

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) RNA とタンパク質の結合阻害による抗RSウイルス薬の創出
(英語) Anti-RS viral drug discovery based on
RNA-protein interaction inhibition

研究開発実施期間: 令和2年8月25日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 遠藤 慧
(英語) Kei ENDO

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 助教
(英語) Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate school of Frontier
Sciences, The University of Tokyo, Research Associate

II 研究開発の概要

低分子医薬品は大半が酵素、受容体、チャネルやトランスポーターを標的としており、これらが医薬品開発可能な標的分子とされている。これら以外の分子を標的とする場合には抗体や核酸といった高分子医薬品の開発がなされているが、このような高分子は基本的には細胞内には侵入できない。より一般的な細胞内の低分子医薬品の標的としては、タンパク質-タンパク質相互作用 (PPI) の研究が精力的になされており、さらに近年では、タンパク質合成の鋳型である mRNA も低分子医薬品の標的として注目を集めている。mRNA の機能は細胞内のタンパク質が結合して発揮されることから、RNA-タンパク質間相互作用 (RPI) も PPI と同様に新たな医薬品の標的として期待され始め、新しい評価系へのニーズが高まっている。そこで、RPI 自体を評価できるとともに、RPI 阻害薬の評価、探索が可能なセルベースアッセイシステムを開発した。

RNA ウイルス感染症は、新興、再興感染症の多数を占め、人類への脅威度が高いにも関わらず、現在までに開発されたウイルス感染症治療薬はごく限られている。RNA-タンパク質間相互作用は RNA ウイルスの増殖に不可欠であることから、新たな RNA ウイルス感染症治療薬の標的となることが期待される。RNA ウイルスのなかでも感染症例が非常に多く、特に乳幼児や高齢者で重篤化が問題となっている RS ウイルス (RSV) に注目し、その RPI 阻害剤を探索して抗 RS ウイルス薬の創出することを目的とした研究開発を実施した。

出芽酵母細胞を用いて RNA-タンパク質間相互作用を探索する技術の開発

これまでに特定の RNA と特定のタンパク質との一対一の相互作用を、出芽酵母細胞を用いて評価する RPI センサの開発に成功していることから、この技術をシーズに用いて特定のウイルスタンパク質とウイルスゲノム RNA の部分配列との一対多の相互作用を評価する技術を開発した。これまでに RPI センサを用いた相互作用の評価実績の豊富なバクテリオファージ MS2 の殻タンパク質とファージゲノム RNA との相互作用を RNA-タンパク質相互作用のモデルとして用い、96 ウェルプレート形式の合成オリゴ DNA から、PCR や形質転換等の反応スケールや反応時間、培養時間、および宿主細胞株の条件を検討して、96 ウェルプレート形式にて RPI センサによる相互作用評価の全過程を実施するハイスループット評価系を開発した。RS ウイルスのゲノム RNA を分割したタイリングライブラリを作成し、この評価系を用いて、RNA への結合性が報告されている RS ウイルス N、M、M2-1 タンパク質との相互作用を網羅的に評価した。また、ウイルスゲノムのタイリングライブラリをさらに大規模化し、さらに、RSV タンパク質が認識する RNA 配列のコンセンサス配列を獲得することを意図してランダム配列のライブラリを構築して、RNA 配列のプールから RPI を指標にポジティブ選択する探索実験系を構築した。これらの探索を経て、最終的には、RSV M2-1 タンパク質が特異的に結合する RNA 配列のコンセンサス配列を抽出することに成功した。

