

200934037A

(別添1)

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

関節リウマチに対するアプタマーRNA 新薬の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 義一

平成22(2010)年5月

(別添2)

## 目 次

I.	総括研究報告	
	関節リウマチに対するアプタマーRNA 新薬の開発	2
	研究代表者 中村 義一	
	(資料1) IL-17 アプタマーと IL-17 タンパク質の相互作用試験結果	
	(資料2) 細胞刺激阻害試験結果	
II.	分担研究報告	7
	IL-17 対する RNA アプタマーの動物投与試験	
	研究分担者 石黒 亮	
	(資料3) EAE マウスモデル投与試験	
	(資料4) GPI 誘導関節炎マウスモデル投与試験	

(別添 3)

## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)

総括研究報告

関節リウマチに対するアプタマーRNA 新薬の開発

研究代表者 中村 義一 (東京大学医科学研究所・教授)

### 研究要旨

本研究は、インターロイキン-17(IL-17)に対する RNA アプタマーを創製し、これを利用した関節リウマチの発症予防・治療の RNA 新薬の開発を目的とした。我々が特に注目したのは、関節リウマチや多発性硬化症の発症が、Th17 欠損マウスで著しく抑制されるという報告である(岩倉ら、2002)。我々の作出した IL-17 アプタマーは、IL-17 に対し解離定数 50pM 以下という抗体を凌ぐ高いアフィニティーを有し、IL-17 の受容体への結合を完全に阻害した。さらに、細胞を IL-17 で刺激した際に産生される IL-6 を検出限界以下に抑制できる優れた阻害作用を有することを明らかにした。さらに、複数種の自己免疫疾患マウスモデルを用いて体内動態を解析するとともに、その薬効を詳細に解析した。

[研究分担者] 石黒 亮 (東京大学・医科学研究所・遺伝子動態分野・特任助教)

#### A. 研究目的

人工進化法(SELEX)により創出したヒトの炎症性サイトカインである IL-17 に対する RNA アプタマーを用いて、自己免疫疾患である関節リウマチの RNA 新薬開発を目的とする。アプタマーRNA は、人工進化法により選び抜かれた、標的に対する特異的な高親和性分子で、抗体に代わる次世代の高分子医薬である。本研究では、我々のプラットフォーム技術を利用

して、IL-17 に対するアプタマーRNA を作製し、自己免疫疾患に対する新コンセプトの RNA 新薬を開発する。

関節リウマチの発症メカニズムや病態悪化要因については未だ不明な部分が多く、治療薬の開発競争は世界規模で行われているが、いまだ決定的な治療薬は開発されていない。近年、T細胞サブセットの一つである Th17 細胞が生産する IL-17 は炎症性疾患の発症や細菌感染防御において重要な働きをすることが明らかになってきた。IL-17 は慢性関節リウマチのみならず、気管支喘息、炎症性腸

疾患、多発性硬化症等の発症に関与することが示唆されており、この IL-17 の機能を阻害することができればそれら病態進行の抑制、若しくは改善薬にもなることが期待される。

## B. 方法

### 1. 実験方法

我々を含む近年の研究によって、RNA 分子は様々な立体構造を形成する能力があり、その優れた造形力によって、タンパク質の形状を広く識別するポテンシャルを備えていることが次第に明らかになってきた。RNA アプタマーとは標的タンパク質に特異的に結合する RNA 分子をさし、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法と呼ばれるセレクション法により取得される。一方、RNA 医薬品としては 1980 年代より研究が開始されたアンチセンスや 1998 年の RNA 干渉の発見を契機にその現象を利用した siRNA が知られている。これらは素材として RNA を用いる点は共通であるが、アンチセンスや siRNA が細胞内の mRNA を標的とするのに対し、RNA アプタマーは、タンパク質を標的にする点が大きく異なる。このことは、医薬開発をする上で非常に有利であり、アンチセンスや siRNA は細胞内に導入しないと効果を発揮できないのに対し、アプタマーは細胞外タンパク質（例えばサイトカイン）やその受容体をターゲットにすることが出来ることより、薬物輸送システム(DDS)の問題を考慮しなくて良い。その他にアプタマーの特筆すべき点として、

- 抗体作製不向きな標的にも適用可能
- 標的分子のアンタゴニストとして機能可能
- 化学合成で作製するため大量合成が容易
- 免疫排除が生じにくい
- 抗体を凌ぐ結合特異性等があげられる。

