

研究報告書

「間葉系細胞の機能を制御する核酸アプタマースキャフォールド」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016年10月～2020年3月

研究者: 吉本 敬太郎

1. 研究のねらい

本研究課題では、核酸アプタマーを基盤とする、接着・増殖・分化などの細胞の機能を人工的に制御する新規液性因子やスキャフォールドの開発を目的とした。本目的を達成するため、まずは改良型核酸アプタマー選抜法(SELEX)に取り組み、次世代シーケンサーのビッグデータを効率良く解析する手法の導入や、キャピラリー電気泳動法を活用した独自の SELEX 法を確立するところから研究を開始した。

2. 研究成果

(1) 概要

次世代シーケンサーのビッグデータを効率良く解析する手法の導入、さらにキャピラリー電気泳動法を導入した独自の SELEX 法を確立するとともに、VEGF 様な血管新生機能を有する液性因子アプタマーの獲得、ならびに上皮系細胞の選択的な接着・培養を可能とする核酸アプタマースキャフォールドの開発に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ①「核酸アプタマー選抜法の改良」

「化学抗体」と称されるアプタマーは Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX)という手法によって人工的に獲得が可能である。しかし、SELEX 法におけるアプタマー選抜工程の長期化や非常に低い成功率が課題となっている。i

SELEX 法の基本工程は、(1)核酸ライブラリーと標的分子の混合、(2)結合性の核酸の分離、(3)PCRによる増幅、(4)一本鎖化による核酸ライブラリーの再構築、(5)シーケンス、に大別され、この一連の操作を繰り返すことで目的の核酸アプタマー候補分子を濃縮するものである。本研究では、まず、5のシーケンスの工程に次世代シーケンサーを導入し、さらに、次世代シーケンサーから得られるビッグデータを効率良く解析するソフトウェアを用いて、核酸アプタマーの獲得率の上昇を目指した。その結果、N-cadherin、E-cadherin、VEGFR に結合する核酸アプタマー群を6ラウンドで獲得することに成功した。

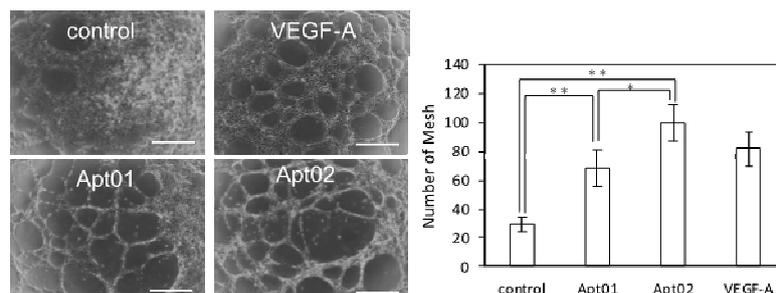
また、SELEXの(2)の工程におけるアプタマー/標的分子複合体の分離効率はSELEXの成功を左右する因子であり、高い分離性能を誇るキャピラリー電気泳動を用いる Capillary Electrophoresis-SELEX(CE-SELEX)は、最も高速な核酸アプタマーの取得法の一つである。しかし、検出感度の限界によりアプタマー/標的分子複合体のCE分取が不確実、アプタマーとの結合時に十分なCE移動度シフトを起こす標的分子に限られるといった課題があったため、本研究では、CE-SELEXの課題である「複合体の正確な検出」と「複合体形成時の大きなCE移動度シフト」を同時に満たす、高親和性アプタマーの高速選抜法「マイクロ粒子支援型

キャピラリー電気泳動 SELEX (microbeads-assisted capillary electrophoresis SELEX; MACE-SELEX)」を確立した (*Mol. Ther. Nucleic Acids*, 16, 348-359, 2019. *Anal. Sci.*, 35(5), 585, 2019.)。その結果、トロンビンや TNF- α に結合するアプタマー群を 3-4 ラウンドで獲得することに成功し、獲得したアプタマーの結合能と薬効は既報のアプタマーの性能を上回るものであった。

