

<特集「医薬品開発の最前線」>

スプライシングを標的とした治療薬の開発動向

衣 斐 督 和*

金城学院大学薬学部

Developmental Trends of Splicing Modifiers in the Rare Diseases

Masakazu Ibi

College of Pharmacy, Kinjo Gakuin University

抄 録

高等真核生物のタンパク質をコードする遺伝情報（エクソン）は、イントロンにより分断されている。そのためエクソンとイントロンを含むmRNA前駆体からイントロンを除去しエクソンを連結させるスプライシングは遺伝子発現に必須の過程である。このスプライシング機構の破綻が、様々な疾患の起因となることが明らかになってきた。正確なスプライシングを実行するためには、イントロンの目印となる保存性の低いスプライス部位配列のみでは不十分である。そのため、スプライシング調節配列へのスプライシング因子の結合による、スプライシングの厳密な制御が必須である。人為的にスプライシング因子の結合を阻害することでスプライシング効率が変化し、エクソンの除外（エクソンスキッピング）または含有（エクソンインクルージョン）が可能となる。この機序に基づいて開発されたスプライシング修飾薬は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMM）や脊髄性筋萎縮症（SMA）の治療薬として近年使用されるようになってきた。

キーワード：スプライシング修飾薬、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、脊髄性筋萎縮症。

Abstract

For the most eukaryotic genes, the pre-mRNA transcribed from the genomic DNA must be processed to be a mature mRNA, template for protein synthesis. One of the processes of RNA processing is called splicing, remove the intron and connect the exon. Splicing is strictly performed by binding of spliceosome to conserved sequences in introns as well as the binding of splicing factor to sequences of splicing enhancer/silencer. Splicing modifiers, inhibit the binding of splicing factors to the splicing enhancer/silencer, include the exon into mRNA or exclude exon with intron from pre-mRNA. Antisense oligonucleotides or small molecule modifying the efficacy of splicing are used for treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMM) or spinal muscular atrophy (SMA).

Key Words: Splicing modifier, Duchenne muscular dystrophy, Spinal muscular atrophy.

令和5年4月25日受付 令和5年4月29日受理

*連絡先 衣斐督和 〒463-8521 名古屋市守山区大森2-1723 金城学院大学薬学部

ibi@kinjo-u.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.132.06.385

はじめに

高等真核生物において、ゲノムDNAから転写されたRNA前駆体は、核内でRNAプロセッシングを受けて成熟mRNAとなり、これを鋳型としてタンパク質が合成される。RNAプロセッシングの一つであるスプライシングは、mRNA前駆体からイントロンを除去しタンパク質情報をコードするエクソンを連結する過程であり、正確なタンパク質発現に必須の過程である。事実、このスプライシングの異常は様々な疾患に寄与することが報告されており、RNAおよびRNAプロセッシング異常に起因する疾患は「RNA病」と呼ばれている。本稿では難病指定されているデュシェンヌ型筋ジストロフィー（Duchenne muscular dystrophy: DMM）と脊髄性筋萎縮症（spinal muscular atrophy: SMA）の薬物療法に用いられるスプライシング修飾薬とその機序について概説する。

スプライシング

スプライシングは、RNA前駆体からイントロンを除去してmRNAを生成する過程である。スプライシングに必須であるスプライス部位配列はmRNA前駆体上のイントロン内に存在し、それぞれイントロン5'末端または3'末端に位置する5'スプライス部位、3'スプライス部位、さらに3'スプライス部位の少し上流に位置するブランチ部位に保存されている¹⁾ (図1A)。高分子リボヌクレオタンパク質複合体であるスプライソソームは、これらスプライス部位配列を目印にイントロンを除去しエクソンを連結する。このスプライソソームの中心的な役割を担うのが、タンパク質と、5種の核内低分子RNA (U1, U2, U4, U5, U6 snRNA) から構成される核内低分子リボヌクレオタンパク質 (U1, U2, U4, U6 snRNP) である。U1snRNAがRNA前駆体とRNA-RNA結合を形成することでイントロンとエクソンの境界を認識する。スプライシングは、U1snRNPの5'スプライス部位への結合、

