

201023024A

(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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 義一

平成23(2011)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	3
	研究代表者 中村 義一	
	(資料1) 抗 IL-17A アプタマーの阻害活性	
	(資料2) GPI 誘導関節炎モデルを用いたアプタマーの治癒効果	
II.	分担研究報告	10
	IL-17A/F ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーの作出と解析	
	研究分担者 石黒 亮	
	(資料3) ヘテロ二量体特異的アプタマーの確認	
	研究成果の刊行に関する一覧表	14

(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-17A(IL-17A)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する。我々の作出した抗 IL-17A アプタマーは、IL-17A 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を有し、IL-17A の受容体への結合を完全に阻害する。また、関節炎モデルマウスを用いた投与試験を実施し、その薬効を確認した。

さらに、IL-17A は、同じファミリーに属する IL-17F とヘテロ二量体を形成し、機能する可能性が提唱されているが、その機能は不明である。我々はホモ二量体は阻害せず、ヘテロのみを阻害するアプタマーの開発に成功した。これまで解析不可能だった慢性関節リウマチにおける IL-17 A/F ヘテロ二量体の作用機序解明の解析基盤として期待できる。

[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

RNA の人工進化法(SELEX)により関節リウマチの原因物質、炎症性サイトカイン等の機能を阻害する RNA アプタマーを取得し、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抜さ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、長年蓄積してきた我々のプラットフォーム技術を利用して、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-17A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-17Aは慢性関節リウマチ、気管支喘息、炎症性腸疾患、多発性硬化症等の自己免疫疾患の発症に関与することが示されており、このIL-17Aの機能を阻害することができれば病態進行の予防薬・治療薬になることが期待できる。我々は抗IL-17A RNAアプタマー取得に成功し

た。得られたRNAアプタマーは解離定数48.5pMと非常に高い結合特性をもち、現在知られているいかなる抗IL-17抗体よりも安定的に結合、機能阻害をもたらす(試料1)。自己免疫疾患モデルを用いたアプタマーの薬効試験を試み、多発性硬化症の動物モデルであるEAEマウスモデルや、GPI (glucose-6-phosphate isomerase)誘導関節炎マウスモデルでアプタマーの投与による発症率の低下と病徴の減少を確認した。本年度はGPI誘導関節炎マウスモデルで発症後の投与による早期回復等、病態の改善が確認できるかを詳細に検討した。

医薬開発を目的としたアプタマーの利点の一つに、修飾や化合物付加が容易であるという特色がある。取得したアプタマーをより安定的に、より安全に体内で機能させるために、様々な修飾を加えた変異体を多数作製して比較解析を続けている。

IL-17はIL-17AからFまで6つのファミリーメンバーが知られており、この内IL-17AとIL-17Fは、メンバー間の内で最も相同性の高い分子(アミノ酸配列で45%程度の相同性)となっている。IL-17AとIL-17Fはそれぞれジスルフィド結合でつながったホモ二量体を形成することが知られているが、最近になってIL-17A/Fヘテロ二量体の存在が提唱された。実際にIL-17は活性型ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞から、IL-17A/AあるいはF/Fのホモ二量体の形だけでなくIL-17A/Fヘテロ二量体の形でも発現されていることが示されており、生体内では大多数のIL-17が主にIL-17A/Fヘテロ二量体の形で存在するという報告もされている。我々は、様々な結合様式を取るRNAアプタマーを用いることで、ホモ二量体とヘテロ二量体とを区別して認識することができるIL-17A/Fヘテロ二量体の解析法確立も併

せて開発した。

## B. 方法

### 1. リウマチ関節炎マウスモデルへの発症後投与試験

GPI誘導関節炎マウスモデルを用いて、抗IL-17Aアプタマーのin vivo薬効実験を行なう。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(松本ら1998年)。誘導はDBA/1Jマウスに、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。既に前年度の試験では免疫直後からのアプタマー投与により、関節炎の発症及び病徴が抑えられることを確認している。本年度は発症後にアプタマーの投与を開始し、病徴の推移を詳細に解析した。

### 2. RNAアプタマーの改良

取得されたRNAをより安定で安全な薬剤として改良するため、様々な修飾を検討し、最適化を行う必要がある。配列を部分的に欠失させたクローンを合成して、IL-17タンパク質に特異的に結合する領域を決定する。また、ヌクレアーゼに対する耐性を付与するため、両末端にinverted dTやコレステロール、ポリエチレングリコールを付加したり、リボースの2'位のOH基をF基やOMe基に置き換える修飾を加える。実際、RNAアプタマーの両末端をinverted dTで保護し、リボ