研究テーマ②「液性因子・スキャホールドとして機能する核酸アプタマーの選抜と機能評価」

細胞培養の添加因子や足場材料には、タンパク質を利用するのが一般的な手法であるが、タンパク質は保存性が悪く高価、さらに作製した時期や場所、個体の差で大きなロット差が発生することから、長期間同質のものを提供することが困難である。再現性の良い細胞実験を遂行するためには、本課題を解決する新たな分子の利用が必要不可欠である。本研究では、核酸アプタマーの利用を着想した。核酸アプタマーは標的分子に特異的に結合するだけでなく、化学合成が可能であるため安価で常に均一の質の物質を提供でき、物質としての保存性も非常に高い。

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は、既存の血管から分岐して新たな血管を形成する血管新生や、初期の胚形成時に新たに血管を形成する脈管形成において重要な因子であり、VEGF がその受容体 (VEGFR) に結合することで活性を示す。また、最近では、VEGF-A が iPS 細胞の内皮細胞への分化に重要な因子であることが報告されている。本研究では、VEGF-A に似た核酸アプタマーを獲得するために、試験管選択法 (SELEX 法) を VEGFR-1 と VEGFR-2 の両ターゲットに対し交互に 3 ラウンド行った。各ラウンドで得られた PCR サンプルを次世代シーケンサーで解析後、ラウンド数が上昇するに従って存在割合が上昇する配列を独自に開発した解析用ソフトウェアを用いて抽出した (研究テーマ①で開発した改良 SELEX 法の一つ)。得られた候補配列の結合能を、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーを用いて評価した結果、VEGFR-1 と VEGFR-2 の両ターゲットに結合する核酸アプタマー群の獲得に成功した。円偏光二色性 (CD) スペクトル (Fig.2) と融解温度 (T_m) (Fig.3) の結果から、Apt01 という配列はステムループ構造を形成し、VEGFR-1 に対して 3.3 nM、VEGFR-2 に対しては 100 nM の K_d 値を示すことが明らかとなった。また、四重鎖構造をもつ Apt02 は VEGFR-1 に対して 1.5 nM、VEGFR-2 に対して 32 nM の K_d 値であることが明らかとなった。マトリゲル上に播種した HUVEC2 細胞は、通常 18 時間で血管網を形成するが、血管網形成促進効果が知られている VEGF-A を添加すると、4 時間で血管網を形成する。興味深いことに、獲得したアプタマーのうち、Apt02 は 4 時間で VEGF-A と同程度の血管網を形成させる効果があることが明らかとなった (下図)。つまり、VEGF-A 様の新しい人工サイトカインとして機能することが明らかとなった (*Anal. Sci.*, 35(1), 113, 2019. 他、現在 revise 中)。



E-cadherin は、細胞間接着を担う細胞膜表面受容体存在するタンパク質である。上述した VEGFR に結合するアプタマーを獲得した時と同様、各ラウンドサンプルの次世代シーケンスデータ解析を利用する改良 SELEX 法により、3 段の平行型 4 重鎖構造をもつ E-cadherin 結合型アプタマー (EBA) の獲得に成功した。EBA の細胞接着能を確認するため、EBA をストレプトアビジン-ビオチン相互作用によって基板に修飾し、細胞足場を作製した。EBA 修飾基板に E-cadherin を多く発現している上皮細胞を播種したところ、細胞の接着が確認された。興味深いことに、EBA 修飾基板上の細胞は EDTA 処理後も剥離が起らず、二価の金属イオンに非依存的な細胞-DNA 間の新しい細胞接着様式をとることが示唆された。EBA 修飾基板上の細胞接着を免疫染色によって評価した結果、二価の金属イオン依存的な細胞接着様式である細胞-細胞外マトリクス (Extracellular matrix, ECM) 間接着と同様の接着斑が確認された。以上の結果から、EBA 修飾基板上における細胞接着は、細胞-ECM 間接着と細胞-DNA 間接着が混在した結合様式であることが示唆された。このような細胞接着特性を有する EBA の細胞選択性を確認したところ、間葉系の細胞には接着を示さず、上皮系細胞を選択的に接着・増殖する機能を有する事が明らかとなった(現在、論文投稿準備中)。