我々は既にランダム配列の RNA プールの中から、標的タンパク質に特異的に結合する RNA 分子を選択・増幅する SELEX 法を駆使し、IL-17 に対するアプタマーを作出した。本研究で用いる IL-17 に対する阻害性 RNA アプタマーの作出、短小化、IL-17 受容体への結合阻害の解析を行い、最終候補アプタマーが、ヒト及びマウス細胞で、IL-17 刺激によるシグナル誘導を遮断し、最終的に IL-6 の産生誘導を阻害するか確認した。また、複数のマウスモデルを用いて、IL-17 アプタマーの発症予防効果を解析している。

### 2. 倫理面への配慮

研究内容は、「研究開発等に係る遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に従い、東京大学医科学研究所遺伝子組み換え生物等安全委員会の審議をへて承認を受けており、法令を遵守して行う（東大機関承認番号 08-12、08-17、08-37、08-44）。また動物実験については、東京大学医科学研究所の動物実験委員会の審議を経て承認を受けており（東大機関承認番号 18-31、20-

34)、施設が定める規則に従い、最大限に動物愛護に配慮した方法で行われる。なお、本研究は遺伝子治療研究や臨床研究は含まない。

#### C. 結果

IL-17に対するRNAアプタマーを用いた関節リウマチのRNA新薬開発を目的とし、SELEX法を用いてRNAアプタマーを作出、*in vitro*及び*in vivo*の活性阻害試験を行った。このアプタマーはIL-17に対し解離定数約50pM以下という抗体を凌ぐ高いアフィニティを有する(資料1)。NHDF細胞(正常ヒト皮膚繊維芽細胞)及びMEF(mouse embryonic fibroblast)を用いてIL-17による刺激の変化を解析したところ、IL-6の産生誘導を完全に阻害することを確認した(資料2)。アプタマーは動物モデルにおいて顕著な効果を確認した(後述・研究分担者)。

#### D. 考察

MKとIL-17に対するRNAアプタマー本研究が標的とするサイトカインを産生するTh-17細胞は、自己免疫疾患発症の「かなめ」となるT細胞である。したがって関節リウマチのみならず、本研究によって広範な自己免疫疾患の予防・治療薬の開発が期待できる。今回の成果に基づき、広く自己免疫疾患に対する新薬へも適用拡大の可能性も期待できる。

#### E. 結論

動物モデルで優れた薬効を示したアプタ

マーは、抗体医薬に劣らぬ高い結合特異性を有すのみではなく、免疫排除が生じにくい点や、大量の化学合成が容易であるなど、非常にユニークな特性を持っている。このような特色を持つRNAアプタマーは、他に類を見ないような作用機序を持つ高分子医薬品へと昇華させることが可能と考える。

#### F. 健康危機情報

該当しない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当無し

##### 2. 学会発表

- 中村義一:RNAの造形力を利用した創薬、日本薬学会年会・岡山・2010年3月
- 石黒亮、秋山泰身、井上純一郎、中村義一:抗インターロイキン17アプタマーによる自己免疫疾患抑制の分子機構、日本分子生物学会年会・横浜・2009年12月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 「IL-17に対するアプタマー及びその使用」  
発明人:中村義一、石黒亮、大内将司  
出願人:国立大学法人東京大学  
出願番号:PCT/JP2009/062764  
出願日:2009年7月14