ースの2'位のOH基をOMe基で置換した場合、ヒト血清中で数週間保温(37℃)しても殆ど分解されなかったという報告もある。

### 3. IL-17A/Fヘテロ二量体特異的RNAアプタマーの作出と解析(石黒担当)

IL-17A/Fヘテロ二量体特異的なRNAアプタマーを取得するために、鋳型となるRNAプールのランダム配列の塩基数を複数種類用いることや、選別時に目的のIL-17A/Fヘテロ二量体以外に結合する分子を除くことなどの工夫を試みて新しくSELEXを行った。転写のためのプロモーター領域の下流にPCR増幅で用いるプライマー結合領域に挟まれたランダム領域を持つDNAプールを鋳型として転写を行い、初期ラウンドのRNAプールを合成した。このランダムRNAプールを、まずIL-17A/A, IL-17F/Fホモ二量体を固相化した樹脂ビーズと反応させ、これらに結合しなかった分子のみを選別した(=ホモ二量体によるサブトラクション)。続いて、得られたホモ二量体とは結合しなかった分画をIL-17A/Fヘテロ二量体の結合したビーズと反応させ、結合した分子のみを溶出後、逆転写、PCR、転写の各段階を経ることにより、新しいラウンドのRNAプールを取得した。この選別・増幅の過程を7回繰り返した後、PCRにより増幅したDNAをプラスミドベクターに組み込んでクローン化し、配列解析を行った。

### 4. 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

1. DBA/1J♂マウスにGPIを免疫し(n=10)、免疫後8日目から抗IL-17 RNAアプタマー(10mg/kg)の腹腔内投与を開始し、非投与群と比較解析した(試料2)。両群共に全頭発症しているが、投与開始後3日目(免疫後11日目)より投与群で症状の改善が確認され始め、投与開始後11日目には投与群の全てのマウスで関節炎が観られなくなった。
2. 更なる最適化を行った結果、全長31塩基まで短鎖化できた他、ヌクレアーゼ耐性を高めるためにリボースの2'位OH基をOMe基へ多数改変することができた。
3. 配列解析の結果、多数のアプタマー候補が得られた。SPR(表面プラズモン共鳴; Surface Plasmon Resonance)解析で結合特異性を確認した結果、わずか2つの配列がIL-17A/Fヘテロ二量体特異的な結合を示した。これら2種類のアプタマー候補の内、よりヘテロ二量体特異性の高かった配列を以後の解析に用いることにした。

### D. 考察

1. 関節リウマチのマウスモデルであるGPI誘導関節炎の発症後にアプタマーを投与し、薬効が得られたことは、『新規RNA創薬』を目指す上で極めて重要な知見であり、本研究計画の当初目標が達成できたと考えられる。続く毒性試験、特にアプタマーの血液凝固への影響やアプタマーの免疫毒性を確認するための準備を進めている。我々は既にHPLCを用いた血中

アプタマーの濃度測定法やハイブリダイゼーション法による血中アプタマーの高感度測定法を GLP 基準で確立している。

2. 取得したアプタマーは動物実験で極めて有効な結果を示したが、より安全で効果的アプタマーを安価で提供するために必須な最適化は極めて重要である。短鎖化とヌクレアーゼ耐性付与に関しての成果はあったが、今後進める予定の毒性試験の推移と同時並行し、より詳細なデータ収集が必要である。

3. 近年ヒトやマウス体内では IL-17A/F ヘテロ二量体が大半を占めるという興味深い報告がなされている。このことは創薬のターゲットとする場合、十分考慮する必要がある。比較解析のための新たなツールとして IL-17A/F ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーが得られた意味は大きい。

#### E. 結論

我々が取得した抗 IL-17A RNA アプタマーは、関節リウマチや多発性硬化症のマウスモデルで優れた発症阻害効果を示す。今回、発症後投与でも明らかな治癒効果を示し、ここに当初の目標を達成することができた。RNA アプタマーは、抗体医薬を凌駕する高い結合特異性を有すのみではなく、免疫排除が生じない点や、大量の化学合成が容易であるなど、非常に優れた特性を持っている。今回は、新規に IL-17A/F ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーを解析ツールとして加えることができた。今後 GLP 試験のための予備毒性試験を進めるための準備ができつつあり、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

Akira Ishiguro, Taishin Akiyama, Hironori Adachi, Jun-Ichiro Inoue, Yoshikazu Nakamura. Therapeutic potential of anti-interleukin-17A aptamer: suppression of interleukin-17A signaling and attenuation of autoimmunity in two mouse models. *Arthritis & Rheumatism*, The American College of Rheumatology, 63: 455-466, 2011.

Hironori Adachi, Akira Ishiguro, Michiaki Hamada, Eri Sakota, Kiyoshi Asai, Yoshikazu Nakamura. Antagonistic RNA aptamer specific to a heterodimeric form of human interleukin-17A/F. *Biochimie*, Elsevier, *in press*.

##### 2. 学会発表

足立大典、石黒亮、中村義一「Interleukin-17A/F ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーの創製」、『第 10 回東京大学生命科学シンポジウム』、PC-031、東京、2010 年 5 月

足立大典、石黒亮、中村義一「ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーの創製」、『第 12 回日本 RNA 学会年会』、P-127、東京 2010 年 7 月

Ishiguro, A., Akiyama, T., Adachi, H., Inoue, J., Nakamura, Y.: A chemically specified RNA aptamer against human interleukin-17 has broad therapeutic potential in autoimmune disease. The 10<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 7-10, 2010 (Awaji)

Nakamura, Y.: RNA-protein mimicry and RNA aptamer therapeutics, FEBS Advanced Lecture Course, "Analysis and Engineering of Biomolecular Systems", September 11-17, 2010 (Spetses, Greece, Organized)

Nakamura, Y.: Conformational Plasticity of RNA and Therapeutic Aptamers to Midline and Interleukin 17, POSTEC International Symposium on "Aptamer as an emerging technology for biomedical application", December 1, 2010 (Pohang)

石黒亮、秋山泰身、足立宏典、井上純一郎、中村義一：自己免疫疾患モデルマウスを用いた RNA アプタマーによるインターロイキン 17 の機能制御、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7～10日(神戸)

「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

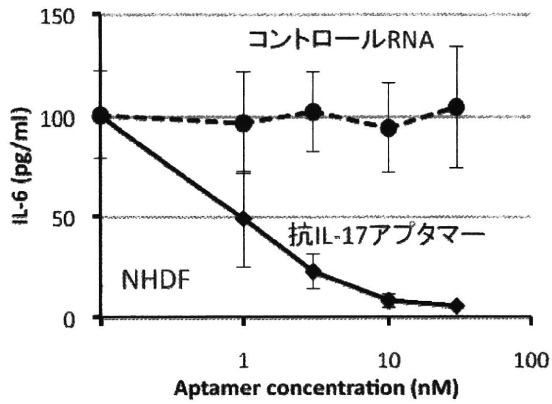
出願人：国立大学法人東京大学

出願番号：PCT/JP2009/062764

出願日：2009年7月14

H. 知的財産権の出願・登録状況

資料 1

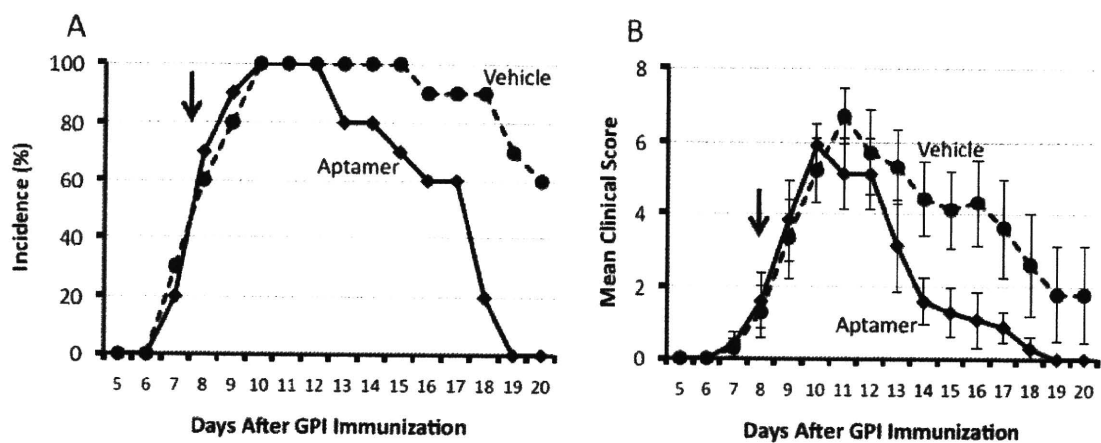


抗 IL-17A アプタマーの阻害活性 (ELISA 法により検出)

NHDF (normal human dermal fibroblast) 細胞を IL-17A で刺激 24 時間後の IL-6 産生を確認。同じ濃度の特異的中和抗体に比べ、高い阻害活性を持っている。10nM 以上の濃度で培地に加えた場合、IL-6 の産生はほとんど検出されない。



