

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 創薬基盤推進研究事業  
(英語) Research on Development of New Drugs
- 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
- 研究開発担当者 (日本語) 株式会社リボミック 事業開発部長 秋田一雅  
所属 役職 氏名 : (英語) Kazumasa Akita, General Manager Business Development Department RIBOMIC Inc.
- 実施期間 : 平成28年11月1日 ~ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) Cell SELEX 法による GPCR を標的とする RNA アプタマー取得方法の検討、  
および SEEDS 法による新しいアプタマー探索手法の開発  
開発課題名 : (英語) Generation of RNA aptamers against GPCR by Cell SELEX and the  
development of SEEDS method, a novel selection technique of RNA  
aptamers
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学医科学研究所「RNA 医科学」社会連携研究部門 特  
任准教授 高橋 理貴  
所属 役職 氏名 : (英語) Masaki Takahashi, Project Associate Professor, Project Division of  
RNA Medical Science, The Institute of Medical Science, The  
University of Tokyo

## II. 成果の概要（総括研究報告）

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指している。本研究課題では GPCR に対するアプタマーを取得するための新しい方法論として、GPCR を安定化させた新規材料を用いた SELEX や GPCR を発現させた細胞を用いた SELEX 法を確立する。またハイスループットシーケンスによる網羅的な候補アプタマー配列の取得とコンピューター解析を組み合わせた効率的なアプタマー配列同定手法の確立を試みている。これらを組み合わせることで効率的かつ汎用性を有する GPCR に対する新規薬剤開発基盤技術を構築する。

平成 28 年度はモデルケースとして 2 種の GPCR (X および Y) を選定しアプタマー取得手法である SELEX を実施するための基礎的技術の構築に注力した。SELEX の材料として不安定な膜タンパク質である GPCR を安定的に取り扱うための新規素材をビーズに固相化したもの (1) および GPCR-X、GPCR-Y を発現させた培養細胞 (2) を用いることとした。(1) は GPCR を安定的に保持する新規素材をビオチン標識してアビジンビーズに固相化することで SELEX のベイトとして利用するものであり、各種検討の結果、効率的にアビジンビーズに固相化する手法を確立した。すでに GPCR-X をターゲットとした SELEX を実施し、GPCR-X に結合しているアプタマーを回収できていることから、新規素材が SELEX に有用であることを確認している。(2) ではウイルスベクターを用いて HEK293 細胞に GPCR-X または Y をそれぞれ過剰発現させた細胞を構築した。過剰発現細胞と同様、HEK293 細胞の内在性の GPCR-X または Y をノックアウトした細胞株についても作製しており、この細胞を非特異および非標的アプタマーの除去に使用する予定である。これらの細胞を用いて東京大学医科学研究所 RNA 医科学社会連携研究部門にて確立した Icell-SELEX 法を用いて SELEX を行う予定である。

また取得したアプタマーの生理活性を評価するための *in vitro* 評価系として cAMP センサーを用いた Gs/Gi type GPCR の評価系とエクオリンを用いた Gq type GPCR の評価系を構築した。特にエクオリンを用いた細胞内カルシウム濃度測定系は G<sub>15/16</sub> G タンパク質を用いることで他の type に属する GPCR の活性も評価できる汎用性の高い評価系である。これらの評価系により実際に GPCR-X および Y の活性評価が可能であることを確認している。

ハイスループットシーケンスとコンピューター解析によるアプタマー配列同定手法の開発では、モデルケースとして非膜タンパク質を用いて少ない選択工程により得られた候補アプタマー配列から種々の解析プログラムを用いて標的分子への特異性を示す配列群を同定し、実際にこれらの候補アプタマーが標的に結合することを確認した。今後は GPCR をターゲットとした SELEX に本技術を適応したいと考えている。

Since the structure of GPCR is very complex, it is difficult to generate therapeutic antibody. In addition, it is also difficult to make a selective small molecule ligand against each GPCR, because it has a lot of family receptors respectively. Therefore, the novel strategy to make therapeutics targeting GPCR is needed. In this project, we are planning to make new fundamental technologies for GPCR using RNA aptamer that has gotten a lot of attention recently as a new technology and an efficacious pharmaceutical compound comparable to antibody.

In this project, one of our goals is the development of new SELEX methods using a new material that stabilize the structure of GPCR and cells expressing GPCR. Additionally, we intend to make a new efficient analytical method that identify the sequences of candidate aptamers with a combination of high throughput sequencing and computer analysis. We make effective and versatile fundamental technologies to develop RNA aptamers against GPCR by integrating those methods.