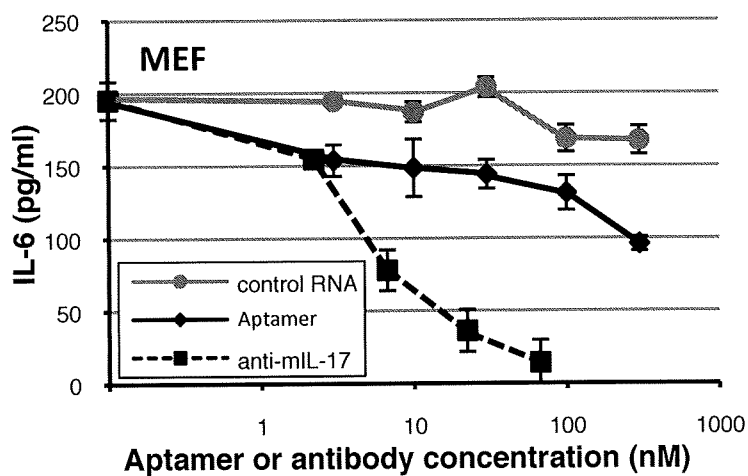
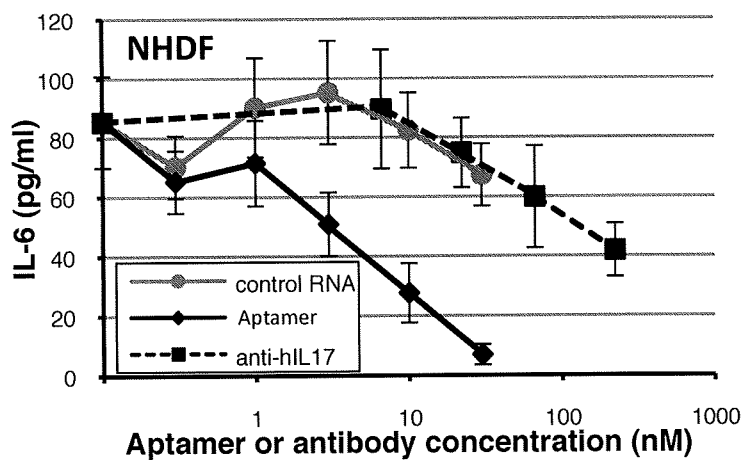
資料 1

表面プラズモン共鳴法を用いた抗 IL-17 アプタマーと IL-17 タンパク質 (ヒト : hIL-17, マウス : mIL-17) の相互作用 (BIAevaluation software version 3.0 にて計測)

	Dissociation constant ( $K_D$ ), pM	Association rate ( $K_a$ ), $10^6$ /MS	Dissociation rate ( $K_d$ ), $10^{-4}$ /S
hIL-17	48.47e $\pm$ 20.45	3.33 $\pm$ 0.19	13.22 $\pm$ 6.36
mIL-17	701.33 $\pm$ 67.38	1.07 $\pm$ 0.12	7.25e $\pm$ 0.13

Mean values  $\pm$  SEM from three experiments are indicated.

資料 2



NHDF (ヒト) and MEF (マウス)細胞を用いた IL-17 刺激阻害試験

IL-17 刺激 24 時間後の IL-6 産生を ELISA 法で測定。アプタマーの添加によって IL-6 産生が強く阻害される。NHDF 細胞では市販の中和抗体よりも強い阻害が観られた。

(別添4)

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)  
関節リウマチに対するアプタマーRNA 新薬の開発

### IL-17 に対する RNA アプタマーの動物投与試験

[研究分担者] 石黒 亮 (東京大学・医科学研究所・遺伝子動態分野・特任助教)

#### 研究要旨

本研究では、自己免疫疾患モデルを用いたアプタマーの薬効試験、動物モデルでのアプタマーの体内動態の解析を行い、その阻害効果と自己免疫疾患との関連を詳細に解析した。動物モデルは、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) マウス、Glycosyl-6-phosphatidylinositol (GPI) 誘導関節炎マウスを用いた。これら動物モデルを用いアプタマー投与を投与し、発症の抑制や軽減、症状の緩和や早期回復等詳細に解析。結果、アプタマー投与量依存的な発症の抑制効果等を確認した。

#### A. 研究目的

本研究は慢性関節リウマチ等、自己免疫疾患の原因分子の一つ IL-17 を特異的に認識する RNA 分子 (RNA アプタマー) を用いて、動物モデルでの体内動態を解析するとともに、その阻害効果を疾患の治療や創薬に結びつけることを目的としている。

本研究では既に抗体を凌ぐ高い中和効果を持つアプタマーを多数得ており、IL-17 による細胞刺激を阻害することを確認している。IL-17 は慢性関節リウマチのみならず、気管支喘息、炎症性腸疾患、多発性硬化症等の発症に関与することが示唆されており、この IL-17 の機能

を阻害することができれば病態進行の抑制、若しくは改善薬になることが期待される。

#### B. 方法

IL-17 に対する RNA アプタマー創薬のため、以下の実験を行った。

1. ヒト多発性硬化症の動物モデルであるマウス実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) モデルを用いて、IL-17 アプタマーの発症予防効果を確認する。髄鞘構成タンパク質で動物を免疫することで T 細胞依存的な中枢神経系の炎症や局所脱髄を誘導することができることから、多発性硬化症の動物



