

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： 環状ピロール-イミダゾールポリアミドを用いた CAG/CTG トリプレットリピート病における
創薬開発

Drug development for CAG/CTG triplet repeat diseases using cyclic pyrrole-imidazole polyamide

研究開発実施期間： 令和 2 年 6 月 1 日から令和 5 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名： 塩田 倫史
Norifumi Shioda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人熊本大学・発生医学研究所・教授
Kumamoto University, Institute of Molecular Embryology and Genetics. Professor

II 研究開発の概要

本研究は、申請者らが見出した中分子化合物「CAG/CTG DNA 配列特異的に結合する環状ピロール-イミダゾールポリアミド（環状 PI ポリアミド）」の CAG/CTG トリプレットリピート病（CAG リピート病のハンチントン病と CTG リピート病の筋強直性ジストロフィー1 型）に対する物理化学的および生物学的な薬効評価系の確立し、非臨床 POC を取得することを目的とした。

【物理化学的薬効評価】

CWG-cPIP の標的 DNA 配列に対する選択性と結合親和性を調べるために、融解温度（T_m）アッセイを行い、いくつかの配列について T_m を測定した。CWG-cPIP は二本鎖の CWG DNA に結合したが、AT-rich や GC-rich には高い特異性で結合しなかった。CWG-cPIP の結合特性をさらに調べるために、3 つの A/A および T/T ミスマッチ対を含む 5'- (CAG) 10-3' および 5'- (CTG) 10-3' リピート DNA を用いて T_m アッセイをそれぞれ実施した。CWG-cPIP は、これらの CWG ミスマッチ繰り返し DNA に対しても高い結合親和性を示した。さらに、CWG-cPIP は CWG repeat RNA に結合しないことも確認した。重要な点として、CWG-cPIP は従来のポリアミド CWG-hPIP と比較して、二本鎖およびミスマッチ構造の CWG repeat DNA に対して有意に高い結合親和性を示したことである。予想外に、CWG-cPIP と CWG-hPIP は共に 5'-(CCG)10-3' repeat DNA に対して高い親和性を示した。この原因を解明するために、CWG-cPIP と繰り返し DNA の結合に関する分子モデリング研究を行った結果、CCG リピート DNA は CWG リピート DNA と同じ近接距離で CWG-cPIP と相互作用することがわかり、CCG リピート DNA に対する高い親和性は CWG リピート DNA を標的とする PIP に共通する性質であることが示唆された。PIP は、RNA ポリメラーゼ II (pol II) による転写伸長を in vitro で 20 時間以上安定的に阻害することが知られている。

転写伸長時に pol II は、自身の Switch 1 領域を介して DNA に結合した PIP を認識し、その 2-5 塩基対上流で停止する。CWG-cPIP の pol II による転写伸長に対する阻害効果を調べるために、T7 プロモーター下で 321 塩基の RNA を生成する正常範囲 (CTG) 10 または病原範囲 (CTG) 73 を含む CTG リピート DNA を用いて *in vitro* 転写停止アッセイを行った。CWG-cPIP の濃度が上昇すると、転写された完全長 RNA の量が減少し、複数の停止した RNA が蓄積した。定量的な評価では、CWG-cPIP 処理により、(CTG)10 DNA よりも (CTG)73 DNA から有意に多くの停止した RNA が生成された。これらの結果は、CWG-cPIP がリピート長に依存し pol II 転写伸長を阻害することを示している。