資料 2



GPI誘導関節炎モデルを用いたアプタマーの治癒効果

(A)発症率(B)臨床スコアのグラフ。発症後のアプタマー投与(↓)でも、早期の回復が確認された。

(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)  
分担研究報告書

### 関節リウマチに対するアプタマーRNA 新薬の開発

IL-17A/F ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーの作出と解析

[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

アプタマーの持つ高い基質特異性と柔軟性は、抗体と異なるユニークな性質を有する。近年、IL-17A は、同じファミリーに属する IL-17F とヘテロ二量体を形成し、機能する可能性が提唱されている。ホモ二量体は阻害せず、ヘテロのみを阻害するアプタマーを用い、これまで解析不可能だった、慢性炎症における IL-17 A/F ヘテロ二量体の作用機序を、自己免疫疾患モデルマウスを用いて詳細に解析する。

#### A. 研究目的

IL-17 は 6 つのサブファミリー (IL-17A から F) を形成している。これらの内、IL-17A と IL-17F はメンバー間で最も高い相同性 (アミノ酸配列で 55%の同一性) を示し、両者はホモ二量体 (IL-17A/A, IL-17F/F) の他にヘテロ二量体 (IL-17A/F) を形成する。IL-17A/A, IL-17F/F の各ホモ二量体は、それぞれ異なる機能が明らかになってきているが、IL-17A/F ヘテロ二量体の生理作用は未解明であり、解析手段が無いことが、主な原因であった。IL-17A/F ヘテロ二量体は細胞内でホモ二量体よりも多く存在しているという報告もあり、その生体内での作用機序は興味深い。我々は関節リウマチにおける IL-17 ヘテロ二量体の解析技術基盤の確立を目指し、ヘテロ二量体タ

ンパク質に結合するアプタマー取得を試みた。得られたアプタマーを用いて IL-17A/F ヘテロ二量体の生理活性阻害を確認し、効果があればリウマチへの関与を関節リウマチのモデルマウス等を用いて解析したい。

#### B. 方法

IL-17A/F ヘテロ二量体の作用機序を解析する目的で以下の実験を行った。

1. IL-17A/F ヘテロ二量体タンパク質を的とし、SELEX 法で、多数のアプタマー候補を選抜する。
2. 得られた候補とタンパク質との結合特異性を、SPR 解析で検証
3. SPR 解析で IL-17 受容体との結合阻害試験を行い、IL-17A/F ヘテロ二量体と IL-17 受容体との結合及びホモ

二量体との結合阻害効果を確認する。

4. BJ 細胞（ヒト包皮線維芽細胞）を IL-17A/F または A/A または F/F で刺激し、シグナル伝達の下流で産生されるケモカイン GRO- $\alpha$  の分泌量を ELISA により測定。

#### C. 結果

1. IL-17A/F ヘテロ二量体タンパク質を標的とし、SELEX 法でアプタマー候補を選抜した。
2. 2つのアプタマーは IL-17A/F ヘテロ二量体特異的な結合を示すアプタマーであった。
3. SPR 解析を用いて検証した結果、2つのアプタマーは、IL-17A/A ホモ二量体と IL-17 受容体との結合は全く阻害しないものの、IL-17A/F ヘテロ二量体と IL-17 受容体との結合は効果的に阻害できることが確かめられた。
4. アプタマーの候補の1つは IL-17 シグナル阻害能を計測した結果、IL-17A/F ヘテロ二量体による刺激に対して特異的に、濃度依存的な GRO- $\alpha$  の産生阻害効果を確認することができた。A/A または F/F ホモ二量体による刺激に対して、阻害効果は全く確認できなかった（試料3）。

#### D. 考察

アプタマーの一つは結合・特異性共に高く、SPR 解析によって推量された解離定数は、IL-17A/F に対する  $K_D=69.7$  nM、IL-17A/A に対する  $K_D=3.72$  mM、IL-17F/F に対する  $K_D=99.5$  mM と、ホモ二量体と比較してヘテロ二量体に対して2~3オーダー高い結合親和性を示すものであった。細胞刺激試験でも同様に高い特異性を有していたため、生体内での解析にも有効である可能性が高い。

