

日本医療研究開発機構
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)
事後成果報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) mRNA 構造を標的とした新規免疫制御医薬研究開発
(英語) Development of Novel Immunoregulatory Therapeutics Targeting mRNA Structures

研究開発実施期間：令和3年7月15日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 竹内 理
(英語) Osamu Takeuchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立大学法人京都大学・大学院医学研究科・教授
(英語) Kyoto University・Graduate School of Medicine・Professor

II 研究開発の概要

研究の概要

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。

研究開発の成果およびその意義等

本研究では、Reg1 mRNA の 3' UTR に存在する 2 つのステムループ構造をそれぞれ破壊する 2 種類のアンチセンスオリゴ核酸が、Reg1 mRNA の自己分解を抑制し、Reg1 mRNA を安定化、そのタンパク質の発現を増強することを見出した。これまで、アンチセンスオリゴ核酸は、標的 mRNA を分解したり翻訳抑制することで、その機能を抑制するように使用されており、アンチセンスオリゴ核酸により標的 mRNA の発現を増強するのは、全く新規の使用法である。アンチセンスオリゴ核酸としては、モルフォリノ修飾核酸を用いた。本オリゴ核酸 2 種類をコンビネーションでマクロファージに導入することで、Regnase-1 発現が増加し、それにより LPS 刺激に対する IL-6 や IL-1β など炎症性サイトカインの産生を抑制した。加えて、炎症に関わるケモカインや細胞内炎症メディエーターなどの遺伝子発現も抑制した。また、Reg1 アンチセンスオリゴ核酸投与が、炎症性疾患マウスモデルにも効果を示すことを見出した。多発性硬化症マウスモデルである EAE に Reg1 標的アンチセンス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。また、リポポリサッカライド (LPS) 投与による呼吸窮迫症候群マウスモデルに Reg1 標的アンチセンスオリゴ核酸を経気道投与することにより、肺でのサイトカイン産生や好中球浸潤が抑制された。また、肺線維症マウスモデルに Reg1 標的アンチセンスオリゴ核酸を毎週経気道投与することで、線維化の抑制と線維化に関連した遺伝子発現の低下が観察された。このように、Reg1 標的アンチセンスオリゴ核酸は、マウス炎症性疾患の改善に有用であることが明らかとなった。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を明らかにした (Tse KM et al. Sci Transl Med 2022)。また、ヒト肺高血圧症に

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や、患者の中でも Regnase-1 発現の低い一群は、疾患の予後が悪いことも明らかとなった (Yaku A et al. Circulation 2022 に論文発表)。また、肺高血圧症は、膠原病である強皮症とよく合併する事が知られている。Regnase-1 のマウスにおける欠損は自己免疫疾患を自然発症する事が知られているが、Regnase-1 を肺胞マクロファージを中心とする細胞で欠損させたマウスでは、重篤な肺高血圧症を自然発症することも明らかにした。Regnase-1 欠損肺胞マクロファージから産生される IL-6 や PDGF が病態の形成に重要な役割を果たしていることが示唆され、IL-6 受容体抗体や PDGF インヒビターである Imatinib の投与により病態が改善する事が明らかとなった。つまり、Regnase-1 発現はヒト肺高血圧症においても単なるマーカーでは無く、その病態に寄与している可能性が考えられる。また、Regnase-1 の発現を増強する事で、病態改善も期待できる。これまでの研究で、Regnase-1 がマクロファージに加え、T 細胞や B 細胞、II 型自然リンパ球、上皮細胞などさまざまな細胞で活性化のブレーキとして機能していることを明らかにしてきた。本研究で、樹状細胞 (DC)、中でもコンベンショナル樹状細胞 1 型 (cDC1) に着目して Regnase-1 の役割を解析したところ、Regnase-1 が cDC1 の炎症活性や細胞傷害性 T 細胞を活性化する役割を負に調節していること、また、cDC1 で Regnase-1 発現が減弱したマウスは、多発性硬化症モデルの誘導に対し、野生型に比べより早期に発症する事、またメモリー T 細胞の誘導も増強するためその収束もより早くなることを見出した (Rong et al. Frontier Immunol In press)。このように、cDC も Regnase-1 を標的としたアンチセンスオリゴ核酸の標的細胞の一つとなることが想定され、細胞種毎の Regnase-1 機能が明らかになることで、より適切な治療戦略となることが期待される。