【生物学的薬効評価】

CWG-cPIP が病原性 CWG リピート DNA 配列を持つ細胞に有効であるか検討した。まず、Neuro-2a 細胞における CWG-cPIP の細胞毒性を、細胞生存率アッセイを用いて検討した。その結果、CWG-cPIP は 30 μ M の濃度で 48 時間培養しても、細胞生存率に影響を与えなかった。CWG-cPIP の細胞膜透過性と細胞内滞留時間を調べるために、FITC 標識 CWG-cPIP を合成し、Neuro-2a 細胞へ投与した。FITC 標識 CWG-cPIP (1 μ M) はドラッグデリバリーシステム (DDS) を用いずに、3 日以上細胞核に観察された。次に、HaloTag mRNA の 3'-UTR に (CUG)10, (CUG)180, または (CUG)700 リピートを発現するプラスミドをトランスフェクトした Neuro-2a 細胞で、病原性 CUG RNA 産生に対する CWG-cPIP の効果を検討した。トランスフェクション効率を正規化するために、2 つの異なる遺伝子-CTG リピートを持つ HaloTag と内部参照として EGFP を発現するデュアルプロモーターベクターを使用した。その結果、0.1 μ M という低濃度の CWG-cPIP 処理から 12 時間後には、vehicle 処理と比較して、HaloTag-(CUG)700 mRNA の発現が著しく抑制され、1 μ M の濃度では 50%以上抑制されることが判明した。一方、HaloTag-(CUG)10 mRNA の発現は、最高濃度の 1 μ M CWG-cPIP でも vehicle 処理と比較してわずか 20%しか抑制されなかった。つまり、1 μ M CWG-cPIP で処理すると、リピート長依存的に HaloTag-CUG repeat mRNA の発現が抑制された。次に、EGFP mRNA の 3'-UTR に (CUG)10 または (CUG)700 リピートを発現するプラスミドをトランスフェクトしたマウス初代培養ニューロンで CUG RNA foci を検出するために Cy5 標識した (CAG)10 リピートプローブで FISH を実施した。EGFP-(CUG)10 mRNA を発現する神経細胞は CUG RNA foci が検出されなかったが、EGFP-(CUG)700 mRNA を発現する神経細胞は核内に CUG RNA foci を顕著に蓄積していた。CWG-cPIP を 1 μ M で 14 日間処理すると、核の CUG RNA foci 数は有意に減少した。DM1 患者由来の誘導神経細胞 (iNeurons) を用いて、内因性 CTG repeat 由来の CUG RNA foci に対する CWG-cPIP の抑制効果を検討した。1 μ M の CWG-cPIP を 3 日間処理すると、DM1 iNeuron の核内 CUG RNA foci の数が有意に減少した。さらに、CWG-cPIP がコーディング遺伝子拡張に由来する病原性 mRNA を抑制するか検討した。HTT 遺伝子のエクソン 1 内の (CAG)23 または (CAG)74 繰り返し配列でタグ付けされた HaloTag mRNA を発現するプラスミドで Neuro-2a 細胞をトランスフェクトし、12 時間 CWG-cPIP で処理した。CWG-cPIP は低濃度で HaloTag(CAG)23 mRNA 発現よりも HaloTag(CAG)74 mRNA 発現を効率的に抑制した。また、CWG-cPIP による処理が、HTT 遺伝子のエクソン 1 内の (CAG) 23 または (CAG) 74 繰り返し配列 (それぞれ EGFP-Q23 および EGFP-Q74 と呼ぶ) でタグ付けした EGFP を発現するプラスミドをトランスフェクトした Neuro-2a 細胞において、polyQ 封入体形成を抑制するか評価した。EGFP-Q74 発現細胞の核と細胞質には様々なサイズの EGFP 陽性凝集体が観察されたが、EGFP 陽性凝集体は CWG-cPIP 処理により有意に減少した。一方、EGFP-Q23 発現細胞では EGFP 陽性凝集体は観察されなかった。polyQ 抗体で検出された polyQ 拡張型ハンチンチン (HTT) タンパク質のレベルは、CWG-cPIP 処理後の HD 患者由来線維芽細胞では、vehicle 処理後の線維芽細胞と比較して有意に減少していた。重要なことは、HD 線維芽細胞において、CWG-cPIP 処理後の正常な HTT タンパク質量に変化がなかったことである。

CWG-cPIP が生体内で病原性 CUG RNA foci と polyQ の産生を抑制し、CWG リピート伸長に由来する異常を行動、生理、分子レベルで回復させるか評価した。CWG-cPIP を脳内投与し、CWG リピート伸長疾患モデルマウスの脳機能への影響を検討した。まず、FITC 標識した CWG-cPIP をマウス海馬に両側から注射し、その組織分布と 7 日までの保持率を組織学的解析により決定した。FITC 標識した CWG-cPIP は、速やかに海馬の細胞核に送達され、少なくとも 7 日間滞留した。さらに、CWG-cPIP を注入した海馬では、切断型カスパーゼ 3 免疫反応から判断される細胞死は観察されなかった。CWG-cPIP の生体内遺伝子発現に対するオフターゲット効果を評価するため、CWG-cPIP 投与 3 日後のマウスの海馬から抽出した mRNA を RNA-Seq 解析し、CWG リピート関連遺伝子発現を評価した。CWG リピート配列を含む遺伝子（リピート長>15）や Htt、Dmpk などの CWG リピート疾患関連遺伝子の発現に、vehicle 投与マウスと CWG-cPIP 投与マウスで変化が見られなかった。CWG-cPIP が CWG リピート病の脳機能障害を *in vivo* で改善するかどうかを評価するために、アデノ随伴ウイルス（AAV）9 を用いて海馬の両側 CA1 領域に以下の遺伝子導入を行い、脳特異的 DM1 および HD のモデル動物を作製した。[EGFP mRNA の 3'-UTR に (CTG) 10 または (CTG) 300 リピートを挿入（CUG10 および CUG300 マウスと呼ぶ）、HTT 遺伝子のエクソン 1 内に EGFP タグ付き（CAG）23 または（CAG）74 リピート（Q23 および Q74 マウスと呼ぶ）。]CWG-cPIP（83 μ g/kg）または vehicle、および各 AAV9 の混合物を注射し、注射後 21-27 日目に Y 迷路試験、新規物体認識（NOR）試験、受動回避（PA）試験で記憶関連行動を評価した。海馬組織は 28-30 日目に電気生理学と免疫組織化学に使用した。Y 迷路試験において、CUG10 および Q23 マウスと比較して、CUG300 および Q74 マウスはそれぞれ記憶関連行動の障害を示し、これは交替行動の割合を計算することによって定量化された。CWG-cPIP を投与した CUG300 および Q74 マウスでは、自発的な交替行動の割合が有意に増加した。CUG300 マウスは、アームエントリ回数で判定される運動活性が劇的に上昇する特徴的な行動を示し、CWG-cPIP 処理では多動を改善することはできなかった。NOR 試験において、訓練試行中の全マウスで同一物体を用いた識別指数に差は認められなかった。24 時間の保持期間後、CUG300 および Q74 マウスは、CUG10 および Q23 マウスに比べ、それぞれ新規物体に対する弁別指数が有意に低かった。CWG-cPIP を投与した CUG300 および Q74 マウスでは、新規物体に対する識別指数が、vehicle 投与したマウスで観察された識別指数より有意に高かった。PA テストでは、すべてのマウスで足裏衝撃がない場合の暗室入室までの待ち時間に有意差は認められなかった。しかし、CUG300 および Q74 マウスでは、足部ショックから 24 時間後に暗室に入るまでの潜伏時間が、それぞれ CUG10 および Q23 マウスより顕著に減少した。CWG-cPIP 投与により、低下した潜伏時間は有意に回復した。

