

令和元年5月21日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15339

研究課題名(和文) 伸長リピート特異的転写抑制によるリピート病の根源的治療開発

研究課題名(英文) Allele specific inhibition of mutant mRNA expression for repeat expansion disorders

研究代表者

中森 雅之(Nakamori, Masayuki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60630233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：CAGやCTGといった塩基繰り返し配列(リピート)の異常伸長により引き起こされるリピート病では、異常伸長DNAから転写されたmRNA(筋強直性ジストロフィーなど)や、翻訳された蛋白(ハンチントン病など)が毒性を示すことが知られている。本研究では、これらリピート病の治療開発として、リピート異常伸長DNAからのmRNA転写を特異的に抑制する化合物を見出した。これら化合物による異常RNA産生抑制効果をリピート病モデル細胞で実証し、リピート病モデル動物への投与で治療効果を確認した。こうした化合物による伸長リピート特異的転写抑制は、リピート病の根治療法につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リピート病は、そのほとんどが進行性の神経筋変性疾患であり、現在根本的な治療法がない難病である。本研究により、リピート病の原因を根源から断つ、新たな治療アプローチの可能性が示された。また、この治療アプローチは、リピート病のなかでも伸長リピート配列が同一の疾患群全てにおいて治療効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Repeat expansion disorders are caused by unstable expansions of tandem repeats, such as CAG or CTG. The transcripts containing the expanded repeat or abnormal protein products can give rise to a toxic gain-of-function by the mutant RNA (e.g. myotonic dystrophy) or mutant protein (e.g. Huntington disease). In this study, we identified small molecules that specifically inhibit transcription of mutant alleles with expanded repeats. These compounds reduced abnormal RNA levels in a cell model for myotonic dystrophy. The lead compound showed treatment effects in a mouse model for repeat expansion disorders. These results indicate that allele specific inhibition of mutant mRNA can be a means to treat repeat expansion disorders.

研究分野：神経筋疾患

キーワード：筋強直性ジストロフィー ハンチントン病 リピート病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リピート病とは、塩基繰り返し配列(リピート)の異常伸長により引き起こされる疾患の総称で、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、異常伸長リピートを持つ変異アリルから転写された mRNA 自体が毒性を示したり、翻訳された蛋白が障害を引き起こすとされている(Nakamori et al. *Neurobiol Dis* 2010)。また、GGGGCC リピートの異常伸長が原因の C9-ALS では、異常 mRNA から ATG 開始コドン非依存的に翻訳された蛋白が病態に関与する可能性も示唆されている。これまでのリピート病の治療研究では、異常を示す mRNA や蛋白を個別にターゲットとする手法がとられてきた。申請者らも DM1 において、核酸医薬による異常 mRNA 分解(Nakamori et al. *Mol Ther* 2011, Wheeler et al. *Nature* 2012)、低分子化合物による異常 mRNA 毒性中和(Warf & Nakamori et al. *PNAS* 2009, Parkesh et al. *J Am Chem Soc* 2012, Ofoli et al. *Nucleic Acid Res* 2012)といった研究を行ってきたが、この過程で、リピート結合性低分子化合物のなかに、リピート伸長アリルからの異常 mRNA 転写を特異的に抑制する作用を持つものが複数あることを発見した(Coonrod et al. *ACS Chem Biol* 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、リピート結合性低分子化合物を網羅的に解析し、より高い異常 mRNA 転写抑制効果・特異性をもつ化合物を同定して、リピート病の病態の根源にアプローチする新規治療法の確立を目指す。研究期間内の目標として、下記の三項目を設定した。

- (1) 伸長リピート転写抑制作用をもつ低分子化合物の網羅的探索
- (2) 伸長リピート転写抑制効果の特異性の確認と downstream effect の評価
- (3) in vivo モデルでの効果検証と治療法の確立

