

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 遠藤 信康

本研究は、先行研究によって同定されたマウス自己免疫性疾患モデルへの病態抑制効果を持つ低分子化合物KN69について、その標的である内性免疫性核酸を同定とその機能解析を試みたものであり、炎症・自己免疫疾患の発症および増悪機構の解明と創薬研究への分子基盤を供することを目的とし、下記の結果を得ている。

1. ビオチン化KN69を用いてRaji細胞溶解液よりKN69結合RNAを単離した。次世代シーケンサーを用いてKN69結合RNAの配列を取得し、その標的として18および28S ribosomal RNAとAutoimmune RNA1(AIR1)の断片を同定した。
2. KN69結合RNAを合成し、その免疫原性を検証した。免疫原性の検証にはマウス骨髄細胞から分化させたFLT3-ligand培養骨髄細胞を用い、カチオン性脂質DOTAPとKN69結合RNAの複合体により刺激を行った際のI型インターフェロン(IFN)と炎症性サイトカインの遺伝子発現誘導を定量的PCR法によって測定した。その結果、AIR1断片のみがToll-like receptor(TLR)7のリガンドとして用いられる一本鎖RNA poly uridic acid (polyU)と同程度の、免疫原性を有すること、この遺伝子発現誘導能はKN69の添加により強力に抑制されることが示された。
3. AIR1の全長を合成し、その免疫原性を検証した。免疫原性の検証には、マウス脾臓細胞、マウス脾臓細胞より単離した形質細胞様樹状細胞、マウス腹腔滲出細胞を用いた。これらの細胞を全長AIR1とカチオン性の脂質の複合体によって刺激した際の細胞培養液中の炎症性サイトカイン産生量を測定し、その結果、全長のAIR1は、上記細胞に対して、polyUで刺激した際と同程度の炎症性サイトカイン産生を誘導することが示された。
4. AIR1の免疫原性発揮機構についての検証を行った。まずAIR1認識受容体に関する解析を行った。AIR1は一本鎖RNAであるため、TLR7の関与が想定される。TLR7欠損マウスおよびその野生型同腹仔よりTLR7を発現する細胞としてマウス脾臓細胞を採取した。これらの細胞に対して、全長AIR1とDOTAPとの複合体で刺激をした際のI型IFN遺伝子発現量を定量的PCR法によって測定した。その結果、TLR7欠損細胞においてはAIR1による刺激時のI型IFN遺伝子の発現量が著明に減弱しており、このことからAIR1によるI型IFN遺伝子発現誘導能はTLR7に依存的であることが示された。

一方で、多くのnon-coding RNA(ncRNA)に含有されるリボース修飾は自然免疫受容体のアンタゴニストとして働くことが知られているが、AIR1はリボース修飾を有さないことが明

らかとなっている。AIR1の強力な免疫原性の発揮に重要であるとの仮説のもと、リボースのメチル化を導入したAIR1変異体を合成しその免疫原性を検証した。その免疫原性を比較したところ、AIR1は前述の通り、強力な炎症性サイトカイン産生誘導能を示した一方で、メチル化AIR1変異体は、炎症性サイトカイン産生誘導能が著明に減弱した。このことから、AIR1の免疫原性の発揮にはリボースメチル化修飾を持たないことが重要であることが示された。

5. AIR1がDamage-associated molecular patterns (DAMPs)として放出される可能性について検証するため、近年DAMPsとしてのDNAの免疫原性発揮に重要と報告されている抗菌ペプチドについて、AIR1への関与の可能性を解析した。複数の抗菌ペプチドとAIR1の複合体をそれぞれ形成させ、マウス脾臓細胞を刺激した際の炎症性サイトカイン遺伝子発現量を定量したところ、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子の遺伝子発現誘導能はDOTAPで刺激した場合と同程度であった。またヒト抗菌ペプチドLL-37とAIR1によって腹腔滲出細胞を刺激した際のIL-1 $\beta$ 産生量をELISA法にて定量したところ、IL-1 $\beta$ 産生誘導能をもつ典型的なligandであるNigericinとリポポリサッカライドの刺激と比較して同程度のIL-1 $\beta$ 産生が観察されることが示された。これらの結果より、AIR1の免疫原性発揮において、少なくとも一部の抗菌ペプチドが関与する可能性が示された。そこで、細胞死に伴い抗菌ペプチドとAIR1が放出される可能性について検証するため、抗菌ペプチドと核酸を放出する細胞死の一形態であるNeutrophil extracellular Trap-osis(NETosis)におけるAIR1の関与について検討を加えており、液体試料中のAIR1濃度の定量法を確立した上で、NET中にAIR1が含まれることを明らかとした。またNETがTLR7活性化能を有することを示しており、これらの結果から、NETに伴いAIR1がDAMPsとして放出される可能性が示唆された。

6. これまでの結果から、免疫原性を有するAIR1がDAMPsとして自己免疫性疾患において病態形成に関与する可能性が考えられる。そこでマウス自己免疫性疾患モデルマウスである複数のモデルとヒト関節リウマチおよび全身性エリテマトーデス患者の血清におけるAIR1濃度を定量し、病態との関連を解析した。その結果、2つのマウス関節炎モデルおよび2つのマウス全身性エリテマトーデスモデルにおいて、疾患発症群におけるAIR1濃度が陰性対照群と比較して上昇する傾向を示した。全身性エリテマトーデスおよび関節リウマチ患者血清においても健常人と比較してAIR1濃度の有意な上昇が認められ、かつ疾患スコア高値群においてAIR1濃度が高値を示す結果を示した。

以上、本論文はマウス自己免疫性疾患に対して薬効を有する定分子化合物の標的の探索とその昨日解析を通して、ncRNAであるAIR1を新規DAMPsとして報告した。本研究はこれまで知見の乏しかった自己免疫性疾患においてDAMPsの機能と治療戦略の確立に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。