

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350522

研究課題名(和文) 抗FGF2アプタマーを用いた関節リウマチの病態制御

研究課題名(英文) Anti-fibroblast growth factor 2 aptamer improves existing arthritis in murine models

研究代表者

石黒 亮 (ISHIGURO, Akira)

法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員

研究者番号：70373264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は関節リウマチの病態形成に関わる線維芽細胞増殖因子FGF2に対するRNAアプタマーを創成し、発症機序解明と治療薬の開発を目的としている。申請者が作製した抗FGF2アプタマーはFGF2依存的なシグナルを強く遮断して、リウマチ関節炎モデルマウスを用いた投与試験で明らかな予防及び治癒効果を示す。GPI誘導関節炎モデルを用いて行った投与試験では病態形成後にアプタマーを投与した場合に於いても明らかな病態の軽減や早期の回復が確認された。さらにアプタマーの改変でより血清中安定性の高かった候補品の投与を行い、より薬効の高い候補の絞り込みを達成することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast growth factor 2, FGF2 is a heparin binding protein that mediates numerous cell signaling. Previous study suggested that FGF2 is an also important inducer of osteoclastogenesis and angiogenesis in human and animal joint. This is a first investigation against murine model of RA using anti-FGF2 specific antagonist. We developed anti-FGF2 RNA aptamer, that binds human and mouse FGF2 and blocks the interaction between FGF2 and its receptor. The inhibition of FGF2-mediated signal proteins, cell proliferation and repression of OPG (osteoprotegerin) production was analyzed in cultured cells. Mice with GPI-induced rheumatoid arthritis used to assess efficacy. Administration of anti-FGF2 aptamer inhibited the development of arthritic in a dose-dependent manner. Significantly, anti-FGF2 aptamer slowed the progression of arthritis when administered after the onset of GPI induced arthritis.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA アプタマー FGF2

1. 研究開始当初の背景

本研究遂行者はこれまで RNA とタンパク質の相互作用解析に立脚した研究(転写制御、非コード RNA、RNA の構造・機能相関など)を続けており、それらの経験は『RNA 医科学』という新規の分野に集約されるに到った。本研究課題では生体内の生理活性因子 FGF2 を制御する「機能性 RNA」分子を用いて疾患の発症機序解明や治療薬の開発を目的とする。(1) 分子生物学の黎明期から、RNA は単なる遺伝情報のコピーに過ぎないという思い込みが支配的だった。しかし、近年この考えは誤りであることが様々な研究によって明らかになってきた。RNA は単に一次配列や配列相補性に依存して働くだけでなく、タンパク質と同レベルの個性ある立体構造を形成して機能する高分子マテリアルとしてのポテンシャルを有している。この RNA の造形力を発掘する方法が SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)法である。始めに 4 種類の塩基(AUGC)のランダム配列の RNA プールを作製(10^{14} 数の chemical library)、標的となるタンパク質と結合する RNA を分離・増幅して 2 回目のプールを作製、この作業を繰り返す。このサイクルを 10 数前後行うことによって、最終的に標的タンパク質に強く特異的に結合する RNA 分子アプタマーを取得することができる。

(2) 線維芽細胞増殖因子(FGF; fibroblast growth factor)はヘパリン結合性増殖因子で、細胞増殖因子、血管新生因子、神経栄養因子として広い機能を有し、間葉系細胞、神経外胚葉細胞、内皮細胞を含む様々な種類の細胞の増殖を促進する。中でも FGF2 は骨形成促進作用を有する一方で、高濃度に於いては骨吸収因子として機能することが明らかとなってきた。ヒトやマウスの関節リウマチは FGF2 が強く発現していることが報告されており、関節部位での血管新生、滑膜細胞から産生される破骨細胞形成抑制因子(OPG/OCIF)の発現抑制、骨芽細胞からの RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)の発現促進、を通じて破骨細胞への分化を促進する可能性が示唆されている。しかしこれまで関節リウマチの発症機序における FGF2 の関与は良く理解されておらず、FGF2 のみの機能を特異的に阻害する薬剤や中和抗体も存在しない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では FGF2 が関節リウマチに及ぼす影響について以下の項目に関して明らかにする。

- ・ 関節リウマチのマウスモデル(GPI: glucose-6-phosphate isomerase 誘導関節炎モデル)を用いた FGF2 遺伝子及

びタンパク質の発現解析

- ・ 抗 FGF2 アプタマーを投与したマウス関節部における破骨細胞の分化
 - ・ 抗 FGF2 アプタマーを投与したマウスにおける炎症性サイトカインの産生
- さらに抗 FGF2 アプタマーを関節リウマチ治療薬へ応用する目的で以下の項目について検討する。

