

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14789

研究課題名（和文）高度マルチプレックスSELEX法による機能性分子の限定的創製戦略の構築

研究課題名（英文）Multiplex SELEX-based selection strategy to generate multifunctional aptamers targeting the transferrin receptor (TfR) and the insulin receptor (IR).

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、これまで困難であった「結合部位の限定化」と創薬（前臨床）に必須である「マウス/ヒト交差性（種差の壁）」を克服する技術として、複数の標的分子を組合せた高度マルチプレックスSELEX法を確立・最適化し、脳内薬剤送達の標的分子であるトランスフェリン受容体（TfR）およびインスリン受容体（IR）のマウスとヒト間共通かつリガンド結合部位以外の領域を限定的な標的としたアプタマー選抜を実施した。その結果、ヒトとマウスの受容体両者に強く結合し、内在性リガンドと受容体の結合を競合阻害しない分子の創製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬シーズの探索技術の強化・高度化は、あらゆる疾患や生命現象の制御（創薬）と理解の深化（学術）に必須である。本課題で構築した複数の標的分子を組合せた高度マルチプレックス化によって標的部位を限定化する技術は、選抜材料の種類や組合せを変更することで高い汎用性を発揮し、ニーズの高い創製技術基盤へと発展することが期待できる。また、脳内薬剤送達の標的分子のTfRおよびIRをモデル標的としたため、本課題で創製したアプタマーは、ニーズが高まり続ける神経疾患の治療薬開発研究に貢献する具体的成果物として期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated RNA aptamers that bind to the transferrin receptor (TfR) or the insulin receptor (IR), known targets for drug delivery to the brain. To identify aptamers that are cross-reactive with the mouse and human receptors and do not block the interaction of the target receptor with the ligand, we established an advanced multiplex SELEX method using two or more different target molecules such as the mouse and human receptors in ligand-bound and ligand-unbound forms. After selection and high-throughput sequencing, surface plasmon resonance-based analyses revealed that some aptamers can bind to mouse and human receptors and hardly compete for the interaction between the target receptor and the ligand. This result suggests that our selection method has the potential to identify molecules with diverse functions by changing the type and combination of targets and may be valuable in drug discovery studies.

研究分野：RNA工学

キーワード：Multiplex SELEX法 RNAアプタマー 核酸医薬 脳内薬剤送達（DDS） インスリン受容体（IR） トランスフェリン受容体（TfR） マルチプレックス化 表面プラズモン共鳴（SPR）法

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

創薬シーズの探索力の強化・高度化は、あらゆる疾患や生命現象の制御(創薬)と理解の深化(学術)に必須である。現に、それらの実現が困難となった低分子化合物や抗体による新薬の開発は世界的に停滞している。新たな創薬モダリティも登場してきているが、それらについても、学術および創薬研究において現実的なニーズを満たすだけの十分な分子探索力の強化・高度化が必要とされている。高度化が期待される技術(ニーズ)の代表例として、任意の機能・作用を発揮するための「結合部位の限定化」やマウスを用いて前臨床試験を行うための「マウス/ヒト交差性(種差の壁)」が挙げられる。これら今でも残されている課題(ニーズ)は、従来分子では克服が困難であったことから、巨大なライブラリ規模と探索技術の可変性・柔軟性に富む創薬モダリティが必要とされている。

本研究で着目した抗体のような機能を持つ核酸分子「アプタマー」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)、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」から造り出され、探索技術の高度化において発展の余地を持つ優れたモダリティの一つである。しかし、上記ニーズを満たせるだけの多様で高度なアプタマー創製技術を保有する研究グループは世界的にも数少ない。申請者は、これまでのアプタマーの探索技術の高度化や分子認識機構の解明研究などで成果をあげており、その経験から、上記課題の克服にはアプタマー特有の分子特性と柔軟な創製法が有効であると考え、本研究課題の発案とその検証に至った。

