

総 説

リピート病の治療薬開発を目指した低分子創薬研究

村瀬 裕 貴*, 佐々木 茂 貴

(長崎国際大学 薬学部 薬学科 ゲノム標的創薬学研究室, *連絡対応著者)

Drug Discovery Research Toward the Small Molecular
Therapeutic Agents for Repeat Expansion Diseases

Hirotaka MURASE* and Shigeki SASAKI

(Lab. Genome-targeting Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Department of Pharmacy, Nagasaki International University, *Corresponding author)

Abstract

The repeating nucleic acid sequences play the important role in the gene regulations via the formation of the various higher-order structure, such as a stem-loop or a G-quadruplex structure. However, the abnormal repeat-expansion, although its mechanism remains unclear, results in the intractable hereditary disease due to the onset of the toxicities in the nucleus and cytoplasm. In many cases, the disease-cause repeat consists of 3 to 6 nucleotides and forms the pathogenic higher-order structures when abnormally expanded. There has been a great interest in the development of the small molecular therapeutic agents targeting the higher-order structure of repetitive nucleic acid, and some lead compounds have been found for the treatment of repeat diseases. In this paper, we summarize examples of repeat expansion diseases, causative sequences, their symptomatic features, and describe the mechanism of toxicity directly caused by repeat expansions and approaches for the development of therapeutic agents.

Key words

repeat expansion disease, causative sequences, DNA or RNA higher-order structure, small molecular ligand

要 旨

遺伝子中に含まれるリピート配列は、ステムループ構造やG4重鎖構造など様々な高次構造を形成することで、遺伝子発現を制御する重要な因子として働くことが知られている。しかしながら、原因は未だ不明であるが、このリピート配列の異常伸長が生じると、核内や細胞質内にて様々な毒性が発生することになり、難治性の遺伝性疾患を引き起こす。疾患の原因となるリピート配列の多くは、3-6塩基程度の短いリピート単位であり、正常リピート域を超えると異常な高次構造が形成され疾患の原因となることが示されている。これまでに、核酸の高次構造を標的とした低分子治療薬の開発が盛んに研究されており、いくつかの分子はリピート病治療に向けたリード化合物として見出されている。本稿では、リピート病の疾患例やその症状の特徴、原因リピート配列などについてまとめ、リピート配列が直接的な原因となる毒性の発現機序や治療薬開発に向けたアプローチについて記述する。

キーワード

リピート病、疾患原因配列、核酸高次構造、低分子リガンド

1. はじめに

リピート病とは、遺伝子中の特定の配列が異常に繰り返されることで発症する遺伝子疾患である。これまでに、数多くの遺伝子で様々な原因リピート配列が同定されてきたが、疾患ごとの発生機序が大きく異なることや、それぞれが希少疾患であることなどから、進行性の重篤な症状にも関わらず現在までに根本的な治療法は確立されていない。疾患の原因となるのは、3-12塩基の短い配列で構成されたリピート領域で、翻訳領域・非翻訳領域に関わらず、遺伝子中に広く分布している^{1,2)} (図1)。これに伴い、原因配列の分布位置や、リピートの種類・数の違いなどから、細胞内での毒性の発生過程が異なるため、リピート病の発生機序は以下のように分類されている³⁾。リピート配列が翻訳領域内に存在する場合は、翻訳後のタンパク質に異常なリピート数をもつアミノ酸領域が形成され、その細胞内凝集性から、多くは神経変性疾患を引き起こす (protein gain of function)。一方で、リピート配列が非翻訳領域に存在する場合は、転写阻害による遺伝子発現の抑制 (loss of function) や、転写後の異常 RNA による毒性 (RNA gain of function) などが疾患の原因となる。

2. 翻訳領域内の CAG リピート

CAG の三塩基はグルタミンをコードしており、翻訳領域内における CAG リピートの異常

伸長が原因となる疾患は、ポリグルタミン病と呼ばれている。その一つであるハンチントン病 (HD) は、*HTT* 遺伝子の翻訳領域内に存在する CAG リピートが異常伸長して発症する遺伝性の神経変性疾患である。舞踏運動、筋緊張異常、協調運動障害、認知障害などを特徴とし、世代を経るごとにリピート数が増加し重篤化する傾向がみられる。正常遺伝子中での CAG リピートは6-35回程度であるのに対して、異常遺伝子中では、36-121回のリピートが形成されており、翻訳の結果、グルタミンが異常に繰り返された領域をもつ神経障害性の凝集タンパク質が産生されている (図2)。また、*ATXN* など他の遺伝子中にも CAG のリピート領域が確認されており、原因遺伝子やフェノタイプなどにより疾患が分類されている⁴⁾。