3. 今後の展開

EBA 固定化表面上に播種された細胞の網羅的遺伝子発現解析を mRNA seq などを用いて解析し、アプタマーが選択的に誘起する遺伝子発現現象を明らかにする。さらに、本研究で開発した改良 SELEX 法を駆使し、新たな標的分子に対するアプタマー群の獲得を継続して進め、新しい機能をもつ核酸アプタマースキャフォールドを開発する予定である。

4. 自己評価

獲得した核酸アプタマースキャフォールドは、上皮系細胞に対して選択的に接着を示す足場材料であった。当初の目標であった間葉系細胞の接着は研究機関内に実現できなかったが、選択的な細胞分離や培養を可能とする核酸アプタマーを資源とする足場材料を世界で初めて開発し、着想したアイデアが実現可能なものであることを明らかとした点は評価される点である。また、本研究の過程で確立された改良 SELEX 法は非常に効率よく、優れた結合能を有するアプタマー群を獲得することができる。本法は、アプタマー製剤をスクリーニングする際にも有益な技術となりえるはずである。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Wakui, K., Abe, A., Yoshitomi, T., Furusho, H., Yoshimoto, K., "High Enrichment of Nucleobase-Modified Aptamers in Early Selection Rounds by Microbeads-Assisted Capillary Electrophoresis SELEX" *Analytical Sciences*, 35(5), 585 (2019).

2. Wakui, K., Yoshitomi, T., Yamaguchi, A., Tsuchida, M., Saito, S., Shibukawa, M., Furusho, H., Yoshimoto, K., “Rapidly Neutralizable and High Anticoagulant Thrombin-Binding DNA Aptamer Discovered by Microbeads-Assisted Capillary Electrophoresis (MACE) SELEX” <i>Molecular Therapy Nucleic Acids</i> , 16, 348–359 (2019).
3. Yoshitomi, T., Wayama, F., Kimura, K., Wakui, K., Furusho, H., Yoshimoto, K., “Screening of DNA signaling aptamer from multiple candidates obtained from SELEX with next-generation sequencing” <i>Analytical Sciences</i> , 35(1), 113 (2019).
4. Maruyama, R., Makino, K., Yoshitomi, T., Yui, H., Furusho, H., Yoshimoto, K., “Estimation of G-Quartet-Forming Guanines in Parallel-Type G-Quadruplexes by Optical Spectroscopy Measurements of Their Single-Nucleobase Substitution Sequences” <i>Analyst</i> , 143, 4022–4026 (2018).
5. Furuhashi, Y., Yoshitomi, T., Kikuchi, Y., Sakao, M., Yoshimoto, K., “Osteogenic Lineage Commitment of Adipose-Derived Stem Cells is Predetermined by Three-Dimensional Cell Accumulation on Micropatterned Surface”, <i>ACS Applied Materials & Interfaces</i> , 9 (11), 9339–9347 (2017).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(1) 吉本敬太郎, “toehold 導入型核酸アプタマーによる中和制御可能な抗凝固製剤”, 日本薬学会第 139 年会 一般シンポジウム “生体分子骨格子デザインで挑む次世代創薬研究”, 2019 年 3 月 22 日, (幕張メッセ, 幕張, 千葉).

(2) Keitaro Yoshimoto, “Functions of DNA aptamers discovered by improved SELEX”, 3rd International symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, March 8th 2019 (NIMS, Tsukuba, Ibaraki).

(3) 吉本敬太郎, “DNA アプタマー選抜における分離・洗浄工程の重要性: 微粒子導入型キャピラリー電気泳動の導入効果”, 日本分析化学会第 67 年会, 2018 年 9 月 13 日(東北大学, 仙台, 宮城)

(4) 吉本敬太郎, “細胞接着性核酸アプタマーを利用する細胞分離・分析用足場材料の提案”, 日本分析化学会 66 年会, 2017 年 9 月 10 日(東京理科大学, 葛飾, 東京).