

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業(早期探索的・国際水準臨床研究事業))
分担研究報告書

京都大学臨床研究ハイウェイを活用した難治疾患・がん等の
新規治療法の開発

研究分担者

萩原 正敏	京都大学医学研究科	形態形成機構学	教授
喜井 勲	京都大学医学研究科	形態形成機構学	特定助教
高橋 良輔	京都大学医学研究科	神経内科学	教授

研究要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に対する有効な治療法はなく、現在、DMD に対する治療として、エクソンスキッピング誘導による治療法の開発が試みられている。しかし、このエクソンスキッピング誘導療法の治療薬候補物質は、アンチセンス・オリゴヌクレオチド等であり、有効性・安全性・生産性などの面において様々な問題がある。本研究の候補化合物は、我々が世界で初めて発見した、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物 (Cik 阻害剤) である。本化合物の発見は、エクソンスキッピング誘導療法を低分子化合物により可能とする、全く新しい、臨床応用性が極めて高い治療法の確立に大きく貢献するものである。

ダウン症の原因療法的な治療薬は皆無であり、本治療薬の開発は患者本人だけでなく、患者家族及びそれを支える社会に対しても大きな副音をもたらすことが予想される。本研究の候補化合物は、21 番染色体のダウン症責任領域内に含まれる DYRK1A を阻害する低分子化合物であることから、原因療法につながる可能性が高い。さらに、治験により DYRK1A 阻害剤の POC が明らかとなれば、ダウン症に対する新たな創薬標的が見出されたことにもつながり、この分野の研究進歩にも大いに貢献できると考えられる。

A. 研究目的

本研究は、エクソンスキッピングを誘導する Cik 阻害剤について、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) 治療薬としてヒトにおける POC の取得を目的とする。また、ダウン症患者に好発するアルツハイマー病などの精神疾患に対する治療薬の創出を目的とする。

B. 研究方法

【筋ジストロフィー】

DMD は、進行性の筋萎縮を呈する極めて重篤な遺伝病であり、その原因はジストロフィン遺伝子の異常による骨格筋のジストロフィン欠損である。DMD に対する有効な治療法はなく、現在、特定の欠陥のあるエクソンのスキッピングを誘導して、エクソンの配列を mRNA から取り除き、アミノ酸読み取り枠をインフレームにかえ、サイズの小さなジストロフィンを発現させるという、エクソンスキッピング誘導治療の開発が試みられている。このような療法の候補として、様々なアンチセンス・オリゴヌクレオチドがあるが、様々な問題点がある。一方、本研究で用いる Cik 阻害剤 TG003 は、世界で初めて発見された、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングを誘導する低分子化合物である。革新的細胞解析研究プログラム (セルイノベーション) において、C2C12 筋芽細胞株を用いたトランスクリプトーム解析で、TG003 が影響を与える遺伝子の網羅的解析を行い、安全評価のための基礎データが取得された。そこで、この基礎データから薬効および副作用のバイオマーカーを見出し、候補化合物の最適投与量などを算定する評価系を構築し、開発化合物の薬効および毒性をモニターしていく計画を想定している。加えて本事業では、TG003 と Cik 阻害能を示す構造類似化合物 (GIF304 など) の、ジストロフィン遺伝子のエクソンスキッピングなどの薬効、および代謝・毒性データを取得し、DMD の治療薬として最適な候補化合物を選択して、本研究を進める。さらに、平成 24 年度に、筋ジストロフィー治療薬候補化合物の中から、マウス炎症性疼痛モデルに投与することで鎮痛作用を発揮する化合物群を見出した。筋ジストロフィーは臨床症状として筋肉などの痛みが現れるため、鎮痛薬が処方されることから、筋ジストロフィー患者の抱える疼痛を同時に緩和できる治療薬としての可能性を探るため、薬理作用などの検討を進める。