治療薬開発に向けた研究として、リピート配列の形成する特殊な核酸構造を標的とする結合分子の開発が盛んに行われている。CAG リピートは、相補鎖である CTG リピートと正常な二本鎖 DNA を形成しているが、リピート数が異常に増大すると、鎖内でのグアニン-シトシン (G-C) の塩基対2つとアデニン-アデニン (A-A) のミスマッチ塩基対1つをリピート単位として含む準安定なステムループ構造が形成される。この時、相補鎖 CTG リピートは、チミン-チミン (T-T) のミスマッチ型ステムループ構造を形成する。これらの高次構造は形成と解離の平衡状態にあり、DNA 複製段階での核酸

リピート病の例		DRPLA HD (<i>HTT</i>) SBMA SCA1 SCA3 SCA6 SCA7 SCA17 (<i>TBP</i>)		FRDA (<i>FXN</i>)		DM2 (<i>CNBP</i>)		SCA10 (<i>ATXN10</i>)		BPES CCD CCHS HFG HPES ISSX MRGH OPMD SPD		DM1 (<i>DMPK</i>) HDL2 SCA8 (<i>ATXN8</i>)	
EPM1 (<i>CSTB</i>)	FXS FXTAS (<i>FMR1</i>)	SCA12	c9FTD/ALS (<i>C9ORF72</i>)	(CAG)n	(GAA)n	(CCTG)n	(ATTCT)n	(GCN)n	(CTG)n				
原因リピート													
(C_4GC_4GCG)n	(CGG)n (CAG)n		(G4C2)n	(CAG)n	(GAA)n (CCTG)n		(ATTCT)n		(GCN)n		(CTG)n		
Promoter	5'-UTR		Intron	Exon	Intron		Exon		Exon		3'-UTR		

図1 リピート病の原因配列と存在位置

構造の不安定性がリピート異常伸長の原因ではないかと考えられている。中谷らの研究グループは、このミスマッチ構造に着目し、A-A ミスマッチ領域に選択的に結合しステムループ構造を安定化する低分子リガンドの開発を行った⁵⁾ (図3)。この分子 (NA) は、Naphthyridine ユニットと 8-Azaquinolone ユニットがリンカーにて連結されており、それぞれグアニン塩基と3点で、アデニン塩基と2点で水素結合を形成するように設計されている。CAG 領域に対して2分子の NA が結合し、その際に隣接シトシン塩基がフリップアウトする構造が¹H-NMR 解析により示されている。この研究に関

する最新の報告では、異常伸長した CAG リピートを有する疾患モデルマウスに対して NA を投与することでリピート数の低減が認められており、実際にマウス脳内での HTT タンパクの凝集が抑制されることがわかった⁶⁾。著者らは、マウスの遺伝子修復系が関与しているメカニズムを予想しており、リピート数低減効果をもつ低分子薬の First-in-class として位置付けている。

