

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：大規模疾患レジストリと iPS 細胞技術を活用した筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療薬開発
Development of novel therapeutic drugs for amyotrophic lateral sclerosis
using a large-scale disease registry and iPS cell technology.

研究開発実施期間：令和元年 4 月 1 日～令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：祖父江 元
Gen Sobue

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
学校法人愛知医科大学・学長
Aichi Medical University・President

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

本研究開発は、多様な孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）患者に対する有効性をもつ新規治療薬を創出するために、幅広い孤発性患者 iPS 細胞由来運動ニューロンで有効性を示す、または孤発性の特定の患者 iPS 細胞由来運動ニューロンで有効性を示す新規治療薬候補化合物を同定すること、および治療薬候補の特性に応じた臨床試験デザインを立案することを目標とした。本研究開発の特徴は、企業の持つ約 10 万種類のライブラリー化合物からリード化合物を定め、さらに多種類の誘導体を合成し、薬効・動態・安全性面を総合的にブラッシュアップして新規有望化合物による創薬を進めることである。

ALS 患者大規模レジストリ（JaCALS）に登録された ALS 患者に対して、進行パターン、病型、遺伝子多型などによる分類を行い、iPS 細胞パネルが各々の分類に分かれて作成できるように候補を抽出し、それぞれの患者の不死化リンパ球（LCL）を用いて、孤発性 ALS 患者由来 iPS 細胞パネルを構築した。対照となる健常者 iPS 細胞は、理研 BRC より健常者由来不死化リンパ球を入手して作成を進めた。

当初は、エピゾーマルベクターを用いて OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, p53DD/shp53 の 6 因子を導入する既存の手法を用いて iPS 細胞の樹立を進めた。しかしこの手法では樹立効率が低く、クローン間のばらつきが大きいことなどの問題点があった。そこで、改良型センダイウイルスベクター（SRV）を用いた、新たな iPS 細胞樹立法を開発した。SRV は従来 LCL には感染しにくいとされていたが、末梢血単核球細胞の場合に比べて約 3 倍高い力価の SRV を用いることで、高効率に LCL に遺伝子導入することに成功した。また、高品質の iPS 細胞の樹立には、山中 4 因子の全てが一定のコピー数で LCL に導入される必要があるが、山中 4 因子すべてを搭載した SRV を用いることで、樹立した iPS 細胞の品質を担保することが可能となった。この方法により、バ

ルク培養で高品質の iPS 細胞を迅速に樹立することが可能となった。

次に、これまでに確立した高効率分化誘導法 (Shimojo et al., 2015) を用いて運動ニューロンへと分化誘導して表現型解析を行った。その結果、患者由来運動ニューロンにおいて神経突起伸長の抑制や神経細胞死の増加がみられ、孤発性 ALS の表現型を検出し得ていると考えられた。また、SRV を用いてバルクで樹立した iPS 細胞由来運動ニューロンは、同じ LCL からエピソーマルベクターを用いた従来法によりクローンとして樹立した複数株の iPS 細胞由来運動ニューロンと比較すると、その平均的な表現型を示すこと、および、より明確に患者の表現型を捉えられることを見出した。これらの結果から、SRV を用いたバルクでの iPS 細胞の樹立法により、迅速、高効率、簡便に高品質の iPS 細胞の樹立が可能であり、かつ従来のエピソーマルベクターを用いた方法でみられたクローン間差の問題を解決し得る可能性が示された。

そこで、この方法を用いて、JaCALS より提供を受けた孤発性 ALS 患者由来 LCL および RIKEN BRC より分譲された 30 代から 70 代の各年齢層の健常者由来 LCL を用いて、iPS 細胞樹立を進め、患者 67 株、健常者 20 株の樹立を達成した。樹立した iPS 細胞パネルから運動ニューロンへの分化誘導と成熟培養を行い、レポーターレンチウイルス (HB9e438::Venus) を用いて運動ニューロンを可視化し、表現型解析を進めた。病態の指標として、運動ニューロンへの分化誘導効率 (HB9, ISL-1)、成熟度 (ChAT)、神経突起長、神経細胞死 (Cleaved Casp3)、LDH 放出、タンパク質凝集 (TDP-43)、ストレス顆粒、ミトコンドリア機能などを検討した。

