

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2020～2022

課題番号：20KK0126

研究課題名（和文）人工エクソソームに封入したRNAアプタマーによる神経変性疾患治療法の開発

研究課題名（英文）International research project on nucleic acid aptamers and their exosome-based application to therapeutics for synucleinopathy

研究代表者

村上 一馬（Murakami, Kazuma）

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80571281

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：RNAアプタマーは、標的分子に対する高い結合能と選択性を特徴とする。本研究では、シヌクレイン（Syn）のN末領域に対するRNAアプタマーの開発とその治療基盤を築くことを目的とした。試験管内人工進化法とin silico解析を駆使して、N末領域特異的なRNAアプタマー（1R6）を得た。1R6はSynのin vitro凝集と細胞間伝播を強く阻害した。病態マウス脳のSynの細胞内蓄積物に1R6が結合したことから、1R6はシヌクレイノパチーに対する有望な創薬リードになる可能性がある。また血液脳関門への透過性を高めた人工エクソソームを開発したことから、今後1R6の効率的な脳内送達期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Syn凝集体の蓄積はパーキンソン病の病理的特徴の一つであることから、その検出薬は研究を進める上で重要である。しかし従来の検出薬は分解や切断を受けやすいSynのC末領域に対するものが大半であり、凝集に重要なN末領域は正電荷をもつ繰返し配列が集中することから、抗体には認識されにくいという長年の課題があった。そこで負電荷が多いRNAアプタマーは、本課題の打開策になりうると考えた末、1R6の開発に成功した。1R6は従来抗体では認識できなかったSyn凝集体を捉えている可能性があり、学術的意義は高い。脳内送達を可能にする人工エクソソーム技術と組み合わせることで治療応用が期待され、社会的にも意義深い。

研究成果の概要（英文）：RNA aptamers are characterized with high affinity and selectivity to target molecules. This study aimed to develop an RNA aptamer for the N-terminal region of  $\alpha$ -synuclein (Syn), a presynaptic neuronal protein that is linked genetically and neuropathologically to Parkinson's disease (PD), and to establish its therapeutic basis. Using in vitro SELEX and in silico analysis, anti-N-terminal RNA aptamer (1R6) was obtained. 1R6 strongly inhibited in vitro aggregation and intercellular transmission of Syn. The binding of 1R6 to intracellular accumulations of Syn in a mouse model of Parkinson's disease indicates that 1R6 could be a promising drug lead for the treatment of synucleinopathies. Moreover, we developed a technological basis using artificial exosomes with the enhanced permeability to the blood-brain barrier, so the efficient brain delivery toward therapeutics is expected.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：アプタマー エクソソーム 神経変性疾患 計算科学 核酸医薬 ドラッグデリバリーシステム シヌクレイン 国際共同研究

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) やレビー小体型認知症の病態において、細胞内における凝集を特徴する  $\alpha$ シヌクレイン ( $\alpha$ Syn) の関与が指摘されている。従来の抗  $\alpha$ Syn 抗体は C 末領域 (96-140 残基) を認識するものがほとんどであるが、これらの領域は  $\alpha$ Syn の凝集過程で欠損しやすい<sup>1)</sup> (図 1A)。一方、 $\alpha$ Syn の N 末 (1-60 残基) および中央領域 (61-95 残基) では、リシン残基等のカチオン性アミノ酸からなる繰り返し配列 (KTKEGV) が抗体に認識されにくいことから、有力な N 末領域特異的抗体は存在しなかった。近年、核酸アプタマーは、類似の分子検出薬である抗体と同様に、標的分子への高い結合能と選択性を示すことから注目されている。これまでに、本研究代表者らはアミロイド  $\beta$ 42 (A $\beta$ 42) のオリゴマー形成および神経細胞毒性を抑制する RNA アプタマーの開発に初めて成功した<sup>2-4)</sup>。本成果は、これまで停滞していた凝集性タンパク質へのアプタマー適用に新たな方向性を示すものとして、国際アルツハイマー病学会等で注目を集めたことから、これらの研究成果を起点に神経変性疾患に対するアプタマー開発研究の国際的なネットワークの構築に着手した。また  $\alpha$ Syn は A $\beta$ 42 等の異種アミロイドと共凝集しやすいことから、治療戦略の波及効果も期待できる<sup>5,6)</sup>。研究開始時 (2020 年 10 月) はコロナ禍の真っ只中だったが、オンラインツールを駆使しながら、日米豪の若手研究者が協同してアミロイドのアプタマー開発研究を推進しようという機運が高まった。