3. 非翻訳領域内の CGG リピート

正常 *FMRI* 遺伝子の 5'-非翻訳領域 (5'-UTR) には、6-52リピートの CGG 配列が存在してお

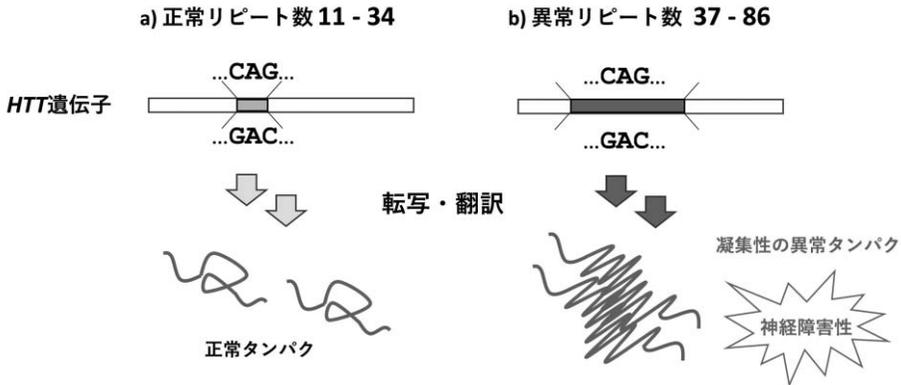


図2 CAG リピートによるポリグルタミンタンパクの産生

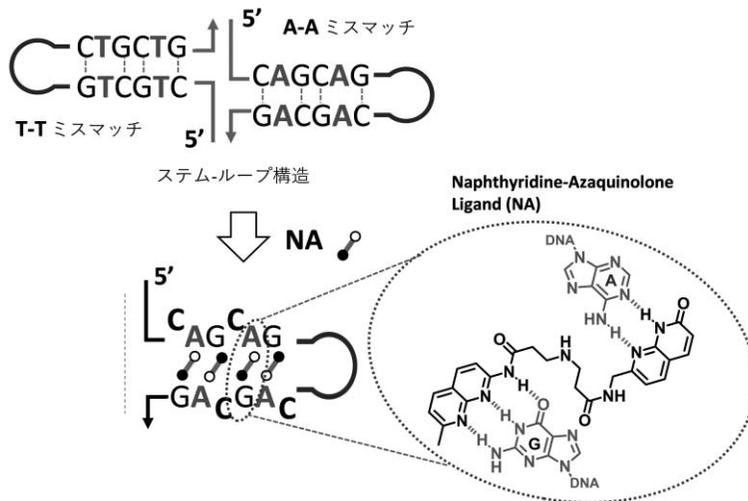
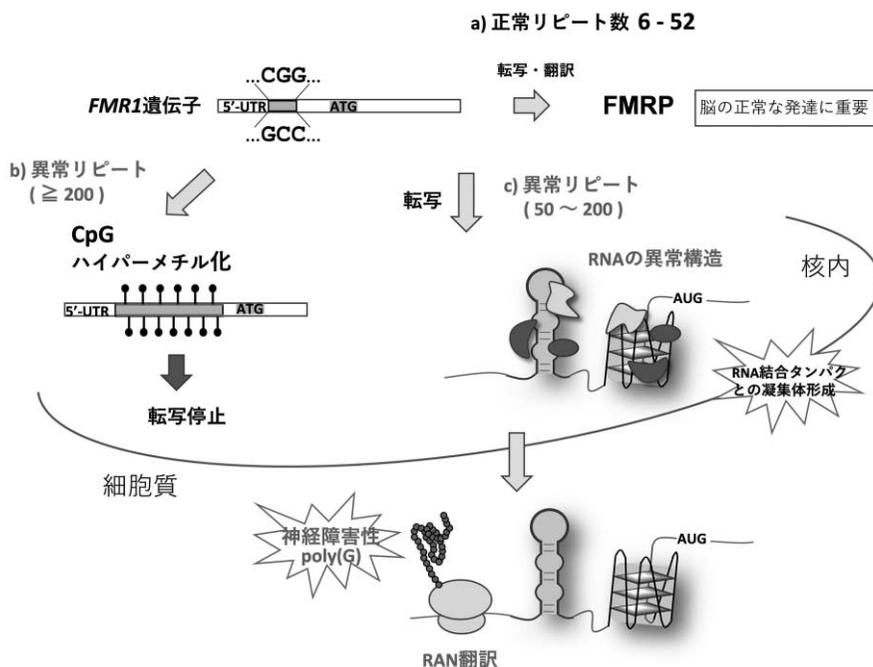