その結果、プレートのコーティング、運動ニューロンの播種密度、培地組成、培地交換頻度等を最適化することで、神経突起長の抑制、神経突起の断片化、神経細胞の生存と細胞死 (LDH/MTS アッセイ、Cleaved Caspase-3)、TDP-43 凝集体形成、リン酸化 TDP-43 凝集体形成などの表現型を、定量的に評価することに成功した。これらの評価指標のいくつかを組み合わせることで Composite marker として定量化し、病態を評価する方法を確立した。本手法により、孤発性 ALS 患者の多様な表現型を多角的に解析できると考えられる。

各臨床病型 (急降下型、緩徐進行型、シグモイド型、単調減少型) の少数例の孤発性 ALS 患者由来運動ニューロンを用いて、参画企業で取得している孤発性 ALS 治療薬候補となる有望化合物についての治療薬スクリーニングを行った。すなわち、ALS 患者由来運動ニューロンに有望化合物を添加し、有効性の評価、および化合物の Brush up を行った。その結果、全ての臨床病型で有効性を示す、キナーゼ阻害作用を有する新規低分子化合物を複数取得することに成功した。

参画企業の約 10 万種類の化合物ライブラリーから in silico 解析 (化学構造分類、ドラッグライクネス指標、中枢移行性等)、タンパク凝集阻害能評価、運動ニューロンフェノタイプ評価から 3 つのリード化合物を取得した。これらのなかから薬効、薬物動態、安全性の各プロファイルのバランスが良く、有望なリード化合物 A を絞り込み、これを起点にした合成展開に注力した。

化合物 A は運動ニューロンにおける神経保護作用のメカニズムが不明であったことから、その解明が課題であった。この系統はもともとキナーゼ阻害化合物 (既知化合物) をオリジンとしていたことから、キナーゼ阻害作用を切り口とした網羅解析を実施した。化合物 A が強く阻害する 29 種のキナーゼのうち、神経細胞での発現の有無、キナーゼ阻害活性と神経保護作用の関係性、神経保護作用との関連を示す公知情報から、キナーゼ X を介して神経保護作用を示す可能性に着目した。siRNA でキナーゼ X の発現を低下させることで神経保護作用が生じることを確認したこと、またこの系統化合物の神経保護作用 (細胞死抑制を指標とした pIC50) とキナーゼ X 阻害活性 (pIC50) は正の相関を示したことから、本系統化合物の神経保護作用に関わる主要作用標的はキナーゼ X と推定した。なお、化合物 A 誘導体は 4 つ全ての臨床病型の孤発性 ALS 患者由来運動ニューロンで神経保護作用を示し、かつキナーゼ X の活性向上に伴い保護作用は向上した。

標的推定を受けて化合物 A に加えて新たなリード化合物の設計・合成を実施した。キナーゼ X 阻害活性を指標

に別系統化合物のスクリーニングを実施することで、新たなリード化合物として化合物 B を取得した。そこで、化合物 A および化合物 B それぞれからさらに誘導体を合成し、薬効・薬物動態・安全性を総合的にブラッシュアップし、有望化合物として化合物 C および化合物 D を取得した。いずれも ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンにおいて顕著な細胞死抑制作用を示した。また、これら化合物が TDP-43 凝集体の蓄積を抑制することも見出した。これまでキナーゼ X と TDP-43 凝集の関連性を示した報告例はなく、今回初めてキナーゼ X 阻害化合物が TDP-43 凝集に対して有効であることを示すことができた。

続いて安全性を評価すべく、化合物 C および化合物 D のマウス反復投与による毒性試験を実施した。その結果、化合物 C は低用量から顕著な毒性所見（骨髄細胞の多核化、末梢血の白血球・網状赤血球の減少等）が見られ、安定性面での懸念が示唆された。一方、化合物 D については、毒性面は比較的マイルドである結果を得ており、現在薬効との乖離度（安全域）について精査中である。これらの結果より、化合物 C および周辺化合物の検討は中断、化合物 D および周辺化合物の検討に注力する方針とし、それらの安全性の精査を引き続き進める。