## 2. 研究の目的

このような背景の下、RNA アプタマーはアミロイドへの高い結合能と特異性を特徴とした新しい核酸医薬として注目されている<sup>7,8)</sup>。全長 140 残基の  $\alpha$ Syn は凝集することで神経細胞毒性を示す。上述のように、 $\alpha$ Syn の N 末領域は脳内凝集物中で多く認められるにも関わらず、N 末領域を認識する抗体はほとんどなかった原因として、アニオン性のアミノ酸が多い中央および C 末領域に比べて、N 末領域のカチオン性のリシン残基を含む繰り返しモチーフは、抗体に認識されにくい点が挙げられる。そこで、負電荷が多い RNA アプタマーは、これらの課題の打開策になる可能性があると考えた。本研究の目的は、 $\alpha$ Syn の N 末領域特異的 RNA アプタマーを作製し、 $\alpha$ Syn の細胞内凝集への影響を調べるとともに、人工エクソソームに RNA アプタマーを包含することによって PD 治療法の技術基盤を構築することである。

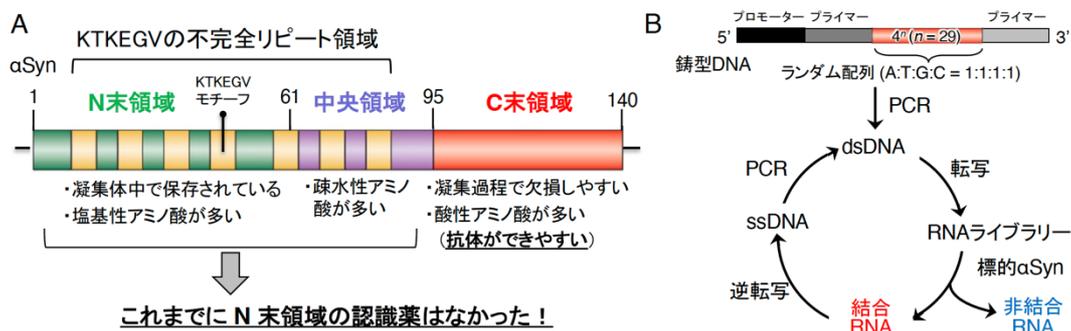


図 1 (A)  $\alpha$ Syn の 3 つの各領域の特徴 (B) RNA アプタマーの作製法 (*in vitro* SELEX 法)。

## 3. 研究の方法

### (1) RNA アプタマーの作製と結合試験

□29 塩基のランダム配列を含む一本鎖 DNA から試験管内人工進化法 (図 1B) によって RNA プールを作製し、メンブレンに固相した  $\alpha$ Syn の修飾ペプチドと反応させた。結合 RNA を分離した後、それに続く逆転写と PCR からなるラウンドを、結合 RNA の割合が増大するまで 6 回繰り返した。結合能が増大した後、C 末領域を含む修飾ペプチドを用いたネガティブ選抜を行った。結合能の評価は、酵素免疫測定法、ドットプロット法、バイオレイヤー干渉 (BLI) 法で行った。

### (2) In silico 解析による RNA アプタマーの配列解析とドッキング計算

次世代シーケンサーを用いて、結合 RNA の濃縮プールの全配列を読み取り、AptaSuite によるクラスター解析より共通モチーフの有無と結合活性との相関を調べた。RNA 構造のモデリングは mfold と centroid fold の 2 種類で行い、 $\alpha$ Syn の APBS 計算を行った後、HADDOCK で結合サイトを予測した。ドッキング計算は研究分担者の水口と研究協力者の長尾が行った。

### (3) RNA アプタマーによる $\alpha$ Syn の凝集阻害能の評価

$\alpha$ Syn の *in vitro* 凝集の評価はチオフラビン S (Th-S) 蛍光法および電子顕微鏡で行った。PD に特徴的な神経変性は  $\alpha$ Syn 凝集核の形成が細胞間で伝播されることから引き起こされることから、蛍光標識した  $\alpha$ Syn を発現させた HEK293T 細胞を作製した。本細胞に病態マウス由来の凝集核 (seed) を加えて 48 時間インキュベーションした後、 $\alpha$ Syn の細胞内凝集を FRET 法で計測した。FRET 実験の立ち上げについて研究協力者の Bitan が助言を行った。

### (4) PD マウス脳の免疫組織染色

$\alpha$ Syn フィブリルを超音波破碎により断片化した後、野生型マウスの線条体に投与した PD マ

ウスのモデル系<sup>9)</sup> を作出し、3週間後に解剖した。ホルマリン固定した後、凍結切片 (20 mm) を作製し、DAB 染色を行った。比較対照には、 $\alpha$ Syn の抗 C 末抗体 ( $\alpha$ Syn115-121) を用いた。染色実験は研究分担者の泉尾が行った。