図3 A-A ミスマッチ部位を標的とする低分子リガンド

り、脳の正常発達に重要な働きを持つ FMRP の発現量を制御している (図 4-1)。脆弱 X 症候群 (FXS) の患者の遺伝子では、リピート数が 200 以上となっており、この結果シトシンのハイパーメチル化の発生によって *FMR1* 遺伝子のサイレンシングが生じ、重度の精神遅滞が引き起こされる⁷⁾。また、ヒストン H3K27 トリメチル化などの遺伝子抑制的なヒストン修飾が誘起されている経路も報告されている⁸⁾。一方で、リピート数が 50-200 の前変異の場合では、疾患の発生機序が全く異なる脆弱 X 関連振戦/失調症候群 (FXTAS) となる。FXTAS 患者の *FMR1* 遺伝子は転写され、異常 CGG リピート領域を含む RNA が合成される。このとき、開始コドンが必要としない特殊な翻訳が始まり、神経障害性のポリペプチドが合成される。この現象は、repeat-associated non-AUG (RAN) 翻訳と呼ばれ、リピート病の発症機序に重要な役割を果たしていると考えられている⁹⁾。RAN 翻訳の詳細な機構はまだ不明であるが、リピート RNA の形成する異常構造が翻訳開始を誘起している

と予想されている。CGG リピートの場合は、リーディングフレームの違いで、poly(G)、poly(A)、poly(R) の 3 種類のポリペプチドの産生が考えられるが、FXTAS 患者の細胞では、poly(G) が多く合成されていることがわかっている。この他にも、DGCR8 や Sam68 などの RNA 結合タンパクと RNA 凝集体を形成することが示されており、RNA 凝集による細胞毒性に加えて、microRNA プロセッシング異常や pre-mRNA スプライシング異常が生じている機構が報告されている^{10,11)}。

これらの疾患原因に対して、低分子的なアプローチが検討されている。上述の通り FXS の患者では、CpG ハイパーメチル化による *FMR1* 遺伝子のサイレンシングが生じている。遺伝子発現を回復させる試みとして、DNA メチル化阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジン (デシタビン) を用いる手法が報告されている。デシタビンは、DNA 複製段階でゲノム DNA に 5-アザシトシンとして取り込まれ、6 位での共有結合形成によりメチルトランスフェラーゼを



不可逆的に阻害することが知られており、DNA のメチル化レベルを低下させる分子として、癌をはじめとする様々な遺伝子疾患への適用が期待されている (図 4-2)¹²⁾。FXS の疾患モデル細胞実験では、デシタビンの投与により FMRP 合成量の回復がみられたものの、その後、再メチル化やヒストン修飾などが発生し遺伝子の再サイレンシングが生じてしまうことがわかっている¹³⁾。現在は、遺伝子発現を亢進させる働きをもつ各種低分子をデシタビンと併用する方法が検討されている¹⁴⁾。また、FXTAS の患者では、転写されて生じる異常 RNA が疾患の原因として考えられており、異常 RNA を標的とした低分子開発が行われている。Disney らのグループは、共有結合を介して強力に標的 RNA と複合体を形成する低分子リガンドを開発しており、RNA 凝集化の抑制や、リボソーム

進行の物理的なブロックによる RAN 翻訳の阻害など、治療効果が期待される結果が報告されている¹⁵⁾。

4. 非翻訳領域内の CTG リピート

DMPK 遺伝子の 3'-UTR に存在する CTG の三塩基リピートは、正常遺伝子中では 5-37 回のリピート数であるが、筋強直性ジストロフィー 1 型 (DM1) の患者の遺伝子中では 100-1,000 回のリピート数となっている。転写により生じる CUG リピート RNA は、U-U ミスマッチを含むステムループ構造を形成することが知られており、この異常構造体がスプライシング制御に重要な役割をもつ MBNL1 を捕捉する¹⁶⁾ (図 5)。その結果、正常なスプライシングによる成熟 mRNA の産生が抑制されることで様々なタンパク質の合成に障害が起り、全身症状が発生する。この他にも、MEF2 タンパクの翻訳阻害¹⁷⁾ や RAN 翻訳による毒性ポリペプチドの産生¹⁸⁾ などの経路が疾患の原因として報告されている。

Zimmerman らのグループは、水素結合を介して U-U ミスマッチ部位に選択的に結合するトリアミノトリアジン誘導体の開発に成功している。この分子は、ウラシル塩基間で合計 6 点の水素結合を形成可能であり、認識分子として高い選択性を有している (図 6 上)。また、結合親和性の増加のために、側鎖にはインターカレート分子であるアクリジン環が導入されており、MBNL1 との競合的な結合により治療効果

