

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21880

研究課題名(和文)多重特異性多機能キメラ核酸による革新的ウイルス感染治療分子の創製

研究課題名(英文)Development of multi-functional siRNA-aptamer chimera for virus infections

研究代表者

高橋 理貴(Takahashi, Masaki)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：00549529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はウイルス感染症の新規治療分子創出への挑戦を目的として、核酸抗体「RNAアプタマー」によるウイルス中和機能と「siRNA」によるウイルスゲノム分解機能を併せ持つ複合体「多重特異性多機能キメラ核酸」の創製とその有効性評価研究を実施した。その結果、デングウイルスをモデル標的として、結合活性および中和活性を有するアプタマー分子の同定、高効率にゲノムRNA配列を分解するsiRNAの同定にそれぞれ成功し、それらの複合体の作製と評価を行った結果、ウイルス様粒子に高い結合活性を持ちRNA干渉能を保持するキメラ核酸の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染症には、デングウイルスなどの未だ効果的なワクチンや中和抗体が開発できていない再興ウイルス感染症が多く存在する。長期にわたり続く課題の克服には、新たなアプローチによる治療薬開発への挑戦的研究が必要である。その実現のため我々は、上市実績のある機能性核酸「アプタマー」「siRNA」の2つを活用することで、ウイルス中和活性とウイルスゲノム分解活性を併せ持つ「多重特異性多機能キメラ核酸」の開発とその有効性評価を実施した。多様化が進む創薬モダリティの一つとしてキメラ核酸を提案し、その有効性を検証した本成果は今後のウイルス治療分子開発を議論する上で大きな意義を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to generate a new therapeutic agent for viral infection. To address this, we generated siRNA-aptamer chimera molecule multiply achieving viral neutralization and degradation of viral genome. In the study, we focused on a re-emerging virus disease, dengue virus (DENV), as model target, and generated aptamers and siRNA targeting DENV E-protein and RNA viral genome, respectively. As a result, we succeeded in identifying aptamers with binding and neutralizing activity to DENV, and further succeeded in design of siRNAs degrading DENV genomic RNA sequences. After development of each functional molecule, chimeric nucleic acids were prepared, and their performance as a complex was evaluated by SPR analysis and reporter assay in vitro. A series of assays revealed that chimeric molecule retained both binding activities and RNA interference ability.

研究分野：RNA医科学

キーワード：RNAアプタマー siRNA ウイルス キメラ核酸

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症には、デングウイルス(DENV)などの未だ効果的なワクチンや中和抗体が開発できていない再興ウイルス感染症が多く存在する。DENV に対する既存の創薬モダリティであるワクチンや中和抗体を用いた創薬実現の最大の障壁となっているのが、ウイルスが複数(4つ)の血清型を持つことに起因する抗体依存性感染増強(ADE)現象が副作用として生じるためである(N Engl J Med. 2018;379:327-40)。複数あるウイルス血清型の全てに対して効果的なワクチンや中和抗体を作製する必要があるが、その実現は極めて困難であり、複数の製薬企業が開発を試みるも上市に至った分子は未だ存在しない。

この課題の克服には、複数の血清型全てを同時に標的として創薬が可能な創薬モダリティの選定と、当該分子の開発技術の高度化と最適化を実現するための挑戦が必要となる。近年注目されている創薬モダリティの一つとして核酸医薬があり、様々な作用機序を持つ有力分子が存在する。核酸アプタマーは、核酸抗体とも呼ばれ、抗体と作用機序が似ており、中和活性分子の創製が可能である。しかし、ウイルス粒子表面の膜タンパク質に対して効果的かつ複数の血清型に対応するアプタマー創製技術は未だ存在しない。また、RNA 干渉を利用した siRNA 創薬では、複数の標的に対して共通配列を狙った分子設計技術やその評価法が確立されているため、目的とする分子の創製が比較的容易であると思われる。しかし、ウイルス感染した細胞に送達する技術開発が依然停滞していることから、その実現には更なる工夫が必須である。申請者は、これまでに機能性核酸の開発研究に実績を有しており、上記課題を解決しつつ機能性核酸の利点を活用した分子と成り得る新たなキメラ核酸開発の着想に至り、その分子開発と有効性評価を本研究で実施した。