2. 研究の目的

核酸アプタマー特有の柔軟な創製法に基づき、既存モダリティでは困難であった「結合部位の限定化」と創薬(前臨床)に必須である「マウス/ヒト交差性(種差の壁)」を克服する技術を、複数の標的分子を組合せた「マルチプレックスSELEX法」の構築によって実現することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、種差の壁が難題とされる脳内薬剤送達の標的分子「トランスフェリン受容体(TfR)」および「インスリン受容体(IR)」をモデル標的として、そのマウスとヒト受容体単体に加えて、内在性リガンドであるトランスフェリン(Tf)やインスリン(INS)との複合体など複数の選抜材料(抗原)を用いる「高度マルチプレックス化」によって、結合部位を三者間の共通領域(=マウスとヒト間共通かつリガンド結合部位以外の領域)に限定化したアプタマー選抜法を確立・最適化した(図1)。次に、表面プラズモン共鳴(SPR)法を基盤とした結合評価系を確立・最適化し(図2)、候補配列の結合活性と内在性リガンドとの競合阻害性を評価した。高い結合活性を有し、内在性リガンドと受容体の結合を競合阻害しないアプタマーについては、短鎖化後、結合活性を向上させるため、配列の最適化を実施した。

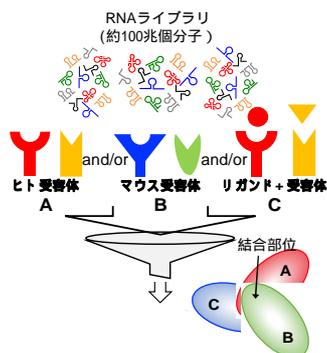


図1. マルチプレックスSELEXによるアプタマー選抜

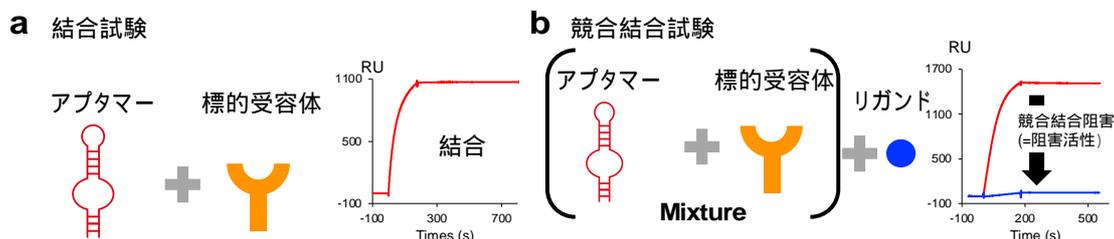


図2. SPR解析法による標的受容体に対する結合評価方法。a) アプタマーと標的受容体の結合評価。b) 内在性リガンドを用いた阻害活性効果の評価。

(1) TfR および IR に対するアプタマー選抜

ヒスチジンタグ付きのマウス、ヒト組換えの両方、またはいずれか一方の IR と TfR タンパク質 (R&D systems 社製あるいは SinoBiological 社製) 単体または、TfR タンパク質と Tf (SinoBiological 社製) の複合体の混合液を、ニッケルあるいはコバルトビーズに固相化し、RNA ライブラリと混合した。IR タンパク質と INS (BioVision 社製) の複合体を標的とする場合は、RNA ライブラリとの混合前に IR 固相化済ビーズに INS を添加した。数回の洗浄後、結合 RNA を回収、逆転写 PCR によって増幅した。この選別および増幅操作を 10 ラウンド繰り返し、ライブラリ内の結合配列を濃縮させた。また、最終ラウンドでは、標的である IR と TfR タンパク質単体あるいは複合体に結合した分子に加え、非標的である空のビーズやリガンド単体等に結合した分子も回収した。その後、濃縮ライブラリをハイスループットシーケンス (HTS) に供し、標的および非標的に結合する膨大な配列データを取得した。次に、アプタマー配列解析プログラム FASTAptamer を用いたクリスタリング解析によって、リード数が 10 以上で 6 塩基以上違いの配列群を一つのクラスターと設定し、クラスター内で最もリード数の補正值 (read per million, RPM) が高い配列を代表候補配列とした。さらに、代表候補配列のうち、濃縮値 0.5 以下を示す配列を最終候補配列とした。濃縮値「 y/x 」0.5 以下とは、標的から得られたデータ「 x 」と非標的から得られたデータ「 y 」を比較した際、その配列の RPM 値が x 内で 2 倍以上高い (= 濃縮されている) ことを示す。