【ダウン症患者におけるアルツハイマー病等の精神疾患】

ダウン症候群は、母体の出産年齢が 35 歳以上で約 400 人に 1 人と高い割合で発症する染色体異常疾患の中で最も頻度が高い疾患であり、治療薬は未だ皆無である。DYRK1A は、ダウン症候群の原因である第 21 番染色体トリソミーのダウン症責任領域に位置し、マウスでは DYRK1A の単独過剰発現によりダウン症に類似した精神・神経疾患を発症する (J Neuropathol Exp Neurol. 2004; 63:429-440, Hum Mol Genet. 2001;10:1915-1923)。さらに、DYRK1A 遺伝子はダウン症患者及びダウン症モデルマウスの脳内で発現が亢進している (Neurosci Lett. 2007;413:77-81)。これらのことは、DYRK1A がダウン症候群における精神・神経疾患発症の原因因子で

ある可能性を強く示唆している。一方、アルツハイマー病発症の原因では、現在タウ蛋白質の異常リン酸化が最も有望視されている。DYRK1A は、タウ蛋白質の異常リン酸化を誘導することが示唆されていることから、DYRK1A はアルツハイマー病様の精神・神経疾患と密接な関係を持つリン酸化酵素であると考えられ、その活性を阻害すれば、それらの精神・神経疾患の治療や予防が可能になると期待できる。加えて DYRK1A などに対する阻害剤は、他の疾患に対する治療効果も期待されるので、これらの検討を進める。本事業では創製に成功した DYRK1A 阻害剤やそのバックアップ化合物の *in vivo* 行動薬理評価を進めると共に、製剤化検討をおこない、最適な開発化合物を決定し、毒性試験・安全性薬理試験・薬効薬理試験・薬物動態試験データを取得し、臨床試験への導入を目指す。

(倫理面への配慮)

本研究において実施する動物実験については、京都大学動物実験委員会の「動物実験関連法等 - 動物の愛護・管理」を遵守し実施した。また、動物実験の一部は受託試験であり、AAALAC International (The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International/国際実験動物管理公認協会) により認証されている(認証番号:001107)試験施設において、「動物の愛護及び管理に関する法律」及び「株式会社イナリサーチ動物実験指針」を遵守し、試験施設の動物実験審査委員会(IACUC)による審査を受けた試験計画書に従って適正に実施され、あるいは、動物の愛護及び管理に関する法律「昭和48年法律第105号」の改正法(日本)(平成23年8月30日)及び株式会社浜松ファーマリサーチの動物実験規定に基づいて実施された(動物実験計画書承認番号 HPRIRB-104)。

C. 研究結果

【筋ジストロフィー】

開発候補化合物を用いて製剤規格化、非臨床試験、GMP製剤化を行った後、臨床治験或いは臨床研究におけるPOCの取得を目指す。平成25年度までに、薬効薬理試験や薬物動態試験を行った結果、TG003よりも経口吸収性に優れ、経口投与可能な構造類似化合物を開発候補化合物として見出している。さらに、筋ジストロフィー患者が抱える疼痛も同時に緩和出来る可能性を有する開発候補化合物も見出している。平成26年度は毒性試験や安全性薬理試験を行うために経口投与可能な候補化合物の大量合成検討を実施した。医薬品開発の第一段階としてGLP基準に準拠した非臨床試験が必要であり、そのためにはGLP基準に準拠した候補化合物原体が必要とされる。原体製造には原体の原料を調達する必要があるが、合成に必要とされる量の原料を購入することができないため、まずその原料の合成検討を委託した。その後、原料の合成が翻語なく進められると確認できたため、さらに原料のスケールアップ合成検討を委託した。スケールアップ合成も予定通り進められたことから、原体の製造を実施し、候補化合物5.8 kgを取得した。一方で、TG003とは異なる遺伝子配列を操作できる選択的スプライシング介入化合物RECTASを発見した(Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:2764)。これはTG003とは異なる作用、すなわちエクソンインクルージョンを誘導する活性を示すことから、これまで対象外としていた患者を治療できる可能性を見出した。

