



circRNA를 이용한 치료제 개발 가능성 탐구

Sangyong Lee, Eunho Kim, Minki Hong, Ingyeong Lee, Jihwan Ahn, Jongbum Lee*

Department of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul, 02504

Introduction

1.1. Necessity of circRNA therapeutics

의약품은 인류의 건강을 책임지기에 연구가 필수적이며, 특히 2021년 현재처럼 전 세계적인 전염병이 유행 중일 때는 더욱 중요하다. 따라서 백신이나 치료제의 새로운 원리를 연구하는 것이 필요하다. 기존의 백신들은 항원의 약화나 배양 과정이 필요해 개발하는 데 시간이 오래 걸린다. mRNA 백신은 개발 속도가 빠르나 linear하고 반응성이 큰 구조 때문에 불안정해서 목표 세포까지 안전하게 도달하기 어렵다. 따라서 최근에는 말단인 5'과 3'을 연결해 원 형태로 만들어서 안정성을 높인 circRNA가 활발히 연구되고 있다.

1.2. Mechanism of circRNA

circRNA의 메커니즘은 다음과 같다. 예를 들어, 정상세포에서는 miRNA인 miR-15a-5p가 TRIF에 결합해 TLR3의 활성을 억제한다. 그렇기 때문에 바이러스의 RNA를 분해하는 TLR3가 제대로 작동하지 못해 RNA가 계속 복제되는데, 여기서 circDtx1이라는 circRNA가 miRNA에 대신 결합해 TRIF와의 결합을 저지한다. 이렇게 바이러스 RNA를 분해하는 TLR3가 활성화되게끔 도와주어 circRNA가 바이러스 치료제로서의 가능성이 있음을 보여준다.

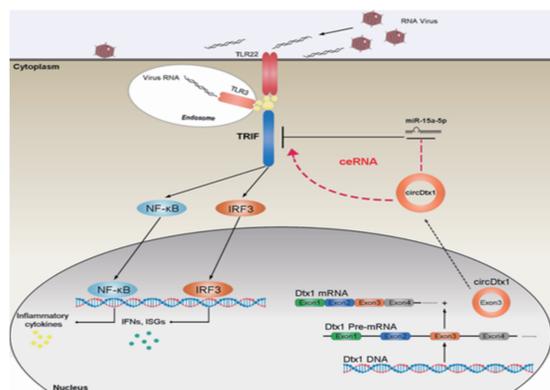


Fig.1 Mechanism of circRNA[1]

Problem Define

2.1. Problem of circRNA therapy technology

바이러스에 감염된 세포의 경우 circRNA를 분해하는 작용을 한다는 문제가 있다. 정상 세포에서는 RNase L이 비활성화 되어있지만 바이러스 감염세포는 Poly(I:C)에 의해 RNase L이 활성화되어 분해를 촉진하게 된다. 여기서 Poly(I:C)는 면역 자극제로 외부에서 들어온 물질에 대한 면역반응을 증강시키는 역할을 한다. Poly(I:C)가 inactive PKR을 활성화 시키고 active PKR은 interferon 합성을 촉진시킨다. 이어서 interferon이 active RNase를 만들게 되어 외부에서 치료제로서 주입한 circRNA는 분해된다.

따라서 외부에서 합성한 circRNA의 분해를 막기 위한 여러가지 전략들이 제시되고 있다. 크게 circRNA 자체를 외부 물질로 인식하지 않도록 하거나, 분해 물질을 직접적으로 inactivation시켜 분해를 막는 2가지 방향으로 정리해볼 수 있다. 본 논문에서는 circRNA 자체를 Endogenous 물질로 인식하게 하는 방향으로 연구를 진행한다.

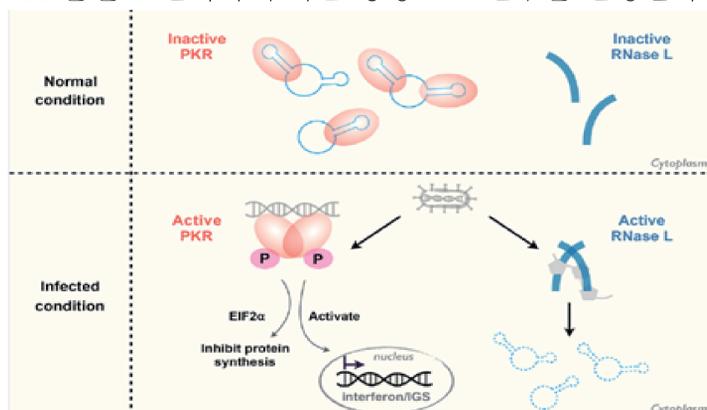


Fig.2 RNaseL activated by infection [2]