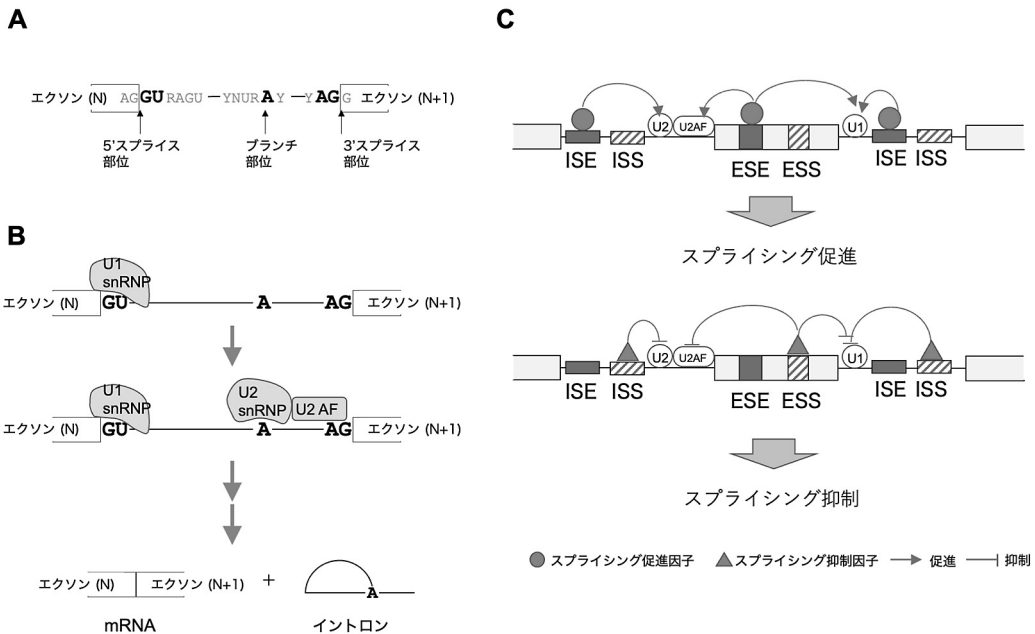


図1 スプライシング反応とスプライシングに重要なmRNA前駆体の配列
 A: スプライス部位配列の概略図 B: スプライシング反応の概略図 C: スプライシング調節配列とスプライシング因子によるスプライシング調節

U2snRNPの補助因子であるU2AFの3'スプライス部位への結合、そしてU2snRNPのブランチ部位への結合により開始され、さらに残りのsnRNPと複合体を形成することで遂行される(図1B)。

しかし、スプライス部位配列の保存性は非常に低いため、イントロンおよびエクソンを正しく認識し、正確なスプライシングを行うのは困難である。そのため、エクソンの認識を補助または抑制する、いわばスプライシングの調節に関わる配列が必要となる。エクソン内またはイントロン内に存在してスプライシングを促進する配列は、それぞれESE (exonic splicing enhancer), ISE (intronic splicing enhancer)、一方スプライシングを抑制する配列は、それぞれESS (exonic splicing silencer), ISS (intronic splicing silencer) と呼ばれる。これらスプライシング調節配列を

認識するスプライシング因子としてSRタンパク質およびhnRNPタンパク質がある。SRタンパク質はESEやISEに結合することでスプライシングを促進する。一方、hnRNPタンパク質はESSやISSに結合することでスプライシングを抑制し、またESEへの結合によりSRタンパク質との結合障害を引き起こすことでイントロンに挟まれたエクソンを除外する²⁾(図1C)。この調節配列を介したスプライシングの複雑な調節は、恒常的および時空間特異的な遺伝子発現制御に関わる一方で、その破綻は様々な疾患の原因となる。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーとその治療薬 ビルトラルセン

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子の変異によるジストロフィンタンパク質の欠損を原因とし、最も重症