#### (5) 脳関門透過を指向した人工エクソソームの作製と脳内 RNA アプタマーの定量

圧縮破碎法によって得られた人工エクソソームに RNA アプタマーを封入し、その取り込み率を定量する方法の確立に向けて、線条体に投与した RNA アプタマーの定量を RT-PCR 法で行った。内部標準には *36B4 mRNA* を用いた。また人工エクソソームの粒子径は光散乱法で測定した。人工エクソソームの作製は研究協力者の Hill の助言を得ながら、研究分担者の泉尾が行った。

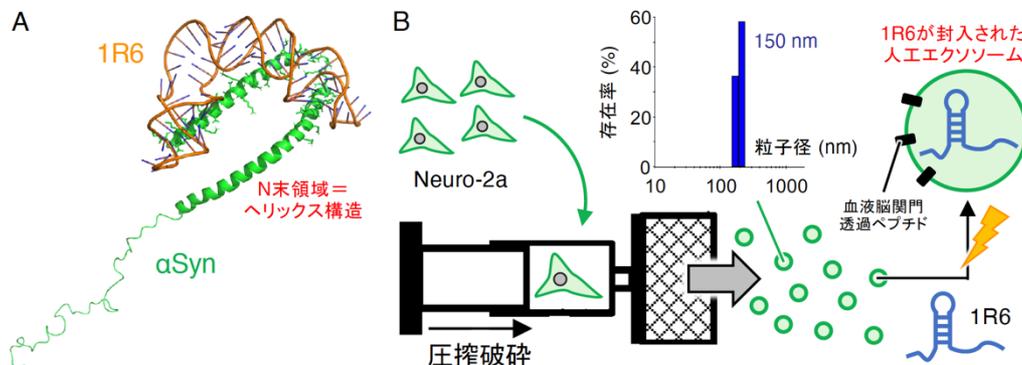


図2 (A) RNA アプタマーと $\alpha$ Syn とのドッキング計算 (B) 脳内透過性人工エクソソームの作製法の概略。

## 4. 研究成果

### (1) RNA アプタマーの作製と結合試験

ラウンド6において結合 RNA が濃縮されたことから全 RNA 配列を解析した結果、約 10% の濃縮が認められた。モチーフ解析によって、20 個のユニークなクローンを得た。ユニーク性が特に高かった 1R6 は、N 末端と中央領域を含む $\alpha$ Syn1-95 と $\alpha$ Syn1-140 にそれぞれ強く結合したが (順に  $K_D = 10.5, 8.7$  nM)、 $\alpha$ Syn96-140 にはまったく結合しなかった (特許申請中)。

### (2) In silico 解析による RNA アプタマーの配列解析とドッキング計算

2 種類の 1R6 の構造と 3 種類の  $\alpha$ Syn 構造の組み合わせで計算したところ、 $\alpha$ Syn の N 末領域付近を 1R6 が認識していることが予想され、結合試験の結果とよく一致した。また $\alpha$ Syn のヘリックス構造を 1R6 が巻き込むように認識している作用機構が示唆された (図 2A)。

### (3) RNA アプタマーによる $\alpha$ Syn の凝集阻害能の評価

1R6 は濃度依存的に  $\alpha$ Syn の凝集を阻害し、形態学的にもフィブリル伸長の阻害が確認された。さらに、 $\alpha$ Syn の細胞内凝集 (seeding) も 1R6 によって濃度依存的に阻害された。

### (4) PD マウス脳の免疫組織染色

神経細胞が多く存在する皮質部分および投与領域において、細胞内における $\alpha$ Syn の蓄積物が 1R6 によって一部染色された。

### (5) 脳関門透過を指向した人工エクソソームの作製と脳内 RNA アプタマーの定量

血液脳関門透過ペプチドの膜上発現による BBB 透過性付与を確認するため、当初、親細胞としてヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y から人工エクソソームを作製したが、マウスに投与したところ免疫原性に起因すると考えられる行動異常が認められた。一方、親細胞をマウス神経芽細胞腫 Neuro2A に変更すると運動障害は認められなかった。これらの事実は、人工エクソソームの構築における親細胞の選択の重要性を示唆するものである。

人工エクソソーム作製においてミトコンドリア媒介性のアポトーシス関連タンパク質の混入が課題であったが、圧縮破碎法における 3 段階の extrusion 過程の 1 段階目の後に、超遠心操作によるミトコンドリア画分の除去工程を加えたところ、本課題が解決されるだけでなく、メンブレンフィルターの大きさに応じた人工エクソソームの厳密な粒子径の調整にも成功した (特許申請中)。また脳内 RNA の取り込み率の定量法を確立した。これらは PD 治療に向けた RNA アプタマーの脳内送達技術の基礎となる (図 2B)。

