

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）GPCR を標的とする RNA アプタマー創薬基盤技術の開発
（英語）Development of fundamental technologies to generate RNA aptamers to G protein-coupled receptors

研究開発実施期間：2016年11月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）秋田一雅
（英語）Kazumasa Akita

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）株式会社リボミック 事業開発部 部長
（英語）General Manager, Business Development Department, RIBOMIC Inc.

II 研究開発の概要

【背景】

Gタンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor、以下 GPCR)は7回膜貫通型の受容体であり、生体の恒常性維持とその制御に極めて重要な上市医薬品の約30%が標的としている膜タンパク質である。GPCRは複雑な立体構造を有する膜タンパク質であることから抗体作製が困難であり、抗体医薬品の開発が進んでいない。また個々の GPCR には多くのサブファミリーが存在することから特異的な低分子化合物を取得することが難しく、新たな創薬手法が求められている。そこで本研究課題では抗体に匹敵する新しい創薬技術として注目されている次世代中分子医薬「RNA アプタマー」を用いて GPCR に対する新規薬剤開発基盤技術の構築を目的とした。

アプタマーは低分子を遥かに凌ぐ約100兆種類の分子から成るライブラリから、標的結合分子群の選抜と増幅を繰り返す特有の創製技術「SELEX法」によって取得される。本技術は、多様な材料(ペプチド、ウイルス、細胞、細菌等)を標的として利用可能であり、近年ではハイスループットシーケンサーやバイオインフォマティクスを活用した統計的かつ系統的な創製技術が確立されつつある。このように他に類を見ない分子特性やその創製技術は創薬に対し高いポテンシャルを有しているが、これまで GPCR を標的としたアプタマーの創製方法は確立されていない。その実現には標的として使用する GPCR 材料の選定と最適化、個々の材料に対するアプタマー創製技術の最適化と高度化が必須となる。本研究は、研究代表者らが培ったアプタマー創製法と医薬品化技術、構造的安定性を高める種々の技巧を凝らした GPCR タンパク質を新規選抜材料として用いること

で、汎用的な GPCR 創薬技術基盤の開発を目標とし、企業やアカデミアへ向けた当該技術の均霑化・導出を目的とする。

【成果】

目的を達成するため、1. GPCR に対するアプタマー探索、2. アプタマーの *in vitro* 評価、3. *in vivo* 動物評価が可能な改変アプタマーの取得、の3つの研究開発項目に取り組んだ。

1. GPCR に対するアプタマー探索

1) リポソーム化 GPCR SELEX 法の検討

GPCR の高次構造をリポソームの脂質膜によって安定化した新規材料に対してアプタマー選抜法 (SELEX 法) の最適化と高度化に取り組んだ。2 種のリポソーム化 GPCR (EP4 受容体, ETB 受容体) を材料として SELEX 法の最適化を検討 (ビーズへの固相化法、ブロッキング試薬、温度等) した結果、リポソーム化 GPCR の汎用的 SELEX 法を確立することに成功し、少なくとも 2 つの GPCR 結合分子を取得することに成功した。また、リポソーム化手法の違いによって、リポソームの脂質粒子が多重化することで粒子径が変化し SELEX 法の成否に影響を与えることが判明し、リポソーム化 GPCR を SELEX 法の選抜材料として使用する上での課題として明らかにした。

2) 可溶化 GPCR を用いた SELEX 法の検討

特殊な界面活性剤を用いて天然の構造を保持した可溶化 (ミセル化) GPCR (A2a) を用いたアプタマー選抜法 (SELEX 法) の最適化と高度化に取り組んだ。本 SELEX 法では GPCR の構造を維持するために作用の弱い界面活性剤しか使用できず、非特異的な核酸の吸着による影響を大きく受けることが分かった。すなわち可溶化 GPCR を固相化したビーズへの非特異的吸着ならびに可溶化 GPCR 自体への非特異的吸着の影響により、特異的なアプタマーを選抜することが難しいことが明らかとなった。そこで RNase 処理による非特異的核酸の分解や固相化するビーズの変更を検討することで良好な結果を得た。さらに SELEX 法におけるラウンドごとに固相化するビーズを変更することで特定のビーズへ結合する核酸を排除することが可能となり、GPCR に結合するアプタマーを特異的に濃縮することが可能となり、複数のアプタマーについてはゲルシフトアッセイにより、確かに GPCR (A2a 受容体) に結合していることを確認した。

3) Cell SELEX 法またはウイルス様粒子を用いた SELEX 法によるアプタマー取得方法の検討

GPCR を過剰発現させた培養細胞をアプタマー選抜材料にした独自の SELEX 法 (Icell-SELEX 法、2016 Biochimie) の更なる最適化によって GPCR アプタマーの選抜法を検討した。種々の条件検討を重ねた結果、低温 (約 4°C) を維持し細胞膜と GPCR の流動性を抑えることで、ライブラリの濃縮を促進することに成功した。さらにより簡便で汎用性の高い SELEX 法の開発を目指し、2018 年度から膜上の標的 GPCR 発現量を増やせるウイルス様粒子を新規材料とした SELEX 法の確立と最適化を追加研究項目として実施した。4 種の GPCR を対象として条件検討 (温度、ブロッキング、分離法、データ解析法等) を行った結果、2 種の GPCR に対して計 5 つ以上の GPCR 結合分子を取得することに成功した。また複数のアプタマーについて生理活性を有することを確認した。ウイルス様粒子が新たなアプタマー選抜材料として有用であることを世界で初めて証明することができた。