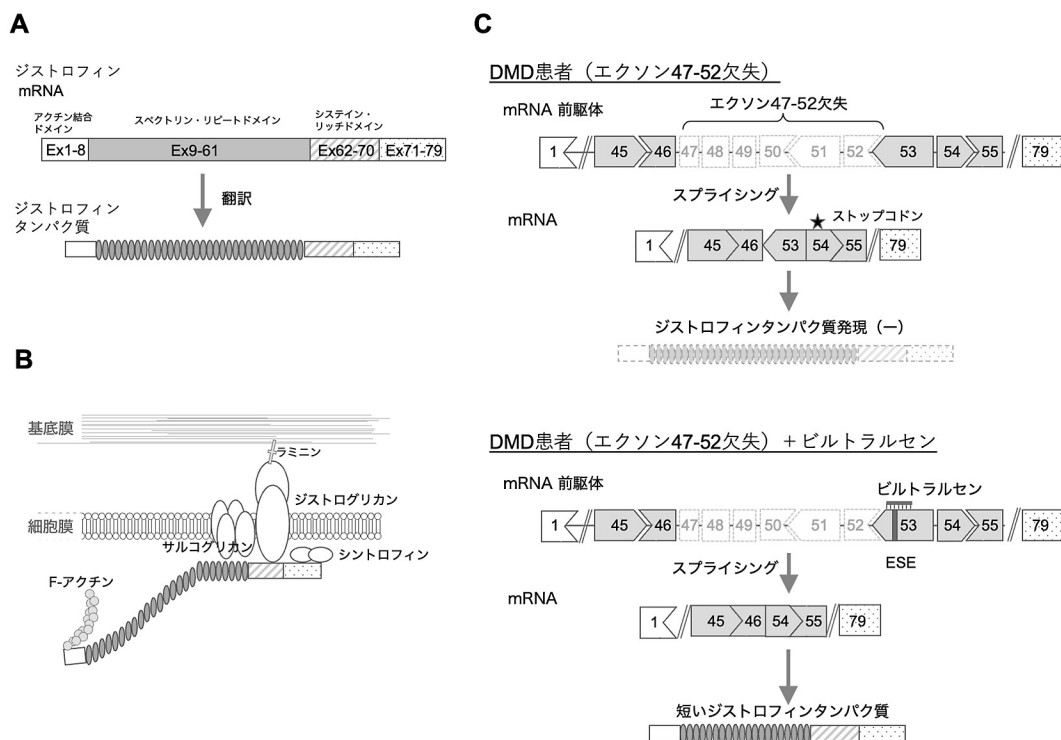


図2 DMDにおけるビルトラルセンのエクソンスキッピング

- A: ジストロフィン遺伝子とタンパク質の概略図
- B: ジストロフィンと結合タンパク質の複合体
- C: DMD (エクソン47-52欠失) 患者におけるビルトラルセンのエクソンスキッピング

度の高いX連鎖性の遺伝性筋疾患である。出生男児3500人に一人がDMDを発症し、幼児期で筋力低下、思春期で歩行不能となり、20歳前後で呼吸障害や心不全で死亡する³⁾。原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子は79のエクソンを持つヒト最長の遺伝子である(図2A)。ジストロフィンタンパク質のアクチン結合ドメインはアクチンフィラメントと、一方システインリッチドメインはラミニンを介して基底膜と結合するジストログリカンと結合している(図2B)。そのため、ジストロフィンタンパク質は細胞膜を支える裏打ちタンパク質として機械的ストレスから細胞膜を保護する。DMD患者のジストロフィン遺伝子変異の多くは欠失であり、その欠失部位はエクソン45-54領域に集中している。これら欠失によりエクソンの塩基配列の読み枠(コドン)がずれ(アウト・オブ・フレーム)、エクソンの途中でストップコドンが生じる(ナンセンス変異)と、ジストロフィンタンパク質が合成されず欠損することになる。一方、DMDと比較して病状が緩和であるベッカー型筋ジストロフィー(BMD)は、欠失変異を持つがコドンのずれが生じない(イン・フレーム)ため、新たなストップコドンは出現しない。BMDの欠失した塩基はジストロフィンタンパク質のロッドドメインに相当し、N末端およびC末端は保持されている。つまりBMDのジストロフィンタンパク質は短くなるが、細胞内外を繋ぎ止めるジストロフィンの機能は保持されることになる。これまでDMD治療薬として、特定エクソンの除外(エクソンスキッピング)を誘導することで、アウト・オブ・フレームをイン・フレームに修正を可能とするアンチセンス核酸が開発されてきた。

日本で承認されているDMD治療薬はビルトラルセン(ビルテプソ[®])である。アンチセンス核酸のビルトラルセンは21塩基配列を持ち、リン酸をジアミドリン酸に、糖をモルフォリン環に置換することで、生体内安定性を向上させたモルフォリノ核酸である。ビルトラルセンは、ジストロフィン遺伝子エクソン53のESEに結合することでスプライス促進因子の結合を阻害し、