<引用文献> (二重線：研究代表者、一重線：研究分担者、点線：研究協力者)

- 1) Sorrentino, Z. A. and Giasson, B. I. **J. Biol. Chem.** 295, 10224 (2020)
- 2) Murakami, K. et al., **J. Biol. Chem.** 295, 4870-4880 (2020)
- 3) Obata, Y., Murakami, K. et al., **ACS Omega** 5, 21531-21537 (2020)
- 4) 村上, 入江 **化学と生物** 59, 216-218 (2021)
- 5) Murakami, K. and Ono, K. **FASEB J.** 36, e22493 (2022)
- 6) 村上 **実験医学増刊** 41, in press (2023).
- 7) Murakami, K., Izuo, N., and Bitan, G. **J. Biol. Chem.** 298, 101478 (2022)
- 8) 村上 **脳神経内科** 98, 864-872 (2023).
- 9) Tarutani, A. et al., **J. Biol. Chem.** 291, 18675-18688 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murakami Kazuma, Izuo Naotaka, Bitan Gal	4. 巻 298
2. 論文標題 Aptamers targeting amyloidogenic proteins and their emerging role in neurodegenerative diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101478
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101478	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 該当する

1. 著者名 Murakami Kazuma, Ono Kenjiro	4. 巻 36
2. 論文標題 Interactions of amyloid coaggregates with biomolecules and its relevance to neurodegeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202200235R	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 村上一馬	4. 巻 98
2. 論文標題 神経疾患に対する核酸医薬：アプタマー医薬	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 864-872
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 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村上一馬
2. 発表標題 アミロイドタンパク質を認識する核酸アプタマーの創製と応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuma Murakami
2. 発表標題 Development of RNA aptamers that recognizes amyloid key structures
3. 学会等名 Special seminar in Neurology at UCLA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上一馬
2. 発表標題 アミロイドタンパク質を認識する核酸アプタマー
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上一馬
2. 発表標題 アミロイド蛋白質を認識する核酸アプタマー
3. 学会等名 第14回タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 村上一馬	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 8
3. 書名 実験医学増刊 Vol.41 No.12 Misfolding病としての神経変性疾患の最前線 (第1章タンパク質構造と病態) (分担)	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 エクソソームの調製法	発明者 泉尾直孝	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-141796	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 RNAアプタマー	発明者 村上一馬	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-023603	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻生命有機化学分野（研究代表者の所属研究室）ホームページ  <a href="http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp">http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp</a></p> <p>京都大学教育研究活動データベース（村上一馬）  <a href="https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/zP8kX">https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/zP8kX</a></p> <p>国際共同研究の一環として、日本農芸化学会2022年度大会においてシンポジウムを実施した(世話人代表者:村上一馬、シンポジウムタイトル:「機能性核酸の創製と生命科学応用に向けた新展開」)。研究協力者のAndrew F. Hill教授(豪州ビクトリア大学)が演者の一人を務めた。  URL:<a href="https://www.jsbba.or.jp/2022/program_jsbba_symp.html">https://www.jsbba.or.jp/2022/program_jsbba_symp.html</a></p> <p>Kudos (FASEB J誌に掲載内容のweb紹介記事)  (<a href="https://www.growkudos.com/publications/10.1096%25252Ffj.202200235r/reader">https://www.growkudos.com/publications/10.1096%25252Ffj.202200235r/reader</a>)</p>
--

#### 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
研究分担者	泉尾 直孝 (Izuo Naotaka) (50722261)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教  (13201)	
研究分担者	水口 賢司 (Mizuguchi Kenji) (50450896)	大阪大学・蛋白質研究所・教授  (14401)	

	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
研究協力者	長尾 知生子 (Nagao Chioko) (10402463)	大阪大学・蛋白質研究所・助教  (14401)	
研究協力者	ビタン ギャル (Bitan Gal)	カリフォルニア大学ロサンゼルス校(米国)・Department of Neurology・Professor	

## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	ヒル アンドリュー  (Hill Andrew F.)	ビクトリア大学（豪州）・Research & Impact・Deputy Vice-Chancellor (Professor)	

## 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1件

国際研究集会 日本農芸化学会2022年度大会（公募シンポジウムで海外演者がオンライン発表）	開催年 2022年～2022年
--	--------------------

## 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			
米国	University of California Los Angeles			
オーストラリア	Victoria University	La Trobe University		