

## 論文内容の要旨

論文題目 インターロイキン-17A/F ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマーの創製

氏名 足立 大典

### 【背景・目的】

インターロイキン-17 (IL-17) とそれを産生する T 細胞サブセットの一つであるヘルパーT (Th) 17 細胞に関する目覚ましい研究の進展は、免疫機構に対する我々の認識を大きく変化せしめるものであった。Th17 細胞の発見は、古典的な「Th1/Th2 細胞バランス」の概念だけでは説明できない現象に対する一つの解答であり、これまでに説明のついていた免疫現象に対してさえも Th17 細胞の関与があったのではないかという疑問を投げかけるまでに至った。IL-17 は IL-6, IL-8, 成長関連腫瘍遺伝子- $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ) などといった種々のサイトカイン・ケモカインを産生することで、Th1 や Th2 細胞では適切に処理できない細胞外増殖性細菌感染防御で重要な役割を担う一方、過剰に発現した場合には関節リウマチや多発性硬化症といった種々の自己免疫性疾患の一因となることが指摘されている炎症促進性のサイトカインである。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 50% 程度の同一性) となっている。IL-17F は IL-17A に比べて研究が進んでおらず生理的な機能や意義が未解明な点が多いが、*in vitro* において受容体 IL-17RA/IL-17RC を通して TNF 受容体関連因子 6 (TRAF6) やアダプタータンパク質 (Actin related gene 1; Act1) 経路で炎症性遺伝子発現を制御していること、*in vivo* において肺で過剰発現させることによりリンパ球の組織浸潤や粘液の過形成が認められることなどが知られており、これらは IL-17A と同様の性質である。IL-17A と IL-17F との間の生理学的に重要な相違点としては、実験的自己免疫性脳脊

髄炎 (EAE) 発症には IL-17A のみが必要であり、IL-17F は必要ではないという点が挙げられる。

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しているという報告もされている。IL-17A/F ヘテロ二量体が機能するには受容体 IL-17RA/IL-17RC 複合体の存在が不可欠であることが報告されており、この IL-17RA/IL-17RC ヘテロ複合体もホモ複合体よりも優先的に形成されることが示唆されている。しかし、抗体やノックアウトマウスを用いた実験系では IL-17A/F ヘテロ二量体特異的な解析ツールが存在しないことから IL-17A/F ヘテロ二量体の詳しい作用機序や生理活性などについて解析することは困難であり、IL-17A/F ヘテロ二量体はまだその詳細の多くが明らかにされていない。そこで本研究では、様々な結合様式を取ることが可能であり、分子の全体構造を広く認識し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期待できる RNA アプタマーを用いることで、既存の系では解析が困難であった IL-17A/F ヘテロ二量体の解析法確立を目指した。

RNA アプタマーとは、SELEX 法 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) により試験管内で人工進化的に選択された、標的分子に対して結合親和性を持つ一本鎖 RNA 分子のことである。RNA アプタマーは、(i)高い結合特異性を持つ、(ii)化学合成が可能であり、修飾や改変が容易、(iii)標的分子のアンタゴニストとして機能可能、(iv)免疫排除が生じにくい、(v)標的分子によっては抗体よりも高い結合力を持ち得る、などの特徴を有する。本研究では、IL-17A/F ヘテロ二量体の機能的あるいは構造的な解析の有用なツールを得る目的で、IL-17A/F ヘテロ二量体特異的な結合活性を有し、その機能を特異的に阻害可能な RNA アプタマーを取得し、その作用機序を解析した。

「分子全体の構造を認識して結合する」という性質は、結合部位が約 6~12 アミノ酸程度に限られる抗体では達成が非常に困難なことであり、この「ホモ二量体とヘテロ二量体という部分的な違いを区別できる」性質は、RNA アプタマーならではの新規分子機能と言える。また、RNA アプタマーの医工学的応用展開の一つとして、IL-17A と強く結合し、生体内で機能を阻害できるアプタマーの解析も行った。

## 【方法・結果】

### 1. IL-17A/F ヘテロ二量体特異的な RNA アプタマーの作出と解析

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、選択の母集団となる RNA ライブラリー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 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

30-40 塩基のランダム領域を持つ DNA ライブラリーを鋳型として転写を行い、初期ラウンドのランダム RNA ライブラリーを合成した。この RNA ライブラリーを、まず IL-17A/A, IL-17F/F ホモ二量体の結合したビーズと反応させ、これらに結合しなかった分子のみを選別した。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 ライブラリーを取得した。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、塩基配列を決定した。