3. 研究の方法

- (1) 伸長リピート転写抑制作用をもつ低分子化合物の網羅的探索

ルシフェラーゼ cDNA の 5'側非翻訳領域に 800 の CAG/CTG 繰り返し配列をもつ異常リピートを挿入した C2C12 細胞モデルを用い、低分子化合物ライブラリーより伸長リピートの転写を抑制する化合物を探索した。ルシフェラーゼ活性の定量は発光マイクロプレートリーダーにより行った。1次スクリーニングで得られた化合物のなかから、細胞毒性により全般的な転写活性低下をひきおこすものを、WST-1 アッセイにより除外した。

- (2) 伸長リピート転写抑制効果の特異性の確認と downstream effect の評価

異常リピートをもつヒトリリピート病細胞モデルを用い、ヒット化合物のなかから変異アリルの転写を特異的に抑制するものを同定した。また同細胞モデルを用いて、核内 RNA 凝集体を FISH 法で解析し、リード化合物による凝集体形成抑制効果を確認した。さらに、異常 mRNA によるスプライシング異常の改善効果を RT-PCR 法により検証した。

- (3) in vivo モデルでの効果検証と治療法の確立

(2)で得られたリード化合物をリピート病マウスモデルに投与し、リピート特異的転写抑制効果を検証した。DM1 マウスモデルとして、申請者が有する HSA-LR マウスを使用した。HSA-LR マウス腹腔内へリード化合物を投与し、骨格筋での異常 CUG リピート含有 mRNA を定量したほか、骨格筋での核内 RNA 凝集体やスプライシング異常の改善を評価した。

4. 研究成果

- (1) 伸長リピート転写抑制作用をもつ低分子化合物の網羅的探索

ルシフェラーゼ遺伝子 cDNA 上流に異常伸長リピートを挿入した C2C12 細胞モデルを用い、伸長リピートの転写を抑制する低分子化合物を同定するためのハイスループットスクリーニングシステムを確立した。本システムを用いて、大阪大学が保有する既存薬・天然化合物ライブラリーより、異常伸長リピートの転写を抑制し、かつ細胞毒性がなく自家蛍光を示さない約 60 のヒット化合物を同定した。

- (2) 伸長リピート転写抑制効果の特異性の確認と downstream effect の評価

DM1 モデル細胞を用いた二次スクリーニングにより、(1)で導出された約 60 の化合物が変異アリルの転写を特異的に抑制することを確認した(図1)。さらに、リピート特異的転写抑制効果が特に高い5つのリード化合物を同定し、異常伸長 CUG リピートによる RNA 毒性の低減効果を Atp2a1 遺伝子 exon 22 スプライシング異常の改善や核内異常 RNA 凝集体形成の抑制効果を確