Main idea

- m6a modification

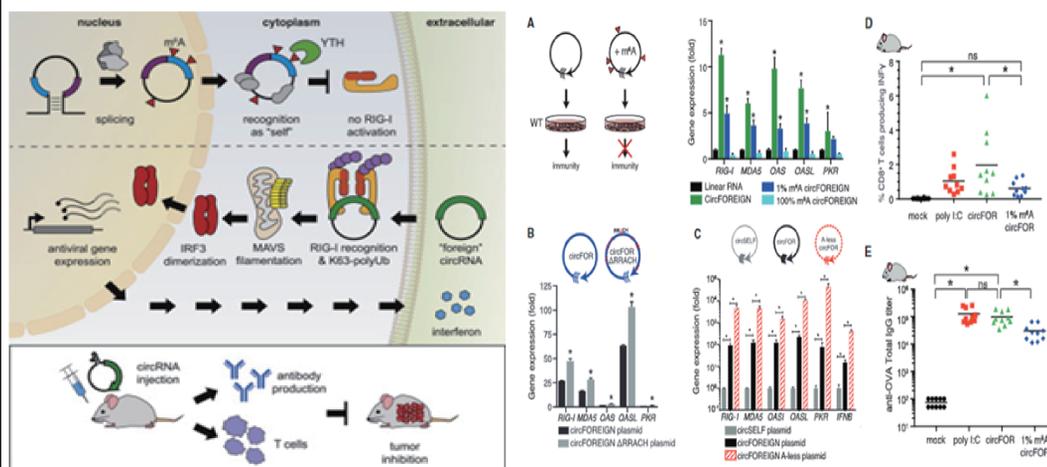


Fig.3 Immune system activated by circRNA | Fig.4 m6A modification experiment result

M6a는 RNA가 자가세포에서 유래된 것인지, 외부에서 유입된 것인지를 결정하는 기준이 된다. 체내에서 생성된 circRNA는 METTL(m6a writer)에 의해 m6a 표지를 가진다. YTHDF 단백질(m6a reader)이 m6a를 인식하고, endogenous RNA에 대한 별도의 면역반응을 거치지 않는다. Fig.4 실험은 circFOREIGN에 m6a 표지를 붙인 결과이다.

100% m6a로 modification한 circFOREIGN은 endogenous RNA와 거의 유사하게 면역반응이 매우 적다. 1%만 modification한 circFOREIGN의 경우에도 눈에 띄게 면역반응이 감소함을 보여준다. T cell의 면역 반응과 antibody의 면역 반응이 모두 떨어지는 것 또한 확인할 수 있다. 실험군의 데이터는 circRNA와 Modified circFOREIGN의 구분이 거의 불가능하다는 것을 보여주고 결과적으로 체내에 주입한 circRNA의 면역반응이 억제되었다.

- Synthesis of m6a modified circRNA



Conclusion

실험 결과, 세포가 m6a를 외부물질로 인식하지 못해 면역발현이 감소하는 효과가 나타났다. 선택적으로 RNA를 methylation 하지 못한다는 한계가 있지만, ATP를 먼저 methylation 한 후 m6ATP와 ATP로 circRNA를 합성한다면 선택적으로 면역 발현도를 줄일 수 있을 것으로 예상된다. 또한, m6a modification 기술로 circRNA degradation을 막기 위한 별도의 adjuvant를 첨가하지 않은 안정적인 치료제 개발이 가능할 것으로 기대된다.

References

- [1] Peerzada Tajamul Mumtaz, Qamar Taban, Mashooq Ahmad Dar, Shabir Mir, Zulfkar ul Haq, Sajad Majeed Zargar, Riaz Ahmad Shah, Syed Mudasir Ahmad (2020) Deep Insights in Circular RNAs: from biogenesis to therapeutics, p1
- [2] Ling-Ling Chen, Li Yang (2015) regulation of circRNA biogenesis, p383-386
- [3] Weiwei Zheng, Qing Chu, Liyuan Yang, Lingping Sun, Tianjun Xu (2021) Circular RNA circDtx1 regulates IRF3-mediated antiviral immune responses through suppression of miR-15a-5p-dependent TRIF downregulation in teleost fish, p19
- [4] Liu, Chu-Xiao, et al. "Structure and degradation of circular RNAs regulate PKR activation in innate immunity." Cell 177.4 (2019): 865-880.
- [5] Y. Grace Chen, et al. (2019) N6-Methyladenosine Modification Controls Circular RNA Immunity, Molecular Cell 76, 96-109.
- [6] Saad Moulay (2019) N-Methylation of Nitrogen-Containing Organic Substrates: A Comprehensive Overview, Current Organic Chemistry, 23(16) 1695-1737