### 2. 研究の目的

DENV など効果的なワクチンや中和抗体の開発が進んでいない再興ウイルス感染症が未だ多く存在する。この現状を変える解決案として、申請者が有する「ウイルス様粒子を活用した膜タンパク質アプタマー開発技術」と一塩基の違いを識別する「特異的 RNAi 誘導技術」とを融合することで、ウイルスの中和活性部位に特異的かつ強固に結合し感染を防ぎ、感染した場合も細胞内でウイルスゲノムを RNAi で分解する“All-in-One molecule”となる「多重特異性多機能キメラ核酸(Aptamer-siRNA Chimera)」の開発に挑戦し、その有効性を評価することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究の目的は、ウイルスの中和活性部位に特異的かつ強固に結合し感染を防ぎ、感染した場合も細胞内でウイルスゲノムを RNAi で分解する「RNA アプタマー」と「siRNA」の複合体となる「多重特異性多機能キメラ核酸(Aptamer-siRNA Chimera)」を開発することである。DENV をモデル標的とした当該分子の開発のため、以下の3つの方法で研究を遂行した。

#### 3-1) DENV を標的としたアプタマーの創製：

ウイルスの膜タンパク質に対してアプタマーを創製するため、ウイルス様粒子(Virus-like particle, VLP)を用いたアプタマー創製法(SELEX)である「VLP-SELEX法」を開発した。開発当初、GPCRなどの膜タンパク質に対するSELEX法としてプロトタイプを開発し、これを更にウイルス膜タンパク質を標的としたSELEX法として最適化した。具体的には、DENVの膜タンパク質であり感染に必要となるE-proteinとM-proteinを表面に提示・発現する市販のVLP(Native Antigen社)をアプタマーの選抜材料に用いてアプタマーのスクリーニングを行う技術の高度化と最適化を行った。濃縮したライブラリをハイスループットシーケンス(High-throughput sequencing, HTS)に供し、標的に結合していた膨大な配列データを取得し、パイオインフォマティクスツール(FASTAptamer, Clustal-Omega, MEME)を活用することで、効率的にアプタマー候補配列の探索を行った。

次いで、候補配列の結合能を調べるため、表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance: SPR)解析法に基づく結合検出技術の最適化を行った。VLPのような分子サイズの大きなタンパク質複合体とアプタマー分子との相互作用検出系が存在しなかったため独自の検出系を立ち上げた。結合そのものを評価する系では、アプタマーをセンサーチップに固相化し、VLPをアナライトとして相互作用を検出する技術を確立した。更に中和活性の有無を評価する系では、既存の中和抗体との競合的結合を指標とすることで、中和活性を有するアプタマーを推定する技術についても確立できた。これらの技術とDENVの4つの血清型のVLPを用いることで、結合力と中和能力を有したアプタマーの選定を行った。

#### 3-2) DENV のウイルスゲノムを標的とした siRNA の創製：

DENV の RNA ウイルスゲノムを分解する siRNA の作製を行った。具体的には、4つの血清型の DENV ウイルスゲノムの共通配列を標的として siRNA 分子の配列を選定した。実際の標的配列として、3'UTR に共通配列が数か所確認できたためこれを標的とした。また、RNA 干渉能力の高い siRNA を同定するために、市販のレポーターアッセイシステムを用いて標的分解活性を評価した。具体的には、psiCHECK2 vector (Promega 社) の Renilla luciferase の 3'UTR に RNA 干渉標的の配列となる DENV の 3'UTR を挿入した評価用ベクターを構築した。特殊な構造を取ることが知られている DENV の 3'UTR のほぼ全長を挿入することで、当該遺伝子の特殊な 2 次構造を模倣した Renilla luciferase レポーターを作製した。そのレポーターと siRNA をリポフェクションにより HEK293 細胞に導入し、Dual-luciferase reporter assay system (Promega 社) によってレポーターの発現量を確認し siRNA の分解活性を評価し、最も活性が高い siRNA 分子を選出した。

### 3-3) DENV を標的とした aptamer-siRNA chimera の創製と評価：

上記で作製した RNA アプタマーと siRNA との機能性核酸複合体である aptamer-siRNA chimera を作製し、個々の機能性核酸分子と複合体とした際の性能を評価した。複合体の分子設計としては、RNA アプタマーと siRNA との 2 分子の構造保持のためスパーサーを介した構造とした。また、ウイルス表層に結合したまま細胞内にエンドソームとして侵入した際、エンドソームから離脱して RNA 干渉作用を発揮するため、それを促すことが知られているアミノ酸(Endosome Escape Domain, EED)を付加した分子も設計し、合成した。また、キメラ体使用する RNA アプタマーは、中和活性を有する分子を組み込むと、そもそもウイルス様粒子(あるいは生ウイルス)が細胞内に侵入することを防いでしまうため、siRNA の RNA 干渉効果を評価する事が困難となる。そのため、今回設計したキメラ核酸では、敢えて中和活性は無いが結合能力が高いアプタマーをキメラ核酸に組み込んだ。そのキメラ核酸に対して、SPR 解析によって DENV-VLP への結合を評価し、レポーターアッセイによって RNA 干渉効果を評価した。また、ウイルスと共に細胞に侵入し、RNA 干渉を起こす効率を評価するため、脂質膜を標識できる DiD 蛍光色素によって DENV-VLP を標識し、その DiD 標識 DENV VLP を DENV レポーター 遺伝子をトランスフェクションした HEK293 細胞と混ぜ合わせた。混合後 24 時間経過した培養細胞を FACS にて DiD 蛍光色素陽性細胞をソーティングし、レポーターの発現量を Dual-luciferase reporter assay system によって確認することで、キメラ核酸の RNA 干渉効果を推定した。

## 4. 研究成果

DENV をモデル標的として「RNA アプタマー」と「siRNA」の複合体となる「多重特異性多機能キメラ核酸 (Aptamer-siRNA Chimera)」の開発と有効性評価に取り組み、以下の成果を得ることができた。

### 4-1) DENV を標的としたアプタマーの創製：

様々な膜タンパク質に対するアプタマー創製法を確立するため、VLP をアプタマーの選抜材料とする新しい SELEX 「VLP-SELEX 法」を確立した。標的以外の膜タンパク質に結合する配列を効率的に除去するため、標記タンパク質の含まない VLP をアプタマーの選抜過程およびバイオインフォマティクスを使用した配列解析過程で活用した。その結果、立体構造が不安定とされる膜受容体である GPCR に対してアプタマー取得できる基盤技術であることを示すことができた(図 1, 2021 PNAS, M Takahashi et al.,)。この技術を基に、DENV が感染するため必要な膜タンパク質 (E-protein, M-protein) を粒子表面に提示する VLP をアプタマー選抜材料として VLP-SELEX を実施した。その結果、VLP-SELEX 法を最適化することで DENV - VLP に対しても、アプタマーライブラリを濃縮させ、HTS による候補配列の解析まで進むことができた。次いで、標的 VLP に対する候補配列の結合性を SPR 解析法によって評価した結果、高親和性を示す複数の結合配列を取

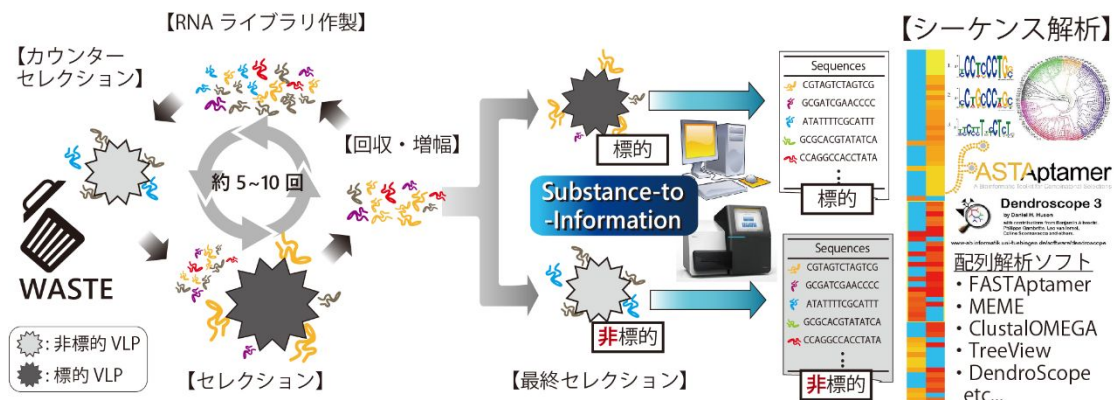


図 1. VLP を活用した膜タンパク質結合アプタマー創製法「VLP-SELEX 法」の確立。得することに成功した。また、SPR 解析法を基盤として、アプタマーと既存の中和抗体との競合

的な結合（中和抗体への結合阻害）を観察することで、同定したアプタマーの中和活性を推定する評価系もついても確立した。この評価系を用いて結合配列の中和活性の有無を調べたところ、非常に強く中和抗体の結合を阻害する分子を同定できた（図2）。一連の実験により、強く結合するが中和活性が無い分子や、目標とする強く結合し中和活性を有する分子など、様々な分子の取得に成功した。また中和活性のあった分子については、ウイルス膜タンパク質融合評価系において、IC50 が 20nM 程度の中和活性を有する事も確認している。

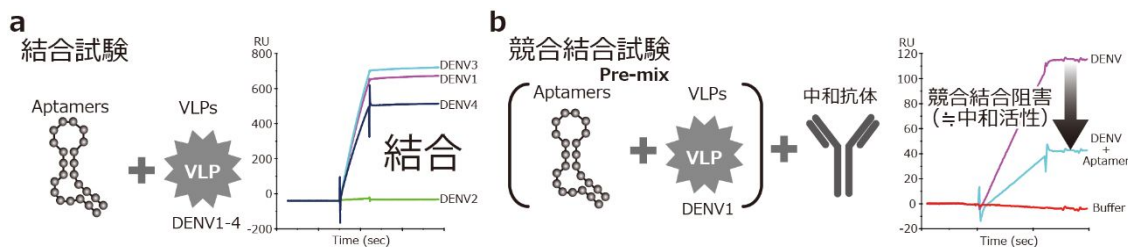


図2. SPR 解析法による DENV に対するアプタマー結合評価。a) 取得アプタマーと DENV 膜タンパク質を発現する VLP との結合評価試験。b) 中和抗体を用いて競合結合阻害効果の測定による中和活性評価試験。

#### 4-2) DENV のウイルスゲノムを標的とした siRNA の創製：

DENV のウイルスゲノムを分解する siRNA 作製では、全血清型（1～4 型）の共通配列を認識し切断する siRNA を設計した。共通配列を探索した結果、DENV の RNA ウイルスゲノムの 3' UTR において 20 塩基（siRNA の標的として利用するための長さ）以上の共通配列が複数存在し、これを標的とする siRNA の活性を評価した（図3）。その結果、本実験で設計した siRNA の中には、標的配列が組み込まれたルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を約 80%程度、強く抑制する分子が存在した。強い RNA 干渉能力を持った siRNA については、更に、長さや末端形状（2 塩基オーバーハング型、フォーク型）について検討し、最も標的 RNA の分解活性が高い配列を決定した。