認した(図2)。

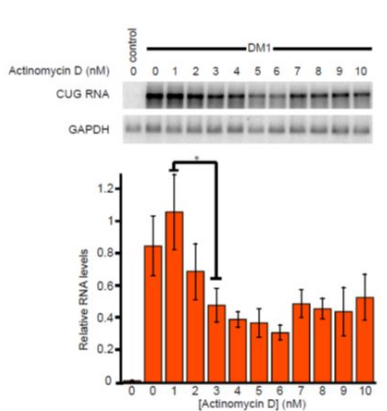


図1 リード化合物アクチノマイシンDによるDM1モデル細胞での異常CUGリピート転写抑制効果

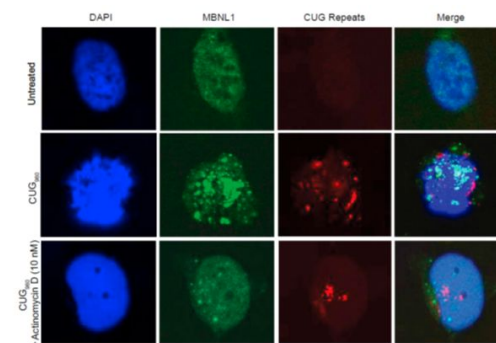


図2 リード化合物アクチノマイシンDによるDM1モデル細胞での異常RNA凝集抑制効果

(3) in vivo モデルでの効果検証と治療法の確立

(2)により異常伸長リピート特異的転写抑制効果が確認された5つのリード化合物について、DM1モデルマウス HSA-LR への腹腔内投与を行った。すべての化合物で、投与用量依存的に異常RNA産生抑制、ならびに核内異常RNA凝集体形成の抑制といった異常RNA毒性の低減効果が確認された(図3)。また、HSA-LRマウスにおけるスプライシング異常や筋強直症状の改善も実証され(図4)。今後のリピート病新規治療薬としての効果が期待される結果が得られた。

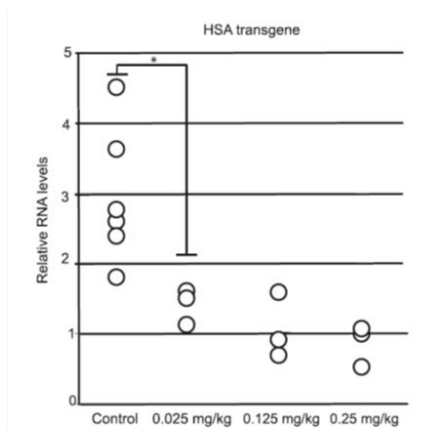


図3 リード化合物アクチノマイシンDによるDM1モデルマウスでの異常CUGリピート転写抑制効果

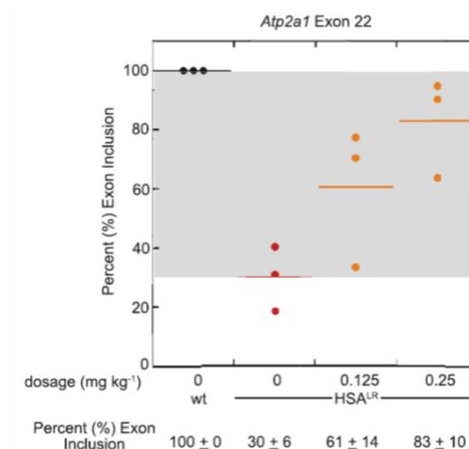


図4 リード化合物アクチノマイシンDによるDM1モデルマウスでのスプライシング異常効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Mori I, Fujino H, Matsumura T, Takada H, Ogata K, Nakamori M, et al. The myotonic dystrophy health index: Japanese adaption and validity testing. *Muscle Nerve*. 2019 in press Jan 25. doi: 10.1002/mus.26422. (査読あり)

Li J, Nakamori M, Matsumoto J, Murata A, Dohno C, Kiliszek A, et al. A Dimeric 2,9-Diamino-1,10-phenanthroline Derivative Improves Alternative Splicing in Myotonic Dystrophy Type 1 Cell and Mouse Models. *Chemistry*. 2018;24(68):18115-22. doi: 10.1002/chem.201804368. (査読あり)

Jenquin JR, Coonrod LA, Silverglate QA, Pellitier NA, Hale MA, Xia G, Nakamori M, et al. Furamide Rescues Myotonic Dystrophy Type I Associated Mis-Splicing through Multiple Mechanisms. *ACS Chem Biol*. 2018;13(9):2708-18. doi: 10.1021/acscchembio.8b00646. (査読あり)

中森雅之. 筋強直性ジストロフィーの病態と治療戦略. *医学のあゆみ*. 2018;267(11,12):830-5. (査読なし)

中森雅之. 筋強直性ジストロフィー. *Clinical Neuroscience*. 2018;36(2):191-4. (査

読なし)