モデルとして用いられている。投与条件は C57BL/6 マウス 8 週齢の♀ (n=10) に PTX (百日咳毒素) 200ng 静脈投与, MOG 100  $\mu$ g (myelin - oligodendrocyte glycoprotein、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク) 皮下投与, 翌々日に再度 PTX 200ng 静脈投与。アプタマーは 0, 1, 3, 10mg/kg の投与量で免疫直後より腹腔内投与を隔日で行い、麻痺の程度と体重現象等を非投与群と比較した。免疫後、10 日前後から麻痺と体重減少の症状が出始める。体重は麻痺の程度と一致する。しっぽの麻痺 (1 点)、歩行障害 (2 点)、片足麻痺 (3 点)、両足麻痺 (4 点)、前肢片側麻痺 (5 点)、全肢麻痺・死亡 (6 点) のスコアを付ける。3~4 週間、経過観察。

2. GPI 誘導関節炎マウスモデルを用いて、IL-17 アプタマーの *in vivo* 薬効実験を行う。GPI タンパク質を免疫することで、高頻度に関節炎を起こすことができる。GPI は解糖系酵素であり、神経系の発達、免疫系の増殖を担い、癌細胞では転移の媒介物質であることが示唆されている。元来、細胞内にあるが、癌や自己免疫疾患の患者血清に高濃度に発現していることが確認されている。また、関節リウマチのモデルマウスである K/BxN マウスの関節炎誘導源生の対応抗原として GPI が同定された (松

本 1998 年)。その他特筆すべき点として①抗 CD4 抗体、TNF $\alpha$  アンタゴニスト、抗 IL-17 抗体で発症後でも制御可能。②T 細胞依存性や、炎症性サイトカインの依存性で RA に近似したモデル。③血清移入では関節炎を転移できない。④しかし、Fc $\gamma$ R を欠損したマウスでは発症しないので、何らかの抗 GPI 抗体の機能がある。などが挙げられる。誘導は DBA/1J  $\delta$  マウス (n=10) に、大腸菌による過剰発現系で発現・精製した GPI タンパク質を尾根部に皮内注射することで行い、結果 7 日~10 日で発症、全肢の関節に炎症を起こす。アプタマーは 0, 1, 3, 10mg/kg の投与量で免疫直後より腹腔内投与を隔日で行い、関節炎の発症及び病徴を非投与群と比較した。

## C. 結果

1. EAE マウスモデルでは、アプタマーの投与で発症が抑えられた。また、発症した個体の症状も軽症であった (資料 3)。
2. EAE マウスでは、脊髄組織において炎症細胞の浸潤や脱髄病変部が多く観察されたが、アプタマーを投与したマウス群ではほとんど見られなかった (資料 3)。
3. GPI 誘導関節炎マウスモデルでは発症率の低下と軽微な病徴、早期回復が確認された (資料 4)。
4. 2 つのモデルとも、効果はアプタマ

一の投与量に依存していた。

#### D. 考察

抗 IL-17RNA アプタマーは、*in vitro* 及び *in vivo* で特異的に IL-17 に結合し、IL-17 受容体との結合を阻害することが証明された。動物実験では2つのモデルにおいて濃度依存的な効果がみられ、明らかな薬効がみられた。

#### E. 結論

マウスモデルで得られた RNA アプタマーによる IL-17 の阻害結果は、新規の関節炎予防・治療薬開発に繋がる重要な指針となった。今後、ヒトリウマチ関節炎の創薬に向けて本格的に取り組むべき対象であることを確認できた。