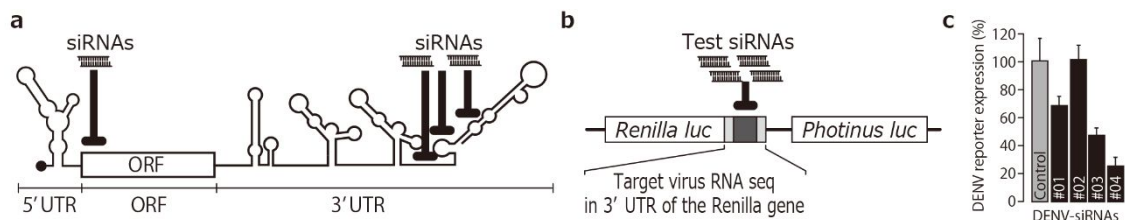


図3. siRNA 設計とその評価。a) DENV1-4 の RNA ゲノムで共通性の高い配列（ORF と UTR）を標的とした siRNA を設計。b) ルシフェラーゼレポーターによる RNAi 誘導効果の評価。c) siRNA のノックダウン試験結果。

#### 4-3) DENV を標的とした aptamer-siRNA chimera の創製と評価：

上記で作製したアプタマーと siRNA の複合体を合成し、その機能を評価した。2 種の RNA が互いに干渉せず機能するために、C3 スペーサーを介した複合体とした。siRNA の antisense 鎖が RISC に取り込まれ機能しやすい形状とするため、sense 鎖とアプタマー配列が一分子となるよう設計した。更に、siRNA の sense 鎖には、5 末端にアプタマーを結合させることに加え、3 末端にエンドソームエスケープの効率を上げるために有効と報告があるペプチド配列「GFWFG」を付加した分子も設計・合成した。まず、キメラ核酸（GFWFG 有り・無し）の VLP への結合性能を評価するため、SPR 解析を行った。すると、アプタマー単独と変わらない結合活性を持っている事が分かった。次いで、キメラ核酸（GFWFG 有り・無し）の RNAi 効果を、トランスフェクションによって細胞に導入するレポーターアッセイ系にて評価した結果、キメラ核酸の「GFWFG 無し」の分子では siRNA 単独分子と同程度の RNAi 効果（80%ノックダウン）を示し、キメラ核酸の「GFWFG 有り」の分子では siRNA 単独分子と比較し若干弱い RNAi 効果（70%ノックダウン）が観察された。更に、DiD 蛍光色素で標識した DENV の VLP とキメラ核酸（GFWFG 有り・無し）を混ぜ合わせ、レポーター遺伝子を導入した HEK293 細胞に添加したところ、レポーター遺伝子の発現を 20%程度抑制することが分かった。

これら上記の結果から、ウイルスの VLP を活用することで中和活性のある核酸抗体「RNA アプタマー」が創製でき、DENV の全血清型を標的として強い RNAi 誘導効果を持つ siRNA を同定できた。そして、それらの成果物の複合体としてキメラ核酸を合成し、その性能を評価した結果、複合体は、2 つの機能性核酸の能力を損なうことなく機能（結合し RNAi 活性を発揮）することが分かり、ウイルスの膜表面に結合し、ウイルスと共に細胞内へ侵入し RNAi を誘導する戦略では、約 2 割程度のゲノム RNA 分解効果を持つことが明らかになった。今後、生ウイルスによる実証実験を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1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 Takahashi Masaki, Amano Ryo, Ozawa Michiru, Martinez Anna, Akita Kazumasa, Nakamura Yoshikazu	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	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 高橋理貴	4. 巻 37
2. 論文標題 キメラ核酸：アプタマーとsiRNAの応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 69-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 高橋理貴	4. 巻 2
2. 論文標題 アプタマー	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 先端の分析法	6. 最初と最後の頁 526-529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 高橋理貴	4. 巻 36
2. 論文標題 アプタマーとsiRNAによる2重特異性多機能キメラ核酸	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 71-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4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 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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 VLPを利用したMulti-target SELEXとin silico解析によるデングウイルス中和アプタマーの創製
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤覚、天野亮、中村義一、高橋理貴
2. 発表標題 チクングニアウイルス様粒子標的RNAアプタマー
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋理貴
2. 発表標題 膜タンパク質GPCRに対するアプタマー創製法「VLP-SELEX法」の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------