

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：アプタマー情報をベースにした低分子医薬品創製プラットフォームの構築
Construction of a small molecule drug discovery platform based on aptamer information

研究開発実施期間：平成30年5月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：笠原 勇矢
Yuuya Kasahara

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センター
人工核酸スクリーニングプロジェクト サブプロジェクトリーダー
Lab. of XNA Screening and Design, Center for Drug Design Research, National Institutes of Biomedical
Innovation, Health and Nutrition, Sub-Project Leader

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

従来の低分子創薬は無数にある化合物をランダムに合成・収集し活性スクリーニングを行うことが一般的であった。しかしながらこの方法では、化合物ライブラリの構築が容易でないこと及び研究資金・労力・時間がかかることに加えて、ヒット率が非常に悪いことが問題であり、新たなスクリーニングシステムの開発が急務である。また、近年の低分子医薬品からバイオ医薬品へのパラダイムシフトにより、新たな治療戦略が開発されてきているが、治療費高騰による医療費の増大も課題となっている。また、バイオ医薬品はその性質上、経口投与が難しいため患者の QOL 向上も課題の一つである。上記課題の解決には、バイオ医薬品の改良だけでなく、バイオ医薬品の優れた生理機能を論理的に低分子化合物に変換する技術開発によって、バイオ医薬品から低分子医薬品への「リバース・パラダイムシフト」を起こすことが重要である。本研究では、低分子医薬品への「リバース・パラダイムシフト」を起こすために、標的タンパク質に結合する抗体医薬品から低分子化合物への変換を効率的に行い、新規なアプローチにより低分子化の成功確度を向上させる技術の開発を試みた。構造多様性を高めることが可能な人工核酸アプタマーを低分子化合物への変換に用いることにより、活性に必須の構造修飾や位置の情報から構造活性相関及びファーマコフォアを取得し、それらを低分子設計に組み込むことで、特異性と活性の両方を備えた次世代の低分子医薬品の創出を可能とする技術開発を進めた。

まず、抗体と活性等価な人工核酸アプタマーの創製を行った。チミジンの5位に芳香族性置換基を有する塩基部修飾型人工核酸三リン酸体を用いたポリメラーゼ伸長反応によって作製した人工核酸ライブラリと独自改良

したキャピラリー電気泳動法 (CE) や磁気ビーズを用いた選別法を用いて、すでに抗体医薬が上市されている標的 X に対する人工核酸アプタマーをスクリーニングした。スクリーニング後のライブラリに含まれる配列とその割合 (リード数) を次世代シーケンサーによる網羅的解析によって同定し、リード数と配列の相同性から機能評価を行う 99 配列を選出した。続いて、初期ライブラリの作製と同様に人工核酸三リン酸体を用いたポリメラーゼ伸長反応によって、選定した 99 配列それぞれに対応する人工核酸アプタマーを作製した。作製した人工核酸アプタマーの結合親和性を CE もしくは表面プラズモン共鳴法 (SPR) によって評価した。その結果、選定した全ての配列が標的 X に対する結合活性を有していることがわかった (K_D 値としては 0.15~450 nM 程度)。また、標的 X とそのリガンド Y との相互作用によるタンパク質 A のリン酸化とそれに続く遺伝子 B の活性化を利用した *in vitro* レポーターアッセイシステムを用いて人工核酸アプタマーの標的 X/リガンド Y の PPI 阻害によるシグナル抑制効果を検証した。その結果、結合親和性が強く (K_D : 0.51 nM)、シグナル抑制も可能な人工核酸アプタマー (Apt#1) を創出することに成功した。また、スケールアップ合成に対応するために、今回使用したチミジンの 5 位に芳香族性置換基を有する塩基部修飾型人工核酸を導入したオリゴマーの化学合成に必要なアミダイト体の合成と続くオリゴマー化を実施した。市販の 5-ヨードチミジンを出発原料として 7 ステップの有機化学合成によってオリゴ核酸の化学合成に適応可能なアミダイト体に誘導化したのち (総収率: 13%)、化学合成によるオリゴマー化によって Apt#1 を作製することに成功した。

次に、人工核酸アプタマーの構造予測方法の確立を進めた。予測の最初のステップである核酸の 2 次構造予測について、広く用いられている mfold、RNAfold、Centroid fold の評価を行った。蛋白質構造データバンク (PDB) から 25 塩基以上ある 1 本鎖 DNA を含む 69 種類の構造を選択し、評価用データセットを作成し、評価に用いた。その結果、予測精度に加え、グアニン 4 重鎖を含む構造に対応していることから、RNAfold が他の予測法よりも優れていることが明らかとなった。なお、3 つの予測法の全てにおいて予測が失敗した 14 配列には、グアニン 4 重鎖を含む配列が 11 配列含まれており、グアニン 4 重鎖の予測の難しさが明らかとなった。そのため、グアニン 4 重鎖専用の予測法である QGRS-Mapper を部分配列に適用するなど、総合的に 2 次構造を判断することが必要になると考えられた。この調査に基づいて、人工核酸アプタマー (Apt#1) の 2 次構造予測を実施した。予測結果を踏まえて、Apt#1 に対して 5 種類の変異体を設計・作製し、鎖長の最適化を実施した。その結果、機能を保持しつつ 17 塩基長の短鎖化に成功した。人工核酸アプタマーの立体構造予測法についても、評価を行った。物理化学的な原理に基づいた *de novo* モデリングは、天然型 RNA でも難しく、確立した構造予測法は存在しないため、天然型 RNA の立体構造予測のツールを組み合わせ、人工核酸アプタマーの立体構造予測のパイプラインを構築した。上記データセットより、類似の構造を取り除き、計 25 種類の構造からなる構造予測法評価用のデータセットを構築し、このパイプライン評価した。その結果、LNA がグアニン 4 重鎖に含まれているなどの難しい 3 つのケースを除いた 22 個中 17 個で RMSD が 7 Å 以下であった。しかしながら、2 次構造予測の精度に依存することや、相互作用によって立体構造が変わる場合やシュドノット構造をとる場合は予測が難しいことが明らかとなり、今後の課題である。この作成したパイプラインを利用して、Apt#1 の立体構造予測を行った。Apt#1 はグアニン 4 重鎖の存在が予測され、高い配列類似度のテンプレートが見つかったため、その構造を鋳型としてモデリングした。

タンパク質と DNA の相互作用部位の予測法については、これまでに転写因子の情報をもと提案されている幾つかの方法を検証したが、いずれの方法も偽陽性が高く、アプタマーの相互作用部位予測への利用は難しかった。上記検証結果を踏まえて、アプタマーの高次構造および複合体構造の予測を補完可能な簡便な実験手法の開発を試みた。核酸分解酵素による構造選択的な切断活性に着目し、アプタマー単独時および標的 X との複合体形成時の切断効率と切断位置の変化を種々の核酸分解酵素を用いて比較検証した。各種核酸分解酵素には至適な緩衝液

組成が知られているが、緩衝液組成の変化によるアプタマーの高次構造変化を起こさないようにするため、実際のアプタマーが機能する緩衝液条件下で切断実験を行った。その結果、5'exonuclease を用いることで Apt#1 の 5' 側の高次構造と不要領域の推定、3'exonuclease を用いることで Apt#1 の 3' 側の高次構造と不要領域の推定、endonuclease を用いることでアプタマー単独時における 1 本鎖領域と複合体形成時の Apt#1 側の相互作用領域を推定できることが明らかになった。本結果は、以降の複合体構造予測時の補完データとして利用した。

これまでの予測結果および実験結果に加えて、既知の標的 X/リガンド Y 複合体構造を用いた相互作用解析より得られた相互作用部位情報を利用して、複合体予測を行った。すなわち、ドッキング計算を行う際に、Apt#1 のグアニン 4 重鎖構造が予測された塩基と標的 X/リガンド Y の相互作用に関与しているアミノ酸残基間での相互作用が有利になるように拘束をかけてドッキング計算を行った。MOE を用いてドッキング計算を行い、エネルギー最小化の後、複合体構造を得た。得られた複合体構造は、スコアが上位のものでも異なる相互作用様式が見られたため、上位 5 つの複合体構造と標的 X の立体構造から得られる官能基特性（フィーチャー）も考慮して、フィーチャーが 10 個からなる、ファーマコフォアを作成した。続いて、作成したファーマコフォアと化合物ライブラリ（Enamine REAL2022, WuXi_subset_50M, Namiki202112）を用いてファーマコフォアの部分一致によるインシリコ・スクリーニングを行った。フィーチャーの部分一致の個数は、Namiki202112 ライブラリに対して約 0.07% がヒットした 5 個を選択した。なお、スクリーニングを行う際に問題となる、多くのタンパク質と相互作用する偽陽性の化合物（Pan-Assay Interference compounds, PAINS）は、化合物ライブラリから取り除き、さらに logP の予測により、溶解度が低い可能性が高い化合物も取り除いた。これらの基準に加えて、本研究期間内で機能評価可能なタイミングまでに入手可能な点を考慮して、21 種類の化合物を選定した。

