

日本医療研究開発機構
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(RNA 標的創薬技術開発)
事後成果報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) RNA 結合 PPR 蛋白を用いた難治性神経筋疾患における異常 RNA 標的治療
(英語) Therapeutic development of PPR protein targeting toxic RNA

研究開発実施期間: 令和3年7月15日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 中森 雅之
(英語) Masayuki Nakamori

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人山口大学・大学院医学系研究科臨床神経学・教授
(英語) Yamaguchi University Graduate School of Medicine・Department of Neurology・Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

植物で発見されたペンタトリコペプチドリピート (PPR) 蛋白は、RNA 塩基配列特異的に結合する核酸結合蛋白である。A, C, U, G 各塩基に結合する PPR モチーフを組み合わせることで、あらゆる RNA 標的配列に特異的に結合する分子を自在に創生できるだけでなく、機能分子と融合させることで、RNA 分解、翻訳抑制など様々な RNA 制御が可能となる。一方、現時点において根本的治療法のない神経筋難病の中には異常 RNA を介した疾患が数多くあり、これら疾患では異常 RNA を標的とする治療開発がすすめられている。これまでこうした治療開発は核酸医薬を中心になされてきたが、薬剤送達性やオフターゲット効果の課題が残る。また CRISPR/Cas や ZFN によるゲノム編集技術も標的配列に制約がある。PPR はこれらの課題をすべて克服することができる RNA 結合蛋白であり、PPR を用いた治療法の基盤が確立すれば、神経筋難病の画期的治療開発に道が拓けるだけでなく、本邦発の汎用性の高い革新的技術として RNA 標的治療のパラダイムシフトを起こす新規モダリティの創生につながる。本研究では、異常 RNA が原因となる難治性筋疾患、神経変性疾患を対象に、新たな創薬モダリティとして PPR を用いた治療薬開発研究を行った。

第一の目標として、筋強直性ジストロフィー (DM1) を治療対象とした PPR の非臨床 POC を確立することを目指し、研究開発を進めた。まず、DM1 の原因となる異常伸長 CUG リピート RNA に結合する PPR (CUG-PPR) の標的

RNA 結合モチーフの最適化を完了し、ELISA (酵素結合免疫吸着測定法)、EMSA (ゲルシフトアッセイ) により標的との結合を確認した。また、DM1 細胞モデルで異常伸長 CUG リピート RNA への結合、異常 RNA 毒性低減効果 (核内異常 RNA 凝集体形成抑制、スプライシング異常改善、筋分化能改善、MBNL1 蛋白凝集抑制) を確認した。次に、CUG-PPR の *in vivo* での効果を検証するため、骨格筋での CUG-PPR 発現を目指し AAV6 搭載型 CUG-PPR (AAV6-CUG-PPR) を合成し、DM1 モデルマウスへ筋肉内投与を行った。AAV6-CUG-PPR の DM1 マウスモデル前脛骨筋投与により、RNA 毒性低減効果 (筋強直症状改善、スプライシング異常改善、異常 RNA 凝集体形成抑制) を確認した。さらに、AAV を用いた CUG-PPR の *in vivo* デリバリーによる有効性・安全性試験を進めるため、マウス全身臓器で PPR の発現誘導が良好な AAV セロタイプとして AAV9 を選定した。AAV9 搭載型 CUG-PPR (AAV9-CUG-PPR) を合成し、マウスへ投与し全身臓器での発現と免疫反応性を検証した。マウスへの尾静脈内単回投与により、DM1 の治療対象臓器である骨格筋、脳、心筋、眼、内分泌器官で CUG-PPR の良好な発現がみられ、PPR が誘導する液性・細胞性免疫反応も極めて低いことを確認した。さらに、AAV9-CUG-PPR を DM1 モデルマウスへ投与し、投与用量反応性 (dosing study) および治療効果持続性 (time-course study) の検証を行った。AAV9-CUG-PPR は投与用量依存性に mRNA、蛋白とも発現が増加し、RNA 毒性低減効果 (筋強直症状改善、スプライシング異常改善、異常 RNA 凝集体形成抑制) も高まった。治療効果も投与 4 週後、8 週後と増強し、少なくとも 16 週後でも持続していることを確認した。また、RNA-seq を用いた解析により、DM1 でみられるスプライシング異常が CUG-PPR 投与により網羅的に改善されること、off target 効果もみられないことも確認した。さらに、標的臓器でのより効果的な CUG-PPR 発現を目指し、プロモーターを改良した AAV9-CUG-PPR を合成した。マウス尾静脈投与により、DM1 の標的臓器である骨格筋、心筋、脳で CUG-PPR を高発現する改良型 AAV9-CUG-PPR を選定した。改良型 AAV9-CUG-PPR の DM1 モデルマウスへの投与実験で、CUG-PPR の発現上昇、RNA 毒性抑制作用 (スプライシング異常改善、異常 RNA 凝集体形成抑制、筋変性抑制) の向上を達成した。マウスをもちいた改良型 AAV9-CUG-PPR の単回投与毒性試験でも、AAV9-CUG-PPR による明らかな毒性はみられないことも確認した。さらに、サルをもちいた改良型 AAV9-CUG-PPR の単回投与毒性試験でも、AAV9-CUG-PPR による明らかな毒性はみられないことも確認した。