ミセル化 GPCR、リポソーム化 GPCR に加えて細胞とウイルス様粒子をアプタマー選抜材料として利用可能としたことで様々な GPCR に対応可能な基盤技術を構築することができた。特にウイルス様粒子には理論上あらゆる GPCR を発現させることが可能であり、また細胞よりも高い発現量が期待できるとともに様々な修飾が可能なことやサイズが小さいことなど、汎用性に優れており、ウイルス様粒子を用いたアプタマー選抜方法は GPCR に対するアプタマー選抜方法のゴールドスタンダードとなることが期待される。

4) SEEDS 法によるアプタマー取得

標的に特異的なアプタマーを選抜するためには、10 回程度、選択と増幅の工程を繰り返す必要がある。この作業は時間、労力、コストの面において研究開発のボトルネックとなる。この課題を克服するために、僅か 1 回の選抜工程でアプタマーを取得する技術開発を行った。その結果、RNA 分解酵素や工夫された配列からなる carrier DNA、ハイスループットシーケンサー、更に *in silico* 解析技術の最適化によって、標的に対してアフィニティーの低い分子を除外し、アフィニティーの高い結合分子を取得する技術を確立した。本技術は新たなアプタマー選抜技術として論文公表を実施済みである (2018 Imashimizu et al., *Biology Methods and Protocols*.)。

2. アプタマーの *in vitro* 評価

1) 各種 GPCR の細胞評価系構築と取得アプタマーの評価

取得したアプタマーの活性を評価する目的で複数の Cell based assay 系を整備した。Gs、Gi 型の GPCR の *in vitro* 評価系として細胞内の cAMP 量を定量する HTRF (Homogeneous Time-Resolved FRET) を応用した評価系を構築し、Gq 型の GPCR の評価系としてエクオリンを用いた細胞内カルシウム濃度測定系を構築した。さらに内因性リガンドを除去した血清や特異性の高い合成リガンドを用い、各 GPCR の発現量を調整することで評価系を最適化し、高感度で特異的な評価系を整備した。これらの評価系により実際に生理活性を有するアプタマーの選抜に利用可能であることを確認できている。

2) 結合評価

アプタマーに特化した汎用的分子間相互作用の検出技術を開発し提供するため、一般的に使用される SPR 法に基づく検出装置 (Biacore) とフローサイトメトリー (FCM) を用いたアプタマーの結合評価系の開発と最適化した。またアプタマー選抜材料の多様化 (培養細胞、リポソームに加えウイルス様粒子、ミセルを追加) を計画以上に発展させることができ、それに伴って各種材料に対して最適な結合評価系を構築・拡張する必要が生じた。そこで各種選抜材料に対して、上記の Biacore システム、FCM に加え、immunoplate-PCR 法、ゲルシフトアッセイ、キャピラリー電気泳動による結合評価系を最適化した。

具体的に可溶化 GPCR であるミセル化 A2a 受容体に対しては、ミセル化タンパク質に特化した、天然の構造を維持した状態で結合を評価できるゲルシフトアッセイ系による評価を実施した。この系を用いて複数のアプタマーにおいてミセル化 A2a 受容体と結合することでバンドが上部に (スミアに) シフトすることを確認でき、様々な結合力を示すクローンが取得できていることが分かった。構造の安定化に特殊な環境を要するミセル化 GPCR も、特殊装置を必要としないベーシックな技術 (ゲルシフト) の最適化によってアプタマーとの結合を簡便に検証できる系を構築した。その他にも物性 (電荷、分子サイズ) に基づく分離法であるキャピラリー電気泳動による結合評価系も構築することができた。

このように本追加項目の達成により、多様な選抜材料に対して、多様な結合評価系を構築することで、より包括的な GPCR アプタマー創製基盤の提案に近づけたと考える。

3. *in vivo* 動物評価が可能な改変アプタマーの取得

アプタマーを医薬品として利用するために必要な加工 (短鎖化と修飾) が可能かを検討した。具体的には GPCR に対するアプタマーとして結合活性を有するのに必要な鎖長や修飾塩基の利用、末端修飾について基礎的な検討を実施した。初めに様々な修飾塩基を用いた SELEX を実施し、F 化核酸や DNA を配列内に共存させた場合 (2'-fluoro, -deoxy, -hydroxy, 等) においても結合活性を有するアプタマーを取得できていると、各種修飾塩基の利用が可能であることを確認した。また SELEX により取得した 80 塩基長のアプタマーを、活性を有した状態で 31 塩基にまで短鎖化することに成功した。さらに 5'末端にビオチンを付加した修飾体においても活性を有していることを確認できた。これらのことから GPCR 以外のターゲットに対するアプタマーと同様に医薬品として応用可能な鎖長で修飾塩基を含み末端を修飾したアプタマーを創製することが可能であることが明