【ダウン症患者におけるアルツハイマー病等の精神疾患】

開発候補化合物を用いて、バイオマーカーを指標とした *in vivo* での薬効評価を実施した後、行動薬理評価を進め、さらに毒性試験などの非臨床試験を行う。製剤化と原薬の大量合成を検討後に薬事戦略相談を行って、臨床治験に取り組むためのプロトコル作成を進める。平成25年度までに、候補化合物の *in vivo* での薬効や、神経幹細胞での安全性の確認、更に、ダウン症の白血病治療にも効果を有することを明らかにしている。また、原薬の大量合成経路確立を目的として、開発候補化合物および、その中間体化合物のスケールアップ合成を検討し、入手性・反応条件・工程数が優位である合成ルートを確認させている。平成26年度は、様々な精神疾患モデル動物を用いた薬効評価を進め、アルツハイマー病モデル以外に、コルチコステロン投与によるうつ様モデルや社会的ストレスうつ病モデルにおいて治療効果を有することを見出した。具体的には、明暗往来テストにおいて、マウスへのコルチコステロン投与による不安様行動の亢進が、30 mg/kgの開発化合物を3週間連日経口投与することによって改善された。あるいは、社会挫折ストレスうつ病モデルの社会忌避行動が、候補化合物の1週間連日経口投与によって改善された。また、平成25年度に合成した候補化合物を用いて遺伝毒性試験を委託し、「細菌を用いる復帰突然変異試験」において候補化合物の遺伝子突然変異誘発性が陰性であること、「マウス *in vivo* 小核試験」において候補化合物の赤血球小核誘発能が陰性であることを確認した。

一方、革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業(厚生労働省)「アルツハイマー病に対する創薬の非臨床評価及び薬剤疫学を踏まえた実臨床における留意点及び課題」(国立大学法人 京都大学大学院医学研究科 平成27年2月)において、ダウン症患者におけるアルツハイマー病の診断基準が定まっていないこと、認知機能とは異なる新規のエンドポイントを開発して POC 試験を組む必要があることが明らかとなり、一般のアルツハイマー病での治験は莫大な費用が必要となることから、2014年度は、対象疾患の見直しを行うとともに製薬企業へのライセンスアウトを目指して交渉を進めた。

D. 考察

平成26年度の研究結果を考慮するに、本研究「筋ジストロフィー」と「ダウン症患者におけるアルツハ

イマー病等の精神疾患」はともに順調に推進している。平成26年度は筋ジストロフィー治療薬候補化合物の大量合成を実施し、平成27年度における毒性試験や安全性薬理試験の実施が可能となった。臨床試験へ向けて着実に前進していると考えられる。また、新規の選択的スプライシング介入化合物 RECTAS の発見は、特筆すべき成果であり、臨床応用への可能性が期待できることから、さらに検討を進めるべきであると考えられる。精神疾患治療薬候補化合物についても、平成26年度は遺伝毒性試験を実施した一方で、対象疾患の可能性を探る検討や製薬企業との交渉を進めており、プロジェクトの「出口」であるライセンスアウトに向けて推進していると考えられる。

E . 結論

筋ジストロフィーに関しては、平成26年度に大量合成した候補化合物原体を用いて、原薬・製剤の規格化を進め、被験物質の特性試験、安定性試験、細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験などの毒性試験や中枢神経系・呼吸・循環器などへの薬理作用を評価する安全性薬理試験を開始する。さらに、医師主導臨床治験或いは臨床研究プロトコルの検討および作成を進める。同時に、鎮痛作用メカニズムの解明や新規の選択的スプライシング介入化合物の適応を目指して検討を進める。

アルツハイマー病等の精神疾患に関しては、アルツハイマー病、タウオパチー、パーキンソン病、うつ病など、様々な適応疾患への可能性を探りながら、臨床治験のプロトコル検討を進める。同時に、安全性薬理試験・毒性試験の検討も行う。また、治験費用獲得のため、製薬企業へのライセンスアウトを目指して交渉を行う。

F . 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

G . 研究発表

1. 論文発表

1) Yamamoto M, Onogi H, Kii I, Yoshida S, Iida K, Sakai H, Abe M, Tsubota T, Ito N, Hosoya T, and Hagiwara M.

CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses.

J Clin Invest. 2014;124(8):3479-3488

2) Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Güntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, Hagiwara M, Kuroyanagi H, and Muto Y.

RBFOX and SUP-12 sandwich a guanine base to form a stable complex and regulate tissue-specific splicing.

Nat. Struct. Mol. Biol. 2014;21(9):778-786

3) Yoshida M, Kataoka N, Miyauchi K, Ohe K, Iida K, Yoshida S, Nojima T, Okuno Y, Onogi H, Usui T, Takeuchi A, Hosoya T, Suzuki T, and Hagiwara M.

Rectifier of aberrant mRNA splicing recovers tRNA modification in familial dysautonomia.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(9):2764-2769.

2. 学会発表

【国際】

1) Masatoshi Hagiwara

"Challenges to cure genetic diseases with RNA-targeting chemical compounds"

2014 COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES RNA Biology

2014.11.10-14 Suzhou, China

会場：Suzhou Industrial Park Conference Center

発表：2014年11月12日（口頭）

2) Akihide Takeuchi, Kei Iida, Kensuke Ninomiya, Mikako Ito, Kinji Ohno, Masatoshi Hagiwara

"RNA-Binding Protein Sfpq is required for the transcriptional elongation of long neuronal genes essential for brain development and relating to schizophrenia"

2014 COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES RNA Biology

2014.11.10-14 Suzhou, China

会場：Suzhou Industrial Park Conference Center

発表：2014年11月14日（口頭）

3) Akihide Takeuchi, Kei Iida, Kensuke Ninomiya, Mikako Ito, Kinji Ohno, **Masatoshi Hagiwara**
"RNA Binding Protein Sfpq is required for the expression of schizophrenia-related long neuronal genes"
Society for Neuroscience 2014 Annual Meeting
2014.11.15-19 Washington DC, USA
会場：Washington DC Convention Center
発表：2014年11月18日（ポスター）

【国内】

- 1) 二宮賢介、佐古有季哉、**萩原正敏**
「変異ジストロフィン遺伝子の新規エキソスキップ誘導法による筋ジストロフィー治療法開発の試み」
第9回日本ケミカルバイオロジー学会年会
9th Annual Meeting of Japanese Society for Chemical Biology
2014.6/11-13, 大阪
会場：大阪大学 豊中キャンパス 大阪大学会館
発表：2014年6月12日（ポスター）
- 2) 豊本雅靖、**喜井勲**、栗原崇、木村亮、小野木博、山本誠、吉田優、細谷孝充、**萩原正敏**
「副作用を示さない新規疼痛治療薬候補化合物の発見」
第9回日本ケミカルバイオロジー学会 年会
9th Annual Meeting of Japanese Society for Chemical Biology
2014.6.11-13, 大阪
会場：大阪大学 豊中キャンパス 大阪大学会館
発表：2014年6月12日（口頭）
- 3) **喜井勲**、奥野友紀子、隅田有人、後藤利保、吉田優、澁谷浩司、安倍美奈子、伊藤暢聡、細谷孝充、**萩原正敏**
「リン酸化酵素 DYRK1A のフォールディング中間体を標的とした新規阻害剤の開発」
第125回日本薬理学会近畿部会 岡山
2014.6.20
会場：岡山コンベンションセンター
発表：2014年6月20日（金）14:30～15:30（口演）
- 4) 片岡直行、吉田真弓、宮内健常、大江賢治、薄井知美、鈴木勉、**萩原正敏**
「家族性自律神経失調症における IKBKAP 遺伝子の異常スプライシングの低分子化合物による是正」
第16回日本RNA学会年会
2014.7/23-25
会場：ウイנקあいち
発表：2014年7月23日（口頭）
- 5) 王丹、二宮賢介、北畠真、**萩原正敏**、大野睦人、片岡直行
「ヒト神経細胞内における翻訳休止状態の mRNA 輸送複合体」
第16回日本RNA学会年会
2014.7.23-25
会場：ウイנקあいち
発表：2014年7月25日（口頭）
- 6) 武内章英、飯田慶、二宮賢介、坪田智明、出縄政嗣、伊藤美佳子、大野欽司、**萩原正敏**
「RNA 結合タンパク質 Sfpq は、統合失調症に関連する神経特異的な長い遺伝子の転写に必須である」
第16回日本RNA学会年会
2014.7.23-25
会場：ウイנקあいち
発表：2014年7月24日（ポスター）