エクソン53を隣接するイントロンとともにRNA前駆体から除去する(図2C)。本薬剤の適応は、エクソン53スキッピングで治療可能なジストロフィン遺伝子の欠失(エクソン43-52, 45-52, 47-52, 48-52, 49-52, 50-52, 52)が確認される患者である。DMDにおけるジストロフィン遺伝子の変異は様々であり、本薬剤のエクソン53スキッピングで治療効果が期待できる患者はDMDの約10%である。従って、種々のジストロフィン遺伝子の変異に有効なエクソン除去を誘導する薬剤が必要となる。エクソン51またはエクソン45をそれぞれ除外するアンチセンス核酸のEteplirsen, Casimersenは、DMD治療薬として用いられている(日本では未販売)。

脊髄性筋萎縮症とその治療薬ヌシネルセンとリスジブラム

脊髄性筋萎縮症(SMA)は、脊髄前角細胞の変性による筋萎縮と進行性筋力低下を特徴とし、*SMN1* (*survival motor neuron1*) 遺伝子の変異を認める常染色体劣性遺伝の下位運動ニューロン疾患である。発症年齢、臨床経過によりI~IV型に分類され、I, II型の90%以上で*SMN1* 遺伝子欠損、III型で約半数、IV型で1-2割の*SMN1* 遺伝子の変異が認められる⁴⁾。*SMN*タンパク質の減少は、snRNP産生量の減少と軸索輸送の機能障害などにより、運動ニューロンの変性・脱落を引き起こす⁵⁾⁶⁾。ヒトは*SMN1* 遺伝子と数塩基の違いが認められる重複遺伝子の*SMN2* 遺伝子を有する。しかしエクソン7の一塩基多型(C→T)により、*SMN2* mRNA前駆体からエクソン7が除外されたmRNAが多く産生される。その結果、完全長のSMNタンパク質量は、*SMN1* 遺伝子から産生されるSMNタンパク質の10%前後となる(図3A)。一方、*SMN2* 遺伝子のコピー数多型がSMAの重症度と負の相関する⁷⁾。このことは*SMN2* 遺伝子から発現する完全長のSMNタンパク質発現を増加させると、病態が改善することを示唆する。従って、*SMN2* mRNAへのエクソン7の含有(エクソンインクルージョン)を誘導し、*SMN2* 遺伝子からのタンパク質発現を増加させるアンチセンス核酸および

低分子化合物が、SMA治療薬として開発されてきた。

ヌシネルセン（スピランザ[®]）は、メチル化シトシンおよびメチル化ウラシルを含有する18塩基配列から構成されるアンチセンス核酸である。核酸の全長にわたりリン酸部位にホスホロチオエート（PS）修飾，リボースの2'位の-OH基がmethoxymethyl（2'-MOE）基に修飾されることで，半減期が延長する（投与間隔は最長で6ヶ月）。本剤は，中枢神経に効率よく運搬させるために髄腔内投与が行われる。ヌシネルセンは，イントロン7の5'スプライス部位から約10塩基下流のISSと結合する⁸⁾。その結果，ISSとスプライス抑制因子hnRNPA1，A2の結合を阻害し，エクソン7の取り込みを促進する⁹⁾ことで，エクソン7を含有する完全長のSMNタンパク質の産生を増加させる（図3B）。

リスジプラム（エプリスディ[®]）は，低分子化

化合物の経口治療薬である。リスジプラムのエクソン7取り込み促進機構は次のように想定されている。一点目は，5'スプライス部位とU1snRNAとの結合親和性の増加である。SMN2 mRNA前駆体エクソン7の最終塩基はアデニンである。そのため，U1snRNAは5'スプライス部位と安定した二重鎖を形成することができず，エクソン7はイントロンと一緒に除去されやすい。リスジプラムは，このアデニンに作用することで5'スプライス部位とU1snRNAとの結合親和性を増加させ，エクソン7のmRNAへの組み込みを促進すると考えられている¹⁰⁾。二点目は，ESEへのスプライス促進因子の誘導である。リスジプラムはSMN2mRNA前駆体エクソン7のESE2に結合することで，hnRNPGをESEから遊離させ，スプライシング促進因子のFUBP1タンパク質とKHSRPタンパク質を誘導し，エクソン7の取り込みを促進すると考えられている¹⁰⁾（図