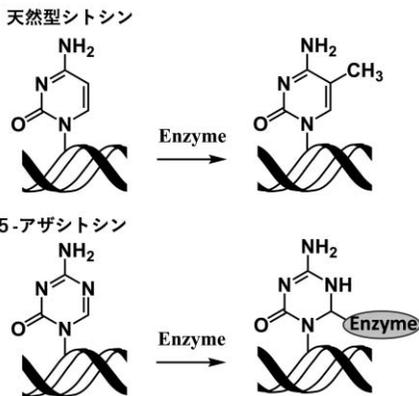


図 4-2 5-アザシトシンによるメチルトランスフェラーゼの不可逆阻害

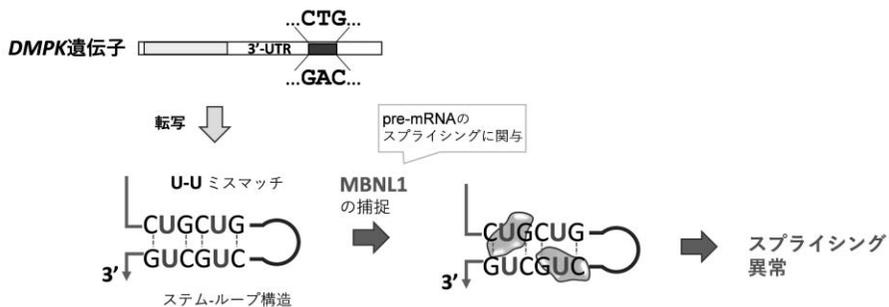


図 5 異常 CUG リピートによる MBNL タンパクの捕捉

が期待される¹⁹⁾ (図6左)。その後の報告では、トリアミノトリアジンを基本構造とし、側鎖にRNA切断活性を有するアミノ基やイミダゾール基を導入した新規分子が開発されており、異常伸長したCUGリピートRNAの選択的切断によりDM1疾患モデル細胞でのCUGリピートレベルの低減に成功している²⁰⁾ (図6右)。

5. 非翻訳領域内のG4C2リピート

C9ORF72遺伝子の第1イントロン内にはGGGGCC (G4C2) の6塩基リピート領域が含まれている。正常遺伝子では20以下のリピート数であるのに対し、異常遺伝子では250-2,000以上のリピート数となり前頭側頭型認知症/萎縮性側索硬化症 (c9FTD/ALS) の発症原因として同定されている。主な症状として、FTDでは認知機能の低下や行動・人格異常、ALSでは呼吸器系を含む進行性の筋力低下が認められ、これ

らの症状が併発するケースが多くみられる。患者の細胞内では、C9ORF72遺伝子からの転写により、G4C2の異常リピートを含むRNAが合成され、G4重鎖やヘアピン型などの異常構造が形成されていると考えられている。核内では様々なRNA結合タンパクと非特異的に結合しRNA凝集体が形成されており、細胞質ではRAN翻訳によるグリシンとプロリンのポリジペプチドが合成されている²¹⁾。

Disneyらのグループは、G4C2リピートRNAに選択的に結合する低分子化合物を報告している。この分子は、G4C2リピートの形成するG-Gミスマッチ部位にインターカレート結合し、リボソームの進行をブロックすることで、RAN翻訳を阻害している²²⁾ (図7)。また同グループは、細胞内RAN翻訳産物の蛍光定量評価を基盤とした低分子スクリーニング法を構築しており、有効な新規分子の探索や構造活性相

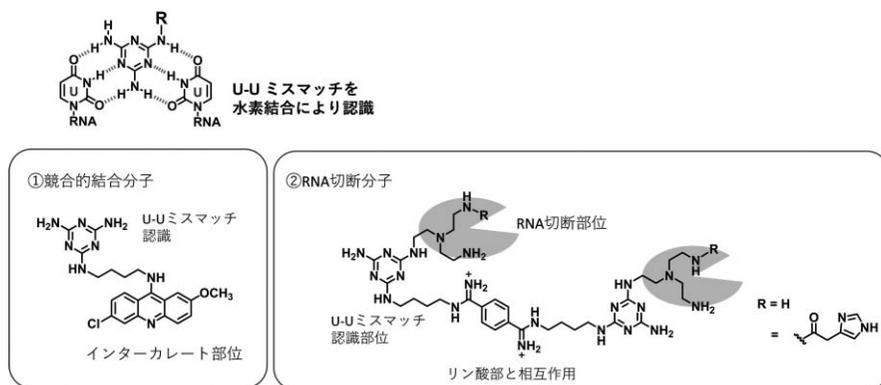


図6 U-U ミスマッチ部位に結合する低分子リガンド

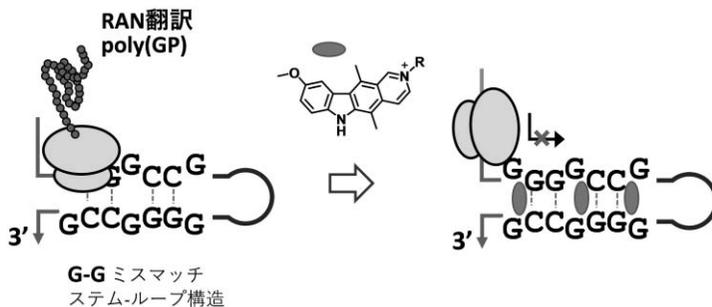


図7 G4C2リピートのRAN翻訳とRNA結合分子による阻害効果

関の検討を行っている。彼らの手法では、G4C2配列の RAN 翻訳産物の産生を示す nonATG-GFP レポーター遺伝子と、通常の翻訳を示す ATG-mCherry レポーター遺伝子を同時にトランスフェクションした系を用いており、タンパクの蛍光強度から GFP/mCherry 比を求めることで RAN 翻訳を選択的に阻害する低分子の大規模スクリーニングが可能となっている²³⁾ (図 8)。

6. おわりに

上述の通り、リピート病の治療効果が期待される低分子リード化合物が続々と報告されており治療薬開発への展開が大いに期待されている。我々のグループでも、リピート病の治療効果を期待した低分子開発を行っている。CGG リピート DNA の二本鎖構造を標的とする分子は、

Chromomycin A3 と呼ばれる天然物を模倣した DNA 結合部位に加え、リガンド間で Mg^{2+} 錯体を相互形成可能な部位が導入されており、CGG リピート配列上に集積する性質をもっている (図 9-1)²⁴⁾。また、標的を RNA とした分子設計もおこなっており、G-G ミスマッチ部位などのグアニン塩基と選択的に水素結合を形成する 1,3-ジアザフェノキサジン誘導体の開発に成功している (図 9-2)²⁵⁾。二量体型の本分子は、極めて高いグアニン選択性及び結合親和性を有しており、生体環境下での適用が強く期待される。現在これらの化合物について、細胞実験による評価が進行中である。

