

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) ゲノム創薬基盤推進研究事業

(英語) Platform Program for Promotion of Genome Medicine

研究開発課題名：(日本語) スプライシング操作化合物を対象としたファーマコゲノミクス解析に基づく遺伝性難病治療薬の開発研究

(英語) Development of genetic disease medicine by pharmacogenomics analysis of splice-switching compounds

研究開発担当者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 形態形成機構学 教授 萩原正敏

所属 役職 氏名：(英語) Department of Anatomy and Developmental Biology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Professor and Vice Dean, Masatoshi Hagiwara

実施期間：平成 28年9月15日 ～ 平成 31年 3月 31日

分担研究 (日本語) 遺伝性難病のゲノム創薬開発に向けて、対象患者群の治療可能性を判定するファーマコゲノミクス解析研究

開発課題名：(英語) Pharmacogenomic study to determine clinical response of toward development of genome medicine

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 形態形成機構学 教授 萩原正敏

所属 役職 氏名：(英語) Department of Anatomy and Developmental Biology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Professor and Vice Dean, Masatoshi Hagiwara

分担研究 (日本語) エキソンスキップ誘導治療薬およびエキソン含有治療薬の非臨床試験

開発課題名：(英語) Pre-clinical evaluation for exon skipping-inducing and exon inclusion-inducing compounds

研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 形態形成機構学 教授 萩原正敏

所属 役職 氏名：(英語) Department of Anatomy and Developmental Biology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Professor and Vice Dean, Masatoshi Hagiwara

- 分担研究 (日本語) ファーマコゲノミクス解析による対象患者の治療可能性判定ツールの開発
 開発課題名: (英語) Development a Pharmacogenomics tool for Matching Splicing modulators and Genetic Disorders
- 研究開発分担者 (日本語) 京都大学 医学研究支援センター 特定助教 飯田慶
 所属 役職 氏名: (英語) Research Assistant Professor, Medial Research Support Center, Graduate School of Medicine, Kyoto University
- 分担研究 (日本語) iPS 細胞による薬効評価検証研究
 開発課題名: (英語) Pharmacological validation study using human iPS cells
 研究開発分担者 (日本語) 京都大学大学院医学研究科 発達小児科学 教授 平家俊男
 所属 役職 氏名: (英語) Kyoto University Graduate School of Medicine, Professor (Pediatrics), Toshio Heike
- 分担研究 (日本語) ファーマコゲノミクスに基づく遺伝性難病を対象とした医師主導治験
 開発課題名: (英語) Clinical trial for genetic diseases based on pharmacogenomics information
 研究開発分担者 (日本語) 清水章 教授 京都大学附属病院・臨床研究総合センター
 所属 役職 氏名: (英語) Institute for Advancement of Clinical and Translational Science, Kyoto University Hospital, Professor, Akira Shimizu
- 分担研究 (日本語) 合成展開およびバックアップ化合物の開発
 開発課題名: (英語) Derivatization and discovery of back up compounds
 研究開発分担者 (日本語) 第一三共株式会社・研究開発本部・希少疾患 グループ長 高石巨澄
 所属 役職 氏名: (英語) DAIICHI SANKYO CO., LTD. R&D Division Rare Disease & LCM Laboratories Senior Director Kiyosumi Takaishi, Ph.D.
- 分担研究 (日本語) 簡易薬効評価方法の開発
 開発課題名: (英語) Development of a simple efficacy evaluation system for splice-switching compounds
 研究開発分担者 (日本語) 福岡大学薬学部 准教授 大江賢治
 所属 役職 氏名: (英語) Fukuoka University Department of Pharmaceutical Sciences. Associate Professor Kenji Ohe

II. 成果の概要 (総括研究報告)

平成 28 年度 ゲノム創薬基盤推進研究事業 総括研究報告

研究開発課題明: スプライシング操作化合物を対象としたファーマコゲノミクス解析に基づく遺伝性難病治療薬の開発研究

研究開発代表者: 萩原正敏 (京都大学大学院医学研究科、形態形成機構学)

研究開発の成果

本年度はスプライシング操作化合物による治療効果が見込まれる標的疾患群に対して作用メカニズムの解析を進めるとともに、RNA-Seq 解析を通して標的疾患の選定に向けたアルゴリズムの検討に着手した。また、遺伝病モデルとしての iPS 細胞実験系の至適化を実施するとともに、国際的な治験展開に向けて海外研究・医療機関との共同研究体制の構築を進めた。

1. スプライシング操作化合物による標的疾患解析

エクソンスキップ誘導化合物、エクソン含有誘導化合物のそれぞれについてヒト細胞株における RNA-Seq 解析を実施し、各スプライシング操作化合物が標的とするスプライシング制御に関して法則性を解析した。それにより治療効果判定ツールのアルゴリズムを試作し、簡易薬効評価による検討を開始している。また、スプライシング異常が原因となる一部の遺伝性疾患に関して、スプライシング操作化合物によるスプライシング是正効果が新たに確認された。それら解析の先行する遺伝性疾患に対してはスプライシング操作化合物の作用メカニズムの解析を実施した。その結果、化合物の応答性と特定のスプライシング制御因子との間に機能的関連が示唆された。これらの実験的知見は治療効果判定ツールの改良に反映にあたり有用と考えられ、今後はより多くの標的スプライシングに対して機能的な検証を進めてゆく。

2. スプライシング操作化合物の合成展開及び初期非臨床評価

エクソンスキップ誘導化合物、エクソン含有誘導化合物に関して薬物動態試験・毒性試験・遺伝毒性試験を含む初期非臨床評価を実施した。血中安定性に関して改善が必要と認められた化合物に関して合成展開を検討し、スプライシング制御活性を保持したバックアップ化合物の取得を行った。

3. 遺伝病モデル iPS 細胞による薬理薬効評価

スプライシング操作化合物の薬理薬効試験にあたり、iPS 細胞を遺伝病モデルとして用いるため、培養条件・各種細胞分化系の誘導法の至適化を実施した。また、治療効果解析が先行する遺伝病に関しては今後の薬理薬効試験の実施に向けて遺伝病患者細胞に由来する iPS 細胞の維持培養系を確立した。

4. 医師主導治験デザインに向けた検討

スプライシング操作化合物による薬効解析が先行する遺伝性疾患に対しては、医師主導治験に向けた準備として疫学調査を進めた。これまでに標的候補として検討を進めている疾患群は主に海外で認められる疾患であるため、海外の研究・医療機関との共同研究に着手した。

Platform Program for Promotion of Genome Medicine (FY2016)

Summary Statement

Study Title: Development of genetic disease medicine by pharmacogenomics analysis of splice-switching compounds

Investigator: Masatoshi Hagiwara, MD, PhD, Professor and Vice Dean, Department of Anatomy and Developmental Biology, Kyoto University Graduate School of Medicine

Major Progress during FY2016:

Major progress during FY2016 include development of prototype algorithm for targeting rule of splice-

switching compounds, functional analysis of those compounds, optimization of iPS cell experimental conditions and initiation of international collaboration, as described below.

1. Targeting rule analysis for splice-switching compounds

We have conducted RNA-Seq for human cell lines, treated with either exon skipping- or exon inclusion-inducing compounds. By analyzing those transcriptome datasets, we developed prototype algorithm for splicing targeting rule to sort out those genetic disease with an expected therapeutic effect by treatment with splice-switching compounds.

During FY2016, we also found several additional genetic diseases, as promising targets by splice-switching compounds. For those target splicing events, we initiated functional study for their splicing regulation and pharmaceutical action of compounds. As a result, we successfully identified specific set of alternative splicing factors that mediate splice-switching following compound treatment. Those experimental evidences will provide a feedback to further improve algorithm to predict target splicing events and genetic diseases. We will further continue functional analysis for more expanded set of target splicing events during the next fiscal year.

2. Synthetic development and preclinical assessment for splicing manipulating compounds

We examined preclinical assessment for splice-switching compounds, regarding pharmacokinetics, general toxicity, and genotoxicity. For one of the compounds, which showed poor blood stability, we conducted synthesis of derivative compounds to obtain backup compound with improved blood stability with a comparable splicing manipulating activity.

3. Pharmacological efficacy test in iPS cells as a genetic disease model.

During FY2016, we optimized culturing and differentiation condition for iPS cells, aiming their application for pharmacological efficacy tests for genetic diseases. For those genetic diseases confirmed for splicing recovery following compound treatment, we obtained iPS cells and completed preparation of own cell culture stock for use in further study.

4. Preparation for a future clinical trial.

Epidemiological survey has been conducted for those genetic diseases, identified as a promising target by splice-switching compounds for a therapeutic effect. In many cases, patients are common in foreign districts, thereby we initiated collaboration with foreign research or medical institutes aiming future cooperation on clinical investigation.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 2 件）

1. SAKO Y, NINOMIYA K, OKUNO Y, TOYOMOTO M, NISHIDA A, KOIKE Y, OHE K, KII I, YOSHIDA S, HASHIMOTO N, HOSOYA T, MATSUO M, HAGIWARA M. Development of an orally available inhibitor of CLK1 for skipping a mutated dystrophin exon in Duchenne muscular dystrophy. Scientific Reports. 2017 (accepted).
2. 栗屋智就. 「神経筋疾患の研究に関する iPS 細胞の応用」小児内科『特集 小児の筋疾患 update』

(東京医学社) 2016; 48(12): 1986-9.

