

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Division of Rare / Intractable Disease Research
- 研究開発課題名： (日本語) 免疫活性化分子の標的薬剤による全身性エリテマトーデス、多発性硬化症の病態抑制機構の解明と治療法の確立  
(英語) Targeting self-derived factors for the treatment of systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis
- 研究開発担当者 (日本語) 生産技術研究所・特任教授・谷口維紹  
所属 役職 氏名： (英語) Institute of Industrial Science・Project Professor・Tadatsugu Taniguchi
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) ヒト疾患研究のデザイン構築と解析及び研究  
開発課題名： (英語) To study the expression and functional role of disease-relevant molecules in the context of human disease, and to design therapeutic strategies for treatment of those diseases.
- 研究開発分担者 (日本語) 医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科・教授・山本一彦  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Allergy and Rheumatology, The University of Tokyo Hospital・Professor・Kazuhiko Yamamoto

## II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

強い免疫原性を持つ自己由来分子に対する自然免疫応答を標的とした2つの薬剤シーズ（small nuclear RNA を標的とする化合物 KN 及び HMGB1 を標的とする ISM ODN）の開発を進めるとともに、その分子作用機序の解明によって独自の視点から SLE、MS の病態解明を目指す。開発研究と基礎研究を平行して推進することにより、相乗的に革新的医療品の開発を促進させる。本年度の解析から以下の成果が得られている。

低分子 RNA である small nuclear RNA（以下 snRNA）が炎症を引き起こす機構について、当初想定していた核内タンパクではなく、ある種の抗菌ペプチドとの複合体形成が重要であることが明らかとなった。さらに、この複合体による免疫応答賦活化に抗核抗体が関与するという予備的知見も得られており、詳細について解析を進めている。また、snRNA の細胞からの放出機構として、好中球が放出する NET（neutrophil extracellular trap）に本 RNA が含まれていることが判明し、NET を放出する様態の細胞死である NETosis が本 RNA の放出に関与することが示唆された。一方で、低分子 RNA のトランスジェニックマウス及びノックアウトマウスについて、当初計画よりも若干遅れが生じているものの、作製が完了し、今後、これらのマウスを用いて低分子 RNA による病態発症機構をさらに解析する予定である。これらのような解析を進めるとともに、低分子 RNA に関する特許出願についても準備を進めている。

また、内在性の炎症誘発タンパクとして知られている HMGB1 を標的とする ISM ODN について、ISM ODN の投与によって MS のマウスモデルである EAE での病変部への T 細胞の集積が阻害されるという予備的知見が得られた。ISM ODN は HMGB1 による炎症促進作用を抑制することで、T 細胞の応答を制御していることが示唆される。この病態における HMGB1 の機能について、さらに詳細な解析を進めたところ、HMGB1 が核外に放出される際、翻訳後修飾を受けることが明らかとなり、この翻訳後修飾を同定した。この修飾部位に変異を導入すると、HMGB1 の核外への移行が著明に抑制されることも明らかとなった。この機構は、HMGB1 による上記の疾患の病態悪化に深く関わる可能性があるため、本修飾部位に変異を導入したノックインマウスを CRISPR/Cas9 の系を用いて作出した。このマウスを含め、すでに作成を完了した様々な HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスを用いて、今後さらに MS と HMGB1 との関係について検討を進める。また、ISM ODN については、構造改変と機能評価による改良を行っており、さらに応用開発を推進する予定である。一方で、ISM ODN について、単回投与による限度試験をガイドラインに従って実施し、非臨床安全性評価を行ったところ、微弱な体重減少を認めるのみで、剖検所見からもほとんど毒性は認められないという結果が得られ、ISM ODN の安全性が確認された。複数回投与による検討など、今後さらに安全性評価を進めていく。

ヒト疾患との関連について、これまで SLE 患者の血清中で snRNA 量が健常者と比べて増加していることを見出しているが、さらに本 RNA 及び HMGB1 の発現量について、多型の影響を受けるかを検討したところ、B 細胞中の HMGB1 の発現量が rs201189183 という多型に影響を受ける予備知見が得られた。これまでのところ、本多型と疾患との関わりについては報告がなく、詳細について解析を進める予定である。

(英文)

## **Progress report -**

Efforts have focused on further characterizing two self-derived, immunogenic molecules that we originally discovered as critical targets for the evocation and/or aggravation of systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS).

