

1.5 感染症診断

DNA マイクロアレイは、微生物への応用も広く行われ、臨床的には、病原体検出への応用が行われるようになってきている。インフルエンザ B 型ウイルス診断のための低密度 DNA マイクロアレイ¹¹⁾をはじめ様々な感染症診断用マイクロアレイが報告されている。

2 RNA マイクロアレイ⁶⁾

最近、マイクロ RNA と呼ばれる 22 ヌクレオチド程度の大きさの、これまでその存在が知られていなかった小さな non-coding RNA が、高等動物や植物で遺伝子発現制御を行っていることや、「がん」との関係も報告されるようになってきた。しかし、マイクロ RNA は短鎖のため DNA とのハイブリダイゼーションでは検出感度や精度に問題がある。そこで、従来の DNA プローブを固定化したマイクロアレイではなく、RNA 型のマイクロアレイが開発されるようになってきている。これは、一般に核酸二重鎖の熱的安定性は、RNA/RNA 二重鎖が最も安定で、RNA/DNA 二重鎖、DNA/DNA 二重鎖の順に安定性が低下することが知られているためである。

3 プロテイン・マイクロアレイ (第 8 章)^{1~9, 12~16)}

プロテイン・マイクロアレイは、第 8 章にも述べられているように、いくつかに分類される。ひとつは、ポストゲノム解析としてのプロテオーム解析のツール (機能性プロテイン・チップ) と、もう一つは多種類同時分析手段としての分析用プロテイン・チップである。プロテオーム解析には伝統的には二次元電気泳動または二次元ゲルクロマトグラフィーと質量分析法を組み合わせ大規模に分離、同定を行う技術が用いられてきたが、最近ではプロテイン・マイクロアレイ法も広く行われるようになってきた。しかし、DNA と異なり、タンパク質は複雑な構造をしており、種類も豊富なため、マイクロアレイのためには様々な工夫が必要であり、一筋縄ではいかない。

2000 年に *Science* に発表された McBeath と Schreiber のプロテイン・チップが最初の例であるが、これはタンパク質をそのままアルデヒド化した基板上へ固定化するものであった。これに対し、Snyder のグループは、酵母タンパク質一種類ごとにニッケル結合性をもつオリゴヒスチジンを導入し、ニッケル被覆スライドガラスに 5,000 種以上をマイクロアレイした。これにより、タンパク質間相互作用を調べ、カルモデュリンに結合する 33 の新たなタンパク質を発見し、フォスファチジルイノシチドに結合する 52 のタンパク質を見出した⁹⁾。この技術を用い、Invitrogen 社が ProtoArrayTM (高密度タンパク質マイクロアレイ、4,000 種以上のタンパク質を搭載)

を販売している。Ptacekらは、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として調製し、酵母由来タンパク質を4,400スポットしたProtoArrayを用い、放射能標識ATPを反応させ、キナーゼの基質特異性およびリン酸化ネットワークの網羅的解析を報告している。その結果、合計約4,200のリン酸化反応が検出され、のべ1,325タンパク質を基質とするリン酸化ネットワークが形成されていた。基質特異性についても網羅的な解析が行われ、その特徴が明らかとなった。細胞内リン酸化の解析は細胞内情報伝達機構の解明につながり非常に注目されている。

抗体の特異性を評価するためのプロテイン・マイクロアレイも報告されている。約5,000の酵母タンパク質をガラススライド上に載せ、その上に11種類のポリクローナルあるいはモノクローナル抗体を作用させ、抗体も交差反応性を調べるといった手段が用いられている。これは、抗体選別やデザインに有用な方法と考えられる。

また、酵素をマイクロアレイし、その阻害剤を探索する方法がFuneriuらにより報告されている¹⁷⁾。彼らは、TEMA (Thematic Enzyme microarray) という方法を開発して、化合物ライブラリーの中から阻害剤を定量的に評価することに成功した。

4 膜タンパク質マイクロアレイ

細胞膜上で重要な機能を担う膜タンパク質のマイクロアレイについてもいくつか報告がある。膜タンパク質は、分離が困難な上に、活性を維持するのも難しい。Fangら^{18,19)}やGroversとBoxer²⁰⁾は、側方拡散で脂質が混ざり合わないような「囲い」を作ることで、二分子膜を二次元上に維持でき、膜タンパク質を組み込むことができることを示している。このように細胞膜を忠実にチップ上に再現できるような系は、膜タンパク質の機能発現のために重要な手法と考えられる。