最後に、選定した 21 種類の化合物について、上記と同様の *in vitro* レポーターアッセイシステムを用いてシグナル抑制効果を検証した。その際、比較対象として、ランダムに選別した 14 種類の化合物についてもヒット化合物と同様に評価した。その結果、2 種類の化合物（L17 と L21）が明確なシグナル抑制効果を示した。一方で、ランダムに選別した化合物では明確なシグナル抑制効果は認められなかった。このうち、L21 は、濃度依存的にアンタゴニスト活性を示し、標的 X 以外のリガンド/レセプター複合体形成によるシグナル伝達により活性が変化するレポーター細胞ではシグナル抑制効果を示さないことを明らかにした。

本研究により、標的 X に対する人工核酸アプタマー（Apt#1）から作成したファーマコフォアを用いることで、濃度依存的かつ特異的に標的 X/リガンド Y 経路のシグナル伝達を阻害する低分子化合物（L21）を効率的に見出すことに成功した。しなしながら、効率的にリード化合物を見出すことができた反面、その活性は設計元の人工核酸アプタマー（Apt#1）や抗体に比べて弱く、活性の向上が必要だと考えている。今後は、選別したヒット化合物の機能評価結果を踏まえたファーマコフォアの最適化や今回見出した有望化合物の構造展開を実施する。これにより、有望化合物の活性向上を図りつつ低分子化合物デザインの確度向上や活性向上に必要な要素の抽出と各工程を効率化し、本技術を広く活用できるように発展させていきたい。

This research aims to develop a new approach for drug discovery by constructing a platform to create next-generation small molecule drugs having both specificity and activity similar to biological medicines in order to make a "reverse paradigm shift" to small molecule drugs from biopharmaceuticals. The discovery of small molecule inhibitors targeting membrane proteins and protein-protein interactions (PPIs) is highly difficult. The main reason for this is extremely low probability of hit finding due to the wide area of interaction sites between target and ligand proteins. Even though X-ray co-crystal structure information of target proteins and very low affinity hit compounds are obtained, it will be very hard to optimize to lead compounds because of the difficulty of preparing variety of derivatives. This research focuses on utilizing the properties of chemically synthesizable aptamers for the design of small molecule drugs. This design strategy is unprecedented and highly original. Through this research, we can accumulate knowledge of aptamer optimization and designing small molecule drugs based on their functional analysis results.

First, we created artificial nucleic acid aptamers with antibody-equivalent activity. We screened the target-X, for which an antibody drug has already been approved, using an artificial nucleic acid library containing a base-modified artificial nucleic acid with an aromatic substituent at the 5-position of the thymidine and an improved screening method. As a result, we succeeded in creating an artificial nucleic acid aptamer (Apt#1) that binds strongly to target-X (K_D : 0.51 nM) and inhibits the PPI and the signal transduction of target-X/ligand-Y. Next, we developed a method for predicting the structure of artificial nucleic acid aptamers. The secondary structure of Apt#1 was predicted using a combination of RNAfold and QGRS-Mapper. By optimizing the structure of Apt#1 based on the prediction results, we succeeded in shortening the length to 17 nucleotides. In addition, we predicted the higher-order structure of Apt#1 using a pipeline constructed by combining the prediction tools for natural RNA structures. Furthermore, to support the aptamer structure prediction, we focused on the structure-selective cleavage activity by nucleases and evaluated the changes in cleavage efficiency and position of the aptamer alone or in complex with the target-X. This information was used to predict the higher-order structure of Apt#1 and Apt#1/target-X complex structure. Using the pharmacophores generated based on the modeled complex structures, we performed in silico screening against compound libraries. Twenty-one compounds were selected considering overlap with features, solubility, and availability. Finally, we evaluated the antagonist activity of the selected compounds using an in vitro reporter assay system. As a result, we found one small molecule compound (L21) that showed antagonist activity in a pathway-specific and concentration-dependent manner.

In this study, we succeeded in efficiently discovering a small molecule compound (L21) that specifically and concentration-dependently inhibits signaling in the target-X/ligand-Y pathway by in silico screening using a pharmacophore created from the modeled complex structures of the anti-target-X artificial nucleic acid aptamer (Apt#1) and target-X. As the next step, we would like to improve the activity of L21 by optimizing the pharmacophore and expanding its structure.