#### E. 結論

今回我々は IL-17A/F ヘテロ二量体タンパク質を特異的に補足し、機能阻害可能な RNA アプタマーの取得に成功した。これまでは解析が不可能だった IL-17A/F ヘテロ二量体タンパク質とリウマチ関節炎の関連を解析する新規ツールとして有望である。このアプタマーは新規の「ヘテロ二量体特異的なアンタゴニスト」としても意義深い。その構造・結合様式は RNA ならではの性質が活かされたユニークなものであり、RNA を用いた新規分子ツール開発例の提示が可能であると考えられる。このように、アプタマーは標的分子の広い領域を認識できる点で、これまで抗体等では難しかった標的の設定が可能である。本研究と同じく、複数のタンパク質分子から形成される複合体や、機能的に構造変化を起こす活性タンパク質等、様々な応用が可能である。本研究が今後の基礎生物学、基礎医学に貢献できるものと信じている。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Akira Ishiguro, Taishin Akiyama, Hironori Adachi, Jun-Ichiro Inoue, Yoshikazu Nakamura. Therapeutic potential of anti-interleukin-17A aptamer: suppression of interleukin-17A signaling and attenuation of autoimmunity in two mouse models. *Arthritis & Rheumatism*, The American College of Rheumatology, 63: 455-466, 2011.

Hironori Adachi, Akira Ishiguro, Michiaki Hamada, Eri Sakota, Kiyoshi Asai, Yoshikazu Nakamura. Antagonistic RNA aptamer specific to a heterodimeric form of human interleukin-17A/F. *Biochimie*, Elsevier, *in press*.

##### 2. 学会発表

足立大典、石黒亮、中村義一「Interleukin-17A/F ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーの創

製』、『第 10 回東京大学生命科学シンポジウム』、PC-031、東京、2010 年 5 月

足立大典、石黒亮、中村義一「ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーの創製』、『第 12 回日本 RNA 学会年会』、P-127、東京 2010 年 7 月

Ishiguro, A., Akiyama, T., Adachi, H., Inoue, J., Nakamura, Y.: A chemically specified RNA aptamer against human interleukin-17 has broad therapeutic potential in autoimmune disease. The 10<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 7-10, 2010 (Awaji)

石黒亮、秋山泰身、足立宏典、井上純一郎、中村義一:自己免疫疾患モデルマウスを用いた

RNA アプタマーによるインターロイキン 17 の機能制御、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月7～10日(神戸)

#### 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」

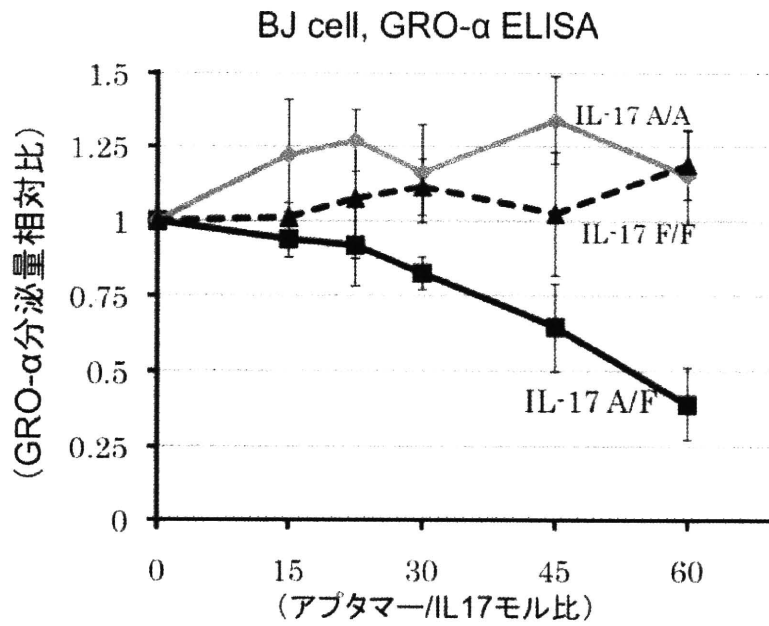
発明人：中村義一、石黒亮、大内将司

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



ヘテロ二量体特異的アプタマーの確認

BJ細胞（ヒト包皮線維芽細胞）を用い、IL-17 刺激阻害効果を検証した。

アプタマーは、IL-17A/F に対して高い相互作用を有し、ホモ二量体には全く影響を与えず、IL-17A/F ヘテロ二量体の生理活性のみを特異的に阻害する。

(別添5)

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akira Ishiguro, Taishin Akiyama, Hironori Adachi, Jun-Ichiro Inoue, Yoshikazu Nakamura.	Therapeutic potential of anti-interleukin-17A aptamer: suppression of interleukin-17A signaling and attenuation of autoimmunity in two mouse models.	Arthritis & Rheumatism	63	455-466	2011
Hironori Adachi, Akira Ishiguro, Michiaki Hamada, Eri Sakota, Kiyoshi Asai, Yoshikazu Nakamura.	Antagonistic RNA aptamer specific to a heterodimeric form of human interleukin-17A/F.	Biochimie	in press	in press	2011