次に、学習と記憶に重要な海馬の長期増強（LTP）の電気生理を評価した。興味深いことに、CUG10 発現マウスと比較して CUG300 発現マウスでは、入出力関係の基礎的なシナプス伝達が低下していることがわかった。さらに、CUG300 発現マウスでは CUG10 発現マウスと比較して高周波刺激（HFS）誘発性 LTP の劇的な低下が観察され、CUG300 発現マウスで低下した基底シナプス伝達と LTP は CWG-cPIP 処理により有意に回復した。Q74 発現マウスでは、HFS による LTP は Q23 マウスと比較して有意に低下しており、CWG-cPIP 処理により Q74 マウスで観察されたシナプス可塑性の低下が有意に回復した。

DM1 および HD マウスモデルの脳における病理学的変化を、Nissl 染色を用いて評価した。Nissl 染色では、CUG300 マウスでは CUG10 マウスと比較して明らかな海馬の萎縮が見られたが、Q23 マウスと Q74 マウスでは有意な変化は見られなかった。免疫組織化学的研究において、神経細胞マーカーである NeuN の免疫反応性を評価した。CUG300 マウスの海馬 CA1 領域では、NeuN 陽性細胞数が CUG10 マウスと比較して有意に減少していた。一方、海馬歯状回（DG）領域では、CUG10 マウスと CUG300 マウスの間で NeuN 陽性細胞数に有意な差は見られなかった。重要なことは、CWG-cPIP 処理により、CUG300 マウスの海馬 CA1 領域における NeuN 陽性細胞数の減少が有意に改善されたことである。次に、GFP 陽性細胞に対する CUG RNA foci 陽性細胞の数を、Cy5

標識 (CAG) 10 プローブを用いた FISH により評価した。細胞培養実験と同様に、CUG300 マウスの海馬 CA1 および DG 領域では CUG RNA foci が観察されたが、CUG10 マウスでは観察されなかった。また、CWG-cPIP 処理により、CUG300 マウスの CUG RNA foci 数は有意に減少した。CUG300 マウスで観察された損傷とは異なり、Q74 マウスの海馬 CA1 および CA3 領域における NeuN 陽性細胞数には、Q23 マウスと比較して有意な変化は見られなかった。GFP 陽性細胞における polyQ 封入体を免疫組織化学的に解析したところ、Q74 マウスの海馬 CA1 および CA3 領域には polyQ 封入体が存在したが、Q23 マウスには存在しなかった。CWG-cPIP を投与すると、Q74 マウスの polyQ 包接体の数は有意に減少した。

以上のことから、本研究ではゲノム上のリピート伸長位置に依存せず、伸長 CWG リピート DNA を標的とし、病原性 RNA およびタンパク質レベルの両方を低減する新規候補化合物 CWG-cPIP を提示できた。

The expansion of CAG and CTG (CWG) triplet repeats causes several inherited neurological diseases. The CWG repeat diseases are thought to induce complex pathogenic mechanisms through expanded CWG repeat-derived RNAs in a non-coding and polypeptides in a coding region, respectively. However, effective therapeutic approach has not been established for the CWG repeat diseases. Here, we show that a CWG repeat DNA-targeting compound, cyclic pyrrole–imidazole polyamide (CWG-cPIP), suppresses the pathogenesis of coding and non-coding CWG repeat diseases. CWG-cPIP binds to the hairpin form of mismatched CWG DNA, interfering with transcriptional elongation by RNA polymerase in a repeat length-dependent manner. We found that CWG-cPIP specifically inhibits pathogenic mRNA transcripts from expanded CWG repeats, resulting in reduced CUG RNA foci and polyglutamine accumulation in myotonic dystrophy type-1 (DM1) and Huntington’s disease (HD) patient-derived cells and mouse models. Treatment with CWG-cPIP ameliorated learning and memory deficits and synaptic dysfunction in DM1 and HD mouse models, without cytotoxicity and off-target effects. Taken together, we present a novel candidate compound that targets expanded CWG repeat DNA independent of genomic location and reduces both pathogenic RNA and protein levels. Thus, CWG-cPIP may be used for the treatment of CWG repeat diseases and for improving clinical outcomes.