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

該当無し

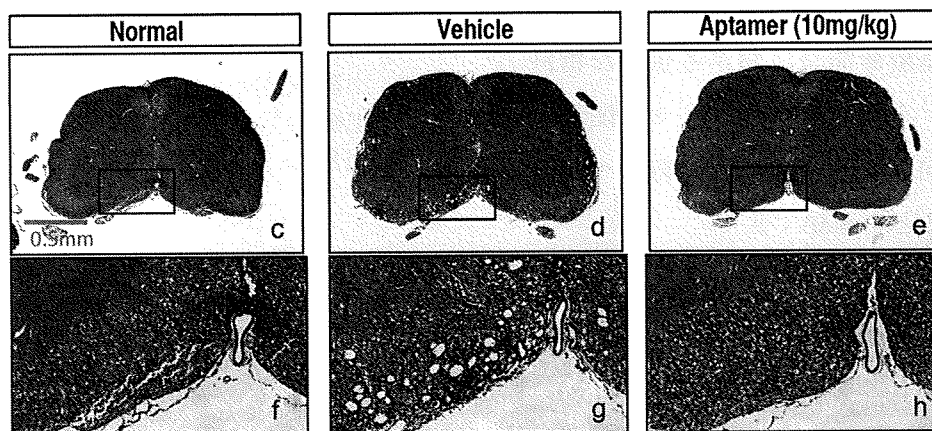
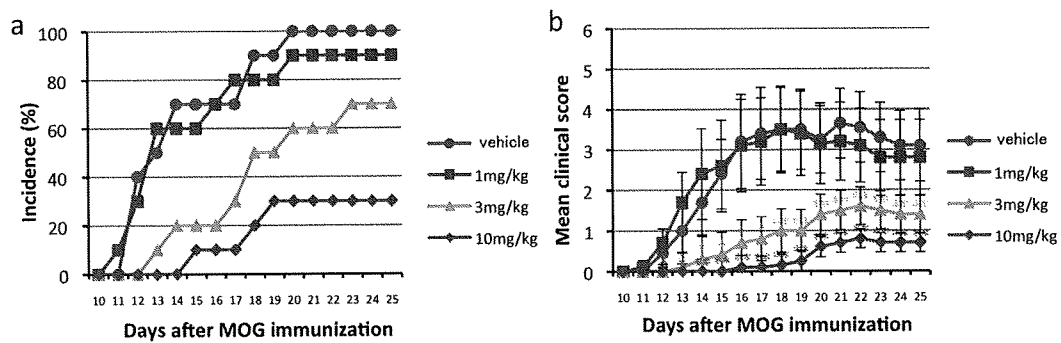
#### 2. 学会発表

- 石黒亮、秋山泰身、井上純一郎、中村義一:抗インターロイキン17アプタマーによる自己免疫疾患抑制の分子機構、日本分子生物学会年会・横浜・2009年12月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

- 「IL-17 に対するアプタマー及びその使用」  
発明人:中村義一、石黒亮、大内将司  
出願人:国立大学法人東京大学  
出願番号:PCT/JP2009/062764  
出願日:2009年7月14日

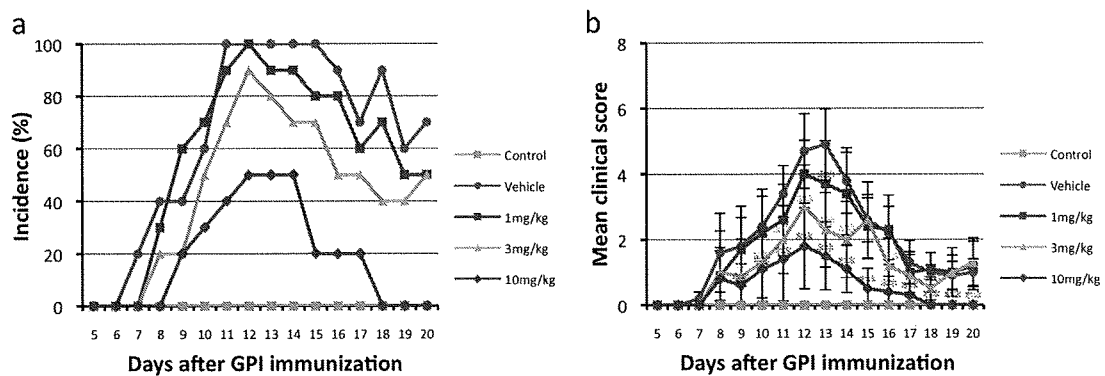
資料 3



EAE マウスモデル投与試験

アプタマーの投与量依存的に発症率(a)、スコア(b)共に EAE の発症を強く抑制した。また、アプタマーを投与したマウスの脊髄(e, h)を投与しないもの(d, g)と解析した結果、炎症細胞の浸潤や脱髄病変部が観られず、健全マウス(c, f)とほぼ同様であった。

#### 資料 4



#### GPI 誘導関節炎マウスモデル投与試験

アプタマーの投与量依存的に発症率(a)、スコア(b)共に GPI 誘導関節炎の発症を強く抑制した。さらに、早期回復の傾向が顕著に確認された。