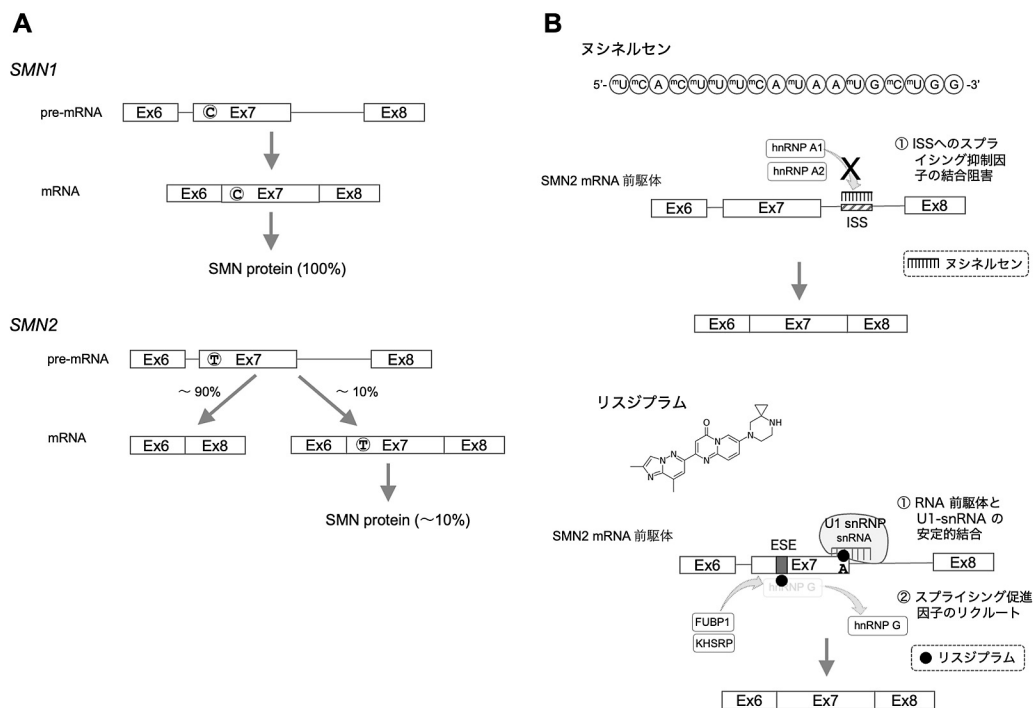


図3 SMAにおけるスプライシング修飾薬のエクソンインクルージョン
 A: SMN1およびSMN2からのSMNタンパク質発現 B: SMN2 mRNA前駆体におけるスプライシング修飾薬のエクソン7取り込み機構

3B). スシネルセンおよびリスジブラムの適応は, *SMN2* 遺伝子のコピー数を1以上持つことが確認された患者である。

スプライシング修飾薬以外に, 億越えの薬価として話題になったオナセムノゲン アベパルボベク (ゾルゲンスマ[®]) は, *SMN1* 遺伝子を搭載したアデノ随伴ウイルスベクター (AAV9) であり, SMAの遺伝子治療として用いられる。このようにSMAの治療においては, 核酸製剤, 低分子製剤, 遺伝子治療と複数の創薬モダリティ (薬剤形態) の活用が可能である。

