

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713034

研究課題名(和文)リピート長制御によるトリプレットリピート病の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Modulation of repeat size in trinucleotide repeat expansion disorders

研究代表者

中森 雅之 (NAKAMORI, Masayuki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60630233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円

研究成果の概要(和文)：トリプレットリピート病は3塩基繰り返し配列(リピート)の異常伸長が原因であり、リピートが長いほど重症となる。このリピートは年齢とともにさらに伸長し、症状の進行に寄与している。従って、リピート長を制御することは、治療の観点からも重要となる。今回われわれは、こうしたリピートの伸長機構解明と、リピート長を安定化あるいは短縮させる治療法の開発を目的に研究をおこなった。この結果、リピート病モデル細胞および患者由来iPS細胞を用いて、リピートの伸長に影響を与える因子を同定した。また、リピート長を安定化・短縮させる化合物を見出し、細胞モデルでの効果も実証しており、将来の臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Triplet repeat disorders are caused by abnormal expansion of trinucleotide repeat sequences (repeat), and the longer the repeat the more severe the condition. These repeats also lengthen with age, contributing to progression of the disease. Therefore, controlling the repeat length is important from a treatment perspective. Here we conducted research with the aim of elucidating the repeat expansion mechanism as well as developing therapies to stabilize or shorten the repeat length. As a result, we have identified factors that affect repeat expansion, using repeat disorder model cells and patient-derived iPS cells. We also discovered a compound that stabilizes or shortens the repeat length, the effect has been demonstrated in cell models, and we can expect future clinical application of this discovery.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋強直性ジストロフィー ハンチントン病 トリプレットリピート リピート不安定性

## 1. 研究開始当初の背景

トリプレットリピート病には、CAG リピートによるハンチントン病 (HD) や、CTG リピートによる筋強直性ジストロフィー1型 (DM1) などがある。これらの疾患では、異常伸長リピートから生じる mRNA や蛋白が障害を引き起こしており、負荷の原因となるリピート長が長いほど、重症となる傾向がある。またもう一つの特徴として、これら疾患の多くではそのリピート長が一定ではなく、変化しやすい点がある (リピート不安定性)。同一患者内でもリピート長は年齢とともに伸長して症状の進行に寄与する。逆の見方をすれば、リピート長を安定化することで症状の進行を抑制でき、またリピート長の短縮が可能となれば、症状の改善が期待できる。

一方、トリプレットリピート病でのリピート不安定性は、異常伸長した CTG や CAG リピートによるヘアピン構造形成が原因と考えられている。リピートヘアピンは、ミスマッチ修復機構により修復が試みられるが、この際正確な修復がなされず、リピート長の伸長や短縮が起こるとされている。しかし、リピート長変動の詳細な機構はいまだ判明していない。

## 2. 研究の目的

### (1) リピート長変動機構の解明と制御法の確立

リピート不安定性の原因となるミスマッチ修復には 20 以上の蛋白が関与することが知られている。しかし、一口にリピート不安定性といっても、リピートの伸長に寄与するのか、またリピート短縮に関わるのかなど、個別の蛋白の役割はいまだに不明である。治療の観点からみると、リピート長の短縮は症状の改善にもつながるため、こうした個々の因子の特性は特に重要となる。本研究では、ヒト細胞モデルを用いて、各因子の発現調節によるリピート不安定性の変化を解析し、リピート長伸長や短縮に寄与する蛋白を同定する。またその発現の制御により、細胞でのリピート長制御を試みる。

### (2) リピート長を安定化・短縮する治療法の確立

リピート不安定性の主因は、リピートによるヘアピン構造形成と、ミスマッチ修復機構による不完全な修復にある。こうした不完全な修復を阻害できれば、リピート長の安定化や短縮につながる可能性がある。本研究では、リピートヘアピンに特異的に結合する低分子化合物などから、ミスマッチ修復阻害作用のある化合物を同定する。得られた化合物を用いてヒト細胞モデルで効果を確認し、その詳細な作用機構を解明するとともに、動物モデルでの効果も検討する。

### (3) 患者由来 iPS 細胞を用いたリピート不安定性機構解析

リピート病では、同一患者由来 iPS 細胞でも、クローンごとにリピート長が異なる現象がみられる。本研究ではこの特性を利用し、DM1 患者由来 iPS 細胞を用いて、リピート長変化のふるまいの異なるクローンでの発現解析などを行うことにより、リピート変動に関わる因子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) リピート長変動機構の解明と制御法の確立

