); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 池谷 真 (IKEYA Makoto); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiki et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目 1 番

1 号丸の内 M Y P L A Z A (明治安田生命ビル) 9 階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: PROPHYLACTIC AGENT AND THERAPEUTIC AGENT FOR FIBRODYSPLASIA OSSIFICANS PROGRESSIVA

(54) 発明の名称: 進行性骨化性線維異形成症の予防剤及び治療剤

(57) Abstract: Provided is a prophylactic or therapeutic agent for fibrodysplasia ossificans progressiva, said agent comprising, as an active ingredient, a binding inhibitor inhibiting an interaction between activin and activin A receptor type I (ACVR1) or an expression inhibitory substance inhibiting the expression of activin.

(57) 要約: 本発明は、アクチビンとアクチビン A 受容体タイプ I (ACVR1) との相互作用を阻害する結合阻害物質、又はアクチビンの発現を抑制する発現抑制物質を有効成分として含有する、進行性骨化性線維異形成症の予防剤又は治療剤を提供する。



WO 2015/152183 A1

明 細 書

発明の名称： 進行性骨化性線維異形成症の予防剤及び治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、進行性骨化性線維異形成症の予防剤及び治療剤に関する。より詳細には、本発明は、アクチビンの活性を抑制することで進行性骨化性線維異形成症の主症状であるフレアアップ、並びに／又は、異常な軟骨若しくは骨の形成及び成長を抑制する、予防剤及び予防方法、並びに、治療剤及び治療方法に関する。

背景技術

[0002] 進行性骨化性線維異形成症（F O P）は、炎症又は痛みを伴う腫脹（「フレアアップ」とも言う。）と異所性の骨化（「異所性骨化」とも言う。）とを主症状とする遺伝性の疾患である。典型的な進行性骨化性線維異形成症の患者（F O P 患者）では、小児期又は学童期からフレアアップが出現し、フレアアップの消失に伴って異所性の骨化が生じる。この頃から全身の骨格筋、筋膜、腱及び靱帯等の線維性組織が進行性かつ異所性に骨化し、関節の拘縮、変形又は可動性障害が生じる。

[0003] F O P における異所性骨化の特徴は、筋等の軟部組織の破壊及び再生によって異所性骨化が急激に誘発される点にある（非特許文献1）。F O P 患者に見られる異所性骨化では、軟骨内骨化（内軟骨性骨化）とよばれる過程を経ることが報告されている（非特許文献2）。軟骨内骨化は、まず軟骨が形成され、その後骨に置き換わる現象である。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：P e d i a t r i c s , 2 0 0 5 , 1 1 6 , e 6 5 4 - 6 6 1

.

非特許文献2：J . B o n e J o i n t S u r g . A m . , 1 9 9 3 , 7
5 (2) , 2 2 0 - 2 3 0 .

非特許文献3: Nat. Genet. 2006, 38, 525-527.

非特許文献4: J. Biol. Chem. 2009, 284 (11), 7149-7156.

非特許文献5: J. Bone Miner. Res. 2010, 25 (6), 1208-1215.

非特許文献6: Oncogene 1993, 8 (10), 2879-2887.

非特許文献7: J. Biol. Chem. 1998, 273 (40), 25628-25636.

非特許文献8: ACS Chem. Biol., 2013, 8 (6), 1291-1302.

非特許文献9: Bioorg. Med. Chem. Lett., 2013, 23 (11), 3248-3252.

非特許文献10: Gene Ther., 2012, 19 (7), 786-790.

非特許文献11: Nat. Med., 2011, 17 (4), 454-460.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] FOPは常染色体優性遺伝形式をとる遺伝子疾患である。FOPは、アクチビンA受容体タイプI (ACVR1) の突然変異が原因であることが報告されている (非特許文献3)。ACVR1は、I型骨形成タンパク質受容体 (BMP受容体) のひとつである。ACVR1は、BMPの受容体として細胞内にシグナルを伝達するセリン／スレオニンキナーゼである。FOP患者でみられる変異型ACVR1は、BMP非依存的にシグナルが伝達されること (非特許文献4及び5)、及び正常なACVR1 (野生型ACVR1) と比較してBMPに対する反応性が亢進していること (非特許文献5) が報告されている。

[0006] TGF- β スーパーファミリーは20種類を超える多様なメンバーから構成され、BMPファミリーとTGF- β ファミリーとに大別される。例えばBMP-7はBMPファミリーに属するサイトカインの一種である。BMPは、膜貫通型セリン／スレオニンキナーゼであるI型及びII型の2種類の受容体と複合体を形成することで、細胞内にシグナルを伝達する。一方アクチビン、TGF- β ファミリーに分類されるリガンドであり、インヒビン β 鎖からなる二量体である。BMP同様にアクチビンもI型及びII型の受容体と複合体を形成することで細胞内にシグナルを伝達する。しかし、アクチビンとBMPとでは、シグナルを伝達する受容体分子が異なることが知られている。

[0007] I型BMP受容体の一種であるACVR1の遺伝子は、ヒトII型アクチビン受容体及び線虫Daf-1と配列相同性のある遺伝子を探索した結果、見出された遺伝子である。そのため、ACVR1はアクチビン受容体様キナーゼ2とも呼ばれている（非特許文献6）。しかしながら、その後の解析によって、ACVR1の生理的リガンドは、BMP-7等のBMPファミリーのリガンドであることが示されている（非特許文献7）。さらに、アクチビンはACVR1を介してシグナルを伝達する活性がないことが示されている（非特許文献7）。

[0008] 現在、FOPの治療には、ステロイド、非ステロイド性消炎鎮痛剤、ビスフォスフォネート等が使用されている。しかしながら、異所性骨化の進行を抑制する、明らかな有効性が確認された治療薬は存在しない。

[0009] FOPの治療法として、ACVR1のキナーゼ活性を阻害する化合物が研究されている（非特許文献8及び9）。これらの化合物には、FOPの病態の一面を模倣した動物モデルを用いた実験で、異所性骨化を抑制する作用が確認されているものがある。

[0010] 別の知見として、RNA干渉技術を用いてFOP患者で見られる変異型ACVR1を選択的に発現抑制すると、FOP患者由来の脱落乳歯歯髓幹細胞の骨分化が抑制されることが報告されている（非特許文献10）。

[0011] FOPの病態の一面を模倣した動物モデルを用いた実験で、レチノイン酸受容体 γ アゴニストが、異所性骨化を抑制することが示されている（非特許文献11）。

[0012] 上記のように、これまでに報告されている治療法は、いずれもACVR1の発現若しくは酵素活性を抑制すること、又はACVR1の下流でシグナル伝達を阻害することに基づいた方法である。

一方、FOPの原因となる変異型ACVR1は、正常なACVR1と比較してBMPシグナルの伝達能が亢進していること、及びBMP非依存的にシグナルを伝達することが報告されている。（非特許文献4及び5）、しかし、これらの現象とFOPの病態との関係は明確ではない。

[0013] 以上のように、FOPの発症のメカニズムは未だ不明であり、FOPの発症の抑制又は治療に用いられる医薬品は見出されていない。

[0014] 本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、進行性骨化性線維異形成症（FOP）の予防剤及び／又は治療剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0015] アクチピンは、ACVR1にも結合するが、本来ACVR1ではなくアクチピンA受容体タイプ1B（ACVR1B）を介してシグナルを伝達するリガンドである。しかしながら、本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、FOP患者由来の細胞では、アクチピンが、変異型ACVR1を介しても細胞内にシグナルを伝達し、この異常なシグナル伝達がFOP患者で認められる異所性の軟骨誘導及び骨誘導の一因であることを見出した。尚、本明細書において、「アクチピンがACVR1に結合する」とは、アクチピンがACVR1を含む受容体複合体に結合することを含む。更に、上述の独自の知見に基づき、アクチピンのACVR1に対する結合活性を抑制する物質又はアクチピンの発現を抑制する物質が、FOP患者から樹立したiPS細胞に由来する間葉系幹細胞様の細胞における軟骨細胞への分化誘導を抑制する効果、すなわち異所性骨化の発症若しくは進行を抑制する効果を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

[0016] すなわち、本発明は、以下に関する。

[1] アクチビンとアクチビンA受容体タイプI (ACVR1) との相互作用を阻害する結合阻害物質、又はアクチビンの発現を抑制する発現抑制物質を有効成分として含有する、進行性骨化性線維異形成症の予防剤又は治療剤。

[2] 上記結合阻害物質が、アクチビン受容体、その改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

フォリスタチン、フォリスタチン様タンパク質、それらの改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

アクチビンに対する抗体及び抗原結合部位を含むその抗体断片、並びに、インヒビン及びその改変体、

からなる群から選ばれる、上記[1]に記載の予防剤又は治療剤。

[3] 上記発現抑制物質が、アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸である、上記[1]に記載の予防剤又は治療剤。

[4] 上記アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸が、アクチビンの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNA及びリボザイムからなる群から選ばれる、上記[3]に記載の予防剤又は治療剤。

[5] ACVR1にアミノ酸変異を有する患者用である、上記[1]～[4]のいずれかに記載の予防剤又は治療剤。

[6] 上記アミノ酸変異が、上記ACVR1のGSドメイン又はキナーゼドメインにおけるアミノ酸変異を含む、上記[5]に記載の予防剤又は治療剤。

[7] 上記GSドメイン又はキナーゼドメインにおけるアミノ酸変異が、配列番号10に記載のアミノ酸配列における第196番目のアミノ酸残基がプロリンであるアミノ酸変異、第197番目のアミノ酸残基がロイシンであり第198番目のアミノ酸が欠失したアミノ酸変異、第202番目のアミノ酸残基がイソロイシンであるアミノ酸変異、第206番目のアミノ酸残基がヒ

スチジンであるアミノ酸変異、第207番目のアミノ酸残基がグルタミン酸であるアミノ酸変異、第258番目のアミノ酸残基がグリシン又はセリンであるアミノ酸変異、第325番目のアミノ酸残基がアラニンであるアミノ酸変異、第328番目のアミノ酸残基がグルタミン酸、アルギニン又はトリプトファンであるアミノ酸変異、第356番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸であるアミノ酸変異、及び第375番目のアミノ酸残基がプロリンであるアミノ酸変異からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、上記〔6〕に記載の予防剤又は治療剤。

〔8〕上記ACVR1のGSドメインにおけるアミノ酸変異を含み、上記GSドメインにおけるアミノ酸変異が、配列番号10に記載のアミノ酸配列における第206番目のアミノ酸残基がヒスチジンであるアミノ酸変異を含む、上記〔6〕に記載の予防剤又は治療剤。

〔9〕進行性骨化性線維異形成症の予防剤若しくは治療剤、又はそれらの候補物質のスクリーニング方法であって、

被験物質の存在下、アクチビンとアクチビンA受容体タイプI（ACVR1）との相互作用を測定し、第1の結合力を求める工程と、

上記被験物質の非存在下において測定した上記相互作用から求められた第2の結合力と比較し、上記第1の結合力が上記第2の結合力より弱いとき、上記被験物質を候補物質として選択する工程と、を含むか、又は、

被験物質の存在下、アクチビンが結合することによる変異型ACVR1を介したシグナル伝達の強度を測定し、第1のシグナル強度を求める工程と、

上記被験物質の非存在下において測定した上記シグナル伝達の強度から求められた第2のシグナル強度と比較し、上記第1のシグナル強度が上記第2のシグナル強度より弱いとき、上記被験物質を候補物質として選択する工程と、を含む、スクリーニング方法。

〔10〕上記〔9〕に記載のスクリーニング方法によって選択された被験物質を有効成分として含有する、進行性骨化性線維異形成症の予防剤又は治療剤。

〔１１〕異所性骨化の症状若しくは進行を抑制する薬剤、又は異所性骨化発症を回避若しくは抑制する薬剤である、上記〔１〕～〔８〕及び〔１０〕のいずれかに記載の予防剤又は治療剤。

[0017] さらに本発明は、以下に関する。

〔１２〕アクチビンとアクチビンＡ受容体タイプⅠ（ＡＣＶＲ１）との相互作用を阻害する結合阻害物質、又はアクチビンの発現を抑制する発現抑制物質の有効量を、哺乳動物に投与することを含む、進行性骨化性線維異形成症の予防又は治療方法。

〔１３〕上記結合阻害物質が、アクチビン受容体、その改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

フォリスタチン、フォリスタチン様タンパク質、それらの改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

アクチビンに対する抗体及び抗原結合部位を含むその抗体断片、並びに、インヒビン及びその改変体、

からなる群から選ばれる、上記〔１２〕に記載の方法。

〔１４〕上記発現抑制物質が、アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸である、上記〔１２〕に記載の方法。

〔１５〕上記アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸が、アクチビンの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、*shRNA*、*miRNA*及びリボザイムからなる群から選ばれる、上記〔１４〕に記載の方法。

〔１６〕上記哺乳動物がヒトである、上記〔１２〕～〔１５〕のいずれかに記載の方法。

〔１７〕上記ヒトがＡＣＶＲ１にアミノ酸変異を有する、上記〔１６〕に記載の方法。

〔１８〕上記アミノ酸変異が、上記ＡＣＶＲ１のＧＳドメイン又はキナーゼドメインにおけるアミノ酸変異を含む、上記〔１７〕に記載の方法。

〔１９〕上記ＧＳドメイン又はキナーゼドメインにおけるアミノ酸変異が、

配列番号 10 に記載のアミノ酸配列における第 196 番目のアミノ酸残基がプロリンであるアミノ酸変異、第 197 番目のアミノ酸残基がロイシンであり第 198 番目のアミノ酸が欠失したアミノ酸変異、第 202 番目のアミノ酸残基がイソロイシンであるアミノ酸変異、第 206 番目のアミノ酸残基がヒスチジンであるアミノ酸変異、第 207 番目のアミノ酸残基がグルタミン酸であるアミノ酸変異、第 258 番目のアミノ酸残基がグリシン又はセリンであるアミノ酸変異、第 325 番目のアミノ酸残基がアラニンであるアミノ酸変異、第 328 番目のアミノ酸残基がグルタミン酸、アルギニン又はトリプトファンであるアミノ酸変異、第 356 番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸であるアミノ酸変異、及び第 375 番目のアミノ酸残基がプロリンであるアミノ酸変異からなる群から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含む、上記 [18] に記載の方法。

[20] 上記 ACVR1 の GS ドメインにおけるアミノ酸変異を含み、上記 GS ドメインにおけるアミノ酸変異が、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列における第 206 番目のアミノ酸残基がヒスチジンであるアミノ酸変異を含む、上記 [18] に記載の方法。

[21] 進行性骨化性線維異形成症の予防又は治療に使用するための、アクチビンとアクチビン A 受容体タイプ I (ACVR1) との相互作用を阻害する結合阻害物質。

[22] アクチビン受容体、その改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

フォリスタチン、フォリスタチン様タンパク質、それらの改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

アクチビンに対する抗体及び抗原結合部位を含むその抗体断片、並びに、インヒビン及びその改変体、
からなる群から選ばれる、上記 [21] に記載の結合阻害物質。

[23] 進行性骨化性線維異形成症の予防又は治療に使用するための、アクチビンの発現を抑制する発現抑制物質。

〔24〕アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸である、上記〔23〕に記載の発現抑制物質。

〔25〕上記アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸が、アクチビンの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、*shRNA*、*miRNA*及びリボザイムからなる群から選ばれる、上記〔24〕に記載の発現抑制物質。

〔26〕進行性骨化性線維異形成症の予防剤又は治療剤の製造における、アクチビンとアクチビンA受容体タイプI（*ACVR1*）との相互作用を阻害する結合阻害物質、又はアクチビンの発現を抑制する発現抑制物質の使用。

〔27〕上記結合阻害物質が、アクチビン受容体、その改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

フォリスタチン、フォリスタチン様タンパク質、それらの改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

アクチビンに対する抗体及び抗原結合部位を含むその抗体断片、並びに、インヒビン及びその改変体、

からなる群から選ばれる、上記〔26〕に記載の使用。

〔28〕上記発現抑制物質が、アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸である、上記〔26〕に記載の使用。

〔29〕上記アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸が、アクチビンの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、*siRNA*、*shRNA*、*miRNA*及びリボザイムからなる群から選ばれる、上記〔28〕に記載の使用。

〔30〕以下の工程（1）及び工程（2）を含む方法によって調製される、進行性骨化性線維異形成症モデル動物：

（1）*ACVR1*にアミノ酸変異を有するiPS細胞から調製された間葉系幹細胞様の細胞を含む細胞集団を、アクチビンAの共存下に培養し、三次元軟骨ペレットを得る工程、

（2）工程（1）で得られた三次元軟骨ペレットを、免疫不全非ヒト哺乳動

物に皮下投与する工程。

[31] 以下の工程(1)～(3)を含む、進行性骨化性線維異形成症の予防剤若しくは治療剤、又はそれらの候補物質の評価方法：

(1) 上記[30]に記載のモデル動物に被験物質を投与する工程、

(2) 上記モデル動物において、異所性に形成された骨軟骨塊の量を評価する工程、及び、

(3) 工程(2)で評価された上記骨軟骨塊の量が基準よりも小さい場合に、当該被験物質を進行性骨化性線維異形成症の予防剤若しくは治療剤、又はそれらの候補物質として同定する工程。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、進行性骨化性線維異形成症の予防剤及び／又は治療剤を提供することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1] FOP患者由来の細胞及び変異修復株由来の細胞における、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現に由来する相対発光強度を示すグラフである。

[図2] FOP患者由来の細胞及び変異修復株由来の細胞における、リン酸化SMAD1/5/8及び総SMAD1/5/8の量を示すウェスタンブロットの写真である。

[図3] FOP患者由来の細胞及び変異修復株由来の細胞から分化した軟骨細胞をアルシアンブルーで染色した写真である。

[図4] FOP患者由来の細胞及び変異修復株由来の細胞から分化した軟骨細胞における、硫酸化グリコサミノグリカンの量を示すグラフである。

[図5] FOP患者由来の細胞における、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現に由来する相対発光強度を示すグラフである。

[図6] FOP患者由来の細胞から分化した軟骨細胞をアルシアンブルーで染色した写真(A)及びFOP患者由来の細胞から分化した軟骨細胞における、硫酸化グリコサミノグリカンの量を示すグラフ(B)である。

[図7] FOP患者由来の細胞から分化した軟骨細胞における、硫酸化グリコサ

ミノグリカンの量を示すグラフである。

[図8]野生型ACVR1又は変異型ACVR1の遺伝子を発現させたU2OS細胞における、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現に由来する発光強度を示すグラフである。

[図9]FOP患者由来の細胞及び変異修復株由来の細胞における、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現に由来する相対発光強度を示すグラフである。

[図10]FOP患者由来の軟骨ペレット又は変異修復株由来の軟骨ペレットのマウスへの移植実験の結果を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0021] 本実施形態における進行性骨化性線維異形成症の予防剤又は治療剤（以下、「FOP予防剤／治療剤」という場合がある。）は、アクチビンとアクチビンA受容体タイプI（ACVR1）との相互作用を阻害する結合阻害物質、又はアクチビンの発現を抑制する発現抑制物質を有効成分として含有する。

[0022] 進行性骨化性線維異形成症（FOP）とは、典型的には小児期から全身の結合組織が進行性かつ異所性に骨化し（異所性骨化）、四肢及び体幹の可動性の低下若しくは変形を生じる遺伝子疾患を意味する。異所性骨化とは、本来は骨形成が起こらない組織において認められる骨化を意味する。FOPでは進行性に全身の結合組織の異所性骨化が起こることで運動機能が著しく障害される。本発明者らは、アクチビンが変異型ACVR1に結合することによって細胞内にシグナルが伝達されること及び、このシグナル伝達がFOP患者で認められる異所性の軟骨誘導及び骨誘導の一因であることを見出している。なお、アクチビンは、ACVR1と結合するが、野生型ACVR1と結合しても、ACVR1の下流にシグナルを伝達しないことが知られている。FOP予防剤／治療剤は、アクチビンとACVR1との相互作用を阻害すること、又はアクチビンの発現を抑制することでFOPの主症状であるフレ

アアップ、並びに／又は、異常な軟骨若しくは骨の形成及び成長を抑制する薬剤である。FOP予防剤／治療剤は、例えば、アクチビンのACVR1に対する結合阻害剤、又は、アクチビンの発現抑制剤として把握することもできる。上記変異型ACVR1の詳細については後述する。

[0023] 進行性骨化性線維異形成症の予防とは、フレアアップ又は異所性骨化が発症することを回避又は抑制することを意味する。例えば、以下の処置によって上記予防が達成される。