配列解析の結果、同一の配列への収束が見られたクローンを表面プラズモン共鳴 (SPR; Surface Plasmon Resonance) 装置を用いた *in vitro* での相互作用解析へと進めた。ランダム領域 N=40 のクローンからは IL-17A/F ヘテロ二量体特異的なアプタマーは取得できなかったが、N=30, 35 のクローンから、それぞれ 1 クローンずつ、IL17A/F ヘテロ二量体特異的なアプタマーを取得した。これら 2 種類のアプタマー (AptAF38; N=35 由来、AptAF42; N=30 由来) の解離定数は、AptAF38 が IL17A/F: 48.6 nM, IL17A/A: 1.12  $\mu$ M, IL17F/F: 5.06  $\mu$ M, AptAF42 が IL17A/F: 72.2 nM, IL17A/A: 1.92  $\mu$ M, IL17F/F: 37.5  $\mu$ M 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。

続いて AptAF38, AptAF42 の、IL-17 とその受容体 IL-17RA との間の結合阻害作用を、SPR 解析を用いて検証した。結果、どちらのアプタマーも IL-17A/A ホモ二量体と IL-17RA との結合は全く阻害しないが、IL-17A/F ヘテロ二量体と IL-17RA との結合は効果的に阻害できることを確認した。

得られたアプタマーの活性や安定性の増大を図るため、アプタマーの改変を行った。一つ目の改変として、ランダム領域の塩基それぞれに 9% の変異を加えた DNA を鋳型として再度選別をする最適化 SELEX を行った。5 ラウンドの最適化 SELEX により、AptAF38 を鋳型として行った最適化 SELEX からは結合活性・結合阻害活性ともに高くなったアプタマーは得られなかったが、AptAF42 を鋳型として用いた再選別からはオリジナルの AptAF42 よりも 2 倍以上 IL-17A/F ヘテロ二量体に対する結合活性の高いアプタマー、AptAF42dope1 が取得された。AptAF42dope1 は、IL-17A/F ヘテロ二量体と受容体との結合阻害でも非常に高い阻害効果を持っていたため、以後の実験にはこれを用いることにした。二つ目の改変として、AptAF42dope1 は 68 塩基と比較的長い点があり、安定性や、応用展開を考えた場合のコスト・副作用の面で改善の余地があるため、アプタマーの短鎖化を行った。RNA 二次構造予測プログラムで予測された構造を元に、分子全体にわたって複数の短鎖化を試みたが、IL-17A/F ヘテロ二量体特異的な活性を維持したアプタマーは得られなかった。このことは、削った部位すなわち分子全体が IL-17A/F ヘテロ二量体との結合に重要であることを示唆している。

次に、AptAF42dope1 の、培養細胞系での IL-17 による刺激阻害効果を検証した。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 により測定する系で、AptAF42dope1 は 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- $\alpha$  の産生阻害効果を示した。同様の結果は IL-6, IL-8 の ELISA の系でも確認された。以上の結果により、AptAF42dope1 の IL-17A/F ヘテロ二量体特異的な結合とその機能阻害を細胞レベルで実証した。

AptAF42dope1 がヘテロ二量体特異的な結合・機能阻害を可能にしている機構について、RNA アプタマーの構造、IL-17A/F との結合部位の両側面から、結合構造様式を軸に明らかにするため、RNase フットプリント解析を行った。AptAF42dope1 は内部のステムが予測二次構造と異なる構造も形成し得ることと、分子のほぼ全域で IL-17A/F ヘテロ二量体と結合することを確認した。

## 2. IL-17A/A ホモ二量体に対する RNA アプタマーの解析

IL-17A/A ホモ二量体に対する RNA アプタマー AptA21-2 の詳細な解析を行った。AptA21-2 は SPR 解析によって、非常に高い IL-17A/A に対する結合活性 (解離定数  $K_D=47.3$  pM) を示し、IL-17A/F ヘテロ二量体に対しても比較的高い結合活性 ( $K_D=57.4$  nM) を示し、*in vitro* の細胞刺激による IL-6 産生誘導試験で優れた阻害活性 (IC50: 1-2 nM) を示した。また、RNA の両末端を修飾し安定性を増大させたアプタマーは、マウスを用いた生体モデルへの投与試験で EAE の発症および症状の抑制効果を示した。

### 【展望】

本研究で取得した IL-17A/F ヘテロ二量体特異的 RNA アプタマー AptAF42dope1 は、これまで困難であったヘテロ二量体だけの機能を抑えるという実験系の構築を可能にし、IL-17A/F ヘテロ二量体独自の機能解析の一助となることが期待される。アプタマーの生体内での安定性の課題を克服した後、IL-17A/F ヘテロ二量体の自己免疫疾患への関与及び作用機序を解析していきたい。また、疾患マウスモデルによって薬効を確認した AptA21-2 は、ヒト IL-17A に対してマウス IL-17A よりも 1 オーダー以上高い結合活性を示しており、ヒトの自己免疫疾患予防・治療薬としての応用が期待される。