最 後 に

今回紹介したスプライシング修飾薬以外に, ハンチントン病を治療対象とし, 第II相臨床試験まで進んでいる低分子化合物が存在する¹¹⁾

(2023年4月現在)。また, 神経セロイドリポフスチン (バッテン病) の治療薬 Milansen は, 特定患者の遺伝子変異に対するスプライシングを修飾するアンチセンス核酸であり, N-of-1 study としてFDAに承認された¹²⁾。アンチセンス核酸は, 核酸合成法, オフターゲット効果や送達効率など改善の余地はあるものの, 個別化医療を可能とする手段である。現在までアンチセンス核酸医薬品は, 主に難治性の遺伝子疾患を対象として開発されてきた。今後は遺伝子疾患以外, 特に遺伝子変異によるスプライシング異常が報告されている疾患, 例えば, がん¹³⁾ の臨床応用への拡大が期待される。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 136: 701-18, 2009.
- 2) Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 3: 285-98, 2002.
- 3) Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, and Constantin C. DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 9: 77-93, 2010.
- 4) “脊髄性筋萎縮症” 難病情報センター <https://www.nanbyou.or.jp/entry/135>
- 5) Bowerman M, Becker CG, Yáñez-Muñoz RJ, Ning K, Wood MJA, Gillingwater TH, Talbot K. UK SMA Research Consortium. Therapeutic strategies for spinal muscular atrophy: SMN and beyond. *Dis Model Mech*. 10: 943-954, 2017.
- 6) Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G. SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* 133: 585-600. 2008
- 7) Calucho M, Bernal S, Alías L, March F, Venceslá A, Rodríguez-Álvarez FJ, Aller E, Fernández RM, Borrego S, Millán JM, Hernández-Chico, Cuscó CI, Fuentes-Prior P, and Tizzano EF. Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord*. 28: 208-215, 2018
- 8) Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF, Krainer AR. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev*. 24: 1634-1644. 2010
- 9) Rigo F, Hua Y, Chun SJ, Prakash TP, Krainer AR, Bennett CF. Synthetic oligonucleotides recruit ILF2/3 to RNA transcripts to modulate splicing. *Nat Chem Biol*. 8: 555-612. 2012
- 10) Meyer SM, Williams CC, Akahori Y, Tanaka T, Aikawa H, Tong Y, Childs-Disney JL, Disney MD. Small molecule recognition of disease-relevant RNA structures. *Chem Soc Rev*. 49: 7167-7199. 2020
- 11) “RNA標的低分子薬の臨床開発状況” 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部ホームページ <https://www.nihs.go.jp/mtgt/>
- 12) Kim J, Hu C, Moufawad El Achkar C, Black LE, Douville J, Larson A, Pendergast MK, Goldkind SF, Lee EA, Kuniholm A, Soucy A, Vaze J, Belur NR, Fredriksen K, Stojkowska I, Tsytsykova A, Armant M, DiDonato RL, Choi J, Cornelissen L, Pereira LM,

Augustine EF, Genetti CA, Dies K, Barton B, Williams L, Goodlett BD, Riley BL, Pasternak A, Berry ER, Pflöck KA, Chu S, Reed C, Tyndall K, Agrawal PB, Beggs AH, Grant PE, Urion DK, Snyder RO, Waisbren SE, Poduri A, Park PJ, Patterson A, Biffi A, Mazzulli JR, Bodamer O, Berde CB, Yu TW. Patient-Customized

Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *N Engl J Med.* 381: 1644-1652, 2019.

- 13) Bradley RK, and Anczuków O. RNA splicing dysregulation and the hallmarks of cancer. *Nat Rev Cancer.* 23:135-155, 2023.

著者プロフィール



衣斐 督和 Masakazu Ibi

所属・職：金城学院大学薬学部・准教授

略 歴：1996年3月 京都薬科大学卒業

2001年3月 京都大学大学院薬学研究科博士課程修了

2001年4月 横浜市立大学医学部薬理学・助手

2003年4月 京都府立医科大学薬理学・助手

2004年4月 京都府立医科大学薬理学・助教

2007年4月 京都府立医科大学薬理学・学内講師

2017年4月 京都府立医科大学薬理学・講師

2021年4月～現職

専門分野：薬理学，行動神経科学

- 主な業績：1. Zhang X, Ibi M, Haga R, Iwata K, Matsumoto M, Asaoka N, Liu J, Katsuyama M, Yabe-Nishimura C. NOX1/NADPH oxidase affects the development of autism-like behaviors in a maternal immune activation model. *Biochem Biophys Res Commun.* **534**: 59-66, 2021.
2. Ibi M, Liu J, Arakawa N, Kitaoka S, Kawaji A, Matsuda KI, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Zhu K, Teramukai S, Furuyashiki T, Yabe-Nishimura C. Depressive- Like Behaviors Are Regulated by NOX1/NADPH Oxidase by Redox Modification of NMDA Receptor 1. *J Neurosci.* **37**: 4200-4212, 2017.
3. Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Sasaki M, Nakagawa T, Katsuyama M, Iwata K, Zhang J, Kaneko S, Yabe-Nishimura C. Involvement of NOX1/NADPH oxidase in morphine-induced analgesia and tolerance. *J Neurosci.* **31**(49): 18094-18103, 2011.
4. Ibi M, Matsuno K, Shiba D, Katsuyama M, Iwata K, Kakehi T, Nakagawa T, Sango K, Shirai Y, Yokoyama T, Kaneko S, Saito N, Yabe-Nishimura C. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci.* **28**(38): 9486-9494, 2008.