7) 栗原崇、櫻井絵里、豊本雅靖、**喜井勲**、川元大輔、朝田俊秀、田邊勉、吉村恵、**萩原 正敏**、宮田篤郎
「炎症性疼痛モデルマウスに対するカゼインキナーゼ1(CK1)阻害薬の抗侵害効果」
第37回日本神経科学大会
Neuroscience2014, The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
2014.9/11.13
会場：パシフィコ横浜
発表：2014年9月11日（ポスター）

8) 祖納元りえ、**喜井勲**、小池悠華、**萩原正敏**
「リン酸化酵素とシャペロンの結合を指標とした阻害剤評価系の構築」
第37回日本分子生物学会年会
2014.11.25-27 横浜
会場：パシフィコ横浜
発表：2014年11月27日（ポスター）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

【筋ジストロフィー】

開発候補化合物の特許は、2004年1月に出願済みで、アメリカ、オーストラリアでは特許査定となっている。
出願番号：特願2010-146699
発明者：**萩原正敏**、片岡直行、松尾雅文、西田篤史
発明の名称：遺伝性疾患の予防・改善剤
出願人：国立大学法人神戸大学 国立大学法人東京医科歯科大学
日本出願日：2010年6月28日
PCT出願日：2011年6月27日（PCT/JP2011/003655）

上記とは別に、開発候補化合物の特許として、本学と国立大学法人東京医科歯科大学および国立大学法人鹿児島大学との共同出願で2013年に出願を行った。

出願番号：特願2013-261396
発明者：**萩原正敏**、豊本雅靖、細谷孝充、吉田優、栗原崇
発明の名称：疼痛に関する化合物及び医薬組成物
出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人鹿児島大学
日本出願日：2013年12月18日

開発化合物が対象とする異常スプライシングとは異なる原因の異常スプライシングを是正できるスプライシング操作薬に関する特許として、本学と国立大学法人東京医科歯科大学との共願で2013年に出願を行った。

出願番号：特願2013-261396
発明者：**萩原正敏**、吉田優、細谷孝充
発明の名称：FD薬スクリーニング
出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学
日本出願日：2013年7月12日

【ダウン症患者におけるアルツハイマー病】

開発候補化合物の特許は、本学と国立大学法人東京医科歯科大学および（株）キノファーマとの共願で2012年に出願を行った。

出願番号：特願2012-168850
発明者：**萩原正敏**、小野木博、**喜井勲**、細谷孝充、隅田有人
発明の名称：精神神経疾患又は悪性腫瘍に関する化合物及び医薬組成物
出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学、株式会社キノファーマ
日本出願日：2012年7月30日

上記に関連する特許として、本学と国立大学法人東京医科歯科大学との共願で2012年に出願を行った。

出願番号：特願2012-129094
発明者：**萩原正敏**、**喜井勲**、細谷孝充、隅田有人、吉田優
発明の名称：スクリーニング方法、タンパク質の不安定性及び/又は安定性を誘導する物質、及び、タンパク質の活性評価
出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法人東京医科歯科大学
日本出願日：2012年6月6日

開発候補化合物の新たな用途の特許は、本学より2013年に出願を行った。

出願番号：特願2013-252443
発明者：秋原正敏、小林亜希子
発明の名称：神経新生に関する化合物及び医薬組成物
出願人：国立大学法人京都大学
日本出願日：2013年12月5日

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし