

報道機関 各位

熊本大学

リピート伸長病治療のゲームチェンジャーを提唱 ～PIポリアミド創薬～

(ポイント)

- リピート伸長病は、特定のDNAの繰り返し（リピート配列）の異常伸長を原因とする疾患群の総称です。例として、ハンチントン病や脊髄小脳変性症、筋強直性ジストロフィー1型などが知られています。
- PIポリアミドのひとつ「CWG-cPIP」は、病態原因となる伸長したCAG/CTGリピートDNAに優先的に結合することで病原性因子の産生を阻害し、ハンチントン病や筋強直性ジストロフィー1型患者由来細胞及びモデルマウスにおける神経機能の低下を抑制しました。
- PIポリアミドは、あらゆるDNA配列に対して設計可能な「高い汎用性」を備えており「細胞膜透過性」・「安全性」・「疾患特異性」も有することから、リピート伸長病の新しい創薬基盤となります。

(概要説明)

リピート伸長病は、特定のDNA塩基配列の繰り返し（リピート配列）が異常に伸長することで引き起こされる疾患群の総称です。リピート伸長病の多くは神経・筋に病変をきたす難病です。代表的な疾患として、ハンチントン病や脊髄小脳変性症（CAGリピート伸長）、筋強直性ジストロフィー1型（CTGリピート伸長）などが知られていますが、未だリピート伸長病に対する治療薬は存在しません。

熊本大学発生医学研究所ゲノム神経学分野の塩田倫史教授の研究グループは、「ピロール・イミダゾール（PI）ポリアミド」がリピート伸長病の新しい創薬基盤になることを発見しました。本研究では、PIポリアミドのひとつである「CWG-cPIP」による、ハンチントン病及び筋強直性ジストロフィー1型患者由来細胞と各疾患モデルマウスにおける神経機能の低下に対する改善効果を薬理的に検討しました。その結果、CWG-cPIPは、各疾患細胞及びモデルマウスで観察される病原性因子の産生を阻害し、神経機能の低下を劇的に抑制することを明らかにしました。CWG-cPIPの注目すべき点は、これまでのリピート伸長病に対する治療薬では達成できなかった ①ドラッグデリバリー技術を必要とせず細胞核内へ移行する「高い細胞膜透過性」②細胞毒性及びオフターゲット効果が極めて低い「高い安全性」③疾患特異性を発揮する「リピート長依存性」を示したことです。

リピート伸長病は、今回検討したCAG/CTGリピート配列だけでなく、疾患毎に異なる3~6塩基の様々なリピート配列の異常伸長が発症要因となります。PIポリアミドは、標的とするDNA配列に合わせてピロールとイミダゾールの配置を変えて設計することで、標的遺伝子に特異的に結合する「高い汎用性」を備えています。したがって、PIポリアミドはリピート伸長病の疾患に合わせて設計可能であり、テーラーメイド医療を実現できる創薬基盤となります。

本研究成果は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）難治性疾患実用化研究事業（研究開発課題名：CAG/CTGリピート伸長病におけるDNA標的治療薬の開発）、文部科学省科学研究費助成事業、国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）創発的研究支援事業及び熊本大学発生医学研究所高深度オミクス事業研究助成の支援を受けて行われ、米国医学研究雑誌「*The Journal of Clinical Investigation*」での掲載に先立ち、令和5年9月14日にオンライン公開（In-Press Preview version）されました。

（説明）

【背景】

リピート伸長病は、特定のDNA塩基配列の繰り返し（リピート配列）が異常に長くなることで引き起こされる疾患群の総称です。現在までに、50以上のリピート伸長病が発見されており、それらの多くは神経・筋に病変をきたす難病です。例えば、「CAGリピート伸長」はハンチントン病・脊髄小脳失調症・球脊髄性筋萎縮症など、「CTGリピート伸長」は筋強直性ジストロフィー1型などの発症要因となります。

これまでにリピート伸長病に対する治療法は、化合物による薬理的治療・幹細胞を用いた治療・遺伝子治療などの開発が進んでいますが、現在のところ有効な治療薬はありません。ハンチントン病に対しては、病原性となるRNAを除去するアンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）を用いた臨床試験が近年実施されましたが、治療効果が認められず中止されました。治療効果が認められなかった原因には、ASOが病原性RNA以外の正常なRNAを除去してしまう「オフターゲット効果」、あるいはASOが脳の適切な領域に到達しない「低い細胞膜透過性」などが考えられています。本研究では、これらの課題を解決する新しい創薬基盤の創出を目指して「ピロール・イミダゾール（PI）ポリアミド創薬」を検討しました。