申請者らが開発した、800 の CTG/CAG リピートをもち、疾患でのリピート不安定性を忠実に反映するヒト HT1080 細胞モデルを使用する。リピート不安定性に関わる各因子を個別にノックダウンしてリピート長の変化を解析し、リピート長短縮機構に関わる因子を同定する。同定した因子の発現をアンチセンス核酸にて制御することで、リピート長変動への介入を行う。

### (2) リピート長を安定化・短縮する治療法の確立

ミスマッチ修復蛋白とリピートヘアピンの結合を阻害し、不完全なミスマッチ修復を抑制する低分子化合物をスクリーニングにより同定し、リピート安定化・短縮作用をヒト細胞モデルおよび動物モデルで検証する。また *in vitro* での binding assay などでもその機構を解明する。

### (3) 患者由来 iPS 細胞を用いたリピート不安定性機構解析

リピート長の異なる DM1 患者由来 iPS 細胞クローンの発現解析をすることで、リピート長変動に寄与する因子を解析する。また iPS 細胞の神経系・骨格筋などへ分化誘導し、その際のリピート長変動を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) リピート長変動機構の解明と制御法の確立

リピート病の症状進行の原因となるリピート伸長機構を解明するため、800 の CTG・CAG リピートを持つヒト細胞モデル (HT1080) を用いて、リピート不安定性に関与する因子をそれぞれ siRNA により抑制し、1 か月後のリピート長の変動を small pool PCR 法およびサザンプロット法により解析した。この結果、ヘアピン構造をとるリピート部分での DNA・DNA ミスマッチ形成を修復する蛋白である MSH2 や MSH3 が、リピート長の数百にわたる大きな伸長を促進することが判明した (図1)。また、DNA:RNA hybrid 形成や transcription-coupled nucleotide excision repair に関与する RNA/DNA helicase である senataxin (SETX) が、リピート長不安定に大きな役割を果たすことも見出した。さらに、DNA の single-strand break repair に関与する topoisomerase 1

(TOP1)や TDP1 をノックダウンすることで、リピート的大幅な短縮を誘導できることも明らかにした。これらの成果は、DNA 修復機構に直接的に介入することで、リピート長変動を人為的に誘導できることを示しており、今後の治療開発にむけた重要な知見となっている。

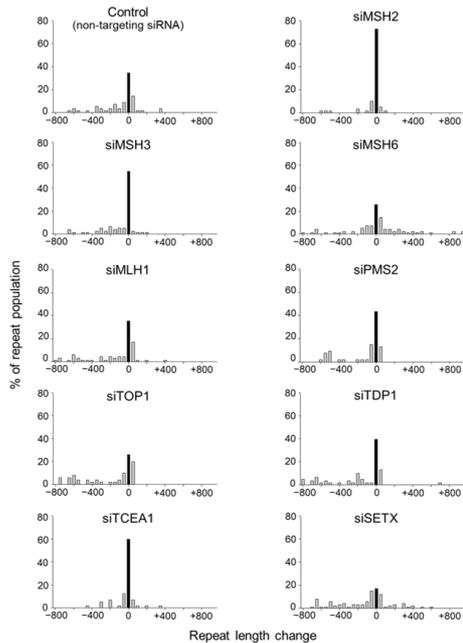


図1. 各因子ノックダウン後のリピート長変化

## (2) リピート長を安定化・短縮する治療法の確立

リピート結合性低分子化合物ライブラリを用いたスクリーニングにより、リピート安定化および短縮を誘導する化合物を同定した。低分子化合物にNBD 標識を行い、十分な核内移行性を確認したのち、これら低分子化合物の効果を、リピート病細胞モデル (HT1080 モデル) やハンチントン病患者由来細胞で実証した (図2)。またこうした低分子化合物は DNA の複製を阻害することなく、DNA 修復機構を制御することにより、細胞モデルでのリピート長変動に寄与することも明らかにした。さらに、slipped strand DNA 構造をとるプラスミドを用いて、低分子化合物によるリピート伸長抑制・短縮効果は、リピート部分の転写の際に生じるミスマッチ修復を抑制することによることを明らかにした。また、こうしたリピート伸長抑制・短縮効果は、異常伸長リピートに特異的であり、遺伝子の各所に存在する通常の長さのリピートには変化を及ぼさないことも確認した。さらに、in vitro での binding assay, repair assay などにより、リピート短縮にかかわる新たな DNA 修復蛋白を同定した。すでにこうした化合物をリピート病動物モデルへ投与し、その効果の検証を開始している。

これらの研究実績は、異常リピート短縮作用をもつ低分子化合物は、トリプレットリピート病のリピート長のさらなる伸長を防ぐ

だけでなく、究極的にはリピート長を正常化させ疾患の根治にいたる、新たな治療薬となる可能性を示唆している。

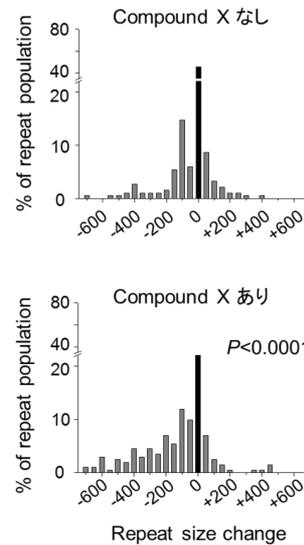


図2. 細胞モデルでのリピート短縮効果

## (3) 患者由来 iPS 細胞を用いたリピート不安定性機構解析

リピート病では、同一患者でも組織間でリピート長が異なることが知られており、組織特異的なリピート長伸長機構の存在が疑われている。DM1 患者由来 iPS 細胞を用い、骨格筋や心筋、および神経細胞へ分化誘導することで、リピート長の変動を解析した。その結果、分化初期の段階では組織間でのリピート長変動に差がないことが判明し、むしろ細胞増殖の際のリピート伸長現象が観察された。このことは発生初期段階でのリピートの急速な伸長を示唆しており、リピート病患者でみられる表現促進現象を反映していると考えられる。今後はさらにエピゲノム解析などをすすめ、こうした急速なリピート伸長を抑制する治療法の開発を目指している。

## (4) リピート結合性低分子化合物による治療効果の検証

リピート結合性低分子化合物であるアクチノマイシン D やヘプタミジン (ペンタミジン誘導体)、エリスロマイシンには、異常 RNA の毒性を低減させる作用があることも DM1 細胞モデル、マウスモデルで証明した (図3)。

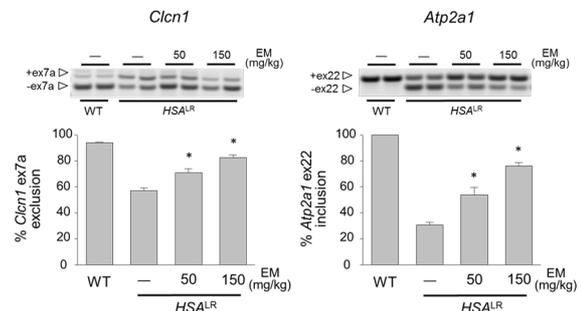


図3. エリスロマイシンによるRNA毒性抑制効果

こうした薬剤の一部はすでに他疾患で使用されており、ドラッグリポジショニングとして、現在治療法のないDM1 に対して早期に適応拡大が図れる可能性を示している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 21 件)

1. Ueki J, Nakamori M, 以下 11 名 Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability. *Sci Rep*. 2017;7:42522. doi: 10.1038/srep42522. 査読有
2. Nakamori M, Takahashi MP. [Myotonic Dystrophy: Advances in Translational Research]. *Brain Nerve*. 2017;69(1):61-9. doi: 10.11477/mf.1416200637. 査読無
3. 中森雅之, 高橋正紀. 筋強直性ジストロフィー治療薬開発の現状と患者登録. 難病と在宅ケア. 2016;22(9). 査読無
4. 中森雅之, 高橋正紀. 筋強直性ジストロフィーの治療戦略. 医学のあゆみ. 2016;259(1):58-64. 査読無
5. 中森雅之, 高橋正紀. 筋強直性ジストロフィーの新規治療開発の動向と標準的医療の意義. *神経内科*. 2016;85(3):240-6. 査読無
6. 階堂三砂子, 古田充, 中森雅之, 湯浅義人, 高橋正紀. てんかん性脳波異常を伴う反復発作性運動失調症 2 型の一家系. *臨床神経学*. 2016;56(4):260-4. 査読有
7. Nakamori M, Taylor K, Mochizuki H, Sobczak K, Takahashi MP. Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2016;3(1):42-54. doi: 10.1002/acn3.271. 査読有
8. Matsumura T, Saito T, Yonemoto N, Nakamori M, Sugiura T, Nakamori A, Fujimura H, Sakoda S. Renal dysfunction can be a common complication in patients with myotonic dystrophy 1. *J Neurol Sci*. 2016;368:266-71. doi:10.1016/j.jns.2016.07.036. 査読有
9. Freyermuth F, Rau F, Kokunai Y, Linke T, Sellier C, Nakamori M, 以下 39 名 Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nat Commun*. 2016;7:11067. doi:10.1038/ncomms11067. 査読有
10. 中森雅之, 望月秀樹. 神経変性疾患の RNA 創薬は 5 年以内に成功するか? . *Frontiers in Parkinson Disease*. 2015;8(3):141-3. 査読無
11. Siboni RB, Nakamori M, 以下 7 名. Actinomycin D Specifically Reduces