レスポnderとノンレスポnderにおける病型の違い、ゲノム情報（SNPs, エクソーム情報）、運動ニューロンにおける分子背景（トランスクリプトーム）の解析と、治療薬候補化合物が有効性を示すことを規定する因子（レスポnderマーカー）の選出を進めた。iPS 細胞樹立を行った ALS 患者 67 例についてはすべて OmniExpressExome による SNP アレイ解析を行い、かつエクソーム解析または全ゲノム解析を終了した。また ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンの RNAseq 解析を行った。これらの解析から、化合物 D および周辺化合物などについて、レスポnder、ノンレスポnderの背景を臨床病型、ゲノム情報、遺伝子発現の状況から分類可能とした。キナーゼ X 阻害化合物は、4 種の進行パターンの異なる孤発性 ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンすべてで有効性を示しており、進行パターンの異なる孤発性 ALS で共通して病態に関与し、幅広く有効性を示す可能性がある。

ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンの mRNA アレイ解析から患者運動ニューロンで発現が亢進している可能性のある分子 Y を同定した。分子 Y の antisense oligonucleotide (ASO) によるノックダウンで孤発性 ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンでの神経突起量の改善、および TDP-43 凝集抑制作用を確認した。これらの結果から、分子 Y が孤発性 ALS に対する有望な創薬標的になると考えられた。分子 Y の発現量を直接的に制御できる ASO で創薬展開を今後はかっていく方針である。なお現時点で分子 Y の ALS を含めた神経変性疾患への関与は報告されていない。

有望化合物として検証しているキナーゼ X 阻害薬は、幅広い孤発性 ALS 患者 iPS 細胞由来運動ニューロンで有効性（高い奏効率）を示しており、孤発性 ALS 患者全体を対象とした治験デザインを検討した。これまでの我が国における ALS に対する治験では、患者同意を取得し登録した後に 3 ヶ月間の前観察期間を置き、進行速度についての多様性を制御することが一般的である。すなわち前観察期間における ALS 機能評価スケール(ALSFRS-R)の低下量により、進行が遅い群、標準的な群、速い群に分け、治験薬投与を行う群を絞るデザインが採用されてきた。JaCALS の臨床データを用いた解析で、3 ヶ月間の ALSFRS-R 変化量は、その後半年もしくは 1 年の症状進行を予測するパワーは不十分であることを明らかとなっている。また本研究開発で探索検証されている有望化合物は進行パターンに関わりなく有効であることが期待できるため、前観察期を設けない臨床試験デザインとする方針である。キナーゼ X 阻害薬化合物 D および周辺化合物の検討により、柔軟に治験デザインを構築できる検討が済んでいる。

これまで、患者 iPS 細胞を用いた創薬においては、既存薬のドラッグリポジショニングによる試みが始まっている。本研究開発では企業とアカデミアとの連携により、新規有望化合物から、病態に基づく最適化された画期的新薬の創出を行った。通常このプロセスは多大な時間を要するものであるが、密なコミュニケーション、進捗報告会、研究者派遣等を通じて、アカデミアが蓄積した患者レジストリの臨床情報、ゲノム、細胞リソース、iPS

細胞パネルの構築、評価技術と企業が有する創薬技術（化合物の薬効評価技術、化合物の設計・合成技術、標的探索・検証技術）を有機的に連携することにより、迅速に成果を挙げることに成功した。これまで非常に困難であった孤発性神経難病創薬課題のブレイクスルーにつながる画期的なプロジェクトである。

The goals of this research and development are to identify novel therapeutic candidate compounds that show efficacy in motor neurons derived from iPS cells of sporadic patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and to design clinical trials according to the characteristics of the therapeutic candidates in order to create novel therapeutic agents with efficacy for a variety of patients with ALS.

The patients were classified by progression pattern, disease type, and genetic polymorphisms, and iPS cell panels were constructed for each classification.

We developed a new method for iPS cell establishment using an improved Sendai virus vector (SRV). This method enabled rapid establishment of high-quality iPS cells in bulk culture.

Next, we induced differentiation into motor neurons using a highly efficient differentiation induction method (Shimojo et al., 2015), which we have established so far, and performed phenotypic analysis. The results showed suppression of neurite outgrowth and increased neuronal cell death in patient-derived motor neurons, suggesting that the phenotype of sporadic ALS could be detected.