- ・ ヌクレアーゼ耐性付与を目的とした塩基修飾及び末端修飾の導入及び安定性の確認
- ・ 生体内での動態確認

このうち のマウスモデルについて、FGF2 遺伝子の高発現が本研究遂行の必須条件となるため、これらは先行して実験を行い既に確認済である。また、FGF2 依存的に変化する関連遺伝子も同時に解析し、確認している。

(2) 核酸医薬としては 1980 年代より研究が開始されたアンチセンスや 1998 年の RNA 干渉の発見を契機にその現象を利用した siRNA が知られている。これらは素材として RNA を用いる点は共通であるが、アンチセンスや siRNA が細胞内の mRNA を標的とするのに対し、RNA アプタマーは、タンパク質を標的にする点が大きく異なる。したがって、FGF2 の様な細胞外因子を標的とした場合、他の核酸医薬と異なり薬物輸送機構(ドラッグデリバリーシステム)を考慮する必要が無い。動物モデルへ任意の時期に必要な分量だけ投与可能であり、低分子薬や中和抗体と比較して体内動態の制御が極めて容易である。

(3) 関節リウマチの発症機序における FGF2 の機能解析が遅れている一因として、特異的な解析ツールが存在しなかったことが挙げられる。本研究が標的とする FGF2 は動物種を越えてタンパク質配列の保存性が極めて高く有効な特異的中和抗体の作製を阻む要因となっている。これに対し、アプタマーは SELEX 法を用いて人工的に作成されるので、抗原性の低い標的分子や抗原として精製が困難な標的分子に対しても作製が可能である。一般的に、阻害剤の標的への結合力は解離定数(Kd)で表されるが、医薬として開発されている抗体の Kd は平均して 10^{-9} モル前後であり、アプタマーはそれより 100 倍程度強いものが作出可能である。結合力という点では、ペプチド医薬はこれらに大きく及ばない。また、現在知られている全ての抗 FGF2 中和抗体は FGF2 以外の FGF ファミリータンパク質の機能も阻害してしまう。故に本研究計画で用いる抗 FGF2 アプタマー及びアプタマーの取得・修飾技術はオリジナリティーが高く、得られる結果は学術的に高い意義を持つと考えられる。関節リウマチにより引き起こされる関節部の破壊では破骨細胞の活性化が顕著に見られる。また、関節部位では血管新生や滑膜細胞の増殖が引

き起こされる。FGF2はこれらの発症機序全てに深く関わっていると示唆されており、本研究により破骨細胞の分化や炎症性サイトカインとの機能相関を明らかにしたい。解析に用いる抗FGF2アプタマーは同時に関節リウマチにおける血管新生や関節破壊の進行を阻害する医薬となり得る。FGFには23種類のファミリータンパク質が知られ創薬標的として注目されているが、いずれも動物種間で高度に保存され中和抗体の作製が難しい。そのため、FGF、結合タンパク質及びFGF受容体に対する阻害剤や抗体医薬の開発は盛んに行われているにも関わらず奏功していない。FGF2は重篤な骨疾患の標的として有望視されながら低分子や抗体での医薬開発が困難あるいは十分な成果をあげていないものであり、有効な薬が乏しいUnmet Medical Needsのある代表的な例である。また、FGF2は他にも、後縦靭帯骨化症、パジェット病のような骨代謝疾患、血管新生を伴う癌の浸潤や転移にも影響を有すると考えられており、様々なFGF2依存的疾患の治療薬となる可能性が高い。抗FGF2アプタマーはこれまで不明だった関節リウマチの発症機序解明に役立つだけでなく、いまだに十分な治療方法のない本分野において「適切な治療法を提供」する医薬の創出に直結する。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞の分化における FGF2 の役割

FGF2 の過剰発現により、滑膜細胞から産生される破骨細胞形成抑制因子 (OPG/ OCIF) が抑制される一方、骨芽細胞からの RANKL の発現が促進され、破骨細胞への分化が促進されることが示唆されている。これらの作用が関節リウマチの発症に関わっているなら、抗 FGF2 アプタマーをマウスモデルの発症前に投与することで、リウマチの発症を阻害するはずである。

(2) FGF2 により制御される炎症性サイトカイン及び分化・誘導因子の同定

関節リウマチでは滑膜組織に好中球、マクロファージ、T細胞、B細胞が集積して炎症を惹起する腫瘍壊死因子(TNF)やインターロイキン6、インターロイキン17等のサイトカインなどが産生されて滑膜細胞の異常増殖や破骨細胞の分化誘導にも関与することが知られている。これら因子とFGF2の関連はこれまで全く知られていない。FGF2のみを特異的に遮断するツールが無かったことも解析が遅れている一因である。滑膜細胞や破骨細胞を含む細胞集団を用いてFGF2による炎症惹起のシステムが明らかとなる。