Thomas JD, Sznajder LJ, Bardhi O, Aslam FN, Anastasiadis ZP, Scotti MM, Nishino I, Nakamori M, Wang ET, Swanson MS. Disrupted prenatal RNA processing and myogenesis in congenital myotonic dystrophy. *Genes Dev.* 2017;31(11):1122-33. doi: 10.1101/gad.300590.117. (査読あり)

中森雅之, 望月秀樹. パーキンソン病の新展開－核酸治療. *医学のあゆみ.* 2017;262(6):683-7. (査読なし)

Nakamori M, Hamanaka K, Thomas JD, Wang ET, Hayashi YK, Takahashi MP, Swanson MS, Nishino I, Mochizuki H. Aberrant Myokine Signaling in Congenital Myotonic Dystrophy. *Cell Rep.* 2017;21(5):1240-52. doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.018. (査読あり)

Ueki J, Nakamori M, Nakamura M, Nishikawa M, Yoshida Y, Tanaka A, Morizane A, Kamon M, Araki T, Takahashi MP, Watanabe A, Inagaki N, Sakurai H. Myotonic dystrophy type 1 patient-derived iPSCs for the investigation of CTG repeat instability. *Sci Rep.* 2017;7:42522. (査読あり)

Nakamori M, Takahashi MP. Myotonic Dystrophy: Advances in Translational Research. *Brain Nerve.* 2017;69(1):61-9. (査読あり)

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. (査読あり)

Freyermuth F, Rau F, Kokunai Y, Linke T, Sellier C, Nakamori M, et al. Splicing misregulation of SCN5A contributes to cardiac-conduction delay and heart arrhythmia in myotonic dystrophy. *Nat Commun.* 2016;7:11067. (査読あり)

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. (査読あり)

Siboni RB, Nakamori M, Wagner SD, Struck AJ, Coonrod LA, Harriott SA, Cass DM, Tanner MK, Berglund JA. Actinomycin D Specifically Reduces Expanded CUG Repeat RNA in Myotonic Dystrophy Models. *Cell Rep.* 2015;13(11):2386-94. (査読あり)

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. (査読あり)

[学会発表](計 14 件)

Nakamori M. Antisense oligonucleotide therapeutics for neurological and neuromuscular disorders. East Asia Neurology Forum 2018 - 37th Annual Meeting of the Korean Neurological Association, 2018.

Nakamori M. Aberrant interleukin-6 signaling in myotonic dystrophy. 第 59 回日本神経学会学術大会, 2018.

Nakamori M. Oral administration of erythromycin decreases RNA toxicity in myotonic dystrophy. New Directions in Biology and Disease of Skeletal Muscle Conference, 2018.

中森雅之. 筋強直性ジストロフィーとマイオカインシグナル異常. 日本筋学会第 4 回学術集会, 2018.

中森雅之. 核酸医薬におけるパーキンソン病の革新的治療法の開発. 第 17 回日本抗加齢医学会総会; 2017.

中森雅之. 筋強直性ジストロフィーの病態と治療法開発. 第 3 回日本筋学会学術集会; 2017.

Nakamori M. Phenotype-genotype/epigenotype correlation and aberrant inflammatory signaling in congenital myotonic dystrophy. 11th International Myotonic Dystrophy Consortium Meeting; 2017.

Nakamori M. PHENOTYPE-GENOTYPE/EPIGENOTYPE CORRELATION IN CONGENITAL MYOTONIC DYSTROPHY. XXIII World Congress of Neurology-第 58 回日本神経学会学術大会; 2017.

中森雅之. エリスロマイシンによる筋強直性ジストロフィーの治療. 第 35 回日本神経治療学会総会; 2017.

中森雅之. リピート病におけるリピート伸長機構解明とその制御による治療法開発. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会 (ConBio2017); 2017.

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.

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.

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gres; 2016.

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.

〔図書〕(計 1 件)

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

〔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: 国立大学法人大阪大学

種類: PCT 出願

番号: 特願 2017-528629

出願年: 2016

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/neurol/myweb6/group04.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。