- Expanded CUG Repeat RNA in Myotonic Dystrophy Models. *Cell Rep*. 2015;13(11):2386-94. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.028. 査読有
12. Siboni RB, Bodner MJ, Khalifa MM, Docter AG, Choi JY, Nakamori M, Haley MM, Berglund JA. Biological Efficacy and Toxicity of Diamidines in Myotonic Dystrophy Type 1 Models. *J Med Chem*. 2015;58(15):5770-80. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00356. 査読有
  13. Nakatani R, Nakamori M, Fujimura H, Mochizuki H, Takahashi MP. Large expansion of CTG\**CAG* repeats is exacerbated by MutSbeta in human cells. *Sci Rep*. 2015;5:11020. doi: 10.1038/srep11020. 査読有
  14. 久保田智哉, 中森雅之, 高橋正紀. 筋強直性ジストロフィーにおける筋強直, 心臓伝導障害とイオンチャネル異常. *臨床病理*. 2014;62(3):246-54. 査読無
  15. Takahashi MP, Nakamori M, Mochizuki H. Therapeutic development in myotonic dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku*. 2014;54(12):1077-9. 査読有
  16. Kokunai Y, Nakata T, Furuta M, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, 以下 11 名 A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology*. 2014;82(12):1058-64. doi:10.1212/WNL.000000000000239. 査読有
  17. Hoskins JW, Ofori LO, Chen CZ, Kumar A, Sobczak K, Nakamori M, 以下 8 名. Lomofungin and dilomofungin: inhibitors of MBNL1-CUG RNA binding with distinct cellular effects. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(10):6591-602. doi:10.1093/nar/gku275. 査読有
  18. 中森雅之, 高橋正紀. 核スプライシング障害とトリプレットリピート病. *脳*. 2013;16(1):71-7. 査読無
  19. Nakamori M, 以下 16 名. Splicing biomarkers of disease severity in myotonic dystrophy. *Ann Neurol*. 2013;74(6):862-72. Epub 2013/08/10. doi: 10.1002/ana.23992. 査読有
  20. Coonrod LA, Nakamori M, 以下 9 名. Reducing levels of toxic RNA with small molecules. *ACS Chem Biol*. 2013;8(11):2528-37. doi:10.1021/cb400431f. 査読有
  21. Axford MM, Wang YH, Nakamori M, Zannis-Hadjopoulos M, Thornton CA, Pearson CE. Detection of Slipped-DNAs at the Trinucleotide Repeats of the Myotonic Dystrophy Type I Disease Locus in Patient Tissues. *PLoS Genet*. 2013;9(12):e1003866. doi: 10.1371/journal.pgen.1003866 査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 中森雅之. ハンチントン病における CAG リピート長の制御. 平成 28 年度 「遺伝性ジストニア・ハンチントン病のガイドラインに関するエビデンス構築のための臨床研究」班会議; 2017/1/28; 学士会館、東京.
2. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィーの病態解明と治療開発研究. 平成 28 年度 精神・神経疾患研究開発費 筋ジストロフィー合同班会議; 2017/1/13; 全共連ビル、東京.
3. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィーの病態解明と治療開発研究. 平成 28 年度西野班班会議 「筋ジストロフィー関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」(26-8); 2016/12/6; 国立精神・神経医療研究センター、東京.
4. 中森雅之. ハンチントン病の将来の治療. 第 10 回 パーキンソン病・運動障害疾患コンGRESS; 2016/10/8; 京都ホテルオークラ、京都.
5. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィーの新しい治療. 第 4 回北海道東北筋強直性ジストロフィー臨床研究会; 2016/9/24; 国立病院機構旭川医療センター、旭川.
6. Nakamori M. Antisense oligonucleotides therapy for neurological and neuromuscular disorders. 第 22 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会; 2016/7/29; 虎ノ門ヒルズフォーラム、東京.
7. Nakamori M. Gene therapy with antisense oligonucleotides for neurological and neuromuscular disorders. 第 57 回日本神経学会学術大会; 2016/5/20; 神戸国際会議場、神戸.
8. Nakamori M. Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy. 第 57 回日本神経学会学術大会; 2016/5/20; 神戸国際会議場、神戸.
9. Nakamori M. Neuroregeneration and nucleic acid medicine. 第 57 回日本神経学会学術大会; 2016/5/19; 神戸国際会議場、神戸.
10. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィーにおける筋細胞骨格蛋白のスプライシング異常と病態. 平成 27 年度武田班班会議 「筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発」; 2015/12/8; 国立精神・神経医療研究センター、東京.
11. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィーの病態解明と治療開発研究. 平成 27 年度西野班班会議 「筋ジストロフィー関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」(26-8); 2015/12/7; 国立精神・神経医療研究センター、東京.
12. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィーの治療戦略. 第 2 回筋ジストロフィー医療研究会; 2015/10/24; 大阪大学中之島センター、大阪.
13. Nakamori M. Phenotype-genotype correlation in congenital myotonic dystrophy. 10th Brain Research