らかとなった。

【結論】

様々な GPCR に対する「選抜材料」（ミセル、リポソーム、細胞、ウイルス様粒子）と最適化された「選抜技術」、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を有効活用した「配列解析技術」、各種 GPCR に対応した「機能評価技術」を基盤技術として構築することができた。最適化された一連の上記技術は必ずしも特殊な機器・設備を使用する必要がなく、簡便で汎用的なアプタマー開発のソリューションパッケージとして様々な製薬企業や大学等への導出、共同研究へ繋げていきたいと考えている。中でもウイルス様粒子を用いたアプタマー選抜技術は理論上すべての GPCR への応用が可能であり、本法をゴールドスタンダードとすべく、実施例を増やすとともに技術の高度化を推進する。

今後は、アプタマー創製技術の特性であるハイスループットシーケンス解析から得られる膨大な配列データを最大限に活用するため、計算機科学（深層学習やベイズ推定などの「人工知能技術」）との融合を推進する。アプタマーの配列情報、結合力、機能性（標的の活性阻害効果）などの情報を蓄積することで、僅かな時間と労力で膨大な配列群の中から有力な候補分子を抽出可能な技術の構築を目標とする。これにより、将来的には SELEX を行うことなく、標的の立体構造情報に基づき *de novo* な結合分子を創製するデータ駆動型のアプタマー創製技術へと発展させたい。

[Background]

G-protein coupled receptors (GPCRs) form highly complexed structures and protein families of diverse functions, which impede generation of therapeutic antibodies or selective chemical agents against each GPCR. In this project, we aimed to solve this problem by establishing new fundamental technologies for GPCR using RNA aptamer. GPCRs are highly integrated into cell membranes and thereby very difficult to purify in the stable conformations. Therefore, various GPCR materials were prepared for SELEX in stabilized forms by using liposome, micelle, cells, and virus-like particles. Additionally, we intended to develop a new efficient method to predict sequences of potential aptamers without iterative selection process. Here we demonstrated effective and versatile fundamental technologies to develop RNA aptamers against GPCR by integrating those methods.

[Result]

1. Screening of aptamers against GPCRs

We have developed and optimized SELEX methods using liposomal GPCR, solubilized GPCR (micellar GPCR), GPCR expressing cells and GPCR expressing virus-like particles, respectively. In SELEX with solubilized GPCR (micellar GPCR), we made the effective method to remove non-specific RNA by switching resins for immobilization of GPCR in every round and RNase treatment. The method allowed us to isolate many aptamers against A2a receptor and their binding activities were successfully confirmed by gel shift analysis. In addition to cell SELEX, we developed a SELEX method with virus-like particle. As a result, we obtained at least 5 aptamers against two GPCRs and confirmed that some of them showed physiological activity against P2Y2 receptor. This is the first report showing that the virus-like particle is a useful material of SELEX. In this study, we successfully demonstrated that various SELEX methods with several materials are useful for generating GPCR aptamers. Among them, we believe that SELEX using virus like particles will be a gold standard for raising aptamers against GPCR. Furthermore, we also

established the SEEDS method, which allowed us to isolate aptamers by only single selection step (2018 Imashimizu et al., *Biology Methods and Protocols*) .

2. *In vitro* assay of aptamer

To assess the physiological activity of candidate aptamers, we established two cell assay methods. One is the quantification of the cAMP concentration in cells using HTRF technology for assessment of aptamers against Gs and Gi type GPCRs. The other is the quantification of the concentration of Ca²⁺ ions in cells using Aequorin protein for Gi type GPCR. In addition to cell-based functional assays, we prepared various methods to evaluate the binding ability of aptamers for a multiple types of GPCRs (liposome, micelle, cells, and virus-like particles) by means of SPR analysis, Flow cytometry, gel shift assay, immunoplate-PCR analysis, and capillary electrophoresis.

3. Optimization of aptamers for *in vivo* pharmacological study

Due to cost reduction and tolerance to RNase *in vivo*, truncation and modification of aptamers are necessary but sometimes impair the activity of aptamers. In this study, we found that even upon shortening and modification, several aptamer variants remained the physiological activity comparable to original aptamers. In addition, aptamers conjugated with biotin on their 5' termini also had physiological activity. Thus it seems feasible to generate aptamers for therapeutic use by the methods developed in this study.

[Conclusion]

We constructed a novel comprehensive platform integrating diverse “materials”, optimized “SELEX methods”, versatile “assay methods”, and effective “data analysis technologies” to isolate aptamers against GPCR. Using this platform, we here showed aptamers having binding and physiological activity for GPCRs. Because our platform technology doesn't need any specific equipment or facility, it will provide a useful technology to generate aptamers against GPCR for researchers in academia and industry. We plan to combine our technology and computer science to take advantage of enormous information collected by high throughput sequencing, leading to a completely *in silico* technology for finding genuine aptamers even without SELEX.