

CAG リピートを標的とした siRNA は 脳内の異常ポリグルタミン蛋白を選択的に抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学の勝野雅央 教授、佐橋健太郎 講師、蛭薙智紀 大学院生（筆頭研究者）らの研究グループは、AMED 橋渡し研究戦略的推進プログラム・自立可能な好循環型先端医療開発拠点の創成を目指した研究の支援を受け、米国の Arcturus Therapeutics 社と共同で行なった、遺伝性神経変性疾患^{※1}のひとつであるポリグルタミン病^{※2}を対象とした基礎研究において、CAG 繰り返し配列（リピート）^{※3}を標的とした siRNA^{※4}により、中枢神経系^{※5}の異常ポリグルタミン蛋白質を選択的に抑制できることを明らかにしました。

ポリグルタミン病は CAG リピート配列の異常伸長に由来する蛋白質（ポリグルタミン蛋白質）の毒性を原因とした遺伝性神経変性疾患の総称であり、球脊髄性筋萎縮症^{※6}、ハンチントン病^{※7}、脊髄小脳変性症などの 9 疾患が含まれます。いずれも進行性の難治性疾患であり、根本的な治療法はありません。

これまでに、細胞を用いた実験において、CAG リピートを標的とした siRNA に人工核酸^{※8}を加えるなどの改良をすることで、正常な蛋白には影響を与えず、異常ポリグルタミン蛋白を選択的に抑制できることが報告されていましたが、siRNA は生体内ではすぐに分解されてしまうため、動物実験での検証が困難でした。

勝野教授らの研究チームは UNA (unlocked nucleic acid) と呼ばれる人工核酸を加えた、CAG リピートを標的とする siRNA を新たに作成し、脂質ナノ粒子^{※9}を利用して球脊髄性筋萎縮症とハンチントン病のモデルマウス^{※10}に投与しました。その結果、モデルマウス的大脑皮質において、siRNA が正常な蛋白にはほとんど影響を与えず、異常ポリグルタミン蛋白を選択的に抑制することを明らかとしました。

本研究の結果から、CAG リピート配列を標的とした siRNA が、ポリグルタミン病全体に共通する治療薬となる可能性が示唆されました。英国科学雑誌「Molecular Therapy - Nucleic Acids」（2021 年 2 月 15 日付の電子版）に掲載されました。

ポイント

- ポリグルタミン病は異常ポリグルタミン蛋白質の毒性を原因とした遺伝性神経変性疾患であり、球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳変性症などが含まれる。
- これまでに細胞実験において、CAG リピートを標的とした siRNA により異常ポリグルタミン蛋白を選択的に抑制することが報告されていたが、siRNA は生体内ですぐに分解されてしまうため、動物モデルでの検証は困難であった。
- 本研究では siRNA を脂質ナノ粒子に抱合し投与することで、ポリグルタミン病モデルマウスの脳内において、CAG リピートを標的とした siRNA が異常ポリグルタミン蛋白を選択的に抑制することを明らかとした。
- 本研究により CAG リピート配列を標的とした siRNA が、ポリグルタミン病全体に共通する治療薬となる可能性が示唆された。

1. 背景

ポリグルタミン病は遺伝子の CAG リピート延長に由来するポリグルタミン蛋白質の毒性を原因とした、遺伝性神経難病の総称であり、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)、ハンチントン病、脊髄小脳変性症などの 9 疾患が含まれます。例えば SBMA 患者ではアンドロゲン受容体(*AR*)遺伝子の CAG リピートが延長することで、ポリグルタミンが伸びた異常な AR 蛋白が運動ニューロンの核内に蓄積し、進行性の筋力低下や嚥下機能障害などの症状が生じると考えられています。ポリグルタミン病はいずれも運動障害や認知機能障害などの症状が進行性に悪化する難治性疾患であり、日本国内だけで 1 万人以上の患者がいると推定されていますが、根本的な治療法はありません。

ポリグルタミン蛋白質を減少させることがポリグルタミン病の疾患の進行を遅らせたり、症状を改善したりできること動物実験で明らかになっており、現在アンチセンス核酸と呼ばれる核酸医薬を用いてハンチントン病の原因遺伝子であるハンチンチンを阻害する臨床試験が行われています。一方、CAG リピートを標的とした治療はポリグルタミン病全体に適応できるという利点があるものの、正常な CAG リピートを有する遺伝子に由来する蛋白は中枢神経系で様々な役割を担っており、正常な蛋白を同時に阻害してしまうと神経毒性が生じることが懸念されています。