(1) フレアアップ又は異所性骨化を発症する前から日常的にFOP予防剤／治療剤を投薬する。

(2) 外傷及び感染等のフレアアップを発症する要因が生じた際にFOP予防剤／治療剤を投薬し、フレアアップの発症を回避又は抑制する。

(3) 炎症、痛み、フレアアップ等が生じたときにFOP予防剤／治療剤を投薬し、異所性骨化の発症を回避又は抑制する。

[0024] 進行性骨化性線維異形成症の治療とは、進行性骨化性線維異形成症の症状の治癒、症状の改善、症状の軽減、又は症状の進行の抑制を意味する。例えば、以下に示す事項が上記治療に含まれる。

(1) フレアアップの症状の抑制、フレアアップが発症している期間の短縮。

(2) フレアアップを発症した後の異所性骨化の症状の抑制。

(3) 通常、進行性の経過をとる異所性骨化の症状又は進行の抑制。

[0025] アクチビンとは、インヒビン β 鎖のホモダイマー又はヘテロダイマーを意味する。インヒビン β 鎖としては、例えば、 β A鎖(NCBIアクセッション番号: NM_002192、配列番号1、2)、 β B鎖(NCBIアクセッション番号: NM_002193、配列番号3、4)、 β C鎖(NCBIアクセッション番号: NM_005538、配列番号5、6)、 β E鎖(NCBIアクセッション番号: NM_031479、配列番号7、8)が挙げられる。上記アクチビンとしては、例えば、アクチビンA(β A鎖のホモダイマー)、アクチビンB(β B鎖のホモダイマー)、アクチビンAB(β A

鎖と β 鎖とのヘテロダイマー)が挙げられる。インヒビン β 鎖は、mRNAからの翻訳後、まずN末端側の約18~30アミノ酸残基のシグナルペプチドが切断されてpro体となる。インヒビン β 鎖の上記pro体は、更にN末端側の約200~300アミノ酸残基のポリペプチドが切断され除かれることで成熟したインヒビン β 鎖となる。

[0026] アクチビンA受容体タイプI (ACVR1)は、I型BMP受容体の一種である。ACVR1は、例えば、NCBIアクセッション番号: NM_001105 (配列番号9) 又はそのアイソフォームであるNM_001111067 (配列番号21) に記載の核酸配列によってコードされる受容体である。ACVR1のアミノ酸配列は、例えば、配列番号10又は22に記載のアミノ酸配列が挙げられる。

[0027] アクチビンA受容体タイプIB (ACVR1B)は、アクチビン受容体の一種である。アクチビンは生体内において、ACVR1Bを介してシグナルを伝達する。ACVR1Bとして、例えば、NCBIアクセッション番号: NM_004302 (variant 1, isoform a; 配列番号23)、NM_020327 (variant 2, isoform b; 配列番号25)、NM_020328 (variant 3, isoform c; 配列番号27) に記載の核酸配列によってコードされる受容体が挙げられる。ACVR1Bのアミノ酸配列としては、例えば、配列番号24、配列番号26及び配列番号28に記載のアミノ酸配列が挙げられる。

[0028] アクチビンA受容体タイプIIは、アクチビンと結合して複合体を形成するタンパク質である。アクチビンA受容体タイプIIは、生体内において、当該複合体がACVR1Bを介してアクチビンのシグナルを伝達する。アクチビンA受容体タイプIIとしては、ACVR2A (NCBIアクセッション番号: NM_001616、配列番号11、12) 及びACVR2B (NCBIアクセッション番号: NM_001106、配列番号13、14) が挙げられる。

[0029] アクチビンとアクチビンA受容体タイプI (ACVR1)との相互作用を

阻害する結合阻害物質（以下、「結合阻害物質」という場合がある。）は、アクチビンがリガンドとしてACVR1に結合することを阻害すること、又はアクチビンがリガンドとしてアクチビンA受容体タイプII（ACVR2A若しくはACVR2B）と結合して複合体を形成し、当該複合体がACVR1に結合することを阻害することが可能であれば、特に制限されない。結合阻害物質としては、例えば、TGF- β スーパーファミリーのリガンドに対するI型又はII型受容体のリガンド結合部位を含む部分タンパク質（アクチビン受容体等）、フォリスタチン、フォリスタチン様タンパク質、アクチビンに対する抗体、インヒビン、及びこれらの部分配列を含むポリペプチド断片、並びに、後述するスクリーニング方法によってスクリーニングされる物質（低分子化合物、ポリペプチド等）等が挙げられる。なお、「結合阻害物質」は、FOP予防剤／治療剤の投与対象の内在性のタンパク質等とは区別される外来性のタンパク質等を意味する。「外来性のタンパク質等」としては例えば、遺伝子工学的方法に準じて製造されたタンパク質等、単離又は精製されたタンパク質等が挙げられる。

[0030] 結合阻害物質は、アクチビン受容体、その改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

フォリスタチン、フォリスタチン様タンパク質、それらの改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、

アクチビンに対する抗体及び抗原結合部位を含むその抗体断片、並びに、インヒビン、及びその改変体からなる群から選ばれることが好ましい。

[0031] アクチビン受容体としては、例えば、アクチビンA受容体タイプI（ACVR1）、アクチビンA受容体タイプIB（ACVR1B）、アクチビンA受容体タイプII（ACVR2A又はACVR2B）が挙げられる。結合阻害物質としてのアクチビン受容体はアクチビンと結合して、アクチビンと内在性のACVR1との結合を阻害する。そのため、アクチビンが変異型ACVR1に結合することによるシグナル伝達が抑制されて、異所性の軟骨誘導

及び骨誘導が抑制される。

ACVR1としては、例えば、配列番号10又は22に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる。ACVR1Bとしては、例えば配列番号24、26又は28に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる。ACVR2Aとしては、例えば配列番号12に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる。ACVR2Bとしては、例えば配列番号14に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる。結合阻害物質としてのアクチビン受容体は、ACVR2A又はACVR2Bであることが好ましく、更にACVR2Aであることが好ましい。

[0032] アクチビン受容体の改変体とは、アクチビン受容体を構成するアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、アクチビン受容体を構成するアミノ酸配列に対して85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、アクチビンに対する結合能力を有するタンパク質を意味する。

[0033] 好ましくは、上記ACVR1の改変体としては、

(1) 配列番号10で表されるアミノ酸配列、又は、配列番号10で表されるアミノ酸配列における第21～第123番目に対応するアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、

(2) 配列番号10で表されるアミノ酸配列、又は、配列番号10で表されるアミノ酸配列における第21～第123番目に対応するアミノ酸配列に対して85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ、アクチビンに対する結合能力を有するタンパク質が挙げられる。

[0034] 好ましくは、上記ACVR1Bの改変体としては、

(1) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列、配列番号 24 で表されるアミノ酸配列における第 24 ～第 126 番目に対応するアミノ酸配列、配列番号 26 で表されるアミノ酸配列、配列番号 26 に記載のアミノ酸配列における第 1 ～第 74 番目に対応するアミノ酸配列、配列番号 28 で表されるアミノ酸配列、又は配列番号 28 で表されるアミノ酸配列における第 24 ～第 126 番目に対応するアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、

(2) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列、配列番号 24 で表されるアミノ酸配列における第 24 ～第 126 番目に対応するアミノ酸配列、配列番号 26 で表されるアミノ酸配列、配列番号 26 に記載のアミノ酸配列における第 1 ～第 74 番目に対応するアミノ酸配列、配列番号 28 で表されるアミノ酸配列、又は配列番号 28 で表されるアミノ酸配列における第 24 ～第 126 番目に対応するアミノ酸配列に対して 85% 以上、好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、更に好ましくは 98% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ、アクチビンに対する結合能力を有するタンパク質が挙げられる。

[0035] 好ましくは、上記 ACVR2A 又は ACVR2B の改変体としては、

(1) 配列番号 12 で表されるアミノ酸配列、配列番号 12 で表されるアミノ酸配列における第 20 ～第 135 番目に対応するアミノ酸配列、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列、又は配列番号 14 で表されるアミノ酸配列における第 19 ～第 134 番目に対応するアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、

(2) 配列番号 12 で表されるアミノ酸配列、配列番号 12 で表されるアミノ酸配列における第 20 ～第 135 番目に対応するアミノ酸配列、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列、又は配列番号 14 で表されるアミノ酸配列における第 19 ～第 134 番目に対応するアミノ酸配列に対して 85% 以上、好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、更に好ましくは 98%

以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、
からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ、アクチビンに対する
結合能力を有するタンパク質が挙げられる。

[0036] 本明細書において、置換、欠失、挿入又は付加されたアミノ酸（変異されたアミノ酸）の数は、改変体がアクチビンに対する結合能力を有する範囲であればよい。アミノ酸の変異の数は、少なくとも１個、好ましくは、１若しくは数個である。「１若しくは数個」は好ましくは１個～５個、より好ましくは、１個～３個、更に好ましくは１又は２個である。変異されたアミノ酸配列は、天然に存在するアミノ酸配列、すなわち、自然発生による変異を有するアミノ酸配列であってもよい。変異されたアミノ酸配列は、人為的に所望の部位又はアミノ酸残基に変異を導入したアミノ酸配列であってもよい。人為的に所望の部位又はアミノ酸残基に変異を導入する場合、天然に存在する変異体に準じて人為的に変異を導入してもよい。人為的な変異（置換、欠失、挿入又は付加）の導入は、例えば、PCR法を用いた部位特異的変異導入法、又は既知の部位特異的変異導入法（Site specific mutagenesis）を用いた常法によって、アミノ酸配列をコードする塩基配列を部分的に改変することによって導入することができる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1984 Vol. 81, 5662-5666; Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual (1989) Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press）。

[0037] 配列同一性は、参照配列（例えば、配列番号１０、１２、１４、２４、２６又は２８に記載のアミノ酸配列）に対して、クエリー配列（評価対象のアミノ酸配列）を、適切にアラインメントし、算出された値である。配列同一性は、例えば、CLUSTALアルゴリズムで算出された値等が挙げられる。

[0038] 上記配列同一性は、高いほど好ましく、具体的には、８５％以上、９０％

以上、95%以上、又は98%以上である。

結合阻害物質としてのアクチビン受容体の改変体は、ACVR2A又はACVR2Bの改変体であることが好ましい。

[0039] 結合阻害物質としてのアクチビン受容体又はその改変体の部分配列を含むポリペプチド断片は、ACVR1と、アクチビン又はアクチビン及びアクチビンA受容体タイプII（ACVR2A若しくはACVR2B）の複合体と、の結合と競合し得るものであればよく、例えば、膜型の受容体、可溶型の受容体、好ましくは可溶型の受容体が挙げられる。ここで膜型の受容体としては、例えば細胞外のリガンド結合ドメイン及び膜貫通領域を有し、細胞内領域の全部又はI型受容体との結合に必要な領域を含む細胞内領域の一部を欠失したACVR2A又はACVR2Bが挙げられる。可溶型の受容体としては、例えばACVR2A、ACVR2B、ACVR1及びACVR1Bからなる群より選択される受容体の細胞外領域の全部又はリガンド結合ドメインを含む細胞外領域の一部からなるタンパク質、及びそれらが例えばヒト由来の抗体のFc領域と直接又はリンカー配列を介して連結されたタンパク質が挙げられる。

[0040] アクチビン受容体又はその改変体の部分配列を含むポリペプチド断片としては、好ましくは、アクチビン受容体又はその改変体の細胞外ドメインに対応するアミノ酸配列を有し、アクチビンに対する結合能力を有する、100～140アミノ酸残基のポリペプチド断片が挙げられる。当該ポリペプチド断片として、好ましくは100～135アミノ酸残基、より好ましくは100～130アミノ酸残基、更に好ましくは100～120アミノ酸残基のポリペプチド断片が挙げられる。

[0041] アクチビン受容体又はその改変体の細胞外ドメインに対応するアミノ酸配列としては、例えば、配列番号12に記載のアミノ酸配列における第20～第135番目に対応するアミノ酸配列、配列番号14に記載のアミノ酸配列における第19～第134番目に対応するアミノ酸配列、配列番号10に記載のアミノ酸配列における第21～第123番目に対応するアミノ酸配列、

配列番号 24 に記載のアミノ酸配列における第 24～第 126 番目に対応するアミノ酸配列、配列番号 26 に記載のアミノ酸配列における第 1～第 74 番目に対応するアミノ酸配列、配列番号 28 に記載のアミノ酸配列における第 24～第 126 番目に対応するアミノ酸配列並びに、これらのアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列及びこれらのアミノ酸配列に対して 85%以上、好ましくは 90%以上、より好ましくは 95%以上、更に好ましくは 98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列が挙げられる。

具体的には、Sotatercept (ACE-011 又は、ActRIIA-IgG1-Fc ともいい、ACVR2A の部分ポリペプチドであり、配列番号 12 に記載のアミノ酸配列の第 20 番目～第 135 番目のアミノ酸配列に相当する。；国際公開第 2006/012627 号の配列番号 1 及び Bone 46 (2010) 1082-1088 を参照) を例示することができる。

[0042] 本実施形態において、上記ポリペプチド断片は、ポリペプチド断片単独の形態、上記ポリペプチド断片と担体タンパク質との融合タンパク質の形態も含むものとする。上記担体タンパク質としては、例えば、抗体の Fc 断片、及び 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有する上記 Fc 断片の改変体等が挙げられる。このような融合タンパク質としては、例えば、配列番号 12 に記載のアミノ酸配列における第 20～第 135 番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片と、ヒト由来の抗体の Fc 領域又は 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有する上記 Fc 領域の改変体等との融合タンパク質、配列番号 14 に記載のアミノ酸配列における第 19～第 134 番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片と、ヒト由来の抗体の Fc 領域又は 1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有する上記 Fc 領域の改変体等との融合タンパク質、配列番号 10 に記載のアミノ酸配列における第 21～第 123 番目のアミノ酸配列を有するポリペ

プチド断片と、ヒト由来の抗体のFc領域又は1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有する上記Fc領域の改変体等との融合タンパク質、配列番号24に記載のアミノ酸配列における第24～第126番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片と、ヒト由来の抗体のFc領域又は1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有する上記Fc領域の改変体等との融合タンパク質、配列番号26に記載のアミノ酸配列における第1～第74番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片と、ヒト由来の抗体のFc領域又は1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有する上記Fc領域の改変体等との融合タンパク質、配列番号28に記載のアミノ酸配列における第24～第126番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片と、ヒト由来の抗体のFc領域又は1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有する上記Fc領域の改変体等との融合タンパク質等が挙げられる。上記融合タンパク質は、上記ポリペプチド断片がFc断片等の担体タンパク質とリンカーペプチドを介して連結された形態でもよい。リンカーペプチドとしては、比較的二次構造がとりにくい5、15、20、30又は50アミノ酸残基以上の人工の又は天然のアミノ酸配列を有するペプチドが考えられる。具体的には、例えばスレオニン若しくはセリンとグリシンとの単一配列、又は、スレオニン若しくはセリンとグリシンとの反復配列（例えば、TG4又はSG4）を含むペプチドが挙げられる。

[0043] フォリスタチンとは、アクチビンに直接結合し、内在性のアンタゴニストとして機能するタンパク質である。すなわち、結合阻害物質としてのフォリスタチンはアクチビンと結合して、アクチビンとACVR1との結合を阻害する。そのため、アクチビンが変異型ACVR1に結合することによるシグナル伝達が抑制されて、異所性の軟骨誘導及び骨誘導が抑制される。フォリスタチンとしては、フォリスタチン317（NCBIアクセッション番号：NM_006350、配列番号15、16）、及びフォリスタチン344（

N C B I アクセッション番号：NM__013409、配列番号29、30)が挙げられる。上記配列番号16で表されるアミノ酸配列からなるフォリスタチン317において第1番目～第29番目のアミノ酸配列に相当するシグナルペプチドが除去されたフォリスタチン288、配列番号30で表されるアミノ酸配列からなるフォリスタチン344から第1番目～第29番目のアミノ酸配列に相当するシグナルペプチドが除去されたフォリスタチン315、上記フォリスタチン315のC末端の12アミノ酸残基（配列番号30で表されるアミノ酸配列の第333番目～第344番目のアミノ酸配列）が除去されたフォリスタチン303も、本明細書におけるフォリスタチンの範疇である。

[0044] フォリスタチンの改変体とは、フォリスタチンを構成するアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、フォリスタチンを構成するアミノ酸配列に対して85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、アクチビンに対する結合能力を有するタンパク質を意味する。

[0045] 好ましくは、上記フォリスタチンの改変体としては、

(1) 配列番号16で表されるアミノ酸配列、配列番号16で表されるアミノ酸配列において第1～第29番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、配列番号30で表されるアミノ酸配列、配列番号30で表されるアミノ酸配列において第1～第29番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、又は、配列番号30で表されるアミノ酸配列において第1～第29番目のアミノ酸配列及び第333番目～第344番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、

(2) 配列番号16で表されるアミノ酸配列、配列番号16で表されるアミノ酸配列において第1～第29番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列

、配列番号 30 で表されるアミノ酸配列、配列番号 30 で表されるアミノ酸配列において第 1 ～第 29 番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、又は、配列番号 30 で表されるアミノ酸配列において第 1 ～第 29 番目のアミノ酸配列及び第 333 番目～第 344 番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列に対して 85 % 以上、好ましくは 90 % 以上、より好ましくは 95 % 以上、更に好ましくは 98 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ、アクチビンに対する結合能力を有するタンパク質が挙げられる。

[0046] フォリスタチン様タンパク質とは、フォリスタチンに類似したアミノ酸配列を有し、アクチビンに結合し、内在性のアンタゴニストとして機能し得るタンパク質である。すなわち、結合阻害物質としてのフォリスタチン様タンパク質はアクチビンと結合して、アクチビンと ACVR1 との結合を阻害する。そのため、アクチビンが変異型 ACVR1 に結合することによるシグナル伝達が抑制されて、異所性の軟骨誘導及び骨誘導が抑制される。フォリスタチン様タンパク質としては、例えば、フォリスタチン様 1 (Folistatin-like 1 又は FSTL1 ともいう; NCBI アクセッション番号: NM_007085 配列番号 17、18)、フォリスタチン様 3 (Folistatin-like 3、FSTL3 又は FLRG ともいう; NCBI アクセッション番号: NM_005860 配列番号 19、20) が挙げられる。更に好ましくはフォリスタチン様 3 が挙げられる。

[0047] フォリスタチン様タンパク質の改変体とは、フォリスタチン様タンパク質を構成するアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、フォリスタチン様タンパク質を構成するアミノ酸配列に対して 85 % 以上、好ましくは 90 % 以上、より好ましくは 95 % 以上、更に好ましくは 98 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、アクチビンに対する結合能力を有するタンパク質を意味する。

[0048] 好ましくは、上記フォリスタチン様タンパク質の改変体としては、

(1) 配列番号 18 若しくは配列番号 20 で表されるアミノ酸配列、配列番号 18 で表されるアミノ酸配列において第 1 ～第 20 番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、又は、配列番号 20 で表されるアミノ酸配列において第 1 ～第 26 番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、

(2) 配列番号 18 若しくは配列番号 20 で表されるアミノ酸配列、配列番号 18 で表されるアミノ酸配列において第 1 ～第 20 番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、配列番号 20 で表されるアミノ酸配列において第 1 ～第 26 番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列に対して 85% 以上、好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95% 以上、更に好ましくは 98% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ、アクチビンに対する結合能力を有するタンパク質が挙げられる。

[0049] フォリスタチン又はフォリスタチン様タンパク質の部分配列を含むポリペプチド断片は、フォリスタチン又はフォリスタチン様タンパク質のアクチビンに結合するアミノ酸領域に対応するアミノ酸配列を有し、アクチビンに対する結合能力を有する、50～220 アミノ酸残基のポリペプチド断片であることが好ましい。具体的には、アクチビンに結合するアミノ酸領域に対応するアミノ酸配列としては、例えば、配列番号 16 に記載のアミノ酸配列における第 30～第 241 番目に対応するアミノ酸配列が挙げられる。より好ましくは、上記ポリペプチド断片は、配列番号 16 に記載のアミノ酸配列における第 30～第 88 番目又は第 93～第 241 番目に対応するアミノ酸配列を有し、アクチビンに対する結合能力を有する、50～150 アミノ酸残基のポリペプチド断片である。

[0050] インヒピンとは、インヒピン α 鎖とインヒピン β 鎖とのヘテロダイマーであって、アクチビンと類似のタンパク質である。結合阻害物質としてのインヒピンは、アクチビン A 受容体タイプ II と結合して、アクチビン及びアク