In the last year, we selected two GPCR (GPCR-X and Y) as model cases and tried to establish fundamental technologies that enable us to conduct SELEX. We used two materials as baits of SELEX. One is the new material that stabilize GPCR without membrane (1). The other is the cell expressing GPCR-X or Y (2). (1) is the new material that maintain GPCR stable and it is modified by biotin to immobilize to avidin beads as a bait for SELEX. First we established the procedure to immobilize it to avidin beads effectively. We conducted some trial SELEXs and got aptamers that bind to GPCR. So the new material (1) is useful for SELEX. Regarding the material (2), we have already established cell lines expressing GPCR-X or Y by infecting HEK293 cells with lentivirus. We have also established cell lines that lack GPCR-X or Y completely and we will use these cell to remove non-specific aptamers. Using these cells, we will conduct Icell SELEX that has been already established by the Institute of Medical Science, University of Tokyo.

For the *in vitro* assay of aptamers against GPCR, we have established two types of assay procedures. One is the assay using cAMP sensor protein. We can evaluate aptamers for Gs and Gi type GPCR with this method. The other is the assay using aequorin protein for Gq type GPCR. This method is versatile because we can evaluate aptamers for all of the types of GPCR with this method using G15/16 proteins. We have already confirmed that these assay methods are appropriate for GPCR-X and Y.

Finally, we conducted a feasibility study for the new analytical method that enable us to identify efficacious sequences of aptamers by the combination of high throughput sequencing and computer analysis. In the last year, we performed some trials targeting a model protein, not GPCR, with only a few rounds of SELEX and we got some aptamers. Of those aptamers, we succeed in identifying the cluster that contains some sequences of aptamers binding to a model protein specifically. We are trying to apply this method to SELEX for GPCR.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 6 件）

1. Jin, L., Nonaka, Y., Miyakawa, S., Fujiwara, M., Nakamura, Y.: Dual therapeutic action of a neutralizing anti-FGF2 aptamer in bone diseases and bone cancer pain. *Mol. Ther.*, 2016, 24(11): 1974-1986.
2. Jaafar, Z.A., Oguro, A., Nakamura, Y., Kieft, J.S.: Translation initiation by the hepatitis C virus IRES requires eIF1A and ribosomal complex remodeling. *eLife*, 2016, 5:e21198.
3. Takahashi, M., Sakota, E., Nakamura, Y.: The efficient cell-SELEX strategy, Icell-SELEX, using isogenic cell lines for selection and counter-selection to generate RNA aptamers to cell surface proteins. *Biochimie*, 2016, 131: 77-84.
4. Goto, R., Miyakawa, S., Inomata, E., Shioyama, S., Nishida, Y., Yamaura, J., Nakamura, Y.: De novo sequencing of highly modified therapeutic oligonucleotides by hydrophobic tag sequencing coupled with LC-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 2017, 52 (2): 78–93.
5. Hashimoto, Y., Takahashi, M., Sakota, E., Nakamura, Y.: Nonstop-mRNA decay machinery is involved in the clearance of mRNA 5'-fragments produced by RNAi and NMD in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2017, 484 (1): 1-7
6. Amano, R., Aoki, K., Miyakawa, S., Nakamura, Y., Kozu, T., Kawai, G., Sakamoto, T.: NMR monitoring of the SELEX process to confirm enrichment of structured RNA. *Sci. Rep.*, 2017, 7: 283.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Divergent roles of FGF2 in disease progression: Multiactions of anti-FGF2 aptamer, 口頭発表, Fujiwara, M., Jin, L., Nonaka, Y., Nakamura, Y., 2nd Fibroblast Growth Factors in Development and Repair Conference, 2017.3.8-11, 国外 (Cancun)
2. RNA アプタマーを利用した血管内皮細胞増殖因子を特異的に捕捉可能な医用材料開発、ポスター、森下裕貴、野村祐介、福井千恵、中村義一、齋島由二、第 16 回日本再生医療学会総会、2017.3.7-9、国内 (宮城)
3. 新規骨再生促進医用材料の開発に関する研究、ポスター発表、野村祐介、福井千恵、森下裕貴、中村義一、齋島由二、第 16 回日本再生医療学会総会、2017.3.7-9、国内 (宮城)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「RIBOMICation vol.2」の発行、当社ホームページでの公開、2016/6/30、国内  
(内容の分かりやすさ、満足度等のアンケートを実施し、双方向コミュニケーションに努めた)

(4) 特許出願

なし