(2) SPR 解析による候補配列の結合評価

SPR 解析には、BIAcore 2000 (Cytiva 社製) を用いた。まず、候補配列と IR あるいは TfR との結合試験では、ストレプトアビジン (SA) センサーチップ (Cytiva 社製) 上に、5'末端にピオチンを付加した poly dT16 オリゴを固相化した。次に、3'末端に poly A16 配列を付加したアプタマーを、センサーチップ上の poly dT16 オリゴを介して固相化後、ヒトとマウス IR あるいは TfR を流して、結合活性を評価した。さらに、IR と INS、TfR と Tf の結合に対する競合結合試験では、アミンカップリング法を用いて、CM5 センサーチップ (Cytiva 社製) 上に INS または Tf を固相化した。続いて、IR のみと IR とアプタマーの混合液、TfR のみと TfR とアプタマーの混合液を流して、リガンドと標的受容体との結合を競合阻害しない配列を選定した。

(3) アプタマーの短鎖化と配列最適化

高い結合活性を示したアプタマーの二次構造を RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) を用いて予測し、その構造情報に基づいて、活性に影響を与えない不要な配列を除去、可能な限り短くした。次に、短鎖化したアプタマー配列を骨格として、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、そのライブラリを用いて再度アプタマー選抜 (Doped-SELEX 法) を実施した。その後、確立した SPR 解析による結合評価系を用いて、候補配列の結合活性と内在性リガンドとの競合阻害性を再度評価した。

4. 研究成果

「結合部位の限定化」や「マウス/ヒト交差性 (種差の壁)」を克服する技術の実現のため、異なる複数の標的分子を組合せた高度マルチプレックス SELEX 法の構築と SPR 解析を基盤とした結合活性と内在性リガンドとの競合阻害性の評価系の確立・最適化に取り組み、以下の成果を得ることができた。

高度マルチプレックス化による結合部位の限定化戦略および HTS やバイオインフォマティクスを用いた核酸分子の配列や構造に基づく統合的な解析を活用し、TfR と IR の「マウスとヒト間共通かつリガンド結合部位以外の領域」を標的としたアプタマー選抜を実施した。得られた候補配列の結合性を SPR 解析によって調べた結果、それぞれの受容体に特異的かつ強固に結合する複数のアプタマーを確認できた。次に、配列改変等の最適化作業の効率化の観点から、高い結合活性を示したアプタマーの短鎖化を実施した。その結果、抗 TfR アプタマーでは、全長 63 塩基から 40 塩基 ($K_D=110$ pM) まで短くした分子、抗 IR アプタマーでは、全長 63 塩基から 30 塩基 ($K_D=0.1$ pM) まで短くした分子を作製することができた。次に、短鎖化したアプタマーのマウス/ヒト交差性、内在性リガンドとの競合阻害性を SPR 解析によって評価した結果、短鎖化した抗 TfR アプタマーは、内在性リガンドと受容体の結合に干渉しないが、マウス型受容体には結合しないことを確認できた。一方、短鎖化した抗 IR アプタマーは、内在性リガンドと受容体の結合にある程度干渉 (40~50% 阻害) するものの、マウスとヒト型受容体両者に対して強く結合することが確認できた。その後、配列最適化による高活性化を図って、短鎖化したアプタマーの配列を骨格として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 (Doped-SELEX 法) を実施した。しかしながら、TfR および IR の両標的にて、結合活性の向上や内在性リガンドとの競合阻害性の改善が見られたアプタマーの獲得には至らなかった。現在、培養細胞を用いた評価系によって、短鎖化した抗 IR アプタマーのインスリンの生理的作用 (IR との結合) に対する影響について調べている。

