

主論文の要旨

**Selective suppression of polyglutamine-expanded
protein by lipid nanoparticle-delivered siRNA
targeting CAG expansions in the mouse CNS**

マウス中枢神経系における、CAG リpeat 延長を標的とした
脂質ナノ粒子送達 siRNA によるポリグルタミン伸長蛋白の
選択的抑制

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 神経内科学分野

(指導：勝野 雅央 教授)

蛭薙 智紀

【緒言】

ポリグルタミン病はシトシン-アデニン-グアニン(CAG)リピート延長を原因として発症する遺伝性神経変性疾患群の総称であり、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疾患が含まれる。異常延長CAGリピート由来のポリグルタミン伸長蛋白が細胞内に蓄積し、中枢神経系の特定の領域の神経細胞が変性することが発症の原因と考えられている。例えばSBMAでは運動ニューロン、ハンチントン病では大脳基底核や大脳皮質、脊髄小脳変性症では小脳が選択的に障害され、運動機能障害や認知機能障害などの進行性の神経脱落症状を呈する。

原因遺伝子を標的としたアンチセンス核酸(ASO)や低分子干渉RNA(siRNA)などの核酸医薬を用いてポリグルタミン伸長蛋白を減少させることは、ポリグルタミン病の有力な治療戦略の一つであり、ハンチントン病の原因遺伝子であるハンチンチン(*HTT*)を標的とするASOを用いた臨床試験が現在行われている。CAGリピートを標的とする核酸医薬はもう一つの治療戦略であり、共通するリピート配列を標的とするため、ポリグルタミン病全体に適応可能な治療薬となる可能性がある。しかし、正常なCAGリピートを有する蛋白は中枢神経系において様々な役割を担っており、正常および異常CAGリピート由来蛋白の同時ノックダウンは神経毒性が生じる可能性がある。近年、CAGリピートを標的とする二本鎖siRNA(CAG-siRNA)に中央ミスマッチや人工核酸を加えることで、伸長ポリグルタミン蛋白を選択的に発現抑制可能なことが細胞実験レベルで報告されているが、生体内での検証は行われていない。

本研究ではCAGリピートに相補的な配列に中央ミスマッチを加え、さらに一部を人工核酸であるunlocked nucleic acid(UNA)に置換したsiRNAを新たに作成し、SBMAモデル細胞を用いてポリグルタミン伸長蛋白の発現抑制効果および選択性を検証した。さらに、脂質ナノ粒子を用いてSBMAおよびハンチントン病モデルマウスに投与することで、同siRNAの生体内でのポリグルタミン伸長蛋白の発現抑制効果および選択性を評価した。

【対象及び方法】

本研究ではまず、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイにより一部の配列をUNAで置換したCAG-siRNAのスクリーニング行なった後、候補CAG-siRNAをSBMA患者および健常者由来の皮膚線維芽細胞に投与し、ウェスタンブロット法によりポリグルタミン伸長アンドロゲン受容体(AR)および正常ARに対する抑制効果を検証した。

つぎに、eGFPのmRNAをLipid-enabled UNA modified RNA(LUNAR®)とよばれる脂質ナノ粒子のデリバリーシステムに抱合(LUNAR-eGFP)した後、新生児マウスの脳室内に投与し、蛍光実態顕微鏡、免疫組織染色およびウェスタンブロット法によりeGFPの発現量を評価することで、中枢神経系におけるLUNARの分布範囲を検証した。

最後に、線維芽細胞による実験でポリグルタミン伸長AR発現を選択的に抑制したCAG-siRNAをLUNARに抱合し、正常ヒトAR遺伝子(AR24Q)またはCAGリピート延長ヒトAR遺伝子(AR97Q)を有するトランスジェニックマウスの脳室内に投与し、

生体内におけるポリグルタミン伸長 AR 蛋白の発現抑制効果および選択性を評価した。さらに、同 siRNA をハンチントン病モデルマウス (R6/2 マウス) の脳室内および AR97Q マウスの骨格筋にも投与し、ポリグルタミン伸長 HTT および骨格筋におけるポリグルタミン伸長 AR の発現抑制効果も検証した。

【結果】

レポーターアッセイによるスクリーニングで候補となった CAG-siRNA を SBMA 患者および健常者由来の線維芽細胞に投与し、ポリグルタミン伸長 AR に対する抑制効果および選択性を検証した。CAG リピートに完全に相補的な配列を有する siRNA (REP) は、25 nM の濃度において正常 AR およびポリグルタミン伸長 AR のどちらも抑制したのに対し、CAG リピートに相補的な配列に中央ミスマッチおよびアンチセンス鎖の 9 番目 (REPU9) 、または 9 番目と 10 番目 (REPU910) を UNA に置換した CAG-siRNA はポリグルタミン伸長 AR を選択的に抑制した (Fig. 1A-C) 。特に REPU910 は高い選択性を示したことから、同 siRNA を低濃度における効果も検証したところ、REPU910 は 2.5-5 nM において正常な AR をほとんど抑制せずにポリグルタミン伸長 AR を 40-65% 減少させることが明らかとなった (Fig. 1D and E) 。

つぎに LUNAR-eGFP (1800 ng) を生後 1 日のマウス側脳室内に投与し、生後 4 日の時点で中枢神経系での分布範囲を評価したところ、eGFP の発現は嗅球や前頭葉～側頭葉皮質で高く、視床や小脳では中程度の発現を認めたが、脳幹や脊髄では eGFP の検出が困難であった (Fig. 2) 。

最後に、REPU910 を LUNAR に抱合し (LUNAR-REPU910) 、生後 1 日の AR97Q および AR24Q マウスの側脳室内に投与し、生後 4 日時点での側頭葉皮質および小脳での AR 蛋白量を評価した。LUNAR-REPU910 (1800 ng) は AR97Q マウスの側頭葉皮質および小脳におけるポリグルタミン伸長 AR の発現を、それぞれ 90% および 70% 近く抑制したのに対し、AR24Q マウスの側頭葉皮質および小脳における正常 AR の発現をほとんど抑制しなかった (Fig. 3) 。さらに、同様に LUNAR-REPU910 (1800 ng) を R6/2 マウスの側脳室や AR97Q マウスの骨格筋に投与し、側頭葉皮質におけるポリグルタミン伸長 HTT や、骨格筋におけるポリグルタミン伸長 AR の抑制効果も確認した。

【考察】

本研究では SBMA モデル細胞およびモデルマウスを用いて、UNA の修飾を加えた CAG-siRNA がポリグルタミン伸長 AR を選択的に抑制することを示した。まずレポーターアッセイを用いたスクリーニングにより、高い選択性を示す CAG-siRNA の配列 (REPU910) を新たに同定し、SBMA 患者由来の線維芽細胞を用いてポリグルタミン伸長 AR を選択的に抑制することを確認した。また脂質ナノ粒子により送達された REPU910 はマウス中枢神経系においてポリグルタミン伸長 AR を選択的に抑制することを示した。我々が調べ得た範囲では、本研究は生体内において CAG-siRNA がポリグルタミン伸長蛋白を選択的に抑制することを示した最初の報告である。

本研究では siRNA のノックダウン効果の持続期間や、SBMA の主病巣である下位運動ニューロンにおけるポリグルタミン伸長 AR の発現抑制効果を評価できておらず、薬効時間の評価や中枢神経系での脂質ナノ粒子の分布範囲の拡大が今後の課題となるものの、REPU910 は SBMA の別の治療標的組織である骨格筋や、ハンチントン病モデルマウスの側頭葉皮質においてもポリグルタミン伸長蛋白の発現抑制効果を認め、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された。

【結論】

本研究により UNA による修飾を加えた CAG-siRNA が、生体内においてもポリグルタミン延長蛋白を選択的に発現抑制することが示され、同 siRNA がポリグルタミン病に共通する治療薬となる可能性が示唆された。