チビンA受容体タイプ11の複合体の形成を阻害する。そのため、当該複合体とACVR1との結合が阻害され、アクチビンが変異型ACVR1に結合することによって細胞内に伝達されるシグナルが抑制されて、異所性の軟骨誘導及び骨誘導が抑制される。インヒビンとしては、例えば、インヒビンA (α 鎖と β A鎖とのヘテロダイマー)、インヒビンB (α 鎖と β B鎖とのヘテロダイマー)が挙げられる。インヒビン α 鎖としては、例えば、NCBIアクセッション番号: NM_002191、配列番号31、32)が挙げられる。インヒビン α 鎖は、mRNAからの翻訳後、まずN末端側の約18アミノ酸残基のシグナルペプチドが切断されてpro体となる。インヒビン α 鎖の上記pro体は、更にN末端側の約200~230アミノ酸残基のポリペプチドが切断され除かれることで成熟したインヒビン α 鎖(例えば、配列番号32で表されるアミノ酸配列における第233~第366番目のアミノ酸配列に相当)となる。

[0051] インヒビンの改変体とは、インヒビンの各鎖を構成するアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、インヒビンを構成するアミノ酸配列に対して85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、ACVR2A又はACVR2Bとアクチビンとの結合を阻害する能力を有するタンパク質を意味する。

[0052] 好ましくは、上記インヒビンの改変体としては、

(1) 配列番号2、配列番号4若しくは配列番号32で表されるアミノ酸配列、配列番号2で表されるアミノ酸配列において第1~第28番目若しくは第1~第310番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、配列番号4で表されるアミノ酸配列において第1~第28番目若しくは第1~第292番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、又は、配列番号32で表されるアミノ酸配列において第1~第18番目若しくは第1~第232番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列において、1個若しくは数個のアミノ酸が

欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列、及び、

(2) 配列番号2、配列番号4若しくは配列番号32で表されるアミノ酸配列、配列番号2で表されるアミノ酸配列において第1～第28番目若しくは第1～第310番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、配列番号4で表されるアミノ酸配列において第1～第28番目若しくは第1～第292番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列、又は、配列番号32で表されるアミノ酸配列において第1～第18番目若しくは第1～第232番目のアミノ酸配列が欠失したアミノ酸配列に対して85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、

からなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、かつ、ACVR2A又はACVR2Bとアクチビンとの結合を阻害する能力を有するタンパク質が挙げられる。

[0053] 上記アクチビン受容体、フォリスタチン、フォリスタチン様タンパク質、それらの改変体、それらのポリペプチド断片、インヒビン、インヒビンの改変体（以下、「本タンパク質」と言う。）は、当業者に周知の以下の方法等で製造することができる。

[0054] まず、上述の本タンパク質をコードする遺伝子（本遺伝子）を、通常の遺伝子工学的的方法〔例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T. 著、モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー発行（Cold Spring Harbor Laboratory press）等に記載されている方法等〕に準じて取得する。次いで、得られた本遺伝子を用いることによって、通常の遺伝子工学的的方法に準じて本タンパク質を製造及び取得することができる。

[0055] 例えば、まず本遺伝子が宿主細胞中で発現できるようなプラスミドを作製し、このプラスミドを宿主細胞に導入して形質転換する。更に形質転換され

た宿主細胞（形質転換体）を培養することで得られる培養物から本タンパク質を取得すればよい。上記プラスミドとしては、例えば、宿主細胞中で機能可能なプロモーターを有し、必要に応じて検出可能なマーカーを導入した発現ベクターに、本タンパク質をコードする遺伝子が導入されたものを好ましく挙げることができる。発現ベクターとしては、各種のものが市販されている。例えば、本タンパク質をコードする遺伝子を導入するために用いられる制限酵素認識部位、及び哺乳動物細胞での発現に使用されるSV40ウィルスプロモーター、サイトメガロウィルスプロモーター（CMVプロモーター）、Elongation factor-1 alphaプロモーター（EF1 α プロモーター）、サイトメガロウィルスエンハンサー、ニワトリ β アクチン遺伝子プロモーター、ウサギ β -グロビン遺伝子3'非翻訳領域から構成される合成プロモーター（CAGプロモーター）、Raus Sarcoma Virusプロモーター（RSVプロモーター）、 β アクチン遺伝子プロモーター、aP2遺伝子プロモーター等のプロモーターを含む発現ベクター等が市販されている。

[0056] 宿主細胞としては、原核生物若しくは真核生物である微生物細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞等を挙げるができる。例えば、生理活性を有する本タンパク質の大量調製が容易になるという観点では、哺乳動物細胞（例えばCHO細胞、NSO細胞等）等を好ましく挙げるができる。上述のようにして得られたプラスミドは、通常の遺伝子工学的方法によって上記宿主細胞に導入することができる。形質転換体の培養は、微生物培養、昆虫細胞若しくは哺乳動物細胞の培養に使用される通常の方法によって行うことができる。例えば哺乳動物細胞の場合、適当な炭素源、窒素源及びビタミン等の微量栄養物を適宜含む培地中で培養を行う。

[0057] 本タンパク質の取得は、一般のタンパク質の単離及び精製に通常使用される方法を組み合わせて実施すればよい。例えば、まず上述の培養によって得られた培養上清を回収し、遠心分離等で夾雑物を除去する。次に、上記培養上清をイオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、及びゲル

ろ過クロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィーを用いた工程を単独で、又は組み合わせることによって精製すればよい。

[0058] アクチビンに対する抗体は、インヒビン β A鎖、インヒビン β B鎖、インヒビン β C鎖及びインヒビン β E鎖からなる群から選ばれる少なくとも1つのインヒビン β 鎖を抗原とする抗体であることが好ましく、インヒビン β A鎖又はインヒビン β B鎖を抗原とする抗体であることがより好ましい。結合阻害物質としてのアクチビンに対する抗体はアクチビンと結合して、アクチビンとACVR1との結合を阻害する。そのため、アクチビンが変異型ACVR1に結合することによって細胞内に伝達されるシグナルが抑制されて、異所性の軟骨誘導及び骨誘導が抑制される。

[0059] 抗体は、公知のアイソタイプ及びサブタイプを含むことができる。抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。これらの抗体は、公知の抗体又は抗血清の製造法に従って製造することができる。抗体のアイソタイプは特に限定されないが、好ましくはIgG、IgM及びIgAが挙げられる。抗体は、標的抗原を特異的に認識し結合するための相補性決定領域 (complementarity determining region; CDR) を少なくとも有するものであれば特に制限はない。抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体及び完全ヒト化抗体等の遺伝子工学的に改変された抗体であってもよい。

[0060] 抗体の抗体断片は、上記抗体の抗原結合部位 (可変領域) を含む抗体断片であればよい。上記抗体断片としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、VH、FvのH鎖 (VH) とL鎖 (VL) を適当なリンカーで連結させた一本鎖抗体: scFv、scFv-Fc、VHとVLを含むポリペプチドの二量体で分子間VH-VL相互作用によって会合したダイアボディ、scFvのH鎖に定常領域の一部 (CH3) が結合したものの二量体であるミニボディ、その他の低分子化抗体等が挙げられる。

[0061] 低分子化抗体は、全長抗体 (whole antibody、例えばwhole IgG等) の一部分が欠損している抗体断片を含む。低分子化抗体は

、抗原への結合能を有していれば特に限定されない。抗体断片は、全長抗体の一部であれば特に限定されないが、重鎖可変領域（VH）及び／又は軽鎖可変領域（VL）を含んでいることが好ましい。

[0062] 一本鎖抗体とは、「単鎖Fv」すなわち「scFv」抗体フラグメントとも呼ばれる。一本鎖抗体は、抗体のVH及びVLドメインを含有し、これらのドメインはポリペプチド単鎖に存在する。「Fv」断片は最小の抗体断片であり、完全な抗原認識部位と結合部位を含む。一般的に「Fv」断片は1つのVH及びVLが非共有結合によって強く連結されたダイマー（VH-VLダイマー）である。各可変領域の3つの相補鎖決定領域（CDR）が相互作用し、VH-VLダイマーの表面に抗原結合部位を形成する。6つのCDRが抗体に抗原結合部位を付与している。しかしながら、1つの可変領域（または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）であっても、全結合部位よりも親和性は低いが、抗原を認識し、結合する能力を有する。scFvポリペプチドは、scFvが抗原結合のための所望の構造を形成できるように、VHとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーを更に含んでいる [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]。

[0063] 上記抗体の製造方法は、特に制限されず、当該分野で公知の種々の抗体製造方法を用いることができる。このような抗体製造方法としては、例えば、ハイブリドーマ法、遺伝子工学的に抗体の遺伝子を導入した微生物を用いて製造する方法、ファージディスプレイ法によって多数の分子からなる莫大なクローンライブラリーから最適抗体がスクリーニングされ、その抗体を哺乳動物細胞（例えばCHO細胞）で大量生産する方法、及び免疫した動物の血清から直接得る方法が挙げられる。

[0064] 例えば、ポリクローナル抗体は、以下のように製造することができる。抗

原タンパク質、又はその部分ペプチドを、ウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。得られた血清を、例えば、硫安沈殿、プロテインAカラム、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、抗原タンパク質又は合成ペプチドをカップリングしたアフィニティークラム等によって精製することで調製する。

[0065] 抗原の調製は、例えば、当業者に周知のバキュロウイルスを用いる方法等で行うことができる。抗原の免疫原性が低い場合には、アルブミン等の免疫原性を有する巨大分子と結合させ、免疫を行えばよい。

[0066] モノクローナル抗体の製造方法としては、例えば以下の工程で行われる。まず、公知の方法にしたがって、感作抗原を動物に免疫する。一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射することによって行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline)、生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁する。得られた希釈液又は懸濁液に所望によって通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化する。その後、乳化した感作抗原を哺乳動物に4～21日毎に数回投与する。感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

[0067] このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付す。このとき、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。上記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3U1 (P3-X63Ag8U1)、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Ma

rgulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/O (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等が好適に使用される。

- [0068] 上記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、例えば、ケーラーとミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。
- [0069] より具体的には、上記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ)等が使用され、更に所望によって融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。
- [0070] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞の数に対して免疫細胞の数を1~10倍とするのが好ましい。上記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、上記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能である。さらに、ウシ胎仔血清 (FCS)等の血清補液を上記培養液と併用することもできる。
- [0071] 細胞融合は、次の方法で行う。まず、上記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を上記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温したPEG溶液 (例えば平均分子量1000~6000程度)を通常30~60% (w/v)の濃度で添加する。得られた細胞懸濁液を、混合することによって目的と

するハイブリドーマを形成する。続いて、適当な培養液を上記細胞懸濁液に逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによってハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

[0072] ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染し不死化したヒトリンパ球を *in vitro* で抗原タンパク質、抗原タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作することによって、ヒト抗体産生細胞株を作製することもできる。抗体分泌能を安定に持続させるために、感作リンパ球を上記と同様のマウスミエローマ細胞又はヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の活性（抗原結合活性）を有するヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる。

[0073] このようにして得られたハイブリドーマは、通常の見分け培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液）で培養することによって選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の見分け希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及び単クローニングを行う。

[0074] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の見分け液中で継代培養することが可能である。上記ハイブリドーマは、液体窒素中で長期保存することが可能である。当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、又は、ハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、上記哺乳動物の腹水として得る方法などが採用される。上記培養上清として得る方法は、高純度の抗体を得るのに適している。一方、上記哺乳動物の腹水として得る方法は、抗体の大量生産に適している。

[0075] ヒト抗体は、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。ヒ

ト抗体は、例えば、ヒト抗体遺伝子座を導入し、ヒト由来抗体を産生する能力を有するトランスジェニック動物に抗原を投与することによって得ることができる。該トランスジェニック動物としては、マウスが挙げられる。ヒト抗体を産生し得るマウスの作出方法は、例えば、国際公開第02/43478号に記載されている。

[0076] 本実施形態におけるモノクローナル抗体には、抗体を構成する重鎖（H鎖）及び／又は軽鎖（L鎖）の各々のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を有する重鎖及び／又は軽鎖からなるモノクローナル抗体も包含される。本実施形態では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体も使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

[0077] キメラ型抗体は、異なる動物種に由来する2以上の部分の結合によって特徴づけられる免疫グロブリン分子である。一般に、キメラ型抗体の可変領域は、ヒト以外の哺乳類抗体（例えばマウスモノクローナル抗体）に由来し、その免疫グロブリン定常領域は、ヒト免疫グロブリン分子に由来する。好ましくは、低免疫原性を持つ可変領域を選択し、それを、やはり低免疫原性を持つヒト定常領域と組み合わせる。そして、その組み合わせもまた、低い免疫原性を持つことが好ましい。キメラ型抗体には、一価、二価又は多価免疫グロブリンが含まれる。一価のキメラ型抗体は、ジスルフィド結合を介してキメラL鎖と結合したキメラH鎖によって形成される二量体（HL）である。二価のキメラ型抗体は、少なくとも1つのジスルフィド結合を介して結合した2つのHL二量体によって形成される四量体（H₂L₂）である。

[0078] キメラ型抗体及びそれらの製造方法は、当該技術分野で既に記述されている [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984); Boul
ianne et al., Nature 312:643-646 (1984); Liu et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 84:3439-3443 (1987); Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:214-218 (1987); Better et al., Science 240:1041-1043 (1988); 及び Harlow と Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]。

[0079] ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される。ヒト化抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものである。ヒト化抗体は、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号 EP 1 250 23 号明細書、国際公開第 92/19759 号参照)。ヒト化抗体の製造方法としては、公知の方法を用いて行うことができる。例えば、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (FR; framework region) を連結するように設計した DNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドから PCR 法によって合成する。得られた DNA を、ヒト抗体定常領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込む。得られた発現ベクターを宿主に導入し産生させることによって、ヒト化抗体が得られる (欧州特許出願公開番号 EP 2 394 00 号明細書、国際公開第 92-19759 号参照)。CDR を介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

[0080] キメラ抗体、ヒト化抗体には、ヒト抗体の C 領域が使用される。ヒト抗体の定常領域 (C 領域) としては、C γ が挙げられ、例えば、C γ 1、C γ 2

、C γ 3又はC γ 4を使用することができる。抗体の構造又はその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体のC領域を修飾してもよい。キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなる。ヒト化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域及びC領域からなる。キメラ抗体及びヒト化抗体は、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本実施形態に使用される抗体として有用である。

[0081] 低分子化抗体、一本鎖抗体は、例えば、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Pluckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137参照）ことによって、製造することができる。

[0082] scFvは、抗体のH鎖V領域（可変領域）とL鎖V領域を連結することによって得られる。これらの領域は単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、scFVはさらにVH及びVLの間にポリペプチドリンカーを含んでいる。ポリペプチドリンカーによってscFvは、抗原結合のために必要な構造を形成することができる [scFvの総説については、Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal

Antibodies” Vol. 113 (Rosenburg and Moore ed (Springer-Verlag, New York) pp. 269-315, 1994) を参照。]。

[0083] この s c F v において、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリッカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)。s c F v におけるH鎖V領域及びL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリッカーとしては、その両端に連結された抗体可変領域の発現を阻害するものでなければ特に限定されないが、例えばアミノ酸12～19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

[0084] s c F v をコードするDNAは、例えば、以下の方法によって得られる。まず、上記抗体のH鎖又はH鎖V領域をコードするDNA、及びL鎖又はL鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法によって増幅する。次いで、増幅したDNA、並びに、ペプチドリッカー部分をコードするDNA及びその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせるPCR法で増幅することによって、s c F v をコードするDNAが得られる。一旦s c F v をコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、及び該発現ベクターによって形質転換された宿主を常法に従って得ることができる。さらに得られた宿主を用いて常法に従って、s c F v を得ることができる。

[0085] ダイアボディは、遺伝子融合によって構築された二価 (bivalent) の抗体断片を指す (Holliger P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)、欧州特許出願公開第404097号明細書、国際公開第93/11161号等)。ダイアボディは、2本のポリペプチド鎖から構成され

るダイマーである。通常、ダイアボディを構成するポリペプチド鎖は各々、同じ鎖中でV_LおよびV_Hが、互いに結合できない程度に短いリンカー、例えば、5アミノ酸残基程度のリンカーによって結合されている。同一ポリペプチド鎖上にコードされるV_LとV_Hとは、その間のリンカーが短いため単鎖可変領域フラグメントを形成することが出来ず二量体を形成する。そのため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有することとなる。

[0086] s c (F v) 2 は、2つのV_H及び2つのV_Lをリンカー等で結合して一本鎖にした低分子化抗体である (Hudson et al., J Immunol. Methods 1999; 231: 177-189)。s c (F v) 2 は、例えば、2つのs c F v をリンカーで結ぶことによって作製できる。

[0087] 本実施形態において、抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学によって導入し得る任意のペプチドリリンカー、または合成化合物リンカー (例えば、Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996参照) に開示されるリンカー等を用いることができる。ペプチドリリンカーを用いる場合、その長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能である。通常、ペプチドリリンカーの長さは、1~100アミノ酸残基、好ましくは3~50アミノ酸残基、更に好ましくは5~30アミノ酸残基、特に好ましくは12~18アミノ酸残基 (例えば、15アミノ酸残基) である。合成化合物リンカー (化学架橋剤) は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)、ジスクシンイミジルスベレート (DSS)、ビス (スルホスクシンイミジル) スベレート (BS³)、ジチオビス (スクシンイミジルプロピオネート) (DSP)、ジチオビス (スルホスクシンイミジルプロピオネート) (DTSSP)、エチレングリコールビス (スクシンイミジルスクシネート) (EGS)、エチレングリコールビス (スルホスクシンイミジルスクシネート) (スルホ-EGS)、ジスクシンイミジル酒石酸塩 (DST)、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩 (スルホ-DST)、ビ

ス〔2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル〕スルホン（BSOCOE S）、ビス〔2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル〕スルホン（スルホ-BSOCOE S）などである。これらの架橋剤は市販されている。

[0088] これら抗体の断片は、上記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主によって産生させることができる。

[0089] タンパク質と融合させた抗体は、抗体のN末端又はC末端に異種タンパク質が融合した抗体であり、その作製方法も公知である（例えば、C l i n i c a l C a n c e r R e s e a r c h, 2004, 10, 1274-1281）。抗体に異種タンパク質を結合させたキメラ分子であればよい。異種タンパク質としては、例えば、Fc受容体、サイトカイン等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0090] 上述のように産生、発現された抗体は、細胞内外、又は宿主から分離し、均一になるまで精製することができる。本実施形態で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーによって行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、H y p e r D、P O R O S、S e p h a r o s e F. F. 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

[0091] 例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本実施形態で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC（H i g h p e r f o r m a n c e l i q u i d c h r o m a t o g r a p h y）に適用し得る。逆相HPLCを用いてもよい。

- [0092] アクチビンの発現を抑制する発現抑制物質（以下、「発現抑制物質」という場合がある。）は、アクチビンの発現を抑制することが可能であればどのような物質であっても、特に制限されない。発現抑制物質は、アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸であることが好ましい。アクチビンの遺伝子発現が抑制されると、アクチビン分子の生成が抑制される。そのため、アクチビンが変異型ACVR1に結合することによるシグナル伝達が抑制されて、異所性の軟骨誘導及び骨誘導が抑制される。
- [0093] アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸は、アクチビンの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNA及びリボザイムからなる群から選ばれることが好ましい。アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNA及びリボザイムの取得方法は当該分野において公知である。当業者は例えば上述のインヒビンβ鎖遺伝子の核酸配列（配列番号1、3、5又は7に記載の核酸配列等）に基づいてこれらを容易に得ることができる。
- [0094] アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸は、配列番号1に記載の核酸配列における第538～第556番目又は第1356～第1374番目に対応する核酸配列、並びに、これらの核酸配列において1個若しくは数個の核酸が欠失、置換、挿入又は付加された核酸配列及びこれらの核酸配列に対して85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上の配列同一性を有する核酸配列からなる群から選ばれる核酸配列の相補鎖を含み、アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸であることが好ましい。ここで遺伝子発現を抑制する核酸は、DNA、RNAのいずれであってもよく、一本鎖の核酸配列及び二本鎖の核酸配列を共に含む概念である。本明細書において、配列番号1に示される核酸配列等は、便宜的にDNA配列であるが、RNA配列を示す場合には、チミン（T）をウラシル（U）として解する。
- [0095] アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸は、配列番号1、3、5又は7に記載の核酸配列を含む核酸と、ストリンジェントな条件下にハイブリダイズ

する核酸配列を含み、アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸であってもよい。

[0096] 「ストリンジेंटな条件」とは、 $6\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC}$ の組成： 0.15M の NaCl 、 0.015M のクエン酸ナトリウム、 $\text{pH}7.0$)と 0.5% SDSと $5\times$ デンハルトと $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の変性サケ精子DNAと 50% (v/v)ホルムアミドとを含む溶液中、室温にて12時間インキュベートし、更に $0.5\times\text{SSC}$ で 50°C 以上の温度で洗浄する条件をいう。さらに、よりストリンジेंटな条件、例えば、 45°C 又は 60°C にて12時間インキュベートすること、 $0.2\times\text{SSC}$ 又は $0.1\times\text{SSC}$ で洗浄すること、洗浄に際し 60°C 又は 65°C 以上の温度条件で洗浄すること等の、より厳しい条件も含む。

[0097] アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸の塩基数は特に制限はない。上記核酸がアクチビンの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである場合には、アクチビンをコードするmRNAの相補鎖の全配列であっても部分配列であってもよい。アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸の塩基数は、短いもので約10塩基程度、長いものでmRNA又は初期転写産物の全配列が挙げられる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、15～50塩基であることが好ましく、20～30塩基であることがより好ましい。

[0098] アンチセンスオリゴヌクレオチドはDNAであってもRNAであってもよく、又はDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドがDNAである場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こすことができる。したがって、RNase Hによる分解を指向するアンチセンスDNAの場合、標的配列は、スプライシングを受け成熟したmRNA中の配列だけでなく、アクチビン遺伝子の初期翻訳産物におけるイントロン領域の配列であってもよい。イントロン配列は、ゲノム配列と、アクチビン遺伝子のcDNA塩基配列とをBLAST、FASTA等のホモロジー検索プログラムを用いて比較することに

よって決定することができる。さらに、本実施形態に係るアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アクチビンのmRNA又は初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するものであってもよい。さらに上記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、二本鎖DNAであるアクチビンの遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAへの転写を阻害し得るもの（アンチジーン）であってもよい。

[0099] アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成するヌクレオチド分子は、天然型のDNA又はRNAであってもよい。上記ヌクレオチド分子は、安定性（化学的安定性及び／又は酵素に対する安定性）又は比活性（RNAとの親和性）を向上させるために、種々の化学修飾を含むことができる。例えば、ヌクレアーゼ等の加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート及びホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。各ヌクレオチドの糖（リボース）の2'位の水酸基を、 $-OR$ （ $R=CH_3$ （2'-O-Me）、 $CH_2CH_2OCH_3$ （2'-O-MOE）、 $CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $CH_2CONHCH_3$ 、 CH_2CH_2CN 等）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよい。上記化学修飾としては、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基若しくはカチオン性官能基の導入、又は、2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換等が挙げられる。

[0100] RNAの糖部のコンフォメーションはC2'-endo（S型）とC3'-endo（N型）の2つが支配的であり、一本鎖RNAではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成するとN型に固定される。したがって、標的RNAに対して強い結合能を付与するために、BNA（Bridged Nucleic Acid）が好ましく用いられ得る。BNAは、2'酸素と4'炭素とを架橋することによって、糖部のコンフォメーションをN型に固定したRNA誘導体である。BNAの具体的な例としては、例えば

2' 酸素と4' 炭素がメチレンによって架橋された2', 4'-BNA (LNA (Locked Nucleic Acid) とも言う。)(Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J. S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004) 及び、2' 酸素と4' 炭素がエチレンにより架橋されたENA (Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003) が挙げられる。

[0101] 本実施形態のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、アクチビン遺伝子のmRNA又は初期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機(アプライド・バイオシステムズ社、ベックマン社等)を用いて、これに相補的な配列を合成することによって調製することができる。上述した各種修飾を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドも、いずれも公知の手法によって、化学的に合成することができる。

[0102] 上記アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸がsiRNAである場合には15~50塩基、更には15~30塩基であることが好ましく、18~26塩基、更には19~23塩基であることがより好ましい。

[0103] siRNAは、5'末端又は3'末端に、付加的な塩基を有していてもよい。該付加的塩基の長さは、通常2~4塩基程度であり、siRNAの全長として19塩基以上である。該付加的塩基は、DNAであってもRNAであってもよいが、DNAを用いると核酸の安定性を向上させることができる場合がある。このような付加的塩基の配列としては、例えばug-3'、uu-3'、tg-3'、tt-3'、ggg-3'、guuu-3'、gttt-3'、ttttt-3'、uuuuu-3'等の配列が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0104] 2本鎖の相補的な配列の他に、各々の鎖の3'末端又は5'末端に、1~4塩基、好ましくは1~3塩基、更に好ましくは2塩基の突出部(オーバー

ハング)が存在していてもよい。具体的には、dTdT(「dT」は、デオキシリボ核酸を示す。)を付加したものが挙げられる。

3'末端又は5'末端は、末端付加がない平滑末端(ブラントエンド)であってもよい。

アンチセンス鎖の3'末端及び5'末端に突出部配列(オーバーハング)を有しセンス鎖とアンチセンス鎖とが異なる塩基数であってもよい。

好ましくは、19~21塩基からなり、ブラントエンド又は二本鎖それぞれの3'末端に1~3塩基のオーバーハングが存在しているsiRNA等を例示することができる。具体的には、標的配列部分が19塩基長で3'末端にdTdTを付加された合計21塩基長のsiRNAが挙げられる。

[0105] 上記アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸がshRNAである場合には5~15塩基のヘアピンループ部分に加えてアクチビン遺伝子に相補的な配列が15~30塩基であることが好ましく、15~26塩基、更には15~23塩基、更には18~23塩基であることがより好ましい。

[0106] siRNA及びshRNAは、標的遺伝子のcDNA配列情報に基づいて、例えば、Elbashirら(Genes Dev., 15, 188-200 (2001))、Teramotoら(FEBS Lett. 579(13): p2878-82 (2005))の提唱する規則に従って設計することができる。

[0107] 標的配列の位置は特に制限されるわけではないが、5'-UTR及び開始コドンから約50塩基まで、並びに3'-UTR以外の領域から標的配列を選択することが好ましい。上述の規則その他に基づいて選択された標的配列の候補群について、標的以外のmRNAにおいて16~17塩基の連続した配列に相同性がないかどうかを、BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)等のホモロジー検索ソフトを用いて調べ、選択した標的配列の特異性を確認する。特異性の確認された標的配列について、AA(又はNA)以降の19~21塩基にTT又はUUの3'末端オーバーハングを有するセンス鎖と、該19~21塩基に相補的

な配列及びTT又はUUの3'末端オーバーハングを有するアンチセンス鎖とからなる2本鎖RNAをsiRNAとして設計してもよい。siRNAの前駆体であるショートヘアピンRNA(shRNA)は、ループ構造を形成しうる任意のリンカー配列(例えば、5~25塩基程度)を適宜選択し、上記センス鎖とアンチセンス鎖とを該リンカー配列を介して連結することによって設計することができる。

[0108] siRNA及び／又はshRNAの配列は、種々のwebサイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、Clontechが提供するRNAi Target Sequence Selector及びshRNA Sequence Designer(<http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/frontpage.jsp>)があるが、これらに限定されない。

[0109] siRNAを構成するリボヌクレオチド分子も、安定性、比活性等を向上させるために、上記アンチセンスオリゴヌクレオチドの場合と同様の修飾を受けていてもよい。但し、siRNAの場合、天然型RNA中のすべてのリボヌクレオチド分子を修飾型で置換すると、RNAi活性が失われる場合がある。したがって、RNA誘導型サイレンシング複合体(RISC複合体)が機能できる最小限の修飾ヌクレオチドの導入が必要である。

[0110] 修飾の例として具体的には、siRNAを構成するヌクレオチド分子の一部を、天然型のDNA、又は、安定性(化学的安定性及び／又は酵素に対する安定性)若しくは比活性(RNAとの親和性)を向上させるために、種々の化学修飾を施したRNA、に置換することができる(Usman and Cedergren, 1992, TIBS 17, 34; Usman et al., 1994, Nucleic Acids Symp. Ser. 31, 163を参照。)。例えば、ヌクレアーゼ等の加水分解酵素による分解を防ぐために、siRNAを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基(ホスフェート)を、例えば、ホスホロチオエート(PS)、メチルホスホネート

及びホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換することができる。各ヌクレオチドの糖（リボース）の2'位の水酸基を、 $-OR$ ($R=CH_3$ (2'-O-Me)、 $CH_2CH_2OCH_3$ (2'-O-MOE)、 $CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$ 、 $CH_2CONHCH_3$ 、 CH_2CH_2CN 等)、フッ素原子 ($-F$) に置換してもよい。siRNAにおけるRNAの一部をDNAに置換する化学修飾 (2'-デオキシ化、2'-H) を施してもよい。

[0111] その他の修飾の例としては、2'位の修飾基が4'位の炭素原子に架橋した構造を有する架橋構造型人工核酸 (BNA)、より具体的には、2'位の酸素原子と4'位の炭素原子とがメチレンを介して架橋したロックト人工核酸 (Locked Nucleic Acid; LNA)、及びエチレン架橋構造型人工核酸 (Ethylene bridged nucleic acid) (ENA) 等が挙げられる。

[0112] 塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基若しくはカチオン性官能基の導入、2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。その他上述のアンチセンスオリゴヌクレオチドにおける修飾方法を用いることができる。siRNAを構成するセンス鎖及びアンチセンス鎖は、リンカーを介し、細胞表層に存在する受容体を特異的に認識するリガンド、ペプチド、糖鎖、抗体、脂質、正電荷若しくは分子構造的に細胞膜表層に吸着し貫通するオリゴアルギニン、Tatペプチド、Revペプチド、Antペプチド等と化学結合していてもよい。

[0113] siRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることによって調製することができる。siRNAの前駆体となるショートヘアピンRNA (shRNA) を合成し、得られたshRNAを、ダイサー (Dicer) を用いて切断することによって調製することもできる。

[0114] s h R N A は、m R N A 上の標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖を適当なループ構造を形成しうる長さ（例えば5～25塩基程度）のスペーサー配列を間に挿入して連結した塩基配列を含むオリゴRNAをデザインし、これをDNA/RNA自動合成機で合成することによって調製することができる。上述のs h R N A 又はs i R N A を発現するように構築された発現ベクターなどを用いることもできる。s i R N A 及びs h R N A を発現するベクターには、タンデムタイプとステムループ（ヘアピン）タイプとがある。タンデムタイプのベクターはs i R N A のセンス鎖の発現カセットとアンチセンス鎖の発現カセットをタンデムに連結したものである。タンデムタイプのベクターでは、細胞内で各鎖が発現してアニーリングすることによって2本鎖のs i R N A （d s R N A ）を形成する。一方、ステムループタイプのベクターはs h R N A の発現カセットをベクターに挿入したものである。ステムループタイプのベクターでは、細胞内でs h R N A が発現しD i c e r によるプロセッシングを受けてd s R N A を形成する。プロモーターとしては、p o l i 系プロモーター（例えば、CMV前初期プロモーター）を使用することもできるが、短いRNAの転写を正確に行わせるために、p o l i i 系プロモーターを使用するのが一般的である。p o l i i 系プロモーターとしては、マウス及びヒトのU6-s n R N A プロモーター、ヒトH1-R N a s e P R N A プロモーター、ヒトバリナー t R N A プロモーター等が挙げられる。転写終結シグナルとして4個以上Tが連続した配列が用いられる。

[0115] s i R N A 又はs h R N A 発現ベクターとしては、例えばレトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス及びセンダイウイルス等のウイルスベクター、動物細胞発現プラスミド等が挙げられる。

[0116] 上記s i R N A は、ヌクレオチド配列の情報に基づいて、例えば394 Applied Biosystems, Inc. 合成機等のDNA/RNA自動合成機を用いて常法に従って化学的に合成することができる。具体的

には、当業者に公知の核酸保護基（例えば5'末端にジメトキシトリチル基）及びカップリング基（例えば3'末端にホスホルアミダイト）を用いて合成できる。すなわち、5'末端の保護基を、TCA（トリクロロ酢酸）等の酸で脱保護し、カップリング反応を行う。ついでアセチル基でキャッピングを行った後、次の核酸の縮合反応を行う。修飾されたRNA又はDNAを含むsiRNAの場合には、原料として修飾されたRNA（例えば、2'-O-メチルヌクレオチド、2'-デオキシ-2'-フルオロヌクレオチド）を用いればよく、カップリング反応の条件は適宜調整できる。リン酸結合部分が修飾されたホスホロチオエート結合を導入する場合には、ボーケージ試薬（3H-1, 2-ベンゾジチオール-3-オン1, 1-ジオキシド）を用いることができる。

[0117] オリゴヌクレオチドは、別々に合成し、合成後に例えばライゲーションによって一緒につなげてよいし（Moore et al., 1992, Science 256, 9923; Draper et al. 国際公開第93/23569号; Shabarova et al., 1991, Nucleic Acids Research 19, 4247; Bellon et al., 1997, Nucleosides & Nucleotides, 16, 951; Bellon et al., 1997, Bioconjugate Chem. 8, 204）、又は、合成及び／若しくは脱保護の後にハイブリダイゼーションによって、一緒につなげてよい。siRNA分子はタンデム合成法によって合成することができる。すなわち、両方のsiRNA鎖を、切断可能なリンカーによって分離された単一の連続するオリゴヌクレオチドとして合成する。次に上記オリゴヌクレオチドを切断して別々のsiRNAフラグメントを生成し、得られたsiRNAフラグメントをハイブリダイズさせて精製する。リンカーはポリヌクレオチドリリンカーであっても非ヌクレオチドリリンカーであってもよい。

[0118] 合成したsiRNA分子は、当業者に公知の方法を用いて精製できる。例えばゲル電気泳動によって精製する方法、又は高速液体クロマトグラフィー

(HPLC)を用いて精製する方法が挙げられる。

[0119] 本実施形態において、アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸は、市販品を用いてもよく、例えば、インヒビン β A鎖の遺伝子に対するs iRNA（アプライドバイオシステムズ社製、カタログ番号、S7434、S7435）が挙げられる。これらのs iRNAの塩基配列は、S7434（配列番号1に記載の核酸配列における第1356～第1374番目の塩基配列に対応）：センス鎖5' - C A A C A G U C A U C A A C C A C U A t t - 3'（配列番号33）、アンチセンス鎖5' - U A G U G G U U G A U G A C U G U U G a g - 3'（配列番号34）、S7435（配列番号1に記載の核酸配列における第538～第556番目の塩基配列に対応）：センス鎖5' - G A A C G G G U A U G U G G A G A U A t t - 3'（配列番号35）、アンチセンス鎖5' - U A U C U C C A C A U A C C C G U U C t c - 3'（配列番号36）である。小文字で表記した配列部分はオーバーハング部分を表し、リボース骨格がデオキシリボース骨格に置き換わっている部分である。

[0120] 上記アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸がリボザイムである場合には、25～60塩基であることが好ましく、30～55塩基であることがより好ましく、35～50塩基であることが更に好ましい。

[0121] リボザイム核酸としては、ウイロイド、ウイルソイド等の感染性RNAにみられるセルフスプライシングRNAが挙げられ、ハンマーヘッド型、ヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることによって、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。アクチビン遺伝子のmRNAが自身で二本鎖構造をとる場合には、RNAヘリカーゼと特異的に結合し得るウイルス核酸由来のRNAモチーフを連結したハイブリッドリボザイムを用いることによって、標的配列を一本鎖にすることができる [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9

8 (10) : 5572-5577 (2001)]。さらに、リボザイムを、上記リボザイムをコードするDNAを含む発現ベクターの形態で使用する場合には、転写産物の細胞質への移行を促進するために、tRNAを改変した配列をさらに連結したハイブリッドリボザイムとすることもできる [Nucleic Acids Res., 29 (13) : 2780-2788 (2001)]。

[0122] 上記アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸がmiRNAである場合には、20～100塩基であることが好ましい。

miRNAは、mRNAからタンパク質への翻訳の阻害又はmRNAの分解を通して、遺伝子の発現調節に関与する。miRNAは、細胞内に存在する短鎖（20～25塩基）のノンコーディングRNAである。miRNAは、以下の過程を経て機能する。まず、DNAから、miRNAとその相補鎖とを含みヘアピンループ構造を取ることが可能な一本鎖のpri-RNAとして転写される。次にpri-RNAは、核内にあるDroshaと呼ばれる酵素によって一部が切断されpre-RNAとなって核外に輸送される。その後、pre-RNAはさらにDicerによって切断されて、miRNAとして機能する。したがって、上記miRNAは、pri-RNA、又はpre-RNAの形態であってもよい。

アクチビンの遺伝子発現を抑制するmiRNAは、標的遺伝子のcDNA配列情報に基づいて、例えば、miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/index.html>) 等のデータベースに従って得ることができる。アクチビンの遺伝子発現を抑制するmiRNAは、例えば、has-miR-4482-3p、has-miR-4507、has-miR-147a、has-miR-3940-5p、has-miR-4252、has-miR-205-5p、has-miR-452-3p、has-miR-3692-3p、has-miR-4699-3p、has-miR-513c-3p、has-miR-4287、has-miR-4685-3p、has-miR-513a-3p、has-miR-4302、has-miR-5094、has-miR-4677-5p、has-miR-548au-3p、has-miR-26b-5p、has-miR-26a-5p、has-miR-4465、has-miR-548ar-3p、has-miR-1297、has-miR-148a-3p、has-miR-630、has-miR-148b-3p、has-miR-152、has-miR-548e

、hsa-miR-548f、hsa-miR-655、hsa-miR-374c-5p、hsa-miR-920、hsa-miR-548a-3p、hsa-miR-4742-3p、hsa-miR-568、hsa-miR-891b、hsa-miR-3666、hsa-miR-301a-3p、hsa-miR-3924、hsa-miR-5591-5p、hsa-miR-130a-3p、hsa-miR-4668-5p、hsa-miR-130b-3p、hsa-miR-3605-3p、hsa-miR-939、hsa-miR-132-5p、hsa-miR-301b、hsa-miR-302a-5p、hsa-miR-548l、hsa-miR-129-5p、hsa-miR-1298、hsa-miR-4300、hsa-miR-3163、hsa-miR-2682-3p、hsa-miR-362-3p、hsa-miR-541-5p、hsa-miR-4295、hsa-miR-223-3p、hsa-miR-329、hsa-miR-454-3p、hsa-miR-369-3p、hsa-miR-548g-3p、hsa-miR-4757-5p、hsa-miR-3943、hsa-miR-5685、hsa-miR-218-5p、hsa-miR-345-3p、hsa-miR-593-3p、hsa-miR-642a-3p、hsa-miR-1228-3p、及びhsa-miR-1237が挙げられる。

[0123] FOP 予防剤／治療剤は、経口的又は非経口的（例えば、静脈内、皮下若しくは筋肉内注射、局所的、経直腸的、経皮的、脊髄内的又は経鼻的）に投与することができる。経口投与のための剤型としては、例えば、錠剤、カプセル剤、丸剤、顆粒剤、散剤、液剤、懸濁剤等が挙げられる。非経口投与のための剤型としては、例えば、注射用水性剤、注射用油性剤、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、エアロゾル剤、坐剤、貼付剤等が挙げられる。これらの製剤は、従来公知の技術を用いて調製され、医薬分野において通常使用される無毒性かつ不活性な担体又は添加剤を含有することができる。

[0124] 本実施形態において、「有効量」とは、組織、系、動物又はヒトにおいて、研究者又は医師によって要求される生物学的又は医薬的応答を誘発する薬物又は医薬の量を意味する。

[0125] 本実施形態において、予防剤又は治療剤とは、特定の量で特定の成分を含む医薬製品、並びに特定の量で特定の成分の組み合わせから直接的又は間接的に生じるあらゆる医薬製品を包含することを意図している。

[0126] さらに本発明の目的を損なわない範囲で、FOP 予防剤／治療剤は、他の併用可能な薬剤と組み合わせて投与してもよい。FOP 予防剤／治療剤及び他の併用可能な薬剤は別々に投与してもよく、1つの医薬組成物として一緒に投与してもよい。FOP 予防剤／治療剤を、他の併用可能な薬剤に対して

、先に、同時に、又は後に投与してもよい。FOP予防剤／治療剤と併用可能な他の薬剤として、例えば、ステロイド性消炎鎮痛剤及び非ステロイド性消炎鎮痛剤等の消炎鎮痛剤、ビスフォスフォネート剤、並びにレチノイン酸受容体 γ アゴニスト等が挙げられる。

[0127] 対象となる哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒト等が挙げられる。本実施形態に係るFOP予防剤／治療剤は、ヒトに対して好適に用いられる。

[0128] FOP予防剤／治療剤は、投与の目的、投与方法、投与対象の状況（性別、年齢、体重、病状等）によって異なるが、ヒトに対して投与される場合、1日当り、好ましくは0.0001～1000mg/kgの有効成分が、より好ましくは0.001～100mg/kgの有効成分が、投与されるように用いられる。

[0129] FOP予防剤／治療剤は、ACVR1にアミノ酸変異（変異型ACVR1）を有する患者に好適に用いられる。「変異型ACVR1」とは、配列番号10に記載のアミノ酸配列において、1～2個が欠失又は置換されたアミノ酸配列を含み、アクチビンと結合することによって下流にシグナルを伝達する、受容体タンパク質を意味する。

[0130] 上記アミノ酸変異としては、例えば、以下の表1に示すものが挙げられる。ここで、アミノ酸残基の番号（アミノ酸残基番号）は、配列番号10に記載のアミノ酸配列におけるアミノ酸残基の番号を意味する。

[0131]

[表1]

略称	アミノ酸残基番号	変異前のアミノ酸	変異後のアミノ酸
L 1 9 6 P	1 9 6	L e u	P r o
PF197/198L	1 9 7、1 9 8	P r o、P h e	L e u
R 2 0 2 I	2 0 2	A r g	I l e
R 2 0 6 H	2 0 6	A r g	H i s
Q 2 0 7 E	2 0 7	G l n	G l u
R 2 5 8 G	2 5 8	A r g	G l y
R 2 5 8 S	2 5 8	A r g	S e r
G 3 2 5 A	3 2 5	G l y	A l a
G 3 2 8 E	3 2 8	G l y	G l u
G 3 2 8 R	3 2 8	G l y	A r g
G 3 2 8 W	3 2 8	G l y	T r p
G 3 5 6 D	3 5 6	G l y	A s p
R 3 7 5 P	3 7 5	A r g	P r o

[0132] 列挙された上記アミノ酸変異は、例えば、Kaplan et al., Human Mutation, Vol. 30, No. 3, 379-390, 2009に記載されているACVR1の一次配列と機能ドメインとの相関図によれば、GSドメイン又はキナーゼドメインに位置すると把握できる。

「GSドメイン」とは、アミノ酸配列中、グリシンとセリンに富んだ領域を意味する。「キナーゼドメイン」とは、アミノ酸配列中、キナーゼ活性を発現するために必要な領域を意味する。

[0133] したがって、上記アミノ酸変異は、ACVR1のGSドメイン又はキナーゼドメインにおけるアミノ酸変異を含むことが好ましい。上記GSドメイン又はキナーゼドメインにおけるアミノ酸変異は、配列番号10に記載のアミノ酸配列における第196番目のアミノ酸残基がプロリンであるアミノ酸変異、第197番目のアミノ酸残基がロイシンであり第198番目のアミノ酸が欠失したアミノ酸変異、第202番目のアミノ酸残基がイソロイシンであるアミノ酸変異、第206番目のアミノ酸残基がヒスチジンであるアミノ酸変異、第207番目のアミノ酸残基がグルタミン酸であるアミノ酸変異、第258番目のアミノ酸残基がグリシン又はセリンであるアミノ酸変異、第3

25番目のアミノ酸残基がアラニンであるアミノ酸変異、第328番目のアミノ酸残基がグルタミン酸、アルギニン又はトリプトファンであるアミノ酸変異、第356番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸であるアミノ酸変異、及び第375番目のアミノ酸残基がプロリンであるアミノ酸変異からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸変異を含むことが好ましく、上記GSドメインにおけるアミノ酸変異は、配列番号10に記載のアミノ酸配列における第206番目のアミノ酸残基がヒスチジンであるアミノ酸変異を含むことがより好ましい。すなわち、FOP予防剤／治療剤は、GSドメイン又はキナーゼドメインにおけるアミノ酸変異を含むACVR1を有する患者に好適に用いられ、具体的には、表1に記載されたアミノ酸変異を含むACVR1を有する患者が挙げられる。なかでも、配列番号10に記載のアミノ酸配列における第206番目のアミノ酸残基がヒスチジンであるACVR1を有する患者により好適に用いられる。

[0134] 本実施形態に係る、進行性骨化性線維異形成症の予防剤若しくは治療剤、又はそれらの候補物質のスクリーニング方法は、

(1-1) 被験物質の存在下、アクチビンとACVR1との相互作用を測定し、第1の結合力を求める工程と、

(1-2) 上記被験物質の非存在下において測定した上記相互作用から求められた第2の結合力と比較し、上記第1の結合力が上記第2の結合力より弱いとき、上記被験物質を候補物質として選択する工程と、を含むか、又は、

(2-1) 被験物質の存在下、アクチビンが結合することによる変異型ACVR1を介したシグナル伝達の強度を測定し、第1のシグナル強度を求める工程と、

(2-2) 上記被験物質の非存在下において測定した上記シグナル伝達の強度から求められた第2のシグナル強度と比較し、上記第1のシグナル強度が上記第2のシグナル強度より弱いとき、上記被験物質を候補物質として選択する工程と、を含む。

工程（１－１）において用いられるＡＣＶＲ１には特に限定はなく、変異型ＡＣＶＲ１を用いてもよい。

[0135] 被験物質としては、特に制限はなく、低分子化合物、ポリペプチド、タンパク質、核酸等が挙げられる。

[0136] 工程（１－１）において、アクチビンとＡＣＶＲ１との相互作用を測定する方法は、当該技術分野において公知の手法であれば特に制限されず、例えば、ＥＬＩＳＡ法、表面プラズモン共鳴法、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）を応用した方法、タンパク質断片コンプリメンテーション法等が挙げられる。

[0137] 上記結合力は、アクチビンとＡＣＶＲ１との相互作用の強さを示すものであればどのような指標であってもよく、例えば、解離定数、発光強度、蛍光強度、酵素活性等が挙げられる。

[0138] 工程（１－２）における、第２の結合力は、第１の結合力を測定するときに同時に測定して求めてもよいし、事前に又は事後に測定して求めたものであってもよい。

[0139] 「第１の結合力が第２の結合力より弱い」との評価は、定性的な比較であってもよいし、定量的な比較であってもよい。定量的な比較を行う場合、第１の結合力が第２の結合力より５倍、１０倍又は１００倍弱いとき、上記被験物質を候補物質として好適に選択できる。

[0140] 工程（２－１）における、アクチビンが結合することによる変異型ＡＣＶＲ１を介したシグナル伝達の強度を測定する方法は、当該技術分野において公知の手法であれば特に制限されず、例えば、ウエスタンブロット法又はＥＬＩＳＡ法によって、変異型ＡＣＶＲ１の下流に存在するシグナル伝達分子（例えば、ＳＭＡＤ１／５／８）のリン酸化の度合いを測定する方法、レポーター遺伝子を用いて変異型ＡＣＶＲ１を介した転写活性を測定する方法、ＦＯＰ患者由来のｉＰＳ細胞、間葉系幹細胞等を用いて軟骨細胞又は骨細胞への分化の割合を測定する方法等が挙げられる。すなわち、工程（２－１）は、被験物質及びアクチビンを接触させた変異型ＡＣＶＲ１を発現している

細胞における、ACVR1を介したシグナル伝達の強度を測定し、第1のシグナル強度を求める工程とすることもできる。同様に、後述する工程(2-2)においては、上記被験物質の非存在下において、アクチビンを接触させた変異型ACVR1を発現している細胞における、ACVR1を介したシグナル伝達の強度を測定し、求められた第2のシグナル強度と比較する工程と言える。変異型ACVR1を発現している細胞とは、外来性及び内在性を問わず変異型ACVR1を発現していれば特に限定されない。変異型ACVR1を発現している細胞としては、例えば、FOP患者由来の細胞が挙げられ、より好ましくは、FOP患者由来のiPS細胞から分化誘導された間葉系細胞、軟骨細胞又は骨細胞が挙げられる。

[0141] 上記シグナル強度は、アクチビンが結合することによる変異型ACVR1を介したシグナル伝達の強度を示すものであればどのような指標であってもよい。上記シグナル強度としては、例えば、SMAD1/5/8分子の総量に対するリン酸化したSMAD1/5/8分子の割合、レポーター遺伝子の発現量、分化した軟骨細胞に由来する硫酸化グリコサミノグリカンの生成量、軟骨細胞若しくは骨細胞への分化に伴って発現が変動する遺伝子の発現量又はそのプロモーター活性等が挙げられる。レポーター遺伝子を用いる場合、例えば、当該レポーター遺伝子がACVR1を介したシグナル伝達によって活性化されるプロモーターと機能的に連結された遺伝子を細胞に導入することによって行い得る。ACVR1を介したシグナル伝達によって活性化されるプロモーターとして、R-Smadが結合する配列を含有するBMP応答配列(J. Biol. Chem., 2002, 277(7), 4883-4891.)が例示される。レポーター遺伝子として、蛍光、発光、呈色、又は、蛍光、発光若しくは呈色を補助すること等によって、定量化することができる遺伝子であってもよい。レポーター遺伝子としては、例えば、GFP、YFP、RFP、BFP、CFP、イクオリン、ガラクトシダーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 β ラクタマーゼ及びルシフェラーゼが例示される。

- [0142] 工程（２－２）における、第２のシグナル強度は、第１のシグナル強度を測定するときに同時に測定して求めてもよいし、事前に又は事後に測定して求めたものであってもよい。
- [0143] 「第１のシグナル強度が第２のシグナル強度より弱い」との評価は、定性的な比較であってもよいし、定量的な比較であってもよい。定量的な比較を行う場合、第１のシグナル強度が第２のシグナル強度より５倍、１０倍又は１００倍弱いとき、上記被験物質を候補物質として好適に選択できる。
- [0144] 本実施形態に係るスクリーニング方法によって選択された被験物質は、変異型ＡＣＶＲ１を発現する細胞にアクチビンを添加した際の、ＳＭＡＤ１／５／８等のシグナル伝達分子のリン酸化の上昇を抑制する分子、ＡＣＶＲ１の下流で働くプロモーターの活性化を抑制する分子、軟骨細胞又は骨細胞へ分化するときに発現が上昇する分子の発現を抑制する分子等でありうる。
- [0145] 上記スクリーニング方法によって選択された被験物質は、進行性骨化性線維異形成症の予防剤又は治療剤の有効成分として好適に用いられる。すなわち、上記スクリーニングによって選択されたアクチビンとＡＣＶＲ１の相互作用、具体的には結合を阻害又は抑制する物質、及びアクチビンが結合することによる変異型ＡＣＶＲ１を介したシグナル伝達を抑制する物質を有効成分として含有する、進行性骨化性線維異形成症の予防剤又は治療剤もまた、本発明の範疇である。
- [0146] 本実施形態に係る、進行性骨化性線維異形成症モデル動物は、以下の工程（３－１）及び（３－２）を含む方法によって調製される。
- （３－１）ＡＣＶＲ１にアミノ酸変異を有するｉＰＳ細胞から調製された間葉系幹細胞様の細胞を含む細胞集団を、アクチビンＡの共存下に培養し、三次元軟骨ペレットを得る工程、
- （３－２）工程（３－１）で得られた三次元軟骨ペレットを、免疫不全非ヒト哺乳動物に皮下移植する工程。
- [0147] 工程（３－１）において、ＡＣＶＲ１にアミノ酸変異を有するｉＰＳ細胞は、例えば、ＦＯＰ患者の体細胞から作製することができる。ＦＯＰ患者の

体細胞としては、FOP患者由来の体細胞であれば特に限定は無く、皮膚由来細胞、血液由来細胞等が挙げられる。当該iPS細胞の製造方法としては、例えば、山中らの方法（Cell, 2007, 131 (5), 8611-8672.）が挙げられる。iPS細胞から間葉系幹細胞様の細胞を含む細胞集団を調製する方法については、本明細書の実施例1に準じて、TGFβ阻害剤及びGSK3β阻害剤を添加した培養液中で培養することによって調製することができる。TGFβ阻害剤としては、SB-431542が例示される。GSK3β阻害剤としては、CHIR99021が例示される。当該細胞団を培養し、軟骨細胞のペレットを形成させる。その後、得られた軟骨細胞のペレットを更にヒトアクチビンAの存在下で15～25日間培養することで、三次元軟骨ペレットを得ることができる。具体的な方法としては実施例3に記載の方法が挙げられる。ここでヒトアクチビンAの添加濃度としては50 ng/mL～150 ng/mLが挙げられる。

[0148] 工程（3-2）において用いられる免疫不全非ヒト哺乳動物としては特に限定はないが、好ましくはげっ歯類動物、具体的には、マウス（例えば、NOD-SCIDマウス）、ラット等が挙げられる。三次元軟骨ペレットの移植部位としては特に限定はないが、動物の背側に皮下移植することができる。

[0149] 上記進行性骨化性線維異形成症モデル動物は、進行性骨化性線維異形成症の予防剤若しくは治療剤、又はそれらの候補物質を評価するために使用することができる。すなわち、当該モデル動物に被験物質を投与し、当該動物において、異所性に形成された骨軟骨塊の量を評価することによって、被験物質が進行性骨化性線維異形成症の予防剤若しくは治療剤、又はそれらの候補物質となり得るか否かを評価することができる。例えば、評価された上記骨軟骨塊の量が基準よりも小さい場合に、当該被験物質を進行性骨化性線維異形成症の予防剤若しくは治療剤、又はそれらの候補物質として同定してもよい。上記基準としては、例えば、当該モデル動物に上記被験物質を投与しなかったこと以外は、上述の方法と同様の方法によって評価された骨軟骨塊の

量が挙げられる。ここで、骨軟骨塊の量を測定する方法に特に限定は無いが、具体的には、X線画像解析によって当該動物の移植部位を観察することができる。又は、当該動物において異所性に形成された骨軟骨塊を回収し当業者に周知の方法で定量することも可能である。

実施例

[0150] 以下に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

[0151] 実施例1：FOP患者由来のACVR1を介した転写活性の評価
(方法)

山中らの方法(Celli, 2007, 131 (5), 8611-8672.)に従って、FOP患者由来のiPS細胞(以下、「患者由来iPS細胞株」という場合がある。)を樹立した。この患者の細胞は、ACVR1遺伝子にFOPの原因となる典型的な変異を有する細胞であることを確認した。この変異は、ACVR1のアミノ酸配列(配列番号10に記載のアミノ酸配列)における第206番目のアルギニン残基をヒスチジン残基へ置換する変異である。次に、コントロールとして使用する目的で、BACノックインベクターによる遺伝子修復によって、上記ACVR1遺伝子の変異を正常型(野生型)に修復したiPS細胞株(以下、「変異修復iPS細胞株」又は「変異回復iPS細胞株」(gene-corrected (rescued) iPS cell clone)という場合がある。)を樹立した。

[0152] 患者由来iPS細胞株及び変異修復iPS細胞株をマトリゲルコートプレート(ベクトンアンドディッキンソン社製、商品名Growth Factor Reduced (GFR) BD Matrigel (登録商標)) Matrix上で、mTeSR1(ステムセルテクノロジーズ社製)を用いて2日間フィーダーフリーの条件下で培養した。その後、10 μ M SB-431542(セレックケミカルズ社製)及び1 μ M CHIR99021(和光純薬工業株式会社製)を添加した無血清培地[F12 Nutrient Mixture (ギブコ社製)/Iscove's Modifie

d Dulbecco's Medium (IMDM) (シグマアルドリッチ社製) / 0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) (シグマアルドリッチ社製) / 1% Chemically Defined Lipid (CD-Lipid) (ギブコ社製、商品名 Chemically Defined Lipid Concentrate) / $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ アポトランスフェリン (シグマアルドリッチ社製、商品名 apo-Transferrin human) / $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ インシュリン (和光純薬工業株式会社製、商品名 Insulin, Human, recombinant) / 0.45 mM 1-Thioglycerol (シグマアルドリッチ社製)] を用いて、患者由来 iPS 細胞株及び変異修復 iPS 細胞株を、更に 1 週間フィーダーフリーの条件下で培養し、神経堤細胞へと分化誘導した。続いて、抗 CD271-APC 抗体 (ベクトンアンドディッキンソン社製、商品名 Alexa Fluor (登録商標) 647 Mouse anti-Human CD271) で細胞を標識し、BD FACSAria II (ベクトンアンドディッキンソン社製) を用いて CD271 陽性細胞をソーティングした。その後、alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium (α MEM) (ナカライテスク株式会社製) / 10% ウシ胎仔血清 (FBS) (株式会社ニチレイバイオサイエンス製) / $5 \text{ ng}/\text{mL}$ FGF-2 (和光純薬工業株式会社製) で、ソーティングした細胞を数回継代することによって、間葉系幹細胞様の細胞へと分化誘導し、以下の実験に供した。患者由来 iPS 細胞株から分化した間葉系幹細胞様の細胞を「FOP 患者由来の細胞」と、変異修復 iPS 細胞株から分化した間葉系幹細胞様の細胞を「変異修復株由来の細胞」という場合がある。

[0153] プロモーター領域に BMP 応答配列を有する Firefly ルシフェラーゼレポータープラスミド (J. Biol. Chem., 2002, 277 (7), 4883-4891.) と、内部標準として CMV プロモーターの下流に Renilla ルシフェラーゼをコードする核酸配列を有するプラスミ

ド（プロメガ株式会社製、商品名 p h R L - C M V V e c t o r）とを混合し、上述した間葉系幹細胞様の細胞に F u G e n e（登録商標） H D（プロメガ株式会社製）を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションを行ってから6時間後に、ヒトアクチビンA（アールアンドディーシステムズ社製、商品名 R e c o m b i n a n t H u m a n / M o u s e / R a t A c t i v i n A、最終濃度 1 n g / m L、1 0 n g / m L、1 0 0 n g / m L）又はヒトBMP-7（アールアンドディーシステムズ社製、商品名 R e c o m b i n a n t H u m a n B M P - 7、最終濃度 1 n g / m L、1 0 n g / m L、1 0 0 n g / m L）を加えて、上記トランスフェクションを行った細胞を16時間培養した。その後、デュアルグロ・ルシフェラーゼアッセイシステム（プロメガ株式会社製）に添付のプロトコールにしたがってルシフェラーゼ活性を測定した。発光検出は、E n V i s i o n マルチラベルカウンター（パーキンエルマー社製）を用いて行った。BMP 応答配列を介した転写活性は、F i r e f l y ルシフェラーゼ活性の測定値を R e n i l l a ルシフェラーゼ活性の測定値で除した値を用いて評価した。結果を図1に示す。図1において、棒グラフは各処理群の平均値を示し、エラーバーは標準偏差（S. D.）を表す。

[0154] （結果）

図1に示すとおり、1 0 n g / m L 及び 1 0 0 n g / m L のヒトアクチビンAで処理することで、F O P 患者由来の細胞において A C V R 1 を介した転写活性が有意に上昇した（1 0 n g / m L $P < 0.01$ 、1 0 0 n g / m L $P < 0.001$ 、D u n n e t t 型多重比較）。一方、この現象は、変異修復株由来の細胞では認められなかった。これに対して、BMP-7で処理した場合には、F O P 患者由来の細胞及び変異修復株由来の細胞のいずれにおいても濃度依存的に転写活性が上昇した（F O P 患者由来細胞：1 0 n g / m L 及び 1 0 0 n g / m L $P < 0.001$ 、変異修復株：1 0 0 n g / m L $P < 0.001$ 、各細胞の無処理群に対する D u n n e t t 型多重比較）。これらの結果から、アクチビンAは、F O P 患者由来の細胞に

特異的にBMP応答配列を活性化することが確認された。

[0155] 実施例2：SMAD1／5／8のリン酸化の評価

(方法)

実施例1と同様の方法によって、患者iPS細胞株由来及び変異修復iPS細胞株由来の間葉系幹細胞様の細胞をそれぞれ作製した。これらの間葉系幹細胞様の細胞に、10ng/mL、100ng/mLのヒトアクチビンA又は100ng/mLのヒトBMP-7を加えて60分間培養した。その後、300μLの溶解液（70mM トリス塩酸緩衝溶液、pH6.8、11.2% グリセロール、3% ドデシル硫酸ナトリウム）で、細胞を可溶化し、細胞抽出液を調製した。得られた細胞抽出液中に含まれるリン酸化SMAD1／5／8の量及び総SMAD1／5／8の量をウエスタンブロット法にて定量した。リン酸化SMAD1／5／8に対する一次抗体は、ウサギ抗リン酸化SMAD1／5／8抗体〔セルシグナリング社製、商品名Phospho-Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser463/465) / Smad8 (Ser426/428) Antibody (Rabbit)〕を用いて、総SMAD1／5／8に対する一次抗体は、ウサギ抗総SMAD1／5／8抗体〔サンタクルーズバイオテクノロジー社製、商品名Smad1／5／8 Antibody (N-18)-R (Rabbit)〕を用いた。二次抗体は、西洋わさびペルオキシダーゼ共役抗ウサギ抗体（セルシグナリング社製、商品名Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody）を用いた。化学発光の基質としてECLプライム（GEヘルスケア株式会社製）を用いて、検出にはChemidocXRSPPlus（バイオラッド社製）を用いた。結果を図2に示す。

[0156] (結果)

図2に示すように、FOP患者由来の細胞において、ヒトアクチビンAによる処理を行うことによって、SMAD1／5／8のリン酸化が誘導された。一方、変異修復株由来の細胞では、ヒトBMP-7による処理を行うこと

によってSMAD 1 / 5 / 8のリン酸化は起こるものの、ヒトアクチビンAによる処理を行ってもSMAD 1 / 5 / 8のリン酸化の誘導は生じなかった。ヒトアクチビンA又はヒトBMP-7による処理で、総SMAD 1 / 5 / 8の量に大きな変化はなかった。以上の結果から、変異修復株由来の細胞においてもACVR1は正常に機能しているが、ヒトアクチビンAによるSMAD 1 / 5 / 8のリン酸化は、FOP患者由来の細胞に特異的に起こる現象であることが確認された。

[0157] 実施例3：軟骨細胞への分化誘導に及ぼす影響

(方法)

実施例1と同様の方法によって、患者iPS細胞株由来及び変異修復iPS細胞株由来の間葉系幹細胞様の細胞をそれぞれ作製した。これらの間葉系幹細胞様の細胞をUmedaらの方法(Sci. Rep., 2012, 2, 455.)の培地条件下で6日間培養し、軟骨細胞へと分化誘導した。分化誘導の際、100 ng/mLのヒトアクチビンA、100 ng/mLのヒトBMP-7、又は、1 ng/mLのヒトTGF- β 3(アールアンドディーシステムズ社製、商品名Recombinant Human TGF- β 3)を共存させることで、軟骨細胞への分化誘導に及ぼす各因子の影響を検討した。軟骨細胞への分化誘導の程度は、アルシアンブルーの染色及び硫酸化グリコサミノグリカンの定量キット(バイオカラー社製、商品名Blyscan Glycosaminoglycan Assay Kit)によって測定した。結果を図3及び図4に示す。図4において、棒グラフは各処理群の平均値を示し、エラーバーはS.D.を表す。

[0158] (結果)

アルシアンブルー染色の結果、100 ng/mLのヒトアクチビンAがFOP患者由来の細胞から軟骨細胞への分化誘導を顕著に促進することが明らかになった(図3)。硫酸化グリコサミノグリカンの定量においても、ヒトアクチビンAがFOP患者由来細胞で特に顕著に軟骨誘導を促進することが明らかになった(図4、FOP患者由来細胞、変異修復細胞ともに $P < 0$ 。

001、各細胞の無処理群に対するDunnett型多重比較；FOP患者由来細胞では変異修復細胞の4倍程度の硫酸化グリコサミノグリカン産生が認められた。）。BMP-7及びTGF- β 3は、いずれの細胞においても有意に軟骨誘導を促進した（FOP患者由来細胞：BMP-7 $P < 0.05$ 、TGF- β 3 $P < 0.001$ 、変異修復細胞：BMP-7、TGF- β 3ともに $P < 0.001$ 、各細胞の無処理群に対するDunnett型多重比較）。しかし、その作用はFOP患者由来細胞に対してアクチビンAが示す作用と比較して弱く、TGF- β 3については、FOP患者由来の細胞と変異修復株由来の細胞の間に有意な差が認められなかった。

[0159] 実施例4：ACVR1又はBMPRI Aの発現を阻害することによる影響
(方法)

実施例1と同様の方法によって、患者iPS細胞株由来の間葉系幹細胞様の細胞を作製した。この細胞に、プロモーター領域にBMP応答配列を有するFireflyルシフェラーゼレポータープラスミド、内部標準としてCMVプロモーターの下流にRenillaルシフェラーゼをコードする核酸配列を有するプラスミド、及びACVR1又はBMPRI AのsiRNAを、リポフェクタミン2000（インビトロジェン社製）を用いてトランスフェクションすることで、ACVR1又はBMPRI Aの発現をノックダウンした。BMPRI Aは、BMPのシグナルを伝達するI型受容体である。siRNAはアプライドバイオシステムズ社から購入し、ノックダウンには、各遺伝子について2種類の異なる配列を有するsiRNAを用いた（カタログ番号、ACVR1：S975、S976、BMPRI A：S281、S282）。さらに、実施例1と同様にアクチビンAを加えて、上記細胞を16時間培養した。その後に、細胞を可溶化し、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図5に示す。図5において、棒グラフは各処理群の平均値を示し、エラーバーはS.D.を表す。ここで、試験に用いたsiRNAの配列は、S975：センス鎖5'-GGAUCAUUCGUGUACAUCAtt-3'（配列番号37）、アンチセンス鎖5'-UGAUGUACACGAA

UGA UCC a a - 3' (配列番号38)、S976:センス鎖5' - GU UGCUCUCCGAAAAUUUA t t - 3' (配列番号39)、アンチセンス鎖5' - UAAAAUUUUCGGAGAGCAAC t c - 3' (配列番号40)、S281:センス鎖5' - GGCCGAUAUGGAGAAG UAU t t - 3' (配列番号41)、アンチセンス鎖5' - AUACUUC UCCAUAUCGGCC t t - 3' (配列番号42)、S282:センス鎖5' - GAAUCUGGAUAGUAUGCUU t t - 3' (配列番号43)、アンチセンス鎖5' - AAGCAUACUAUCCAGAUUC t g - 3' (配列番号44)である。小文字で表記した配列部分はオーバーハング部分を表し、リボース骨格がデオキシリボース骨格に置き換わっている部分である。

[0160] (結果)

図5に示すように、2種類のACVR1 siRNA (ACVR1-1、ACVR1-2それぞれ、S975、S976に対応)のいずれを用いた場合にも、FOP患者由来の細胞における、ヒトアクチビンAによるBMP応答配列の転写活性化が消失した。一方、BMPR1AをsiRNA (BMPR1A-1、BMPR1A-2それぞれ、S281、S282に対応)によってノックダウンした場合には、FOP患者由来の細胞における、ヒトアクチビンAの作用は影響を受けなかった。したがって、FOP患者由来の細胞においてアクチビンのシグナルは、FOP患者に特有の変異型ACVR1を介して伝達されていることが確認された。

[0161] 実施例5: 結合阻害剤の評価

(方法)

実施例1と同様の方法によって、患者iPS細胞株由来の間葉系幹細胞様の細胞を作製した。この間葉系幹細胞様の細胞を実施例3と同様の方法で6日間培養し、軟骨細胞へと分化誘導した。この際、ヒトアクチビンAに対する中和抗体(アールアンドディーシステムズ社製、商品名Human/Mouse/Rat Activin A β A subunit Antibody)を用いた。

ody)、フォリスタチン(アールアンドディーシステムズ社製、商品名 Recombinant Human Follicle Stimulating Protein 315 aa 30-344)、フォリスタチン様3(アールアンドディーシステムズ社製、商品名 Recombinant Human Follicle Stimulating Protein-related Gene Protein/FLRG)、ACVR2A-Fcキメラタンパク質(アールアンドディーシステムズ社製、商品名 Recombinant Human Activin R1A Fc Chimera (CHO))、又はACVR2B-Fcキメラタンパク質(アールアンドディーシステムズ社製、商品名 Recombinant Human Activin R1B Fc Chimera)と、30ng/mLのヒトアクチビンAとを共存させることで、軟骨細胞への分化誘導に及ぼす各因子の影響を検討した。ここで、ACVR2A-Fcキメラタンパク質は、配列番号12に記載のアミノ酸配列における第20~第134番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片と、ヒト由来の抗体のFc領域とがリンカー配列(Ile-Glu-Gly-Arg-Met-Asp)を介して結合した融合タンパク質である。ACVR2B-Fcキメラタンパク質は、配列番号14に記載のアミノ酸配列における第19~第134番目のアミノ酸配列を有するポリペプチド断片と、ヒト由来の抗体のFc領域とがリンカー配列(Ile-Glu-Gly-Arg-Met-Asp)を介して結合した融合タンパク質である。軟骨細胞への分化誘導の程度は、実施例3と同様にアルシアンブルーの染色と硫酸化グリコサミノグリカンの定量とによって行った。結果を図6に示す。図6(B)において、棒グラフは各処理群の平均値を示し、エラーバーはS.D.を表す。

[0162] (結果)

図6に示すように、ヒトアクチビンAに対する中和抗体(抗アクチビン抗体)、フォリスタチン、フォリスタチン様3、ACVR2A-Fcキメラタンパク質及びACVR2B-Fcキメラタンパク質のいずれも、30ng/mLのヒトアクチビンAによるFOP患者由来の細胞の軟骨細胞への分化誘

導を阻害した (ACVR2B-Fc 100 ng/mL $P < 0.05$ 、抗アクチビン抗体 100 ng/mL $P < 0.01$ 、その他の処理はいずれも $P < 0.001$ 、アクチビン処理群に対する Dunnett 型多重比較)。

[0163] 実施例 6：アクチビンの発現を阻害することによる影響

(方法)

実施例 1 と同様の方法によって、患者 iPS 細胞株由来の間葉系幹細胞様の細胞を作製した。アクチビンを構成するポリペプチド鎖であるインヒビン βA 鎖の遺伝子に対する siRNA を、実施例 4 と同様の方法で FOP 患者由来の細胞にトランスフェクションすることで、アクチビンの発現を抑制した。siRNA はアプライドバイオシステムズ社から購入し、ノックダウンには 2 種類の異なる配列を有する siRNA (INHBA-1、INHBA-2) を用いた (カタログ番号 S7434、S7435)。その後、実施例 3 と同様に軟骨細胞へと分化誘導した。軟骨細胞への分化誘導の程度は、実施例 3 と同様に硫酸化グリコサミノグリカンの定量によって判定した。結果を図 7 に示す。図 7 において、「陰性対照」は、どの遺伝子に対しても発現を抑制しない陰性対照の siRNA (ライフテクノロジーズ社製、カタログ番号 4390843) をトランスフェクトした FOP 患者由来の細胞を示す。棒グラフは各処理群の平均値を示し、エラーバーは S.D. を表す。

[0164] (結果)

図 7 に示すように、インヒビン βA 鎖の遺伝子発現をノックダウンすることによってアクチビンの発現を抑制すると、FOP 患者由来の細胞の軟骨細胞への分化誘導は阻害された (両 siRNA とともに $P < 0.001$ 、Dunnett 型多重比較)。

[0165] 実施例 7：各変異型 ACVR1 を介した転写活性の評価

(方法)

BMP の代表的な下流遺伝子である ID1 遺伝子のプロモーター領域を有する Firefly ルシフェラーゼレポータープラスミド (Genes C

e l l s. 2002 Sep; 7 (9) : 949-60.) と、FOPを惹き起こすことが報告されている種々の変異型ACVR1の遺伝子を含むプラスミドとを混合し、U2OS細胞にFuGene HDを用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションを行ってから1時間後にヒトアクチビンA（最終濃度10 ng/mL）を加えて上記トランスフェクションを行った細胞を20時間培養した。その後、ブライトグロ・ルシフェラーゼアッセイシステム（プロメガ株式会社製）に添付のプロトコールにしたがってルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図8に示す。図8において、各サンプル名は、ACVR1のアミノ酸変異に基づいて、上記表1に従って記載した。

[0166] （結果）

図8に示すように、ヒトアクチビンAによる処理によって、FOPを惹き起こすことが報告されている変異型ACVR1を導入した細胞ではいずれもACVR1を介した転写活性が上昇した。一方、この現象は、野生型ACVR1を導入した細胞では認められなかった。このことから、アクチビンAは、FOPを惹き起こすことが報告されている変異型ACVR1を導入した細胞においてのみ、ID1遺伝子のプロモーターを活性化することが確認された。

[0167] 実施例8：その他のアクチビンを用いた場合の評価

（方法）

実施例1と同様の方法によって、患者iPS細胞株由来及び変異修復iPS細胞株由来の間葉系幹細胞様の細胞をそれぞれ作製した。これらの細胞に、プロモーター領域にBMP応答配列を有するFireflyルシフェラーゼレポータープラスミド、及び内部標準としてCMVプロモーターの下流にRenillaルシフェラーゼをコードする核酸配列を有するプラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションを行ってから6時間後にヒトアクチビンA（アールアンドディーシステムズ社製、最終濃度1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL）、ヒトアクチビンB（アールア

ンドディーシステムズ社製、商品名 R e c o m b i n a n t H u m a n A c t i v i n B、最終濃度 1 n g / m L、1 0 n g / m L、1 0 0 n g / m L)、又はヒトアクチビンAB (アールアンドディーシステムズ社製、商品名 R e c o m b i n a n t H u m a n A c t i v i n A B、最終濃度 1 n g / m L、1 0 n g / m L、1 0 0 n g / m L) を加えて、上記トランスフェクションを行った細胞を 1 6 時間培養した。その後、デュアルグロ・ルシフェラーゼアッセイシステム (プロメガ株式会社製) に添付のプロトコールにしたがってルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 9 に示す。図 9 において、棒グラフは各処理群の平均値を示し、エラーバーは S. D. を表す。

[0168] (結果)

図 9 に示すとおり、ヒトアクチビンAで処理した場合と同様に、ヒトアクチビンB又はヒトアクチビンABで処理することで、FOP患者由来の細胞においてACVR1の下流の転写活性が有意に上昇した (1 0 n g / m L 及び 1 0 0 n g / m L のアクチビンB及びアクチビンAB処理 $P < 0.001$ 、無処理群に対するDunnett型多重比較)。この現象は、変異修復株由来の細胞では認められなかった。このことから、アクチビンB及びアクチビンABは、FOP患者由来の細胞に対してアクチビンAと同様の活性を有することが示された。

[0169] 実施例 9 : 三次元軟骨ペレットの形成とマウスへの移植実験

(方法)

三次元軟骨ペレットの作製

実施例 1 と同様の方法によって、患者 i P S 細胞株由来及び変異修復 i P S 細胞株由来の間葉系幹細胞様の細胞をそれぞれ作製した。この間葉系幹細胞様の細胞を 1 5 m L チューブに移して、遠心分離 (1 2 0 0 r p m × 5 分) することで軟骨細胞のペレットを形成させた。実施例 3 と同様の培地条件下で 1 0 0 n g / m L のヒトアクチビンAを共存させ、ペレットの状態で 2 1 日間培養して三次元軟骨ペレット (以下、「軟骨ペレット」という場合が

ある。)を作製した(図10の写真(a))。

[0170] 三次元軟骨ペレットのマウスへの移植実験

上述の方法で得られた三次元軟骨ペレットを、免疫不全マウス(NOD-SCIDマウス)の背側の皮下に移植した。その後、4週間経時的にX線画像解析によって移植したマウスを観察した(図10の写真(b))。移植には10匹のマウスを用いた。それぞれのマウスの右側にFOP患者由来の細胞から作製した軟骨ペレット(FOP患者由来軟骨ペレット)を、左側に変異修復株由来の細胞から作製した軟骨ペレット(変異修復株由来軟骨ペレット)を移植した。移植してから4週間後に、micro-computed tomography解析(μ CT解析)(図10の写真(c))を実施した。その後、異所性に形成された骨軟骨塊を回収して4%パラホルムアルデヒドで固定し、組織染色(HE染色、アルシアンブルー染色、von Kossa染色)による解析を行った(図10の写真(d))。

[0171] (結果)

作製した軟骨ペレットの写真(a)を図10に示す。FOP患者由来軟骨ペレットは、変異修復株由来軟骨ペレットよりもサイズが大きく、より成熟した軟骨細胞が観察された。

[0172] 移植してから4週間後のマウスのX線撮影像の写真(b)を図10に示す。白い破線の矢印が、FOP患者由来軟骨ペレットを移植した場所に発生した石灰化部位を示す。白い実線の矢印が、変異修復株由来軟骨ペレットを移植した場所に発生した石灰化部位を示す。FOP患者由来軟骨ペレットを移植した部位には2週目に10匹中7匹で、3週目以降は9匹で異所性の石灰化が観察された。一方、変異修復株由来軟骨ペレットを移植した部位には3週目以降、1匹だけ異所性の石灰化が観察された。

[0173] FOP細胞由来軟骨ペレットの移植によって起こった異所性の石灰化部位の(白い破線の矢印)、 μ CT解析による撮影像(写真(c))を図10に示す。さらに、FOP患者由来軟骨ペレットを移植したマウスにおいて、異所性に形成された骨軟骨塊の組織染色の写真(d)を図10に示す。いずれ

の解析においても、F O P 患者由来軟骨ペレットをマウスに移植することで、移植した部位に、異所性の石灰化が確認された。

産業上の利用可能性

[0174] F O P は臨床において効果が確認された治療法が存在しない疾患である。本発明は、F O P に対して、その主症状であるフレアアップ及び／又は異常な軟骨若しくは骨の形成及び成長を抑制する、効果的な予防剤及び／又は治療剤を提供するものである。より詳細には、アクチビンと A C V R 1 との相互作用を阻害する、アクチビンの発現を抑制することで F O P の主症状であるフレアアップ及び／又は異常な軟骨若しくは骨の形成及び成長を抑制する、予防剤及び予防方法、並びに治療剤及び治療方法を提供するものである。

請求の範囲

- [請求項1] アクチビンとアクチビンA受容体タイプI（ACVR1）との相互作用を阻害する結合阻害物質、又はアクチビンの発現を抑制する発現抑制物質を有効成分として含有する、進行性骨化性線維異形成症の予防剤又は治療剤。
- [請求項2] 前記結合阻害物質が、アクチビン受容体、その改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、
 フォリスタチン、フォリスタチン様タンパク質、それらの改変体、及びそれらの部分配列を含むポリペプチド断片、
 アクチビンに対する抗体及び抗原結合部位を含むその抗体断片、並びに、
 インヒビン及びその改変体、
 からなる群から選ばれる、請求項1に記載の予防剤又は治療剤。
- [請求項3] 前記発現抑制物質が、アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸である、請求項1に記載の予防剤又は治療剤。
- [請求項4] 前記アクチビンの遺伝子発現を抑制する核酸が、アクチビンの遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA、miRNA及びリボザイムからなる群から選ばれる、請求項3に記載の予防剤又は治療剤。
- [請求項5] ACVR1にアミノ酸変異を有する患者用である、請求項1～4のいずれか一項に記載の予防剤又は治療剤。
- [請求項6] 前記アミノ酸変異が、前記ACVR1のGSドメイン又はキナーゼドメインにおけるアミノ酸変異を含む、請求項5に記載の予防剤又は治療剤。
- [請求項7] 前記GSドメイン又はキナーゼドメインにおけるアミノ酸変異が、配列番号10に記載のアミノ酸配列における第196番目のアミノ酸残基がプロリンであるアミノ酸変異、第197番目のアミノ酸残基がロイシンであり第198番目のアミノ酸が欠失したアミノ酸変異、第

202番目のアミノ酸残基がイソロイシンであるアミノ酸変異、第206番目のアミノ酸残基がヒスチジンであるアミノ酸変異、第207番目のアミノ酸残基がグルタミン酸であるアミノ酸変異、第258番目のアミノ酸残基がグリシン又はセリンであるアミノ酸変異、第325番目のアミノ酸残基がアラニンであるアミノ酸変異、第328番目のアミノ酸残基がグルタミン酸、アルギニン又はトリプトファンであるアミノ酸変異、第356番目のアミノ酸残基がアスパラギン酸であるアミノ酸変異、及び第375番目のアミノ酸残基がプロリンであるアミノ酸変異からなる群から選ばれる少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、請求項6に記載の予防剤又は治療剤。

[請求項8] 前記ACVR1のGSドメインにおけるアミノ酸変異を含み、前記GSドメインにおけるアミノ酸変異が、配列番号10に記載のアミノ酸配列における第206番目のアミノ酸残基がヒスチジンであるアミノ酸変異を含む、請求項6に記載の予防剤又は治療剤。

[請求項9] 異所性骨化の症状若しくは進行を抑制する薬剤、又は異所性骨化の発症を回避若しくは抑制する薬剤である、請求項1～8のいずれか一項に記載の予防剤又は治療剤。

[請求項10] 進行性骨化性線維異形成症の予防剤若しくは治療剤、又はそれらの候補物質のスクリーニング方法であって、

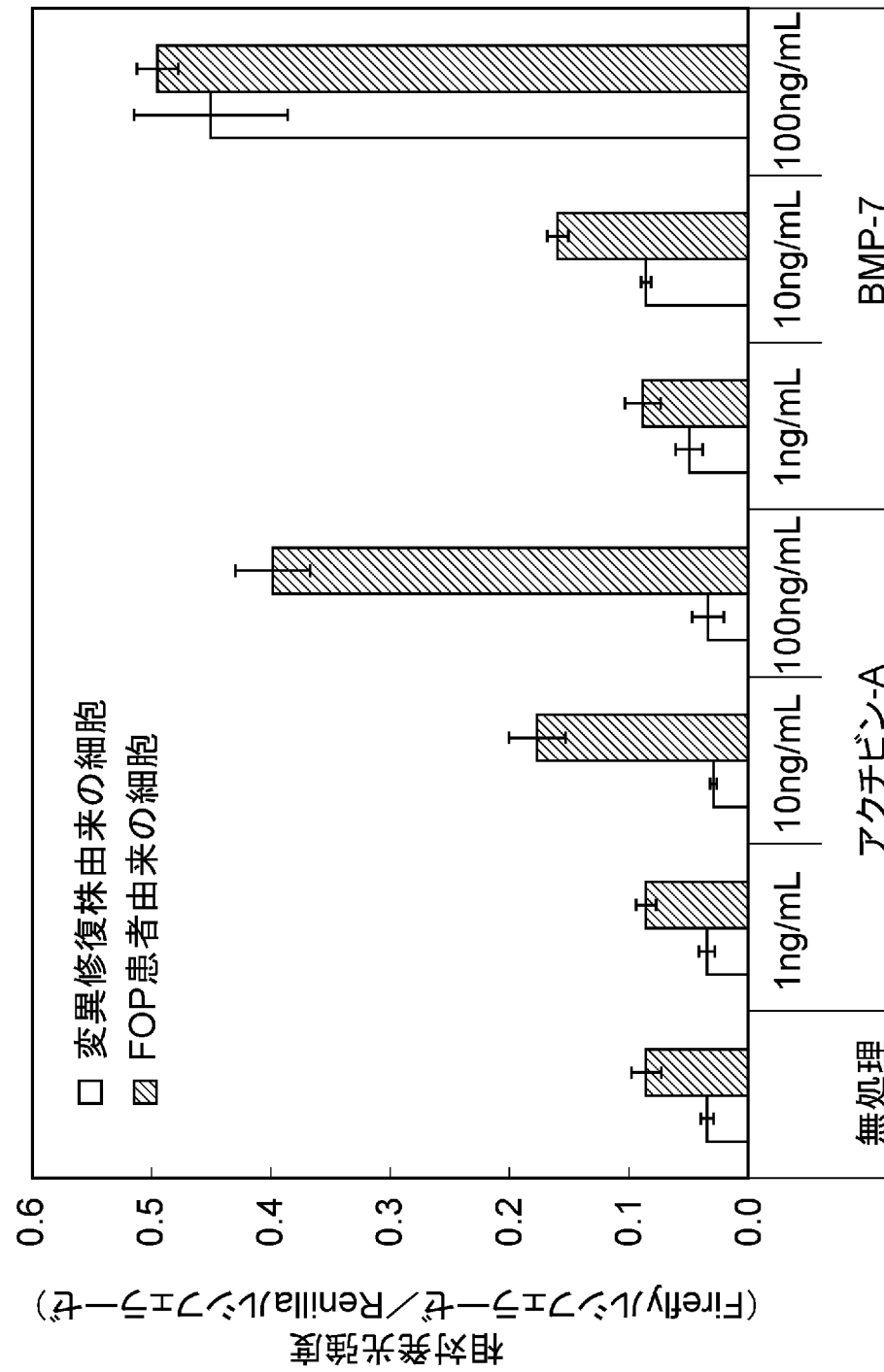
被験物質の存在下、アクチビンとアクチビンA受容体タイプI（ACVR1）との相互作用を測定し、第1の結合力を求める工程と、

前記被験物質の非存在下において測定した前記相互作用から求められた第2の結合力と比較し、前記第1の結合力が前記第2の結合力より弱いとき、前記被験物質を候補物質として選択する工程と、を含むか、又は、

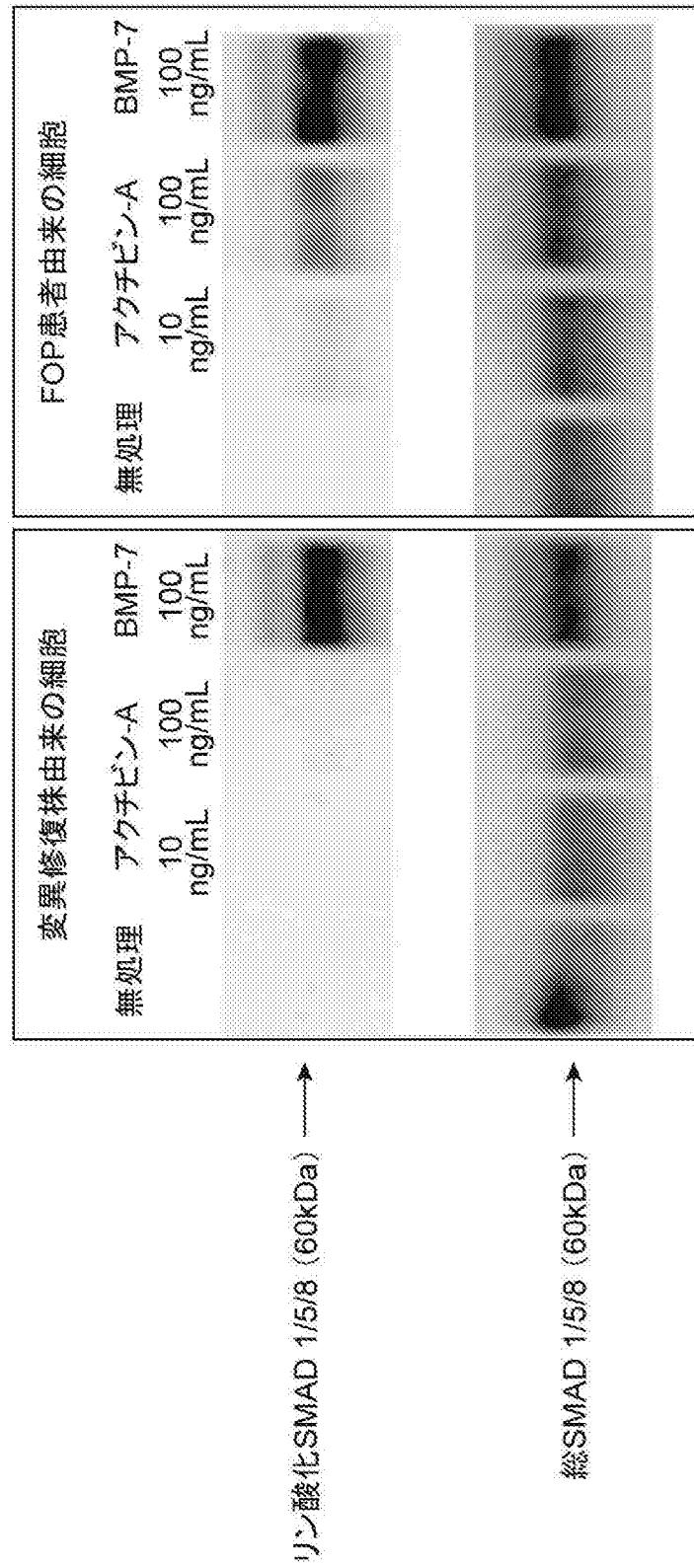
被験物質の存在下、アクチビンが結合することによる変異型ACVR1を介したシグナル伝達の強度を測定し、第1のシグナル強度を求める工程と、

前記被験物質の非存在下において測定した前記シグナル伝達の強度から求められた第2のシグナル強度と比較し、前記第1のシグナル強度が前記第2のシグナル強度より弱いとき、前記被験物質を候補物質として選択する工程と、を含む、スクリーニング方法。

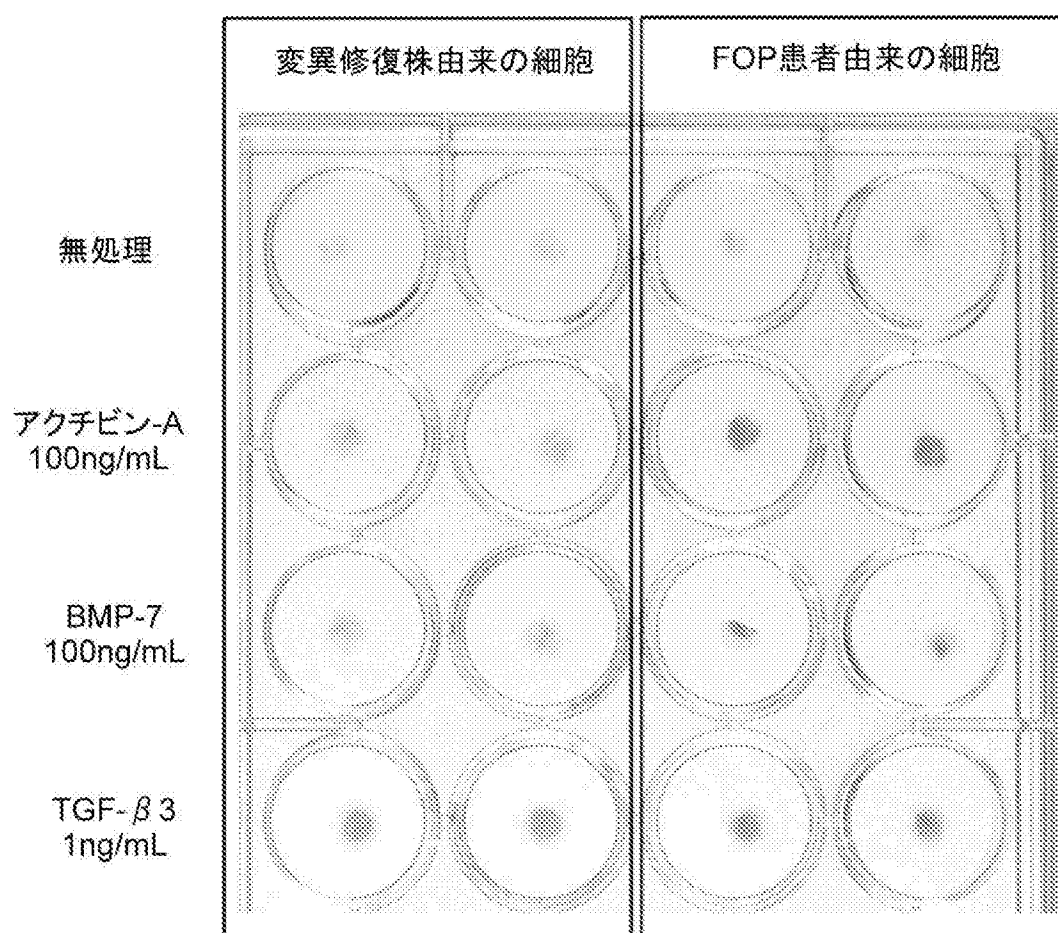
[図1]



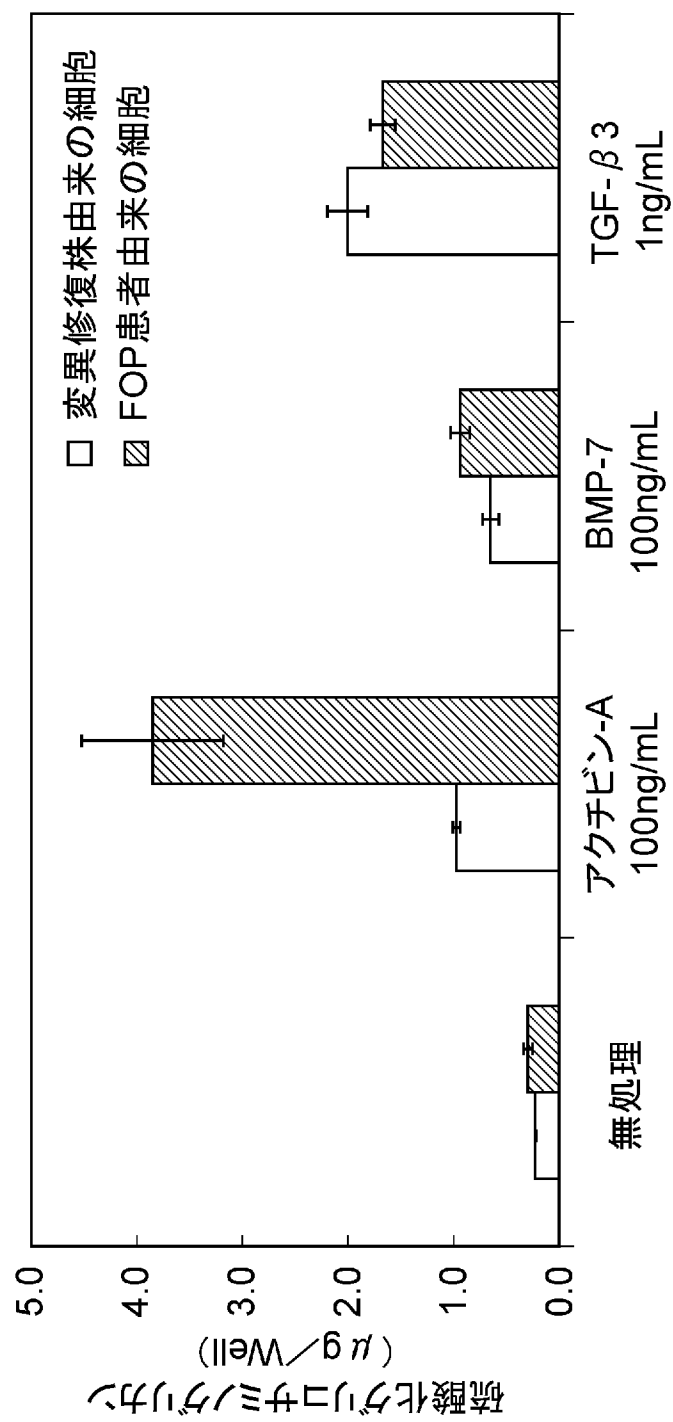
[図2]



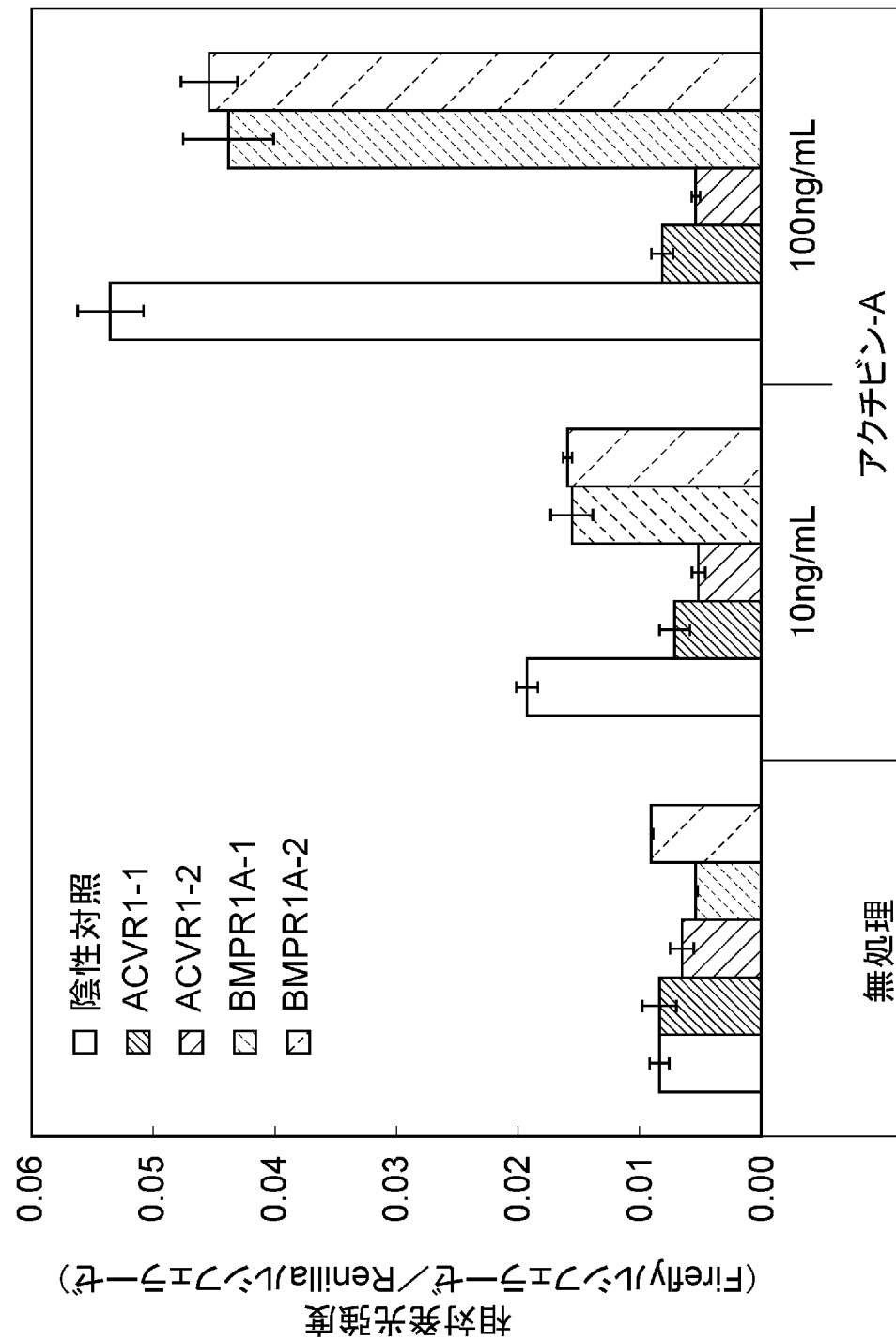
[図3]



[図4]

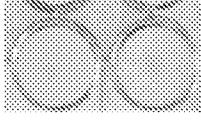
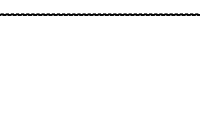
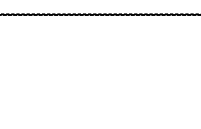


[図5]

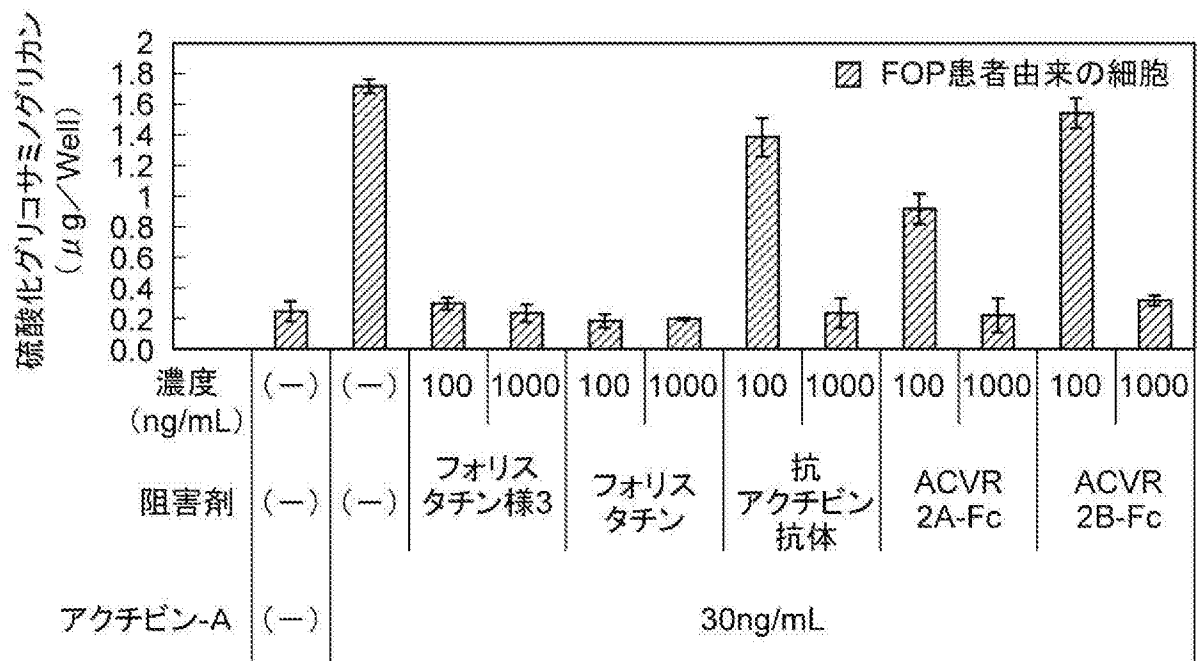


[図6]