リピート病の治療法開発は、今回記述した創薬研究以外にも、様々な視点やアプローチから取り組まれており、根本的な治療法の創出・確立に対する期待が高まっている。

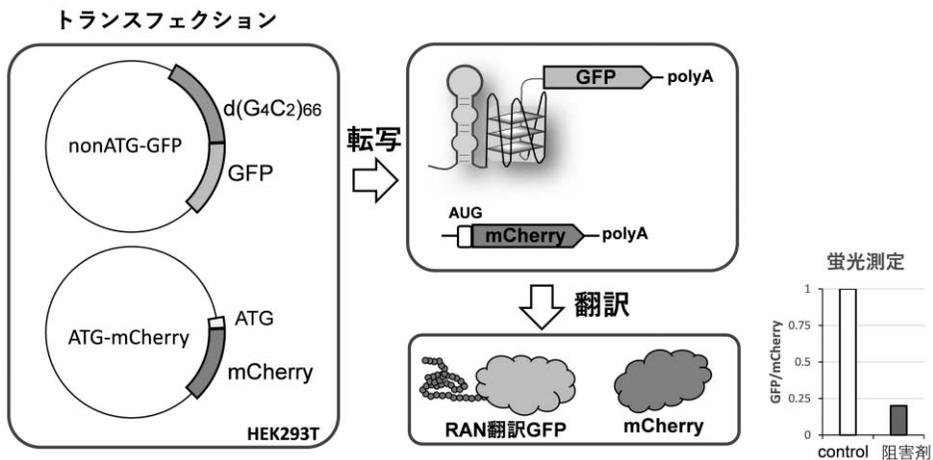


図 8 RAN 翻訳産物の定量と阻害剤スクリーニング法の概略図

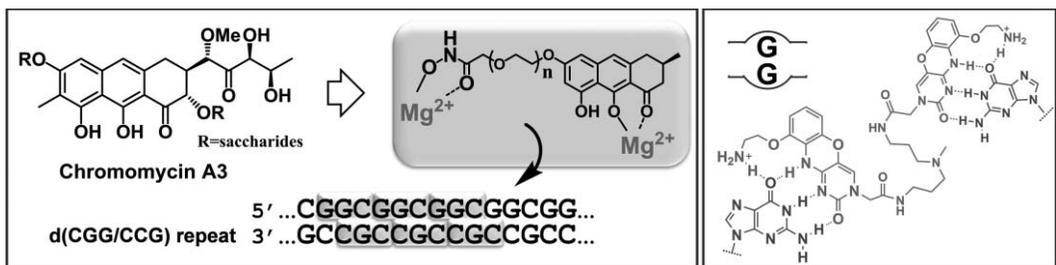


図 9-1 CGG リピート DNA 集積分子²⁴⁾

図 9-2 G-G ミスマッチ認識分子²⁵⁾

略語一覧

HD: Huntington's disease (ハンチントン病)
HTT: huntingtin
'H-NMR: proton nuclear magnetic resonance
ATXN: ataxin
NA: Naphthyridine, 8-Azaquinolone
FMR1: fragile X mental retardation 1
UTR: untranslated region
FMRP: fragile X mental retardation protein
FXS: fragile X syndrome (脆弱X症候群)
FXTAS: fragile X tremor/ataxia syndrome (脆弱X関連振戦/失調症候群)
RAN translation: repeat-associated non-AUG (ATG) translation
poly(G), (A), (R): poly (glycine), (alanine), (arginine)
DGCR8: DiGeorge syndrome critical region 8
Sam68: Src-associated substrate in mitosis of 68 kDa
DMPK: myotonic dystrophy protein kinase
DM: myotonic dystrophy (筋強直性ジストロフィー)
MBML1: muscleblind like splicing regulator 1
MEF2: myocyte enhancer factor 2
C9orf72 (chromosome 9 open reading frame 72)
FTD/ALS: frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis (前頭側頭型認知症/萎縮性側索硬化症)
GFP: green fluorescent protein