また本研究では、核酸医薬による免疫疾患治療に向けて、新たな標的の同定のため、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 構造の同定も行ってきた。まず、マクロファージ細胞株である Raw264.7 細胞や HeLa 細胞をそれぞれ LPS や IL-1b で刺激し、それによる構造変化を icSHAPE-シーケンス法を用いて網羅的に解析した。その結果として、自然免疫刺激に伴い広範な mRNA で構造変化を起こすことが明らかとなった。これらの構造変化を起こす領域に結合する RNA 結合タンパク質の網羅的な解析から、Regnase-1 も含め 50 以上のタンパク質が変動領域へと結合、mRNA 制御に関わる可能性が示唆された。

さらに、Regnase-1 に制御される標的 mRNA の制御とその役割に関する解析も行った。Regnase-1 はその RNA 領域とジンクフィンガー領域の相同性から 4 つのファミリー分子を持ち、中でも Regnase-3 はその発現パターンも Regnase-1 と類似している。また、CLIP-シーケンス解析から、Regnase-1 と Regnase-3 が類似した mRNA の相同なステムループ構造を認識、分解する事を見出した。Regnase-1 と Regnase-3 の生体内における機能を明らかにするために免疫細胞で重欠損するようなマウスを作製すると、そのリンパ球分化が著明に障害され、骨髄球系細胞分化が亢進する事が明らかとなった。造血幹細胞を用いたシングルセル RNA-seq 解析から、造血幹細胞でのリンパ球系細胞への Priming が障害されており、より骨髄球への分化しやすくなっていることが示唆された。造血幹細胞での Regnase-1/Regnase-1 標的 mRNA の解析から、Nfkbiz 遺伝子が標的として同定され、その発現が、重欠損造血幹細胞で上昇していることが明らかとなった。Regnase-1/Regnase-3/Nfkbiz の三重欠損マウスでは Regnase-1/Regnase-3 の重欠損下で認めるリンパ球低下や骨髄球系細胞増多がレスキューされており、Nfkbiz の重要性が確認された。Nfkbiz の 3' UTR に存在するステムループ構造のうち、Regnase-1/Regnase-3 による認識に重要なものを同定し、そのステムループ構造に対するアンチセンスオリゴ核酸を合成すると、Nfkbiz mRNA が安定化し、そのタンパク質合成が著明に増強する事が明らかとなった。また、造血幹細胞の培養系を用いて、Nfkbiz のステムループ構造に対するアンチセンスオリゴ核酸を投与すると、Nfkbiz 発現が増強し、骨髄球系細胞への分化を亢進させることが明らかとなった (Uehata et al. Blood. 2024)。このように、Nfkbiz mRNA のステムループ構造も、アンチセンスオリゴ核酸による制御の標的として有用なものであることが考えられる。Regnase-1 欠損は、がん免疫の増強などにおいてもその有用性が明らかとなっている。Nfkbiz 標的 ASO は、細胞傷害性 T 細胞の活性化を強く亢進させたことから、構造標的オリゴ核酸の免疫増強への応用も期待される。また、免疫細胞活性化において、多数の mRNA 構造変化が認められたことから、さらに多くの標的 mRNA 構造やその制御法の開発につながる事が示唆される。

II. Overview of the Research and Development

Research Overview

RNA-binding proteins (RBPs) recognize diverse features of mRNAs, including primary sequence, chemical modifications, and secondary structures, thereby determining mRNA fate and regulating protein translation. Among these, we identified Regnase-1 (Reg1) as an RNA structure-recognizing RBP that binds stem-loop structures within mRNAs encoding inflammatory mediators such as cytokines, promoting their degradation and functioning as a brake on immune cell activation. Alterations in Reg1 expression or mutations are associated with human immune and inflammatory diseases.