3. NAZIM M, MASUDA A, RAHMAN MA, NASRIN F, TAKEDA J, OHE K, OHKAWARA B, ITO M, OHNO K. Competitive regulation of alternative splicing and alternative polyadenylation by hnRNP H and CstF64 determines acetylcholinesterase isoforms. *Nucleic Acids Research*. 2017, 45, 1455-1468

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「Diseasome 情報を活用した Phenomics 創薬へ」、萩原正敏、第 105 回病理学会総会、2016 年 5 月 13 日、宮城、国内
2. 「京都大学発アカデミア創薬-卓越した基礎研究から医師主導治験まで-」、萩原正敏、第 8 回関西ライフサイエンス・リーディングサイエンティストセミナー、2016 年 6 月 10 日、大阪
3. 萩原正敏、日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会 (日豪合同ケミカルバイオロジーシンポジウム)、2016 年 6 月 16 日、京都、国内
4. Challenges to cure genetic diseases with splicing modulating chemical compounds.” Masatoshi Hagiwara, “RNA2016 The RNA Society of Japan 18th Annual Meeting and THE 21stAnnual Meeting of THR RNA Society. Kyoto International Conference Center Kyoto, Japan, June29, 2016.国外
5. 「トランスクリプトーム創薬の実現に向けて」、萩原正敏、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 7 月 1 日、愛知、国内
6. 「エクソンスキップ誘導薬とエクソン含有誘導薬による遺伝性難病の治療」、萩原正敏、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日、宮城、国内
7. “New chemical therapeutics of genetic diseases by manipulating transcriptome.” Masatoshi Hagiwara, XIV International Congress of Toxicology Merida-Mexico October3, 2016.国外
8. 「New chemical therapeutics of genetic diseases by manipulating transcriptome.」、萩原正敏、Tokyo Medical & Dental University 15th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of medical research Institute International Symposium、2016 年 11 月 29 日、東京、国内
9. 「京都大学におけるアカデミア創薬の試み」、萩原正敏、公益社団法人 先端医療振興財団での講演会、2017 年 1 月 10 日、神戸、国内
10. “RBM24 is a tissue-specific cryptic enhancer of the IKBKAP gene in familial dysautonomia”, Masatoshi Hagiwara, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Sagebrush Inn & Suites, Taos, New Mexico, USA, March7, 国外
11. 「基礎研究から医師主導治験に至るワンストップ創薬」、萩原正敏第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎、国内
12. “Development of inhibitors of CDK9, CLK1, DYRK1a, and their clinical application.” Masatoshi HAGIWARA, DARK1A related kinases & human disease March28-April1st 2017, Palais du Grand Large, saint-malo FRANCE, March 30. 国外
13. Computational characterization of targeting rules of splicing-modulating small molecule: TG003 in differentiated and undifferentiated muscle cells. ポスター、Kei IIDA, Maki Sakuma, Hiromi Toyoshima, Masatsugu Denawa, and Masatoshi Hagiwara. RNA2016、

2016/06/30, 国内 (国際学会)

14. 分化状態の異なる筋肉細胞におけるスプライシング操作化合物TG003の効果の違い、ポスター、飯田慶、佐久間真紀、豊島裕美、出縄政嗣、萩原正敏、第39回日本分子生物学会、2016/12/02, 国内
15. ポスター、佐古有季哉¹⁾、二宮賢介¹⁾、奥野友紀子²⁾、豊本雅靖¹⁾、西田篤史³⁾、小池悠華¹⁾、大江賢治¹⁾、喜井 勲¹⁾、吉田 優⁴⁾、細谷孝充⁴⁾、松尾雅文³⁾、萩原正敏¹⁾
¹⁾京大・院医・形態形成、²⁾京大・院医・医学研究支援センター、
³⁾神戸学院大学・総合リハビリテーション学部、⁴⁾東医歯大・生材研・生命有機化学
新規 CLK1 特異的阻害剤は Duchenne 型筋ジストロフィーに対するエキソンスキッピング誘導治療薬候補化合物である
第11回 日本ケミカルバイオロジー学会 (ポスター発表) 京都テルサ 6.15-17 2016
16. ポスター ○大江賢治¹⁾、内海俊明²⁾、前田明³⁾、遠城寺宗近¹⁾
¹⁾ 福岡大学薬学部・臨床薬物治療学、²⁾ 藤田保健衛生大学病院・乳腺外科、
³⁾ 藤田保健衛生大学病院総合医科学研究所・遺伝子発現機構学
HMGA1a に対する「おとり」RNA は、エストロゲン受容体の選択的スプライシングを制御する
第2回 日本核酸医薬学会 (ポスター発表) 東京理科大学葛飾キャンパス、11.15-17 2016

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「RNA スプライシングを操作すれば遺伝情報の異常を是正できるか?」、萩原正敏、生理化学ユニットシンポジウム、2016年12月22日、京都
2. 「脳・生体イメージングの創薬への展開」、萩原正敏、「シンポジウム「健康社会にむけた多次元脳・生体イメージングの総合的推進」、2017年1月22日、東京
3. 京都大学におけるアカデミア創薬の取り組みについて、萩原正敏、第一回 Kyoto-SPARK シンポジウム (スタンフォード大学創薬連携プログラム)、2017/2/15、京都

(4) 特許出願