

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15406

研究課題名（和文）デングウイルス中和核酸抗体の創製

研究課題名（英文）RNA aptamers targeting dengue virus

研究代表者

天野 亮（Amano, Ryo）

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：20818687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：独自に開発したウイルス様粒子を利用したアプタマー選抜法（VLP-SELEX）を基に、デングウイルス膜タンパク質を発現させたウイルス様粒子「DENV-VLP」を標的としたアプタマー創製法の最適化と高度化によって、感染増強リスクのない新規デングウイルス中和分子の創製に取り組んだ。選抜法やクラスタリング解析法の最適化、表面プラズモン解析を基盤とした結合および中和活性推定技法の確立等の技術的な高度化を実現し、全血清型（1-4型の4つ）のDENV-VLPに対して結合し、既存の中和抗体に対し競合阻害性（中和能）を示す分子の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デングウイルス感染症に対する中和抗体医薬の開発は難航している。その原因として、抗体依存的な感染増強現象による症状の重篤化が挙げられる。このリスクを回避し、より安全な治療薬を開発するためには、抗体に次ぐ新たな中和分子の創製が必須である。本研究では、VLPという精良な選抜材料（抗原）および核酸抗体「RNAアプタマー」の分子特性を活用し、感染増強リスクのない新規デングウイルス（DENV）中和分子を創製することに成功した。今後、本研究にて構築した中和分子創製技術の更なる最適化と高度化を実現することで、未だ治療薬のない多様なウイルスに対して適応可能な基盤技術へと発展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We generated RNA aptamers targeting dengue viruses (DENVs) as a neutralizing agent to overcome antibody-dependent enhancement (ADE) in the antibody-related treatments. To efficiently identify aptamers recognizing viral membrane proteins with native forms, we developed an original selection strategy named VLP-SELEX method that employs virus-like particles (VLPs) displaying DENV membrane proteins. After establishment and optimization of the binding analysis methods based on surface plasmon resonance (SPR), our assessment showed that some of the aptamers not only bind to all four serotypes but also compete for the interaction of a DENV neutralizing antibody with DENV-VLP, thereby suggesting neutralizing activity of the aptamers. Therefore, it seemed that our aptamer selection strategy has the potential to discover therapeutic molecules for broad viral infectious diseases.

研究分野：RNA医科学

キーワード：RNAアプタマー SELEX ウイルス様粒子 Virus-like particle デングウイルス 中和分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

デングウイルス (DENV) は、蚊媒介性のウイルスであり、その感染は一過性の熱性疾患であるデング熱、重篤化した場合は致死的なデング出血熱を引き起こす。これらデング感染症は熱帯・亜熱帯地域のみならず、輸入感染によって世界中に拡大しているが、効果的なワクチンや中和抗体の開発は難航している。その主な原因の一つとして、抗体依存性の感染増強現象による症状の重篤化が挙げられる。DENV には四つの血清型 (1-4 型) が存在し、特定の血清型に対する中和抗体は、異なる血清型に対し交差性を有するものの中和活性を示さない。そればかりか、この抗体-ウイルス複合体は、Fc 受容体をもつ単球細胞などに効率良く吸着し、感染を促進させ、症状の重篤化を招く。したがって、より安全なデング感染症の治療薬を開発するためには、感染増強による重篤化リスクのない中和分子の創製が必須である。

申請者はこれまで、核酸抗体と呼ばれる RNA アプタマーの特異的結合力の根源となる分子認識機構を理解するための学術研究とそれに基づく創製技術の開発研究に従事してきた。この分子は、医薬品としての上市実績を有し、他に類を見ない大規模ライブラリ (約 100 兆個分子以上) 多様な選抜材料 (抗原) や条件を許容できる柔軟な創製法「SELEX 法」によって造り出され、その創製過程では、ハイスループットシーケンサーによる大量配列の解読技術、バイオインフォマティクスを用いた統計的解析手法を活用できる等、多くの利点を有する優れた創薬モダリティの一つである。さらに、この分子は核酸分子であり、感染増強の誘因となる Fc 受容体結合部位を持たないため、デング熱の重篤化発症を回避するという点においても、従来の抗体と比較し、優位性を有する。また、申請者らは学術および創薬の両面において極めて重要な膜タンパク質に対する汎用的なアプタマー創製技術基盤の確立のため、標的膜タンパク質をウイルス様粒子 (Virus-like particle, VLP) の膜上に発現させた材料を用いたアプタマー選抜法「VLP-SELEX 法 (Takahashi M, Amano R et al. *PNAS*. 118, e2019497118, 2021)」を開発している。この手法は、従来の組換え膜タンパク質を用いる手法と比べ、生理的な配向性と活性構造を維持した状態の標的に対して SELEX 法の実施が可能であるという特色をもつ。従来通りの DENV の組換え E タンパク質を選抜材料とした先行研究では、中和活性を示すアプタマーの創製に至っていないことから、中和アプタマー創製のためには良質な材料とそれに適応した新たなアプタマー創製技術の構築が必須であるのは明白である。そこで、独自の VLP-SELEX 法を基に、デングウイルス膜タンパク質 (E, prM タンパク質) を発現させた「DENV-VLP」を標的としたアプタマー創製法の最適化と高度化を実施することによって、RNA アプタマーによる感染増強による症状の重篤化を回避できる革新的なデングウイルス中和分子の創製が実現できるのではないかと考え、本研究の発案とその検証に至った。

2. 研究の目的

RNA アプタマー特有の分子特性およびその柔軟な創製法を活用し、感染増強による症状重篤化リスクのない新規 DENV 中和分子の創製を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、申請者らが独自に開発したアプタマー選抜法 (VLP-SELEX 法) を基に、市販のデングウイルス様粒子 (DENV-VLP, Native Antigen 社) に対し SELEX 法の最適化を施した。DENV-VLP 以外に特異的あるいは非特異的に結合する分子を *in silico* で効率良く選別するために、ハイスループットシーケンサーとアプタマーに特化したバイオインフォマティクスソフト「FASTAptamer (Alam, K. K. et al. *Mol Ther Nucleic Acids.*, 3, e230, 2015)」を用いた統計的配列解析法の最適化を図った。次に、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を基盤としたアプタマーと VLP の結合および中和活性推定技法の確立・最適化し、候補配列の結合力と中和能を評価した。さらに、高い結合親和性を有し、中和活性を示したアプタマーの結合活性を向上させるため、配列の最適化を図った。

4. 研究成果

(1) DENV-VLP に対するアプタマー選抜「VLP-SELEX」

適宜種々の条件を検討し、DENV-VLP に対する VLP-SELEX 法の最適化を試みた。RNA ライブラリと DENV-VLP を混合し、限外ろ過カラムを用いて VLP 結合分子と非結合分子を分子サイズの違いで分離した。回収した結合 RNA は逆転写 PCR および試験管内転写合成にて増幅し、次の工程におけるライブラリとした。この操作を 10 回程度繰り返すことで、ライブラリを濃縮することができた。さらに、効率良く中和活性を示す分子を濃縮するため、既存の中和抗体 (Native Antigen 社, Clone No.4G2) を用いて VLP から結合 RNA を溶出する選抜法「LIGS-SELEX 法 (Zumrut, H. E. et al. *Nucleic Acid Ther.* 26, 190-8, 2016)」を実施し、ライブラリを濃縮することに成功した。また、選抜における条件検討の効率化 (時間・コスト削減等) のため、2 種類の異なる血清型 DENV-VLP の混合標的に対するマルチプレックス SELEX 法を確立・最適化した。

(2) *in silico* 手法による配列解析

目的以外の配列を効率的に除去できるように、上記(1)の SELEX 実験から得られた濃縮ライブラリは、DENV-VLP と非標的 VLP とそれぞれ混ぜ合わせ、両者に結合した配列をハイスループットシーケンサーによって解析した。得られた配列情報は、アプタマー配列解析ソフト「FASTAptamer」にて解析した。具体的には、数塩基(6 塩基程度) 違いの配列を同一クラスターとし、その中で最もリード数が多い配列を代表配列とした。次に、代表配列の中で DENV-VLP に特異的な配列、あるいは非標的 VLP と比較した際に DENV-VLP への濃縮(2 倍以上) が確認できた配列を候補配列とした。このように、数塩基違いの配列群を一つのクラスターとして処理し、その代表配列の濃縮率を指標とすることで、ハイスループットシーケンサーから得られる膨大な配列情報から幅広い配列的特徴を持つ候補配列を抽出することができた。

(3) SPR 解析による候補配列の性能評価

SPR 法(BIAcore system)を用いたアプタマーと VLP の結合評価系を確立・最適化し「結合力」を評価することに加え、その結合評価系を基盤に、既存の中和抗体との競合的な結合を指標とした「中和能」の検証を実施した。具体的には、SA センサーチップ上にアプタマーを固相化し、VLP との結合を検出した。次に、結合が確認できたアプタマーについて、CM5 センサーチップ上に固相化した中和抗体と VLP の結合を競合阻害するか否かを評価し、中和能を有すると推測される分子を選定した。その結果、全血清型(1-4 型の 4 つ) の DENV-VLP に対して結合し、既存の中和抗体に対し競合阻害性(中和能) を示すアプタマー分子の複数取得に成功した(10 種類以上)。

(4) アプタマーの配列最適化

高い結合活性及び中和活性を示したアプタマーの結合活性をより向上させるため、配列の最適化を図った。医薬品とする場合の安全性や品質管理、製造コストの観点に加え、配列改変等の最適化作業の効率化の観点からも、活性に影響を与えない不要な配列を除去し、可能な限り短くする必要がある。そこでまず、二次構造を予測し、その構造情報に基づいてアプタマーの短鎖化を実施した。その結果、全長 78 残基のアプタマーの 54 残基まで短くし不要な配列を除くことで、結合活性を若干向上させることに成功した。さらに、活性に影響を与えることなく 53 残基まで、低下はするが保持させたまま 49 残基まで短くすることにも成功した。次に、短鎖化したアプタマーの結合活性を向上させるため、53 残基および 49 残基のアプタマーそれぞれを鋳型として、骨格となる配列(ステム等) 以外をランダム化したライブラリと各塩基に一定の割合で変異を導入したライブラリを作製し、再度アプタマー選抜法(Doped SELEX 法) を実施、配列最適化を試みた。その結果、49 残基のアプタマーを鋳型とした再選抜からは結合活性が向上した分子は取得できなかったが、53 残基のアプタマーを鋳型とした再選抜からは、オリジナルの短鎖化アプタマーよりも結合活性が向上した分子を取得することに成功した。今後は、当該分子の更なる短鎖化及び配列改変による結合活性の向上を図りながら、化学修飾の導入による生体内での安定性向上にも注力し、製薬企業に導出できる質の高い分子の創製を目指す。

以上、本研究課題では、抗体との相性の悪さ故、中和分子の創製が困難とされる DENV を標的として、VLP という精良なアプタマー選抜材料、それに対する選抜技術や配列解析手法の最適化、結合および中和活性推定技法の確立などの技術的な高度化を実現し、感染増強リスクのない新規 DENV 中和分子の創製を達成することができた。さらに、本研究にて構築した RNA アプタマーによる中和分子創製技術は将来、未だ有効な治療薬のない多くのウイルスに対して適応な基盤技術へと発展することも期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masaki Takahashi, Ryo Amano, Michiru Ozawa, Anna Martinez, Kazumasa Akita, Yoshikazu Nakamura	4. 巻 118
2. 論文標題 Nucleic acid ligands act as a PAM and agonist depending on the intrinsic ligand binding state of P2RY2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2019497118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2019497118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Amano, Masato Namekata, Masataka Horiuchi, Minami Saso, Takuya Yanagisawa, Yoichiro Tanaka, Farhana Ishrat Ghani, Masakuni Yamamoto, Taiichi Sakamoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Specific inhibition of FGF5-induced cell proliferation by RNA aptamers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 2976
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82350-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天野亮, 一ノ瀬顕子, 浜田道昭, 中村義一, 高橋理貴
2. 発表標題 ウイルス様粒子とMultiplex SELEXを用いたデングウイルス中和アプタマーの創製
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 天野亮, 一ノ瀬顕子, 浜田道昭, 中村義一, 高橋理貴
2. 発表標題 ウイルス様粒子とin silico解析を用いたデングウイルス中和アプタマーの創製
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------