【研究の内容】

PIポリアミドは、アミド結合したN-メチルピロールとN-メチルイミダゾールから構成される化合物です。PIポリアミドは、任意のDNA配列に最適化して合成することができ、標的とするDNAの副溝に対して特異的に結合します。本研究では、CAG/CTGリピートDNAに結合するPIポリアミドのひとつである「CWG-cPIP」が、ハンチントン病及び筋強直性ジストロフィー1型患者由来細胞と各疾患モデルマウスにおける神経機能の低下を改善するか、薬理的解析を行いました。

[成果]

1) PIポリアミド「CWG-cPIP」は、病態原因となる伸長したCAG/CTGリピートDNAに優先的に結合する

まず、標的DNAに対するCWG-cPIPの選択性と結合親和性を核酸熱安定性解析で調べました。結果として、CWG-cPIPはCAG/CTGリピートが形成する二本鎖DNA構造に加えて、リピート伸長病で形成されるDNAのエラー構造（ミスマッチDNA構造）に対しても高い選択性と結合親和性を示しました。また、CWG-cPIPはCAG/CTGリピートDNAの長さに正相関しRNAポリメラーゼの転写を阻害することが明らかになりました。

2) CWG-cPIPは、ハンチントン病と筋強直性ジストロフィー1型患者由来細胞において伸長リピート由来の病原性RNAの産生を抑制する

次に、病原性CAG/CTGリピートDNAを持つ疾患由来の細胞を用いてCWG-cPIPの有効性を評価しました。本研究では、「CAGリピート伸長病」であるハンチントン病と「CTGリピート伸長病」である筋強直性ジストロフィー1型に着目しました。ハンチントン病の病態発症は、主に伸長CAG RNAの翻訳産物の凝集体「ポリグルタミン；polyQ」の細胞内蓄積に起因すると考えられています。一方、筋強直性ジストロフィー1型の病態発症は、主に伸長CUG RNAの凝集体の細胞内蓄積に起因すると考えられています。本研究では、患者由来の線維芽細胞にCWG-cPIPを処置することで、ハンチントン病のpolyQと筋強直性ジストロフィー1型のCUG RNA凝集体の産生が有意に抑制されました。

3) CWG-cPIPは、ハンチントン病と筋強直性ジストロフィー1型モデルマウスでみられる神経機能の低下を抑制する

個体における薬効評価を行うため、アデノ随伴ウイルスを介したCAG/CTGリピート脳内発現マウス及び遺伝子改変ハンチントン病モデルマウスにおいて、CWG-cPIPが神経機能障害を抑制するか検討しました。行動学的・電気生理学的・生化学的及び組織学的な多角的解析結果より、CWG-cPIPは、細胞レベルだけでなくマウス個体レベルでも劇的にハンチントン病と筋強直性ジストロフィー1型の神経病態を抑制することが証明されました。

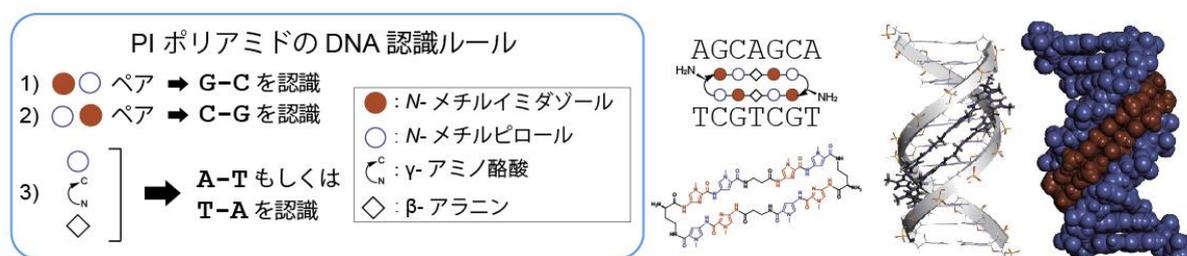
4) CWG-cPIPは「高い細胞膜透過性」「高い安全性」「疾患特異性」を示す

創薬研究において、使用する化合物の細胞内移行性・安全性・疾患特異性は極めて重要な項目として挙げられます。蛍光標識したCWG-cPIPは、マウス脳室内への投与後、ドラッグデリバリーシステムを使用せずに脳内の細胞核で長期間（7日間以上）観察されました。培養細胞におけるCWG-cPIPの細胞毒性を調べたところ、有効濃度の30倍で長時間処置しても細胞生存率に全く影響しませんでした。また、ヒト線維芽細胞とマウス脳組織においてCWG-cPIPのオフターゲット効果は観察されませんでした。さらに、CWG-cPIPは遺伝子改変ハンチントン病モデルマウスの伸長CAGリピート由来のRNAの産生を有意に抑制しますが、正常CAGリピート由来のRNA産生には影響を与えないことが分かりました。