引用文献

- 1) Pearson, C. E., Edamura, K. N. & Cleary, J. D. "Repeat instability: Mechanisms of dynamic mutations". *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 729-742 (2005).
- 2) Mirkin, S. M. "Expandable DNA repeats and human disease". *Nature*, **447**, 932-940 (2007).
- 3) La Spada, A. R. & Taylor, J. P. "Repeat expansion disease: Progress and puzzles in disease pathogenesis". *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 247-258 (2010).
- 4) Fan, H. C., Ho, L. I., Chi, C. S., Chen, S. J., *et al.* "Polyglutamine (PolyQ) diseases: Genetics to treatments". *Cell Transplant.*, **23**, 441-458 (2014).
- 5) Nakatani, K., Hagihara, S., Goto, Y., Kobori, A., *et al.* "Small-Molecule Ligand Induces Nucleotide Flipping in (Cag) n Trinucleotide Repeats". *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 39-43 (2005).
- 6) Nakamori, M., Panigrahi, G. B., Lanni, S., Gall-Duncan, T., *et al.* "A slipped-CAG DNA-binding small molecule induces trinucleotide-repeat contractions in vivo". *Nat. Genet.*, **52**, 146-159 (2020).
- 7) Jin, P., Alisch, R. S. & Warren, S. T. "RNA and microRNAs in fragile X mental retardation". *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1048-1053 (2004).
- 8) Kumari, D., Gazy, I. & Usdin, K. "Pharmacological reactivation of the silenced FMR1 gene as a targeted therapeutic approach for fragile X syndrome". *Brain Sci.*, **9**, 1-18 (2019).
- 9) Todd, P. K., Oh, S. Y., Krans, A., He, F., *et al.* "CGG repeat-associated translation mediates neurodegeneration in fragile X tremor ataxia syndrome". *Neuron*, **78**, 440-455 (2013).
- 10) Sellier, C., Freyermuth, F., Tabet, R., Tran, T., *et al.* "Sequestration of DROSHA and DGCR8 by expanded CGG RNA Repeats Alters micro RNA processing in fragile X-associated tremor/ataxia syndrome". *Cell Rep.*, **3**, 869-880 (2013).
- 11) Sellier, C., Rau, F., Liu, Y., Tassone, F., *et al.* "Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients". *EMBO J.*, **29**, 1248-1261 (2010).
- 12) Christman, J. K. "5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy". *Oncogene*, **21**, 5483-5495 (2002).
- 13) Tabolacci, E., Mancano, G., Lanni, S., Palumbo, F., *et al.* "Genome-wide methylation analysis demonstrates that 5-aza-2'-deoxycytidine treatment does not cause random DNA demethylation in fragile X syndrome cells". *Epigenetics and Chromatin*, **9**, 1-15 (2016).
- 14) Kumari, D. & Usdin, K. "Sustained expression of FMR1 mRNA from reactivated fragile X syndrome alleles after treatment with small molecules that prevent trimethylation of H3 K27". *Hum. Mol. Genet.*, **25**, 3689-3698 (2016).
- 15) Yang, W. Y., Wilson, H. D., Velagapudi, S. P. & Disney, M. D. "Inhibition of non-ATG

- translational events in cells via covalent small molecules targeting RNA”. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 5336–5345 (2015).
- 16) Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M. G., *et al.* “Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy”. *EMBO J.*, **19**, 4439–4448 (2000).
- 17) Kalsotra, A., Singh, R. K., Gurha, P., Ward, A. J., *et al.* “The Mef2 transcription network is disrupted in myotonic dystrophy heart tissue dramatically altering miRNA and mRNA expression”. *Cell Rep.*, **6**, 336–345 (2015).
- 18) Zu, T., Gibbens, B., Doty, N. S., Gomes-Pereira, M., *et al.* “Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 260–265 (2011).
- 19) Arambula, J. F., Ramisetty, S. R., Baranger, A. M. & Zimmerman, S. C. “A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 16068–16073 (2009).
- 20) Nguyen, L., Luu, L. M., Peng, S., Serrano, J. F., *et al.* “Rationally Designed Small Molecules That Target Both the DNA and RNA Causing Myotonic Dystrophy Type 1”. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 14180–14189 (2015).
- 21) Gendron, T. F., Bieniek, K. F., Zhang, Y. J., Jansen-West, K., *et al.* “Antisense transcripts of the expanded C9ORF72 hexanucleotide repeat form nuclear RNA foci and undergo repeat-associated non-ATG translation in c9 FTD/ALS”. *Acta Neuropathol.*, **126**, 829–844 (2013).
- 22) Su, Z., Zhang, Y., Gendron, T. F., Bauer, P. O., *et al.* “Discovery of a Biomarker and Lead Small Molecules to Target r(GGGGCC)–Associated Defects in c9FTD/ALS”. *Neuron*, **83**, 1043–1050 (2014).
- 23) Wang, Z. F., Ursu, A., Childs-Disney, J. L., Guertler, R., *et al.* “The Hairpin Form of r(G4 C2)exp in c9ALS/FTD Is Repeat-Associated Non-ATG Translated and a Target for Bioactive Small Molecules”. *Cell Chem. Biol.*, **26**, 179–190.e12 (2019).
- 24) Murase, H., Wakisaka, G., Noguchi, T. & Sasaki, S. “Protection of all cleavable sites of DNA with the multiple CGCG or continuous CGG sites from the restriction enzyme, indicative of simultaneous binding of small ligands”. *Bioorganic Med. Chem.*, **28**, 115730 (2020).
- 25) Murase, H. & Nagatsugi, F. “Development of the binding molecules for the RNA higher-order structures based on the guanine-recognition by the G-clamp”. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **29**, 1320–1324 (2019).