このほか、標的となる異常 RNA を分解、あるいは異常蛋白の翻訳を抑制する特性をもつ、機能分子融合型 CUG-PPR の開発も進めた。異常 RNA を直接分解する作用をもつ RNase 融合 CUG-PPR の設計・合成をおこない、DM1 モデル細胞で標的 RNA への結合および異常 RNA 毒性低減効果 (異常 RNA 凝集体形成抑制、スプライシング異常改善) を実証した。RNase 融合 CUG-PPR を搭載した AAV9 ベクターの DM1 マウスモデルへの尾静脈単回投与により、RNA 毒性低減効果 (筋強直症状改善、スプライシング異常改善、異常 RNA 凝集体形成抑制) を確認した。また、他の異常 RNA が関わる神経変性疾患を対象とした PPR について PPR モチーフ配列の最適化を行い、細胞モデルでの有効性を確認した。

Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins, originally discovered in plants, are nucleic acid-binding proteins that recognize RNA in a sequence-specific manner. By rationally combining PPR motifs that bind to each of the four nucleotides A, C, U, and G, it is possible not only to design molecules that selectively bind virtually any desired RNA target sequence, but also to achieve diverse modes of RNA regulation—such as RNA degradation and translational repression—by fusing PPRs to functional effector domains. Meanwhile, many intractable neuromuscular disorders lacking fundamental disease-modifying therapies are now known to be caused by toxic, abnormal RNAs, and therapeutic strategies that directly target these pathogenic RNAs are under active development. To date, such efforts have largely focused on nucleic acid therapeutics; however, challenges remain regarding delivery and off-target effects. In addition, genome-editing approaches using CRISPR/Cas or zinc-finger nucleases (ZFNs) are still constrained by target sequence requirements. In contrast, PPR proteins are RNA-binding proteins that can, in principle, overcome all of these limitations. Establishing a therapeutic platform based on

PPR proteins would not only open the way to breakthrough treatments for neuromuscular diseases, but also give rise to a highly versatile, Japan-origin, innovative technology that could drive a paradigm shift in RNA-targeted therapy as a novel therapeutic modality. In this project, we conducted therapeutic development research using PPR proteins as a new drug modality for refractory muscle and neurodegenerative diseases caused by toxic RNAs.

Our first objective was to establish preclinical proof-of-concept (POC) for PPR-based therapy targeting myotonic dystrophy type 1 (DM1). We began by optimizing the RNA-binding motif composition of a PPR protein designed to bind the abnormally expanded CUG repeat RNA that causes DM1 (CUG-PPR), and confirmed its binding to the target RNA by ELISA and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). In DM1 cellular models, we verified that CUG-PPR binds to the expanded CUG repeat RNA and attenuates RNA toxicity, as evidenced by suppression of intranuclear RNA foci formation, correction of mis-splicing events, improvement of myogenic differentiation, and reduction of MBNL1 protein sequestration. To evaluate the *in vivo* efficacy of CUG-PPR, we next generated an AAV6 vector encoding CUG-PPR (AAV6-CUG-PPR) to achieve expression in skeletal muscle and administered it via intramuscular injection into DM1 model mice. In the tibialis anterior muscle of DM1 mice treated with AAV6-CUG-PPR, we observed mitigation of RNA toxicity, including amelioration of myotonia, correction of splicing abnormalities, and suppression of abnormal RNA foci. To further advance *in vivo* delivery of CUG-PPR using AAV and to perform rigorous efficacy and safety studies, we selected AAV9 as the serotype that most robustly drives PPR expression across mouse systemic organs. We then generated an AAV9 vector encoding CUG-PPR (AAV9-CUG-PPR) and examined expression and immunogenicity after administration to mice. Following a single intravenous injection via the tail vein, robust CUG-PPR expression was detected in skeletal muscle, brain, heart, eye, and endocrine organs, all of which are clinically relevant target tissues in DM1, while both humoral and cellular immune responses elicited by PPR were found to be minimal.

We subsequently administered AAV9-CUG-PPR to DM1 model mice and conducted dose-response (dosing) and time-course studies. AAV9-CUG-PPR produced dose-dependent increases in both CUG-PPR mRNA and protein expression, which were accompanied by dose-dependent enhancement of RNA toxicity-ameliorating effects, including improvement of myotonia, correction of splicing abnormalities, and suppression of abnormal RNA foci. Therapeutic efficacy was further augmented at 4 and 8 weeks post-injection and was maintained for at least 16 weeks. RNA-seq-based analyses demonstrated that DM1-associated splicing defects were globally corrected by CUG-PPR treatment, and no apparent off-target effects were detected. In parallel, to achieve more effective expression of CUG-PPR in target organs, we generated promoter-optimized AAV9-CUG-PPR vectors. Through systemic tail vein administration in mice, we identified an improved AAV9-CUG-PPR construct that drives high CUG-PPR expression in skeletal muscle, heart, and brain, the principal target tissues in DM1. In DM1 model mice treated with this optimized AAV9-CUG-PPR, we achieved further enhancement of CUG-PPR expression and improved suppression of RNA toxicity, including better correction of splicing abnormalities, more pronounced inhibition of abnormal RNA foci formation, and attenuation of muscle degeneration. Single-dose toxicity studies of the optimized AAV9-CUG-PPR in mice and non-human primates revealed no evident toxicity attributable to AAV9-CUG-PPR.

In addition, we advanced the development of “functional fusion” CUG-PPR constructs designed either to degrade pathogenic RNAs or to suppress translation of toxic proteins. We designed and generated an RNase-fused CUG-PPR with the ability to directly degrade abnormal RNA, and demonstrated in DM1 cellular models that it binds the target RNA and attenuates RNA toxicity, as reflected by reduced RNA

foci formation and improved splicing abnormalities. A single intravenous tail vein injection of an AAV9 vector encoding the RNase-fused CUG-PPR into DM1 model mice similarly yielded amelioration of RNA toxicity, including improvement of myotonia, correction of splicing defects, and suppression of abnormal RNA foci. Furthermore, we optimized the PPR motif compositions targeting other neuronal disorders, and validated their efficacy in corresponding cellular models.