

次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(RNA 標的創薬技術開発)
研究開発中間進捗／成果概要報告書 (公開版)

令和 5 年 9 月 9 日

1. 公募研究開発課題名：新規 RNA 標的医薬品の研究開発
2. 研究開発課題名： mRNA 構造を標的とした新規免疫制御医薬研究開発
3. 代表機関名：国立大学法人京都大学
4. 研究開発代表者名：竹内 理
5. 所属・役職：大学院医学研究科医化学分野・教授
6. 全研究開発期間：令和3年7月15日 ～ 令和8年3月31日 (予定)

【研究開発概要】

RNA 結合蛋白質 (RBP) は、1 次配列や修飾、構造など mRNA の様々な特徴を認識しその運命を決定、蛋白質翻訳量を調節している。中でも RNA 構造認識 RBP として我々の同定した **Regnase-1 (Reg1)** はサイトカインなど炎症に関連する分子の mRNA をステムループ構造を認識して分解し、免疫細胞活性化のブレーキとして機能する。ヒト免疫炎症疾患に **Reg1** の変異や発現変化が関連する。mRNA 構造は、Roquin など **Reg1** 以外の RBP によっても制御を受けることや、炎症刺激により mRNA 構造が動的に変化することから、mRNA 構造制御は免疫炎症疾患の新たな治療標的となると考えられる。**Reg1** は自身の mRNA をもステムループ構造を介して分解する。この構造を破壊するようにオリゴ核酸をデザインし、細胞に導入したところ、**Reg1** mRNA 分解が抑制され、**Reg1** 蛋白質発現が上昇した。そこで本研究では、1) **Reg1** 構造標的オリゴ核酸の作動メカニズムを、疾患モデルマウスやヒト患者標本を用いて解析、核酸の最適化を行い、本制御法の確立、創薬につなげること、2) ステムループ構造を認識する他の RBP を標的とした新規免疫制御法を開発すること、3) 免疫刺激に対するグローバルな mRNA 構造変化解析を通じて新たな免疫疾患標的 mRNA 構造を同定し、プロテオーム解析によりその構造を認識する RBP を解明、RNA 構造を標的とした新たな核酸医薬の開発につなげていく事を目標とする。これにより、mRNA 構造を標的として細胞機能を調節する核酸医薬、という全く新たな免疫疾患制御法の確立を目指す。

【研究開発中間進捗／研究成果概要】

本研究では、これまでに **Reg1** mRNA の 3'UTR に存在するステムループ構造を破壊するアンチセンスオリゴ核酸が、**Reg1** mRNA の自己分解を抑制しその発現を増強することを見出し、それにより炎症を抑制、炎症性疾患マウスモデルにも効果を示すことを見出してきた。一例として、多発性硬化症マウスモデルに **Reg1** 標的オリゴ核酸を脳室内投与すると、麻痺といった臨床症状が改善したが、脊髄の免疫細胞を用いた 1 細胞シーケンス解析から、**Reg1** 標的オリゴ核酸投与により、好中球の浸潤が低下し、自然免疫細胞であるマイクログリア細胞の活性化が抑制されていることを明らかにした。さらに、**Reg1** の 3'UTR のステムループ構造を通じた制御がヒト **Regnase-1** にも応用できるかの解析を行った。配列は少し異なるが、2 か所のステムループ構造はヒト、マウスおよび他の哺乳類 **Regnase-1** mRNA の 3'UTR で保存されており、ヒト **Regnase-1** の 2 か所ステムループに結合しその構造を壊すアンチセンスオリゴ核酸 (ASO) をそれぞれ設計し、モルフォリノ核酸を用いて合成した。これらの ASO をヒトマクロファージ細胞株に導入すると、マウス **Regnase-1** に対するオリゴ核酸をマウス細胞に導入した際と同様に、**Regnase-1** の発現を増強させ、LPS 刺激に対する IL6 や IL1B などのサイトカイン遺伝子発現を抑制した。同様にヒト末梢血由来単核球を用いた解析でもヒト **Regnase-1** 標的アンチセンスオリゴ核酸は **Regnase-1** の発現を増強し、サイトカイン発現を抑制した (Tse KM et al. *Sci Transl Med* 2022 に論文発表)。また、**Regnase-1** の標的となるヒト疾患を明らかにするため、ヒト免疫疾患における **Regnase-1** 発現を患者検体を用いて検討し、多発性硬化症患者末梢血単核球における **Regnase-1** 発現量と MRI の T2 強調画像での病変部位の体積に負の相関があること (Tse KM et al. *Sci Transl Med* 2022)、また、ヒト肺高血圧症においても **Regnase-1** の血液細胞での発現が、患者群で健常群より低下していること (Yaku A et al. *Circulation* 2022 に論文発表) を見出した。