Conference: RNA Metabolism in Neurological Disease 2015/10/16; Chicago, U.S.A.

14. Nakamori M. Myotonic dystrophy-toxic RNA and spliceopathy. 第 58 回日本神経化学学会大会; 2015/9/11; 大宮ソニックシティ、埼玉.
15. 中森雅之. 筋チャンネル病(筋強直性ジストロフィー). 平成 27 年度「疾患特異的 iPS 細胞を活用した筋骨格系難病研究」拠点運営会議; 2015/8/27; 京都大学、京都.
16. Nakamori M. Aberrant methylation of the CTCF binding site is associated with antisense transcription and disease severity in congenital myotonic dystrophy. 10th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting; 2015/6/10; Paris, France.
17. 中森雅之. 先天性筋強直性ジストロフィー症の筋未熟性と CpG メチル化異常. 第 56 回日本神経学会学術大会; 2015/5/22; 朱鷺メッセ、新潟.
18. Nakamori M. Phenotype-genotype correlation in congenital myotonic dystrophy. 8th International Meeting of Unstable Microsatellites & Human Disease; 2015/1/18; Guanacaste, Costa Rica.
19. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィー症の病態解明と治療開発研究. 平成 26 年度西野班班会議 「筋ジストロフィー関連疾患の基盤的診断・治療開発研究」(26-8); 2014/12/6; 全共連ビル、東京.
20. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィーにおける網羅的スプライシング解析とスプライシングバイオマーカーの確立. 第 59 回日本人類遺伝学会大会; 2014/11/21; タワーホール船堀、東京.
21. 中森雅之. 筋チャンネル病(筋強直性ジストロフィー). 平成 26 年度「疾患特異的 iPS 細胞を活用した筋骨格系難病研究」拠点運営会議; 2014/8/28; 京都大学、京都.
22. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィー症の治療研究と患者登録. 第 22 回阪神小児神経疾患研究会; 2014/7/26; 大阪.
23. 中森雅之. 筋強直性ジストロフィーにおけるスプライシングバイオマーカーの確立. 第 55 回日本神経学会学術大会; 2014/5/22; 福岡国際会議場、福岡.
24. 中森雅之. 先天性筋強直性ジストロフィーの分子病態. 平成 25 年度西野班班会議 「筋ジストロフィーおよび関連疾患の診断・治療開発を目指した基盤研究」(23-5); 2013/12/7; 全共連ビル、東京.
25. 中森雅之. トリプレットリピート病におけるリピート長伸長機構の解明と制御. 第 58 回日本人類遺伝学会大会; 2013/11/21; 仙台.
26. Nakamori M. Phenotype-genotype correlation in congenital myotonic dystrophy. 8th Brain Research Conference:

RNA Metabolism in Neurological Disease;  
2013/11/7; San Diego, U.S.A.

27. Nakamori M. Phenotype-genotype correlation in congenital myotonic dystrophy. 9th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting; 2013/10/17; San-Sebastian, Spain.

28. 中森雅之. トリプレットリピート病におけるリピート長の制御. 第 54 回日本神経学会学術大会; 2013/5/30; 東京国際フォーラム、東京.

〔図書〕(計 2 件)

1. Nakamori M, Takahashi MP. Myotonic dystrophy. In: Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, M M-Y, editors. Translational research in muscular dystrophy. Tokyo: Springer Japan; 2016. p. 39-61.

2. 中森雅之, 高橋正紀. 筋強直性ジストロフィー. 内野誠, editor. 東京: 中外医学社; 2013. 176-81 p.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 筋強直性ジストロフィー治療薬

発明者: 中森雅之ほか

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/ 70067

出願年月日: 2016/7/7

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/neuro1/myweb6/group04.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中森 雅之 (NAKAMORI, Masayuki)

大阪大学大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 60630233