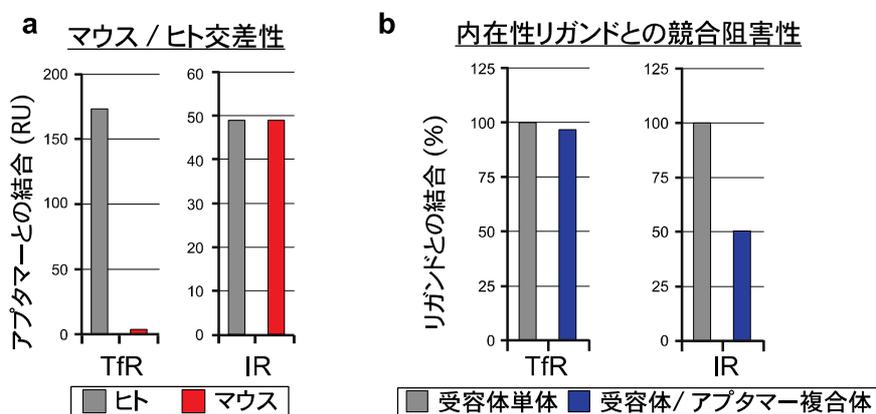


図3. SPR解析法によるマウス/ヒト交差性と内在性リガンドとの競合阻害性の評価。a) 短鎖化アプタマーとマウスおよびヒト受容体の結合評価試験。b) リガンドとの競合結合試験による阻害活性の評価試験。

以上、本研究課題では、これまで困難であった「結合部位の限定化」や「マウス/ヒト交差性(種差の壁)」を克服する技術として、複数の標的分子を組合せた高度マルチプレックス化と核酸情報解析技術(HTS、クラスタリング解析手法)を駆使したアプタマー選抜法、SPR解析を基盤とした結合活性および内在性リガンドとの競合阻害性の評価技法を確立・最適化した。そして、ヒトとマウスの受容体両者に強く結合し、内在性リガンドと受容体の結合をほとんど競合阻害しない分子の創製を達成することができた。さらに、本技術は、選抜材料の種類や組合せを変更することで高い汎用性を発揮し、ニーズの高い創製技術基盤へと発展することが期待できる。また、本課題の成果物は、脳神経疾患の治療薬開発に貢献することが期待できるため、今後、マウスを用いた脳移行性実験を行う計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Kumagai Kazuyuki, Okubo Hiroki, Amano Ryo, Kozu Tomoko, Ochiai Masanori, Horiuchi Masataka, Sakamoto Taiichi	4. 巻 174
2. 論文標題 Selection of aptamers using α -1,3-glucan recognition protein-tagged proteins and curdlan beads	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 433-440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad059	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 天野亮, 道下 瑛陽, 中野 涼太, 一ノ瀬顕子, 浜田道昭, 中村義一, 高橋理貴
2. 発表標題 Multi-VLP 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戦略
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野亮, 道下 瑛陽, 中野 涼太, 一ノ瀬顕子, 芳賀 和美, Meng Ling Moi, 浜田道昭, 中村義一, 高橋理貴
2. 発表標題 VLP-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と有効性評価
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryo Amano, Akiya Michishita, Ryota Nakano, Akiko Ichinose, Kazumi Haga, Meng Ling Moi, Michiaki Hamada, Yoshikazu Nakamura, Masaki Takahashi
2. 発表標題 Generation of an RNA aptamer neutralizing dengue viruses by SELEX method targeting virus-like particles and advanced in silico analyses.
3. 学会等名 INSNAC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 アデノ随伴ウイルスセロタイプ9に対するアプタマー及びその使用	発明者 高橋理貴、天野亮、 中村義一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-040542	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 フラビウイルスに対するアプタマー及びその使用	発明者 高橋理貴、天野亮、 モイメンリン、浜 田道昭	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-054689	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------