### **(1) SLE project**

We previously discovered a chemical compound, termed KN, which suppresses the development of SLE-like disease in autoimmune prone mouse. Subsequently, we found that KN selectively binds to a small nuclear RNA (snRNA) that, normally, is involved in mRNA splicing. This snRNA is implicated in SLE as a result of its potential to potently activate Toll-like receptor 7 (TLR7), which is known to be involved in the development of autoimmunity. Thus, our data support a model in which KN suppresses the immunogenicity of snRNA thereby attenuating the development and/or aggravation of SLE *via* the activation of TLR7.

We further identified the mechanism-of-action of the snRNA and revealed that it is delivered to immune cells where it activates TLR7 by pre-forming into a complex with an antimicrobial peptide. We also showed that this complex is recognized and bound by an anti-nuclear antibody (ANA), suggesting the involvement of snRNA-antimicrobial peptide-ANA multi-complex for the progression of SLE. In asking how the snRNA, which is normally located intracellularly, is released from the cell we revealed a mechanism by which the snRNA resides in neutrophil extracellular traps (NET). Notably, many of the molecules externalized through NET formation are considered to be key autoantigens and implicated in the generation of autoimmune responses in predisposed individuals, when released by NETosis, a novel form of programmed neutrophil death. These results lend further support to the notion that this snRNA is a long sought after culprit for the development and/or aggravation of SLE. Work is now in progress to generate transgenic mice that over-express this snRNA to demonstrate its gain-of-function role in the development of autoimmunity.

In addition, in light of emerging data that the KN compound may have cellular toxicity, we are also generating si-RNAs that inhibits the snRNA's immunogenicity for the development of a therapeutic drug for SLE. Finally, we have also generated data that show there is an elevation of this snRNA in the sera of SLE patients.

### **(2) MS project**

We previously generated a short oligonucleotide, termed ISM-ODN, that binds to HMGB1 (High Mobility Group Box 1) and inhibits the HMGB1's role in promoting inflammation and immunity (*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*;108, 11542-7, 2011). We subsequently found that ISM ODN suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the most commonly used experimental model for multiple sclerosis (MS). In this model, the involvement of DNA-driven TLR9 pathway is known, wherein HMGB1 is critical for the DNA-mediated TLR9 activation. Thus, one likely scenario is that ISM ODN suppresses TLR9-mediated events by interfering HMGB1's function. Nevertheless, HMGB1 *per se* may also be involved in neuro-inflammatory responses. We then found that in EAE mice, perilesional infiltration of inflammatory T cells is inhibited by the treatment of ISM ODN.

To better define the therapeutic potential of ISM ODN for the treatment of MS, we examined its toxicity, following the guideline of limiting test for non-clinical safe evaluation, and observed no toxicity in mice. In parallel, in collaboration with a pharmaceutical company, we have initiated efforts to design and express derivatives of ISM ODN that may be more effective in suppressing extracellular HMGB1.

Most HMGB1 protein is localized within the nucleus where it is released from a cell by a variety of extra-cellular stimuli such as lipopolysaccharide (LPS) stimulation to exert its inflammatory effects. In order to gain further

insight into the molecular basis of HMGB1's release, we analyzed modifications of extracellular HMGB1 and found a specific lysine acetylation that is critical for this process. Our experiments *in vitro* indeed revealed that this lysine residue is critical to the extracellular release of HMGB1. We then generated a genetically engineered strain of mice carrying a specific mutation of this lysine residue for the purposes of proof-of-mechanisms studies exploring extracellular HMGB1 effects on the development of EAE.

Finally, we showed that HMGB1 expression is affected by a single nucleotide polymorphism (SNP; rs201189183). Further study is underway to examine the relationship between this polymorphism and MS susceptibility

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：医学部附属病院アレルギー・リウマチ内科・教授・山本一彦 総括研究報告を参照。

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 7 件)