Because mRNA structures are regulated not only by Reg1 but also by other RBPs such as Roquin, and because inflammatory stimuli dynamically remodel mRNA structures, targeting mRNA structural regulation represents a promising therapeutic strategy. Reg1 also degrades its own mRNA via stem-loop structures in its 3' UTR. We designed antisense oligonucleotides (ASOs) to disrupt these structures, resulting in suppression of Reg1 mRNA self-degradation and increased Reg1 protein expression.

In this project, we aim to:

elucidate the mechanisms of Reg1 structure-targeting ASOs using disease-model mice and human samples and optimize these oligonucleotides for therapeutic development;

develop novel immunoregulatory strategies targeting other stem-loop-recognizing RBPs; and

identify new disease-relevant mRNA structures through global analyses of stimulus-induced mRNA structural changes, coupled with proteomic identification of structure-recognizing RBPs, thereby enabling the development of next-generation RNA structure-targeting nucleic acid therapeutics.

Ultimately, this research seeks to establish a fundamentally new immunomodulatory strategy based on targeting mRNA structures.

Research Outcomes and Significance

We identified two morpholino-modified ASOs targeting distinct stem-loop structures in the 3' UTR of Reg1 mRNA. These ASOs suppressed Reg1 mRNA self-degradation, stabilized the transcript, and enhanced Reg1 protein expression. Unlike conventional ASOs that suppress gene expression, this represents a novel application in which ASOs increase target gene expression. Combined delivery of these ASOs into macrophages increased Reg1 levels and suppressed LPS-induced inflammatory cytokines, including IL-6 and IL-1 β , as well as other inflammatory mediators.

In mouse models, Reg1-targeting ASOs ameliorated disease phenotypes. Intracerebroventricular administration in an EAE model improved clinical symptoms and reduced neutrophil infiltration and microglial activation. Airway administration suppressed cytokine production and neutrophil infiltration in an acute lung injury model and attenuated fibrosis in a pulmonary fibrosis model.

We further demonstrated that this strategy is applicable to human Regnase-1. ASOs targeting conserved stem-loop structures in the human Regnase-1 3' UTR enhanced Regnase-1 expression and suppressed inflammatory cytokine expression in human macrophage cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells (Tse KM et al., *Sci Transl Med*, 2022). Clinically, Regnase-1 expression inversely correlated with disease severity in multiple sclerosis and pulmonary hypertension, indicating its functional relevance in human disease (Tse KM et al., *Sci Transl Med*, 2022; Yaku A et al., *Circulation*, 2022).

Beyond macrophages, we showed that Regnase-1 negatively regulates inflammatory activity in cDC1 cells, influencing cytotoxic T cell activation and disease progression in autoimmune models (Rong et al., *Frontiers in Immunology*, in press). These findings suggest cell type-specific therapeutic targeting of Regnase-1.

Finally, global mRNA structure profiling (icSHAPE-seq) revealed widespread stimulus-induced mRNA structural remodeling and identified more than 50 RBPs, including Regnase-1, potentially involved in structure-dependent regulation. We further identified Nfkbiz as a key Regnase-1/Regnase-3 target regulating hematopoietic lineage commitment. ASOs targeting stem-loop structures in the Nfkbiz 3' UTR stabilized its mRNA and enhanced protein expression, promoting myeloid

differentiation (Uehata et al., Blood, 2024).

Together, these results establish RNA structure-targeting ASOs as a versatile and innovative platform for both immunosuppressive and immunostimulatory therapies, opening new avenues for nucleic acid-based immunomodulation.