ヒト培養細胞を用いて RNA-タンパク質間相互作用を評価する技術の開発

化合物スクリーニングを実施するため、酵母細胞を用いたシーズ技術をもとに、ヒト培養細胞を用いたセルベースアッセイシステムを開発した。特に、化合物スクリーニングにおける実験手順を簡素化するとともに、検出シグナルのばらつきを低減することを意図して、ヒト浮遊培養細胞を使用するシステムを開発した。シーズとなる RPI センサの技術は、足場分子、相互作用を検出したいタンパク質、及び相互作用を検出したい RNA の 3 種類の遺伝子を細胞に導入する必要がある。これら 3 種類の遺伝子を単純にヒト細胞用の発現ベクターを用いてヒト浮遊培養細胞に発現させても RPI を検出することはできなかった。そのためこれらの遺伝子のヒト浮遊培養細胞への遺伝子導入法、発現ベクターシステムとその組み合わせを検討した。特に RNA の発現量がボトルネックとなっていることが考察されたため、RNA の発現システムを改良した。これら一連の研究開発の結果、RPI を評価するセルベースアッセイシステムを出芽酵母からヒト浮遊培養細胞に移植することに成功した。

化合物スクリーニングでは均一な細胞集団を大量に準備する必要があることから、遺伝子が安定的に発現されるアッセイ細胞株が必要になる。そこで任意の RPI の評価で共通に使用される足場分子がゲノム DNA に挿入されたヒト浮遊培養細胞のアッセイ細胞株を構築した。ネガティブコントロール RNA と比較したシグナルの S/N 比がほとんど棄損されることなく、発光シグナルの強度が約 40 倍向上するアッセイ細胞株の樹立に成功した。

セルベースアッセイによる RNA-タンパク質間相互作用の阻害剤の探索

上記 2 項目の技術開発を経て、RSV M2-1 タンパク質と標的 RNA を評価するアッセイ細胞株を複数構築し、これらの中から最も高いシグナルを示す細胞を選別して以降の化合物スクリーニングに用いるアッセイ細胞株とした。化合物スクリーニングを実施するため、樹立したアッセイ細胞株の培養を順次拡大して、同一ロットの凍結ストックを作成し、作成した細胞ロットを用いて、凍結ストックからアッセイに至る化合物スクリーニングの条件を検討した。化合物の代わりに DMSO を全体に分注した 384-well プレートを用いてアッセイ系を評価したところ、ウェル間の発光シグナルには一定のばらつきは避けられないものの、プレート上の位置や縦横方向といった系統的な発光シグナルの傾向は見られず、本研究開発で化合物スクリーニングに耐えうるアッセイ細胞株の構築とスクリーニングプロトコルが開発できたと判断した。

AMED BINDS の東京大学 創薬機構が保有する化合物ライブラリを用いて化合物スクリーニングを実施した。本研究開発では新規のセルベースアッセイ系で化合物スクリーニングを実施することから、極めて多数の一次ヒットが生じてしまうことを懸念し、まず試薬や既知の薬剤で構成される 3,909 化合物の Validated Library、次の

で創薬機構により第一段階の化合物ライブラリとして抽出された 9,600 化合物の Core Library、第二段階の化合物ライブラリとして抽出された 22,400 化合物の Advanced Library と順次拡大し、合計で約 3 万 6 千化合物に対するスクリーニングの実施となった。各化合物ライブラリを用いた化合物スクリーニングではそれぞれ 51 化合物、109 化合物、320 化合物の合計 480 化合物の一次ヒットが得られ、当初懸念されていたごく多数の一次ヒットが生じることはなく 1-2%程度のヒット率となった。

一次ヒット化合物 480 について、化合物スクリーニングと同じ条件のアッセイを $n=4$ で実施し、RPI 阻害効果の再現性を確認した。一定の再現性が確認された 46 の化合物について濃度依存的な RPI 阻害活性を測定した。同時に、RSV に由来する RPI ではなく、既知のモデル RPI として MS2 coat protein と MS2 stem loop の RPI を検出する細胞株を用いたカウンターアッセイを実施し、RSV の RPI への特異性を検証した。32 化合物については濃度依存的なルシフェラーゼ発光の阻害が確認された。化合物濃度 10 μM における RPI 阻害活性をカウンターアッセイの RPI 阻害活性と比較すると、全体的な相関が観察され、非特異的な作用を示す化合物が多くヒットする傾向があることが明らかとなった。今回の化合物探索では、MS2 の RPI に作用せず、RSV の RPI のみに作用する化合物を得ることはできなかったが、11 の化合物では MS2 の RPI に比べて RSV により強い阻害活性を示した。これらの中には、共通の化学構造を持つ 3 種類の化合物が含まれ、化合物スクリーニングの有効性が示唆された。

Most small molecule drugs target enzymes, receptors, channels, and transporters, which are considered “druggable” targets. To target other molecules, macromolecular drugs such as antibodies and nucleic acids are developed, but these macromolecules are basically unable to enter cells. More generally, protein-protein interactions (PPIs) have been intensively studied as targets for intracellular small molecule drugs, and more recently, mRNAs, the template for protein synthesis, have also attracted attention as a target for small molecular drugs. Since mRNA functions are usually exhibited by the binding of intracellular proteins, RNA-protein interactions (RPIs), like PPIs, are expected to become new drug targets and there is a growing need for a new assay system. Therefore, this project developed a cell-based assay system that can evaluate RPIs itself as well as evaluate and screen RPI inhibitors.

Even though RNA viral infections represent most emerging and re-emerging infectious diseases and pose a high threat to humanity, only a few drugs have been developed to date to treat viral infections. Since RPIs are essential for RNA viral replication, they are expected to be a target for new RNA viral drugs. Among RNA viruses, this project focused on Human respiratory syncytial virus (RSV), which has a very large number of cases of infection and is particularly problematic in infants and the elderly, as a target for drug discovery.

Development of a technique to explore RPIs using budding yeast cells

Using the RPI sensor, which evaluates one-to-one interactions between a specific RNA and a specific protein, as a seed technology, this project developed a technique to evaluate one-to-many interactions between a specific viral protein and a fragment of viral genomic RNA in 96-well plate format. Then, the interactions between a tiling library of RSV genome and RSV N, M, or M2-1 proteins, which have been reported to bind to RNA, were comprehensively evaluated. In addition, target RNA sequences of these proteins were positively screened from a pool of RNA fragment composed of an expanded tiling library and randomized RNA library. Through these experiments, this project obtained a consensus RNA fragment to which RSV M2-1 protein specifically binds.

Development of a technique to evaluate RPIs using human cultured cells

To conduct compound screening, this project developed a cell-based assay system using human cultured cells based on the

seeds technology using yeast cells. Human cultured floating cells were used to simplify the experimental procedures for the compound screening and to reduce the variability of detection signals. Even if the three genes required for the system were simply expressed in human cultured floating cells, RPI could not be detected. Then, expression vector systems and gene transfer methods were investigated, and finally a cell-based assay system for evaluating RPI was successfully transferred from budding yeast to human cultured floating cells.

Compound screening for RPI inhibitors using a cell-based assay system

Combining two technical developments described above, an assay cell line was constructed to evaluate RSV MS2-1 protein and its target RNA. Using 384-well plates with DMSO dispensed throughout instead of compound, the experimental protocol for compound screening from frozen stock to assay was evaluated and optimized to reduce variation in detection signals. Compound screening was then conducted using a public library of approximately 36,000 compounds. Consequently, as primary hit compounds, 480 were subjected to the reproductivity testing and then 46 were subjected to dose-dependency testing and counter assays. No compound inhibited only the RPI of RSV, but 11 compounds showed stronger inhibition of the RPI of RSV than the RPI of the counter assay. These included three compounds with a common chemical structure, suggesting the effectiveness of the compound screening system.

III 事後評価総合所見

出芽酵母を用いた独自の RNA-タンパク質相互作用 (RPI) センサ技術を基盤に、ヒト浮遊細胞系で RPI の評価系を構築し、RS ウイルス M2-1 タンパク質とその標的 RNA との相互作用を阻害する化合物スクリーニングを実施し、複数グループのヒット化合物まで到達できた。

なお、RPI 阻害のアッセイ系構築において一定の進捗が認められたが、特異的で RPI 阻害活性が高いヒット化合物は得られておらず、ウイルス存在下での細胞増殖アッセイには到達できなかった。今後、アッセイ系の充実、構造生物学的考察に基づく構造活性相関、RNA-タンパク質の結合メカニズムの検証などの点で発展を期待する。