1. Kimura Y., Inoue A., Hangai S., Saijo S., Negishi H., Nishio J., Yamasaki S., Iwakura Y., Yanai H., Taniguchi T.; The innate immune receptor Dectin-2 mediates the phagocytosis of cancer cells by Kupffer cells for the suppression of liver metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2016, 113, 14097-14102.
2. Ban T., Sato G.R., Nishiyama A., Akiyama A., Takasuna M., Umehara M., Suzuki S., Ichino M., Matsunaga S., Kimura A., Kimura Y., Yanai H., Miyashita S., Kuromitsu J., Tsukahara K., Yoshimatsu K., Endo I., Yamamoto T., Hirano H., Ryo A., Taniguchi T., Tamura T. Lyn Kinase Suppresses the Transcriptional Activity of IRF5 in the TLR-MyD88 Pathway to Restrain the Development of Autoimmunity. *Immunity.* 2016, 45, 319-332.
3. Hangai S., Ao T., Kimura Y., Matsuki K., Kawamura T., Negishi H., Nishio J., Kodama T., Taniguchi T., Yanai H. PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2016, 113, 3844-9.
4. Morita K, Okamura T, Inoue M, Komai T, Teruya S, Iwasaki Y, Sumitomo S, Shoda H, Yamamoto K. Fujio K. Egr2 and Egr3 in regulatory T cells cooperatively control systemic autoimmunity through Ltbp3-mediated TGF- $\beta$ 3 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2016, 113, E8131-E8140
5. Iwamura T., Narumi H., Suzuki T., Yanai H., Mori K., Yamashita K., Tsushima Y., Asano T., Izawa A., Momen S., Nishimura K., Tsuchiyama H., Uchida M., Yamashita Y., Okano K., Taniguchi T. A novel pegylated IFN- $\beta$  as strong suppressor of the malignant ascites in a peritoneal metastasis model of human cancer. *Cancer Science.* 2017, doi: 10.1111/cas.13176. [Epub ahead of print]
6. Tsuge M., Uchida T., Hiraga N., Kan H., Makokha GN., Abe-Chayama H., Miki D., Imamura M., Ochi H., Hayes CN., Shimozono R., Iwamura T., Narumi H., Suzuki T., Kainoh M., Taniguchi T. Chayama K. Development of a novel site-specific pegylated interferon beta for antiviral therapy for chronic hepatitis B. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Apr 3. pii: AAC.00183-17. doi: 10.1128/AAC.00183-17. [Epub ahead of print]

7. Sumitomo S, Nakachi S, Okamura T, Tsuchida Y, Kato R, Shoda H, Furukawa A, Kitahara N, Kondo K, Yamasoba T, Yamamoto K, Fujio K. Identification of tonsillar CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> T cells as naturally occurring IL-10-producing regulatory T cells in human lymphoid tissue. *Journal of autoimmunity*. 2017, 76, 75-84

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. The regulation of immune responses by self-derived molecules, 口頭, 谷口維紹, The Rockefeller University, 2016/5/9, 国外
2. Regulation of inflammatory responses by self and non-self molecule, 口頭, 谷口維紹, Meeting Room 1003, Osaka International Convention Center, Osaka, Japan (International Symposium on Advanced Immunology), 2016/11/2, 国内
3. Regulation of intestinal inflammation by SP-D, 口頭, 谷口維紹, Harnack Haus, Berlin (The 3<sup>rd</sup> Symposium Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammolgy), Germany, 2016/11/28, 国外
4. 炎症と関連疾患に関する研究及び国際連携体制の現状と将来, 口頭, 谷口維紹, 東京大学生産技術研究所 (東京大学生産技術研究所・医科学研究所合同シンポジウム), 2017/1/20, 国内
5. DAMPs, Inflammation and Associated Diseases: The End of the Beginning?, 口頭, 谷口維紹, Dushu Lake Hall, Jinji Lake Grand Hotel, Jiangsu, China (Sanofi China Academy of Medical Science (CAMS) Symposium on Innovative Medicine), 2017/3/8, 国外
6. NOVEL THERAPEUTIC TARGETS IN AUTOIMMUNITY - TGF-beta3 AS A NOVEL TARGET OF IMMUNOTHERAPY, 口頭, 山本一彦, 10th International Congress on Autoimmunity ドイツ, 2016/4/9, 国外
7. Diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis, 口頭, 山本一彦, 21st Hong Kong Medical Forum 香港, 2016/5/6, 国外
8. Genomics and functional genomics of rheumatoid arthritis, 口頭, 山本一彦, the 18th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR) 上海, 2016/9/27, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 東京大学・生産技術研究所におけるオープンキャンパスにおいて、研究紹介や研究室訪問を実施した。 谷口維紹, 東大駒場オープンキャンパス公開, 2016/6/3-4, 国内.

(4) 特許出願