Using LCLs from patients with sporadic ALS registered in JaCALS and LCLs from healthy individuals in their 30s to 70s donated by RIKEN BRC, we established 67 iPS cell lines from patients and 20 lines from healthy individuals. Phenotypic analysis was conducted by inducing differentiation into motor neurons from the established iPS cell panel and culturing them to maturity. As indicators of pathogenesis, we examined the efficiency of induction of differentiation into motor neurons (HB9, ISL-1), maturation (ChAT), neurite length, neuronal cell death (Cl-Casp3), LDH release, protein aggregation (TDP-43), stress granules, and mitochondrial function. We established a method to evaluate pathophysiology by combining some of these assessment indices and quantifying them as composite markers.

Using motor neurons derived from patients with sporadic ALS, we conducted a therapeutic drug screening of promising compounds obtained from the participating company that is potential candidates for the treatment of sporadic ALS.

Three lead compounds were obtained from a library of approximately 100,000 compounds from participating companies based on *in silico* analysis (chemical structure classification, drug-likeness index, central transferability, etc.), evaluation of protein aggregation inhibition ability, and evaluation of motor neuron phenotypes. From these, we narrowed down the lead compound A with a good balance of pharmacodynamic, pharmacokinetic, and safety profiles, and used it as the starting point for synthetic development.

Since Compound A was originally derived from a kinase inhibitor (a known compound), we conducted a comprehensive analysis using kinase inhibition as the starting point, confirming that downregulation of kinase X by siRNA causes neuroprotection and that the neuroprotective effect of this compound (inhibition of cell death) was measured by pIC50. The results also showed a positive correlation between the neuroprotective activity (pIC50) and kinase X inhibitory activity (pIC50), suggesting that kinase X is the primary target of the neuroprotective activity of the compounds in this series. Compound A derivatives showed neuroprotective activity in motoneurons from patients with sporadic ALS of all four clinical types, and the protective effect was enhanced as the activity of kinase X increased.

Compound B was obtained as a new lead compound by screening for compounds of other systems using kinase X inhibitory activity as an indicator. We further synthesized derivatives of Compound A and

Compound B, comprehensively brushed up their efficacy, pharmacokinetics, and safety, and obtained Compound C and Compound D as promising compounds. Both compounds showed remarkable inhibition of cell death in motor neurons derived from iPS cells of ALS patients. We also found that these compounds inhibited the accumulation of TDP-43 aggregates.

To evaluate the safety of the compounds, we conducted a toxicity study in mice by repeated administration of Compound C and D. The results showed that Compound C was effective in suppressing the accumulation of TDP-43 aggregates. The results showed that compound C exhibited significant toxicity findings (e.g., polynucleated bone marrow cells, decreased leukocytes and reticulocytes in peripheral blood) at low doses, suggesting stability concerns. On the other hand, the toxicity of compound D was relatively mild. Based on these results, we have decided to suspend the study of Compound C and related compounds and focus on Compound D and related compounds, and will continue to examine their safety. The kinase X inhibitor compounds have shown efficacy in all four types of iPS cell-derived motor neurons from patients with sporadic ALS with different patterns of progression, and may be involved in the pathogenesis of sporadic ALS with different patterns of progression in common and show broad efficacy.

Molecule Y, which may be upregulated in patient motor neurons, was identified from mRNA array analysis of motor neurons derived from ALS patients' iPS cells. Knockdown of molecule Y by antisense oligonucleotide (ASO) improved neurite outgrowth and inhibited TDP-43 aggregation in motor neurons derived from patient iPS cells with sporadic ALS. These results suggest that molecule Y may be a promising drug target for the treatment of sporadic ALS. We intend to develop drug discovery with ASO, which can directly control the expression level of molecule Y.

The kinase X inhibitor, which is being tested as a promising compound, has shown efficacy (high response rate) in a wide range of motor neurons derived from iPS cells of patients with sporadic ALS, and a clinical trial design for the entire population of patients with sporadic ALS was considered.

So far, attempts at drug discovery using patient iPS cells have been initiated by drug repositioning of existing drugs. In this research and development, a company and academia have collaborated to create breakthrough drugs optimized based on pathological conditions from new promising compounds. This process usually takes a great deal of time, but by combining the patient registry information, cell resources, and iPS cell technology accumulated by academia with the drug discovery technologies (compound efficacy evaluation technology, compound design and synthesis technology, and target exploration and validation technology) possessed by the company, we succeeded in achieving rapid results. This is a groundbreaking project that will lead to a breakthrough in drug discovery for sporadic intractable neurological diseases.