(3) 抗 FGF2 アプタマーのヌクレアーゼ耐性及び体内動態の改善

天然の RNA はリボースの 2' 位が水酸基であるため、RNA 分解酵素によって極めて短時

間に分解され消失する。この分解を防ぐ為に、リボースの 2' 位をフッ素 (F) 化、デオキシ (H) 化、メチル (OMet) 化することが必要で、医薬として動態やコストを勘案して、候補アプタマーの全てのリボース 2' 位を OMet を優先しつつ、H や F に置換する作業を実施する。また近年の技術革新により LNA (Locked Nucleic Acid) や多数のアナログ塩基の導入、光学異性体の利用、チオール化、側鎖へのアミノ酸修飾など様々な改変も可能であり、安定性が低いという認識は既に過去のものとなりつつある。作製した候補群は、ヒト血清を用いて分解速度を計測するとともに、表面プラズモン共鳴法及び滑膜細胞を用いた活性評価試験で FGF2 への阻害効果を再確認する。RNA 分解に対して耐性な候補アプタマーが作製できた次のステップは、ヒト (や実験動物) での体内動態を向上させるためにアプタマー-RNA の両端あるいは片端にポリエチレングリコール (PEG) やコレステロールを結合する。分子量 1 万強のアプタマーは動物に投与した場合に、腎臓から排出され易く、比較的速やかに血中から消失する。PEG はその腎排出を抑制する上で顕著な効果があるため、血中動態を改善するために強力なツールとなる。

(4) マウス関節炎モデルを用いた薬効評価
in vivo におけるアプタマーの薬効試験は GPI 誘導関節炎モデルを用いて行う。GPI 誘導関節炎モデルは既に確立しており、アプタマーは免疫直後より腹腔内投与を隔日で行い、関節炎の発症及び病徴を非投与群と比較する。

4. 研究成果

(1) マウス GPI 誘導関節炎モデルを用いたアプタマーの投与試験を行った結果、関節リウマチの発症を強く抑制することが解った。この結果は FGF2 が関節リウマチ発症の原因因子であることと、本研究で使用するアプタマーが生体内で十分機能することを証明する結果である。また、関節部位で FGF2 の被制御遺伝子を搜索して関連因子の関与を RT-PCR 法や *in situ* ハイブリダイゼーション法、免疫染色法で解析、同定することが出来た。また、実際に破骨細胞の分化がどのように抑制されるかを組織解析により、RANK, RANKL その他破骨細胞の分化マーカーを用いて検討し、アプタマーの投与時期や投与期間を変えてマウスに投与することで、病態形成のどの段階で FGF2 が関与するのかを詳細に解析することができた。

(2) FGF2 により制御される炎症性サイトカイン及び分化・誘導因子の同定を行い、インターロイキン 6、インターロイキン 1

7等のサイトカインで発現の変化を確認した。

(3) 抗 FGF2 アプタマーのヌクレアーゼ耐性及び体内動態の改善を行った結果、血清中の半減期を大幅に遅らせることが出来、なおかつ末端に修飾を行うことで、体内動態の改善を確認することが出来た。

(4) マウス関節炎モデルを用い、抗 FGF2 アプタマーを用いて治癒効果を解析した結果、病態形成後にアプタマーを投与した場合に於いても明らかな病態の軽減や早期の回復が確認された。アプタマーの改変により血清中安定性の高かった候補品の投与を行い、より薬効の高い候補の絞り込み。またその際、投与量や投与間隔、投与方法についても検討を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Ishiguro A, Kimura N, Watanabe Y, Watanabe S, & Akira Ishihama. TDP-43 binds and transports G-quadruplex-containing mRNAs into neurites for local translation. *Genes Cells*. in press. (査読有り)

[学会発表](計4件)

Akira Ishiguro, Akira Ishihama, Nobuyuki Kimura: TDP43 recognizes and transports G-quadruplex-containing mRNAs into neurites for local translation. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会(兵庫県・神戸市)2015年12月1-4日

Akira Ishiguro, Nobuyuki Kimura: TDP43 recognizes and transports G4-containing mRNAs into neurites for local translation. 第58回日本神経化学会大会(埼玉県・さいたま市)2015年9月11-13日

石黒亮・渡辺すみ子・渡邊裕斗・山本兼由・石浜明: 筋萎縮性側索硬化症の封入体成分 TDP-43 タンパク質は RNA 立体構造を認識する. 第37回日本分子生物学会年会(神奈川県・横浜市)2014年11月25-27日

長嶺誠和・大瀧菜月・森重之・佐々木麻子・平本真介・春田和彦・石黒亮・中村義一: 抗 IL-17 アプタマーは C57BL/6J マウスにおける IL-23 誘導乾癬様皮膚炎を抑制する. 第37回日本分子生物学会年会(神奈川県・横浜市)2014年11月25-27日

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 亮 (ISHIGURO, Akira)
法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員
研究者番号: 70373264