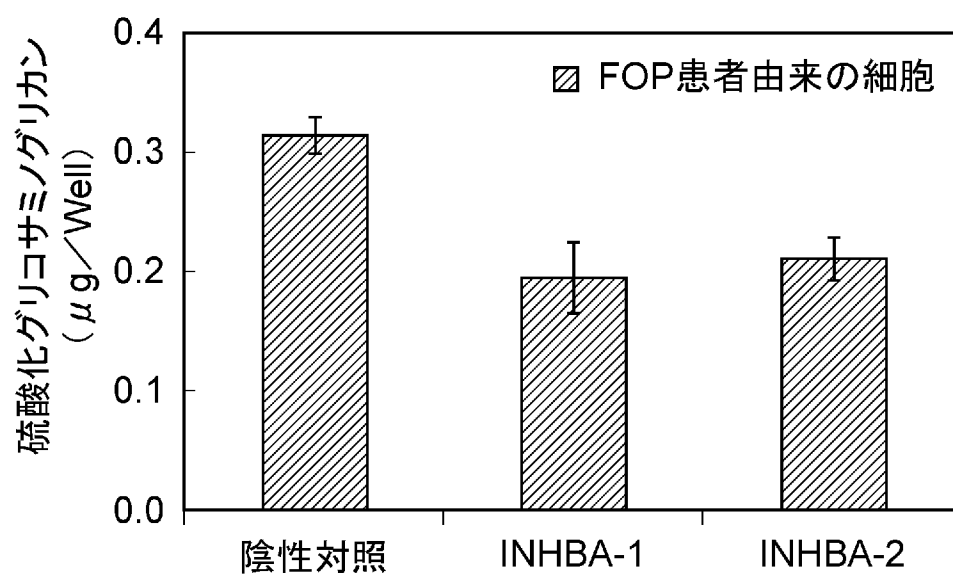
(A)

アクチビン-A (30ng/mL)	阻害剤		アクチビン-A (30ng/mL)	阻害剤	FOP患者由来の 細胞
(-)	(-)		(+)	抗アクチビン抗体 100ng/mL	
(+)	(-)		(+)	抗アクチビン抗体 1000ng/mL	
(+)	フォリスタチン様3 100ng/mL		(+)	ACVR2A-Fc 100ng/mL	
(+)	フォリスタチン様3 1000ng/mL		(+)	ACVR2A-Fc 1000ng/mL	
(+)	フォリスタチン 100ng/mL		(+)	ACVR2B-Fc 100ng/mL	
(+)	フォリスタチン 1000ng/mL		(+)	ACVR2B-Fc 1000ng/mL	

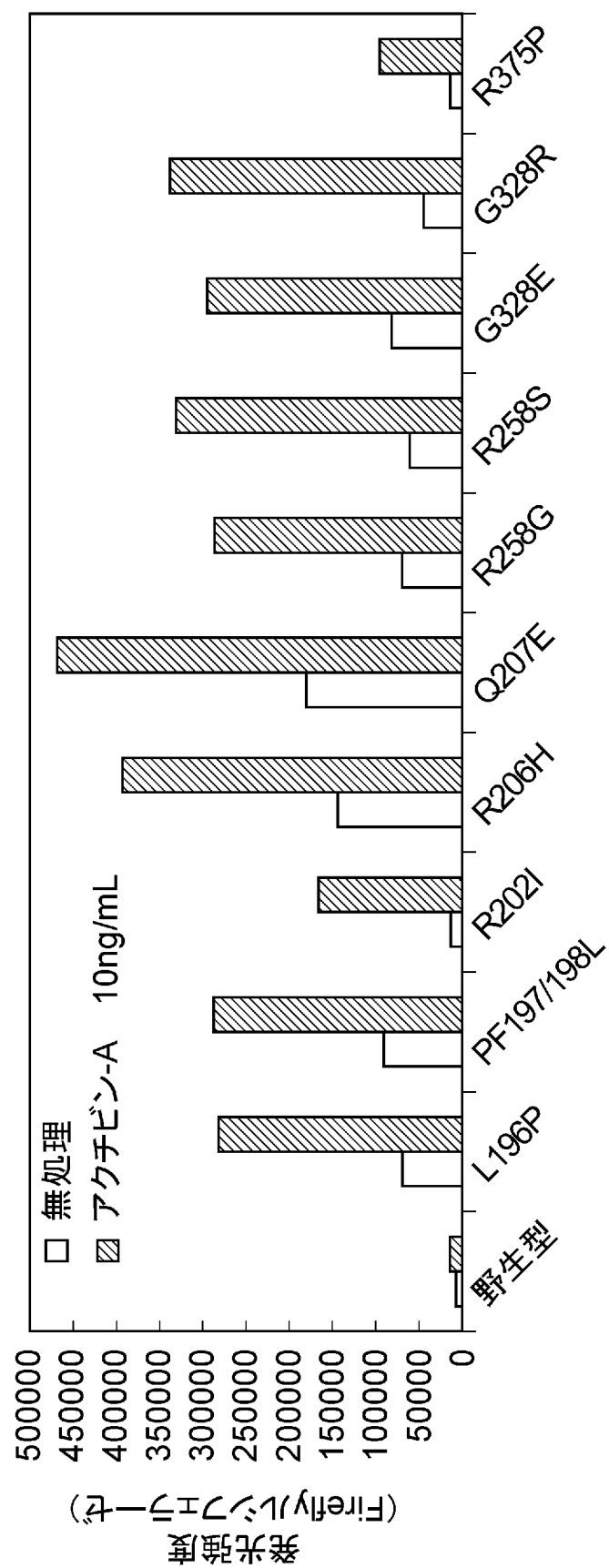
(B)



[図7]

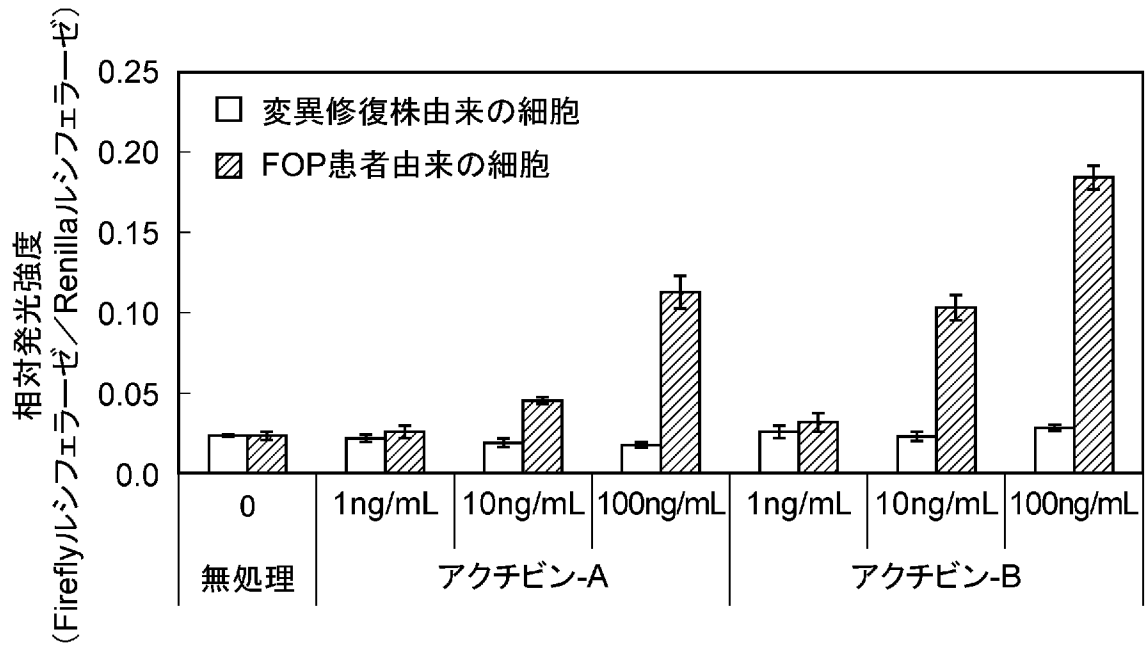


[図8]

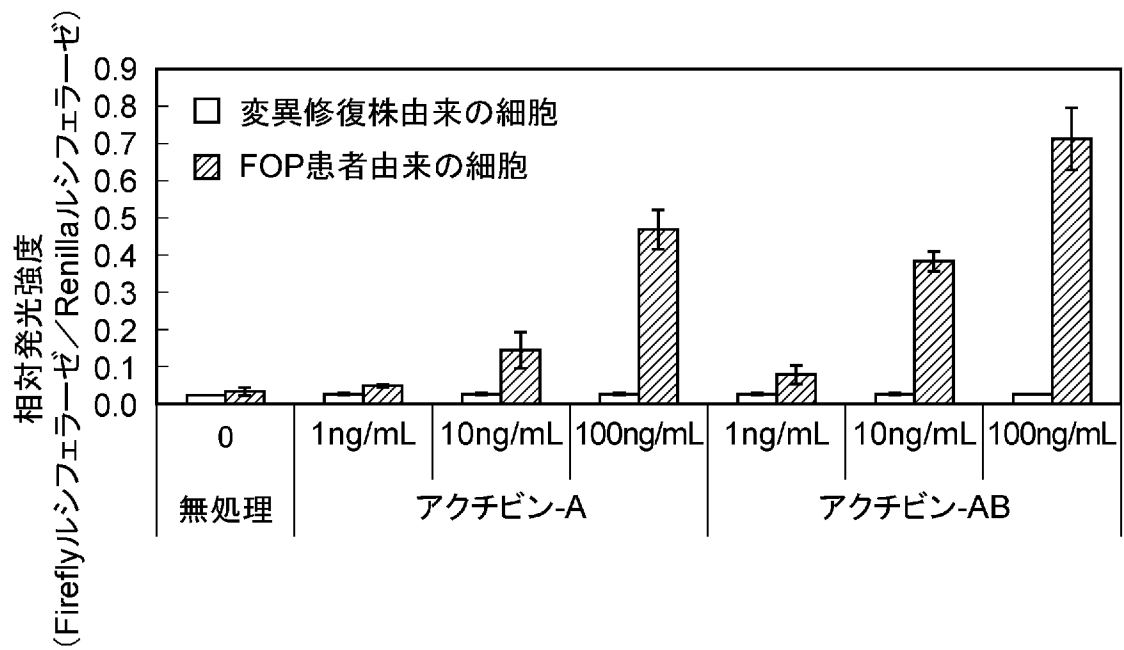


[図9]

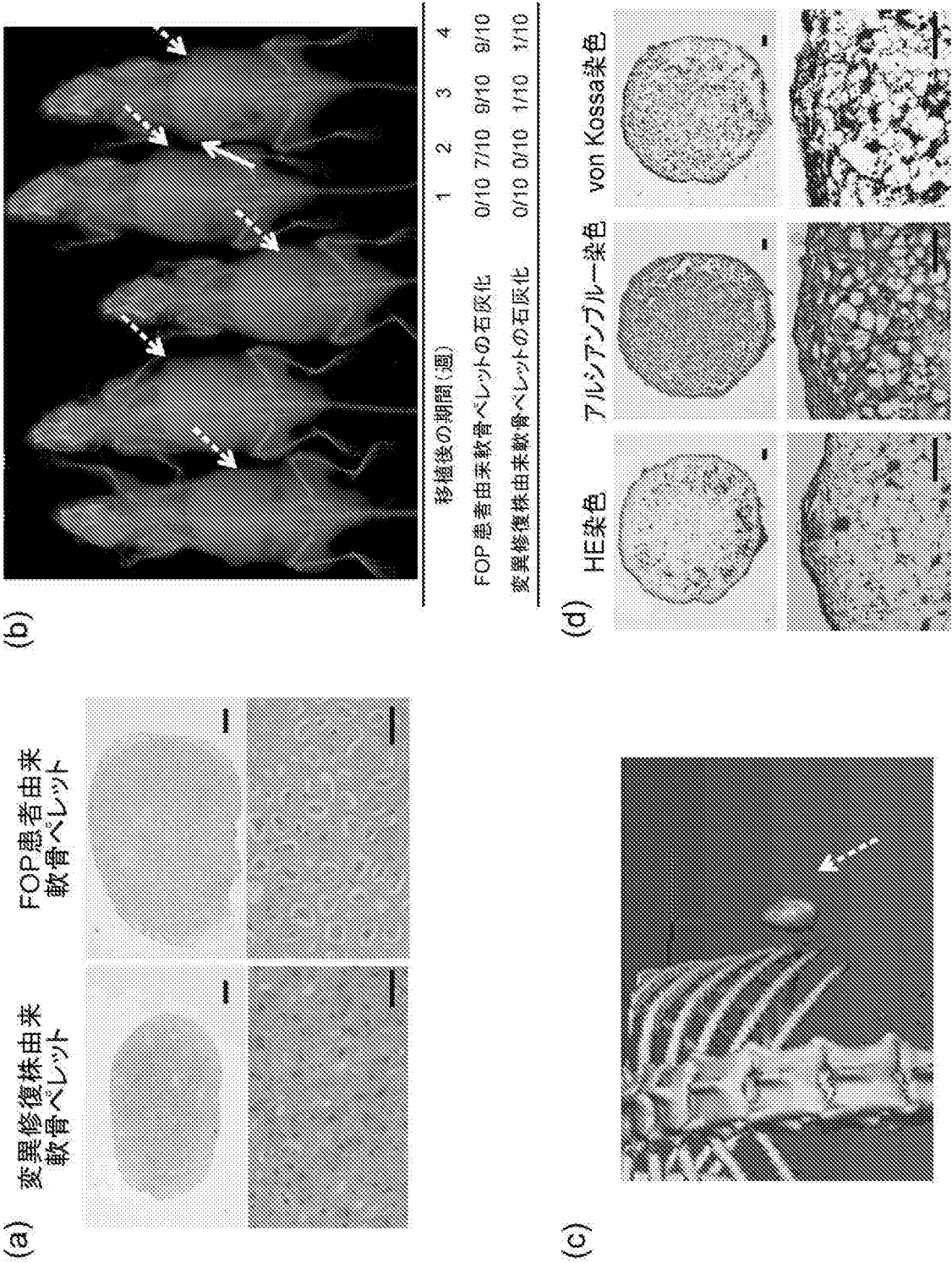
(A)



(B)



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/060015

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i,
A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P19/00
(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K38/00, A61K39/395, A61K48/00,
A61P19/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), UniProt/GeneSeq, Japio-GPG/FX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	WO 2007/123896 A2 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA), 01 November 2007 (01.11.2007), claims 41, 50; pages 5 to 9; paragraphs [000110] to [000113] & US 2009/0253132 A1	1, 2, 5-9/1, 2, 5-9/3, 4, 10
X/Y/A	LOWERY, JW., et al., Allele-Specific RNA Interference in FOP -Silencing the FOP gene, Gene Therapy, 2012, Vol.19, pp.701-702 page 701, left column, 2nd to 3rd paragraphs, Fig.1	1, 2, 5-9/1, 2, 5-9/3, 4, 10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 June 2015 (02.06.15)

Date of mailing of the international search report
23 June 2015 (23.06.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/060015

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP 2008-507288 A (Acceleron Pharma, Inc.), 13 March 2008 (13.03.2008), claims; paragraph [0120] & WO 2006/012627 A2 & US 2006/0068468 A1 & US 2010/0267133 A1 & US 2013/0065299 A1 & EP 2314617 A2 & EP 2332977 A2	1, 2, 5-9/1, 2, 5-9/3, 4, 10
Y/A	MIAO, J., et al., Genetic abnormalities in fibrodysplasia ossificans progressiva, Genes Genet. Syst., 2012, Vol.87, No.4, pp.213-219 Table.1	1, 2, 5-9/3, 4, 10
Y/A	OHTE S., et al., A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2011, Vol.407, No.1, pp.213-218 Abstract	1, 2, 5-9/3, 4, 10
Y/A	Kosei HASEGAWA et al., "ACVR1 Idenshi ni R258G Hen'i o Mitome, Tahatsu Kikei o Tomonatta Shinkosei Kotsukasei Sen'i Ikeiseisho no 1 Nyuji Rei", The Journal of the Japan Pediatric Society, 2011, vol.115, no.2, page 345, column O-363	1, 2, 5-9/3, 4, 10
Y/A	Takenobu KATAGIRI, "Rinsho ni Hitsuyo na Shinkei Yakuri · Kagaku - Shinkosei Kotsukasei Sen'i Ikeiseisho no Hassho Mechanism", Clinical Neuroscience, 2010, vol.28, no.5, pages 480 to 481, fig. 3	1, 2, 5-9/3, 4, 10
A	ERESEN YAZICIOGLU, C., et al., ACVR1 gene mutations in four Turkish patients diagnosed as fibrodysplasia ossificans progressiva, Gene, 2013, Vol.515, No.2, pp.444-446	1-10
A	HAMASAKI, M., et al., Pathogenic mutation of ALK2 inhibits induced pluripotent stem cell reprogramming and maintenance: mechanisms of reprogramming and strategy for drug identification, Stem Cells, 2012, Vol.30, No.11, pp.2437-2449	1-10
A	SHI, S., et al, Antisense-oligonucleotide mediated exon skipping in activin-receptor-like kinase 2: inhibiting the receptor that is overactive in fibrodysplasia ossificans progressiva, PLoS One, 2013, Vol.8, No.7, e69096	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/060015

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATSUMOTO, Y., et al., Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation, Orphanet J. Rare Dis., 2013, Vol.8:190 pp.1-14	1-10
A	WO 2011/158924 A1 (National Center of Neurology and Psychiatry), 22 December 2011 (22.12.2011), & US 2013/0090373 A1 & EP 2583692 A1	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/7088, A61K31/7105, A61K38/00, A61K39/395, A61K48/00, A61P19/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq, Japio-GPG/FX

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y/ A	WO 2007/123896 A2 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 2007.11.01 & US 2009/0253132 A1 Claim41、Claims50、第 5-9 頁、段落 [000110] 一段落 [000113]	1, 2, 5-9/ 1, 2, 5-9/ 3, 4, 10
X/ Y/ A	LOWERY, JW., et al., Allele-Specific RNA Interference in FOP - Silencing the FOP gene, Gene Therapy, 2012, Vol.19, pp.701-702 第 701 頁左欄第 2 - 3 段落、Fig.1	1, 2, 5-9/ 1, 2, 5-9/ 3, 4, 10

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 2 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

2 3 . 0 6 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐々木 大輔

4 C

3 9 6 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y/ A	JP 2008-507288 A (アクセルロン ファーマ インコーポレーテッド) 2008.03.13 & WO 2006/012627 A2 & US 2006/0068468 A1 & US 2010/0267133 A1 & US 2013/0065299 A1 & EP 2314617 A2 & EP 2332977 A2 特許請求の範囲、段落 [0120]	1, 2, 5-9/ 1, 2, 5-9/ 3, 4, 10
Y/ A	MIAO, J., et al., Genetic abnormalities in fibrodysplasia ossificans progressiva, Genes Genet. Syst., 2012, Vol.87, No.4, pp.213-219 Table.1	1, 2, 5-9/ 3, 4, 10
Y/ A	OHTS S., et al., A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2011, Vol.407, No.1, pp.213-218 Abstract	1, 2, 5-9/ 3, 4, 10
Y/ A	長谷川高誠 他, ACVR1 遺伝子に R258G 変異を認め、多発奇形を伴っ た進行性骨化性線維異形成症の 1 乳児例, 日本小児科学会雑誌, 2011, Vol.115, No.2, p.345, 0-363 欄	1, 2, 5-9/ 3, 4, 10
Y/ A	片桐岳信, 臨床に必要な神経薬理・化学 - 進行性骨化性線維異形成 症の発症メカニズム, Clinical Neuroscience, 2010, Vol.28, No.5, pp.480-481 図 3	1, 2, 5-9/ 3, 4, 10
A	ERESEN YAZICIOGLU, C., et al., ACVR1 gene mutations in four Turkish patients diagnosed as fibrodysplasia ossificans progressiva, Gene, 2013, Vol.515, No.2, pp.444-446	1-10
A	HAMASAKI, M., et al., Pathogenic mutation of ALK2 inhibits induced pluripotent stem cell reprogramming and maintenance: mechanisms of reprogramming and strategy for drug identification, Stem Cells, 2012, Vol.30, No.11, pp.2437-2449	1-10

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	SHI, S., et al, Antisense-oligonucleotide mediated exon skipping in activin-receptor-like kinase 2: inhibiting the receptor that is overactive in fibrodysplasia ossificans progressiva, PLoS One, 2013, Vol.8, No.7, e69096	1-10
A	MATSUMOTO, Y., et al., Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation, Orphanet J. Rare Dis., 2013, Vol.8:190 pp.1-14	1-10
A	WO 2011/158924 A1 (独立行政法人国立精神・神経医療研究センター) 2011.12.22 & US 2013/0090373 A1 & EP 2583692 A1	1-10