

## 論文の内容の要旨

論文題目 Small nuclear RNAの免疫原性及びその自己免疫疾患への関与に関する研究

氏名 遠藤 信康

パターン認識受容体(pattern recognition receptor: PRR)は自然免疫系を担う一連の受容体の総称であるが、大別すると分泌型、膜型、細胞質型に分類される。中でも膜型と細胞質型の受容体は病原体特有の分子パターンの認識によって下流のシグナル伝達系を活性化することで、自然免疫応答のみならず、適応免疫系の惹起にも重要とされている。一方、近年の研究においてPRRが病原体由来分子だけでなく、細胞死などにより曝露される自己の構成分子(Damage-associated molecular patterns; DAMPs)を認識して免疫応答を活性化することも判明し、このような自己分子に対するPRR応答が炎症性疾患や自己免疫疾患の発症・増悪に繋がる一因であると予測されている。しかしながら、DAMPsの実態や機能については不明な点が多く、特に疾患との関連という文脈での生理的重要性については不明の点が多い

本研究の先行研究では、自己分子の中でも特に核酸に対するPRR応答を抑制する薬剤の探索が行われ、複数の炎症・自己免疫疾患マウスモデルに薬効を示す低分子化合物(KN69)の同定に成功している。化合物に関する一連の性状解析の結果、この化合物が核酸に直接結合し、その免疫原性を抑制するという性質を有することが判明した。そのため、KN69のマウス疾患モデルに対する薬効は、内在性の免疫原性核酸に対する抑制効果によってもたらさ

れると考えられ、それは同時に、炎症・自己免疫疾患の病態に関与する未知の内在性核酸の存在を示唆している。

このような背景から、本研究ではKN69の標的である内性免疫性核酸を同定・解析することで、炎症・自己免疫疾患の発症・増悪機構を解明するとともに、薬剤開発の分子基盤を供することを目的として解析を行った。KN69結合核酸の単離とその性状解析の結果、KN69は核酸の中でも一本鎖RNAに強い結合力を示すことが明らかとなった。次世代シーケンサーを用いたKN69結合RNA配列の網羅的解析から、新規の免疫性核酸としてSmall nuclear RNAであるAuto Immune RNA(AIR1)を同定した。さらに、AIR1はToll様受容体(Toll-like receptor; TLR)7を介してI型インターフェロン(Interferon; IFN)や炎症性サイトカインの遺伝子発現と産生を誘導し、これらの誘導はKN69の添加により強力に抑制された。AIR1は既報のDAMPs核酸と比較して非常に強い免疫原性を有しており、この差はTLRのアンタゴニストとして機能するリボースの2位のメチル化構造の有無から生じることが示唆された。一方で、内在性のAIR1結合分子として、全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus; SLE)および関節リウマチ(Rheumatoid arthritis; RA)への関与が報告される抗菌ペプチドLL-37および $\beta$ -defensinがその免疫原性発揮に重要であることも明らかにした。これらの抗菌ペプチドはNeutrophil Extracellular Trap(NET)と呼ばれる好中球から放出される構造体に多量に含まれていること報告されている。そこで、私はAIR1が細胞外に放出され、抗菌ペプチドとともに免疫原性を発揮する生理的な機構として、NETが関与する可能性について検討した。その結果、定量的PCR法を用いてNET中にAIR1が含まれること、レポーター細胞を用いた解析により、NETがTLR7活性化能を示すことを明らかとした。

これまでの結果から、AIR1が内在性の免疫性核酸として免疫応答を惹起することが示唆

されることから、さらに、AIR1 と病態との関連について解析を行った。その結果、KN69 が病態抑制効果を示す SLE や RA 等の疾患モデルマウスおよびヒト患者検体において、血清中の AIR1 濃度が高値を示す傾向が認められた。さらに、AIR1 濃度と病状との関連を解析したところ、SLE 患者検体の血中 AIR1 濃度については、健常人群および SLE-DAI (Disease activation index)3.0 以下の群と比較して、重症と診断される SLE-DAI 3.0 以上の群においては統計学的に有意に高い値を示した。一方で RA 患者検体において、Steinbrocker の病期分類(関節破壊評価)、DAS28-CRP(Disease activation score 28)および DAS28-ESR による重症検体群において AIR1 濃度が有意に高値を示すことが明らかとなった。同様に、リウマチ因子陽性群および抗シトルリタンパク質抗体(ACPA)陽性群は、陰性群および健常人群と比較して、有意に高い血中 AIR1 濃度を示す事が明らかとなった。

これらの発見から、AIR1 が自己免疫疾患の病態に関わる内在性因子である可能性が示唆された。

本研究では新たな DAMPs として AIR1 を同定したが、AIR1 はこれまでに報告された DAMPs 核酸と比較しても、細胞内に比較的多量に存在すること、リボースの 2 位のメチル化を持たないことなどから、炎症性・自己免疫性疾患の病態形成において重要であることが示唆される。今後は特異性の高いアンチセンスオリゴヌクレオチド等の別の手法を用いて AIR1 による病態形成の分子機序を詳細に解析することで、創薬研究が発展する可能性が考えられる。また、血中 AIR1 濃度は病態進行の新しいマーカーとして利用できる可能性が考えられる。リウマチ因子や ACPA は RA の初期に検出される代表的なマーカーであるが、AIR1 を新しい指標の一つとして加え、病態形成との相関関係がより深く解析されることで、関節リウマチの病態を把握する新規の診断材料としての利用が期待される。

本研究では AIR1 の単離と解析と通じて、新しい DAMPs を同定するとともに、結果として、DAMPs の免疫原性の抑制という新しい概念に基づく創薬の可能性を提示した。本研究成果によって、これらの知見を基にした KN69 の改変、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた AIR1 阻害等、革新的な原理に基づいた炎症・自己免疫疾患の治療法の開発が促進されることが期待される。