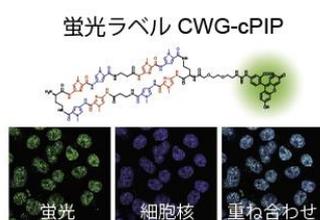
[展開]

リピート伸長病は、ハンチントン病や筋強直性ジストロフィー1型などのCAG/CTGリピート伸長だけでなく、疾患毎に異なる3~6塩基の様々な配列のリピート伸長が発症要因となります。（例えば、GGGGCCリピート伸長による筋萎縮性側索硬化症、CGGリピート伸長による脆弱X症候群関連疾患や神経核内封入体病、AAGGGリピート伸長による小脳性運動失調・ニューロパチー・前庭反射消失症候群など。）PIポリアミドは、標的とするDNA配列に合わせてピロールとイミダゾールの配置を変えて設計・合成することで、標的遺伝子に特異的に結合する高い汎用性を備えています。したがって、「**高い細胞膜透過性**」、「**高い安全性**」、「**リピート長依存性（疾患特異性）**」、「**高い汎用性**」を示すPIポリアミドは、リピート伸長病の疾患毎にテーラーメイド医療を実現できる創薬基盤となります。

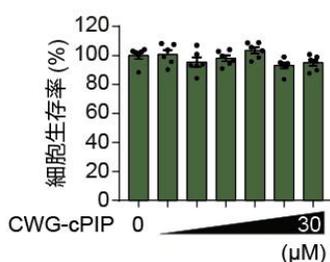
A PIポリアミドの「高い汎用性」



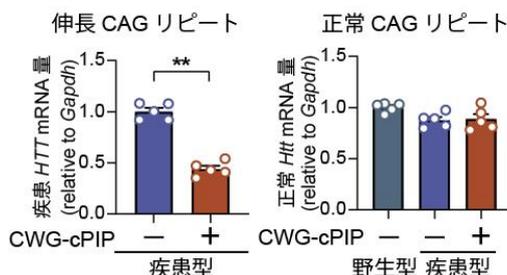
B 「高い細胞膜透過性」



C 「高い安全性」



D 「リピート長依存性（疾患特異性）」



【図説】 A) 「**高い汎用性**」PIポリアミドは、アミド結合したN-メチルピロールとN-メチルイミダゾールから構成される化合物であり、DNA認識ルールに則り任意のDNA配列に最適化して合成することができる。本研究では、CAG/CTGリピートDNAに結合するPIポリアミド「CWG-cPIP」を用いた。CWG-cPIPは標的DNAの副溝に対して非共有結合する。B) 「**高い細胞膜透過性**」蛍光標識したCWG-cPIPはドラッグデリバリーシステム不要で細胞核内に移行する。C) 「**高い安全性**」CWG-cPIPは高濃度（薬効を示す30倍）においても細胞毒性を引き起こさない。D) 「**リピート長依存性（疾患特異性）**」CWG-cPIPはハンチントン病モデルマウス（疾患型）の伸長CAGリピート由来のRNA産生を有意に抑制するが、正常CAGリピート由来のRNA産生には影響を与えない。また、それ以外の遺伝子に対して有意なオフターゲット効果を示さない。

(論文情報)

論文名 : A cyclic pyrrole-imidazole polyamide reduces pathogenic RNA in CAG/CTG triplet repeat neurological disease models

著者 : Susumu Ikenoshita#, Kazuya Matsuo#, Yasushi Yabuki, Kosuke Kawakubo, Sefan Asamitsu, Karin Hori, Shingo Usuki, Yuki Hirose, Toshikazu Bando, Kimi Araki, Mitsuharu Ueda, Hiroshi Sugiyama and Norifumi Shioda*

(# Co-first authors; * Corresponding author)

掲載誌 : *The Journal of Clinical Investigation*

doi : 10.1172/JCI164792

URL : <https://www.jci.org/articles/view/164792>

【お問い合わせ先】

(研究に関すること)

熊本大学発生病学研究所

担当 : 教授 塩田 倫史

電話 : 096-373-6633

e-mail : shioda@kumamoto-u.ac.jp

(報道に関すること)

熊本大学総務部総務課広報戦略室

電話 : 096-342-3269

e-mail : sos-koho@jimu.kumamoto-u.ac.jp