そこで近年、CAG リピートを標的とした siRNA を改良することで、正常な蛋白にはあまり影響を与えず、異常なポリグルタミン蛋白質を選択的に抑制できる方法が開発され、細胞実験レベルでの研究が進んでいますが、siRNA は体内ですぐに分解されてしまうため、動物実験による検証は困難でした。

我々は今回、まず CAG リピートを標的とした配列の特定の部位に UNA (unlocked nucleic acid) という人工核酸を加えた siRNA を作成し、SBMA 患者由来の繊維芽細胞を用いて異常ポリグルタミン蛋白質に対する選択性を検証しました。さらに、脂質ナノ粒子という物質に抱合し運搬することで、この siRNA を分解されずに中枢神経系に届けることができるのではないかと考え、SBMA、ハンチントン病のモデルマウスでの投与実験を行いました。

2. 研究成果

本研究ではまず CAG リピートを標的とした配列に UNA を加えた複数の siRNA のスクリーニングを行い、異常ポリグルタミン蛋白質をより選択的に抑制する siRNA(REPU910)を同定しました。この REPU910 siRNA を SBMA 患者および健常者由来の皮膚繊維芽細胞においてテストしたところ、特に 2.5 nM や 5 nM といった低濃度において、正常な AR 蛋白はほとんど減少させず、ポリグルタミン蛋白を有する異常 AR を選択的に抑制することが分かりました (図 1)。

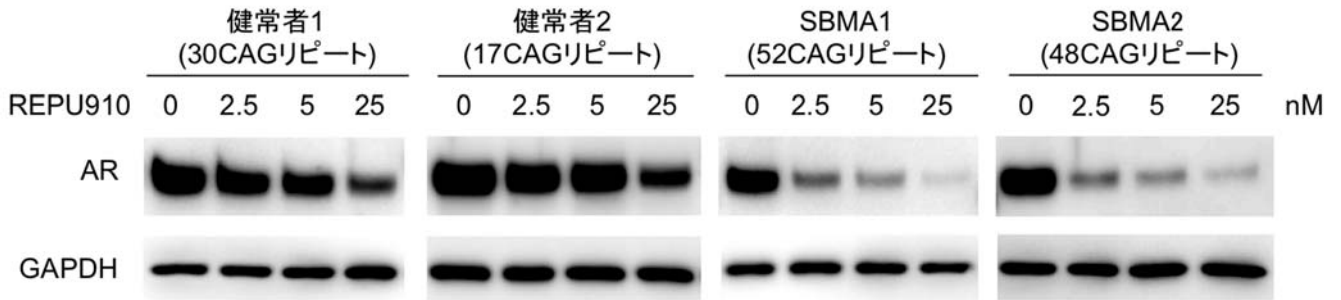
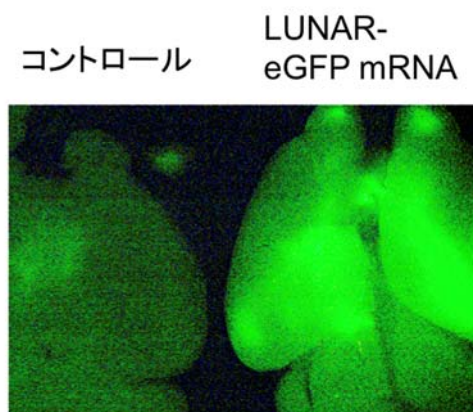


図1 ヒト繊維芽細胞における、REPU910 siRNAによるポリグルタミン伸長アンドロゲン受容体の選択的抑制

次に、この siRNA を Arcturus Therapeutics 社の有する LUNAR (lipid-enabled and UNA modified RNA) と呼ばれる脂質ナノ粒子を用いてマウス中枢神経系に投与するために、まず LUNAR の中枢神経系での分布範囲を調べました。eGFP^{*11} という遺伝子のメッセンジャーRNA^{*12} を LUNAR により運搬し、投与 3 日後の脳を解析したところ、大脳皮質を中心とした脳全体に広範に eGFP 蛋白が生じていることが確認できました (図 2AB)。

A



B

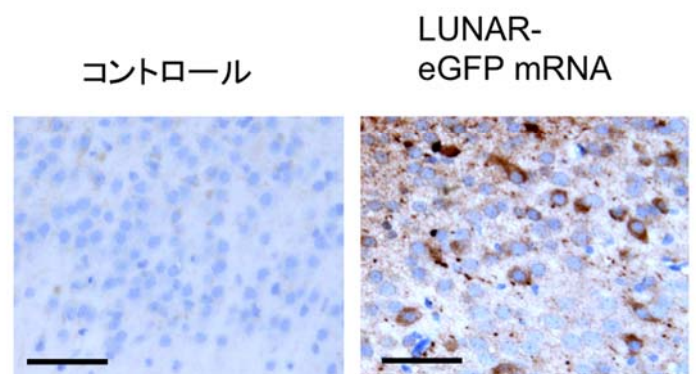


図2 マウス脳におけるLUNARナノパーティクルの分布

A: 蛍光実体顕微鏡を用いたeGFPの検出

B: GFP抗体を用いた大脳皮質の免疫染色 (bar = 50 μm)

この LUNAR を用いて、同定した REPU910 siRNA を SBMA モデルマウスおよび正常なヒト *AR* 遺伝子を有するマウスの脳室内に投与したところ、大脳皮質における異常 AR 蛋白は有意に減少したのに対し、正常な AR 蛋白の減少はみられず、異常ポリグルタミン蛋白を選択的に抑制することが分かりました (図 3)。さらに、REPU910 siRNA はハンチントン病モデルマウスの大脳皮質においても、異常ポリグルタミン蛋白を抑制することが可能でした。

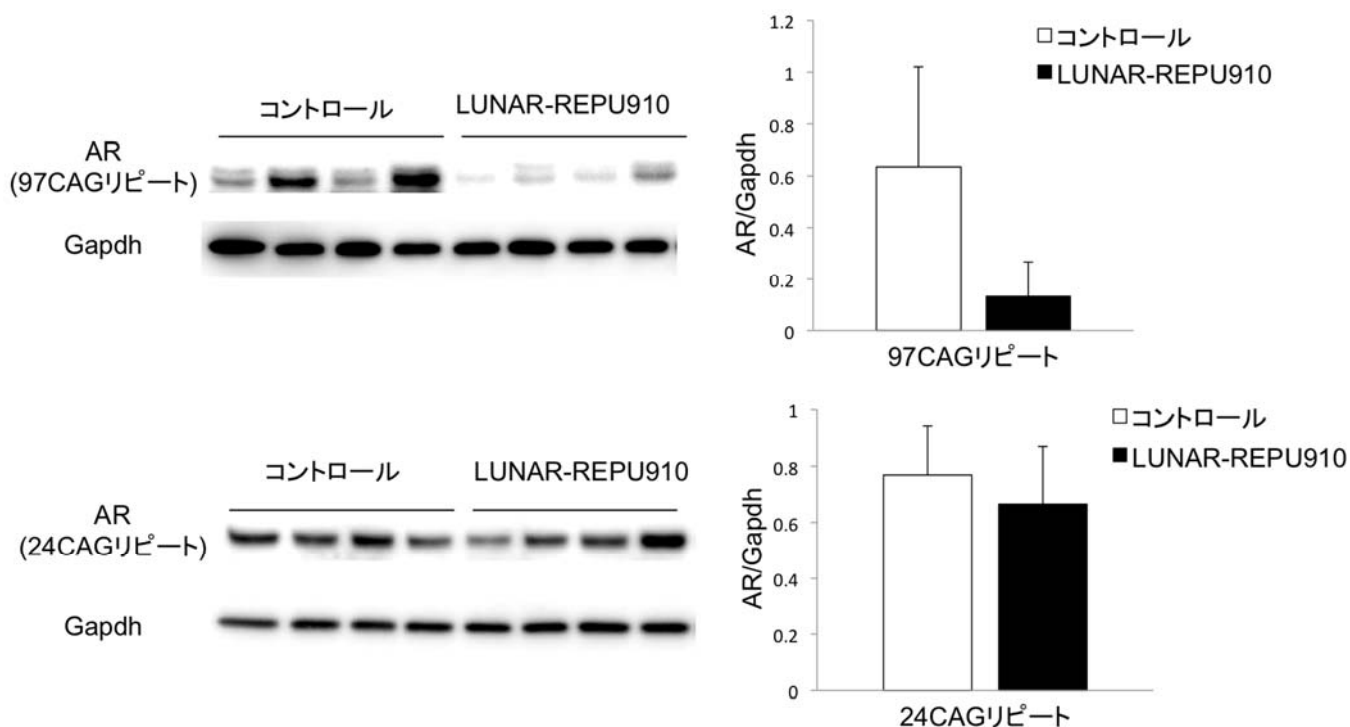


図3 マウス大脳皮質における、LUNAR-REPU910 siRNAによるポリグルタミン伸長アンドロゲン受容体の選択的抑制

3. 今後の展開

本研究の結果から、CAG リピート配列を標的とした siRNA が、ポリグルタミン病全体に共通する治療薬となる可能性が示唆されました (図 4)。現在 siRNA や脂質ナノ粒子の改良により、中枢神経系での薬剤の分布範囲や、蛋白抑制効果の持続時間の延長を目的とした研究を行っており、ポリグルタミン病全般に治療効果を有する医薬品としての臨床応用を目標にしています。

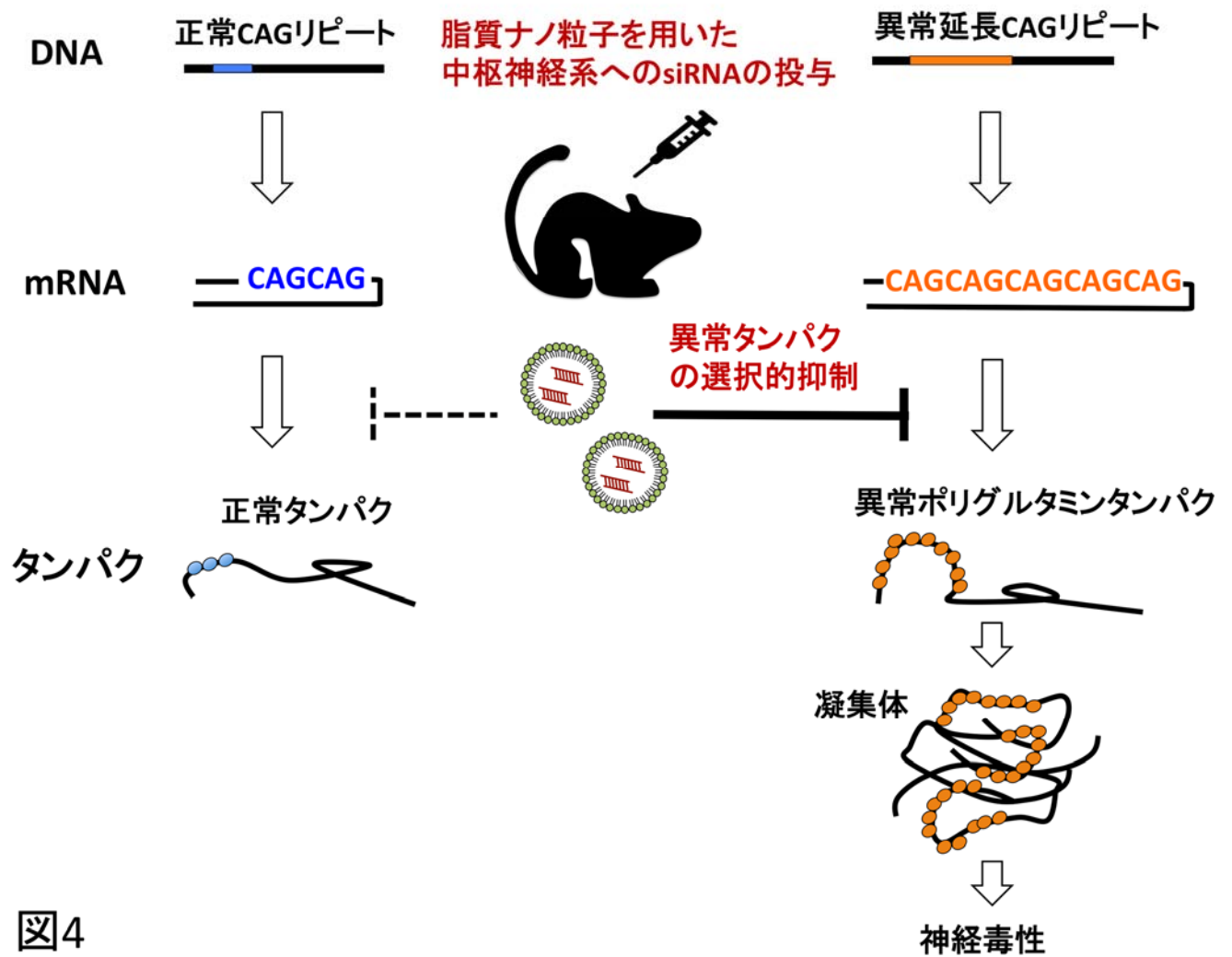


図4

4. 用語説明

※1 遺伝性神経変性疾患

遺伝子の異常により特定の種類の神経細胞が進行性に変性する（死滅する）疾患の総称。遺伝性神経変性疾患に共通する病理学的な特徴として、神経細胞の中や周囲に遺伝子変異を原因とした異常な蛋白質が蓄積し、それによって特定の種類の神経細胞が障害されることが知られている。ポリグルタミン病は代表的な遺伝性疾患の一つである。

※2 ポリグルタミン病

ポリグルタミン蛋白の毒性を原因とした遺伝性神経変性疾患の総称。球脊髄性筋萎縮症（SBMA）、ハンチントン病、脊髄小脳変性症などの9疾患が含まれ、日本国内だけで1万人以上の患者がいると推定されている。

※3 CAG 繰り返し配列（リピート）

遺伝子の構成物質であるシトシン（C）、アデニン（A）、グアニン（G）の三つを一単位とする繰り返し配列（リピート）のことで、一般的に健常者では6～30回程度の繰り返しであるが、ポリグルタミン病では35回以上に延長している。CAG リピートの異常伸長に由来する蛋白質をポリ

グルタミン蛋白と呼ぶ。

※4 siRNA

small interfering RNA の略称。RNA 干渉と呼ばれる原理で特定の遺伝子発現を抑制するために使用され、核酸医薬としての利用が注目されている。

※5 中枢神経系

体の中心にあり、神経系の中核の役割を担う組織。中枢神経系には脳と脊髄が含まれる。

※6 球脊髄性筋萎縮症

アンドロゲン受容体遺伝子の CAG リピート延長を原因として、男性のみに発症する疾患。脊髄の運動神経細胞や筋肉の障害により、嚥下機能障害や手足の筋萎縮、筋力低下が生じる。

※7 ハンチントン病

ハンチントン遺伝子の CAG リピート延長を原因として発症し、大脳皮質や大脳基底核と呼ばれる部位が障害される疾患。全身の舞踏運動（自分の意思がないのに体が動いてしまう運動の一つ）や認知機能低下などの症状が生じる。

※8 人工核酸

自然には存在せず、人工的に作成した核酸の総称。siRNA などの核酸を安定化したり、効果の持続時間を延長したりする目的で使用されることが多い。

※9 脂質ナノ粒子

分解されやすい薬剤を組織に運搬するために、脂質で作られた粒子。核酸医薬品の運搬システムとして注目されている。

※10 モデルマウス

遺伝子を改変し、ヒトの疾患と類似の病態を再現したマウス。一般に、モデルマウスを用いて病態の解明や治療薬の検証を行う。

※11 eGFP

enhanced green fluorescent protein の略称。青色の光を吸収して緑色の蛍光を発し、レポータータンパク質として広く普及している。

※12 メッセンジャーRNA

DNA の配列をもとに作られる RNA の一つ。メッセンジャーRNA の情報をもとにタンパクが合成される。

5. 発表雑誌

掲雑誌名：Molecular Therapy - Nucleic Acids

論文タイトル：Selective suppression of polyglutamine-expanded protein by lipid nanoparticle-delivered siRNA targeting CAG expansions in the mouse CNS

著者：Tomoki Hirunagi¹, Kentaro Sahashi¹, Kiyoshi Tachikawa², Angel I Leu², Michelle Nguyen², Rajesh Mukthavaram², Priya P. Karmali², Padmanabh Chivukula², Genki Tohnai¹, Madoka Iida¹, Kazunari Onodera^{1,3}, Manabu Ohyama⁴, Yohei Okada³, Hideyuki Okano⁵ and Masahisa Katsuno¹

所属：¹Department of Neurology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi, Japan

²Arcturus Therapeutics, San Diego, CA

³Department of Neurology, Aichi Medical University School of Medicine, Aichi, Japan

⁴Department of Dermatology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

⁵Department of Physiology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.02.007>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Mole_The_N_A_210216en.pdf