5 タンパク質ドメインマイクロアレイ

タンパク質全てではなく、タンパク質ドメインをマイクロアレイする例が報告されている。EspejoとBedford²¹⁾は、GSTと種々のタンパク質相互作用ドメインを融合し、ニトロセルロース膜被覆ガラススライドにマイクロアレイし、蛍光ラベル化ペプチドとの相互作用を調べ、予想通りの結合パターンを得た。翻訳後修飾の有無も判定できた。NewmanとKeating²²⁾は、タンパク質マイクロアレイを使って、ヒトのロイシンジッパー転写因子からの49種のコイルドコイル・ストランドの相互作用を調べた。強い相互作用は6%ほどで、いくつかこれまでに知られて

いなかった相互作用も発見された。

タンパク質によっては、細胞表面上に不均一に分布していたり、単一分子として存在していなかったり、不溶性であったりする場合があるため調製しにくいいため、必要となるタンパク質ドメインだけをマイクロアレイしてそのリガンドを探索する研究は活発に行われている^{23~26)}。

6 細胞破砕物マイクロアレイ (リバーズ・プロテイン・マイクロアレイ)

次節で述べる抗体マイクロアレイの逆、タンパク質を固定化してから抗体を作用させるリバーズ・プロテイン・マイクロアレイの研究が、細胞マーカーを調べるために行われている。具体的には、素性の異なる細胞破砕物をマイクロアレイし、この上に特定の抗体ごとに作用させるものである。西塚らは、640の細胞破砕物をマイクロアレイして特定のがん細胞のマーカーを同定することに成功した²⁷⁾。ZeptoSens社では、384の異なる細胞破砕物のタンパク質をアレイしたチップを開発している¹⁾。

7 抗体マイクロアレイ (第9章)

抗体マイクロアレイは臨床分析目的からプロテオーム分析用まで非常に広く研究されている^{1,28~33)}。いくつかの企業が抗体マイクロアレイを製品化している。代表的なところでは、Clonetech社が、500以上のモノクローナル抗体をマイクロアレイし、特異的なタンパク質をアッセイできるものとして最大である。これは、細胞質および膜タンパク質と広い範囲で検出でき、情報伝達系、細胞周期調節、遺伝子転写系、アポトーシス研究に用いることができる。分析は、DNAマイクロアレイのCGH解析と同様、2つのサンプルの比較として行われ、タンパク質量の多寡としてデータが得られる。Sigma-Aldrich社は224種の抗体をニトロセルロースで被覆したスライドガラス上に固定化し、細胞情報伝達測定用のPanoramaAbマイクロアレイキットを開発している。検出は、やはりDNAチップで行われているように、細胞や組織から抽出されたタンパク質に蛍光色素Cy3やCy5で標識し、2種類の標識タンパク質を混合してアレイにスポットして標準的な蛍光スキャナーを使って測定が行われる。その他、キナーゼ特異的抗体をスポットした「ヒトリン酸化MAPキナーゼ抗体アレイ」(R&D Systems社)なども市販されている。

マイクロアレイする抗体については、抗体分子全体でなく、抗原認識ドメインだけをマイクロアレイ固定化する取り組みが行われている³⁴⁾。検出法については、標識タンパク質を用いる方法以外に、信号を増幅させるのにローリングサークル増幅(RCA)法が研究されている。これは、

DNA プライマーを結合した抗体を用いて、環状一本鎖 DNA を鋳型にした DNA 鎖の増幅・伸長を行うもので、伸長された DNA 鎖上に蛍光標識された多数のオリゴ DNA 相補鎖をハイブリッド形成させ、蛍光色素をチップ上の微小スポットに集積するというものである。また、RCA 法と二色標識法の融合技術も報告されている^{1,3)}。

8 アプタマー・マイクロアレイ

アプタマーは、ラテン語の *aptus* (適合する) から派生した造語で、試験内進化法 (*in vitro* selection) あるいは Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment の下線部をとって SELEX と呼ばれる方法で作成される抗体と類似の分子認識機能をもつ核酸である^{35~40)}。コロラド大学の Gold と Tuerk, ハーバード大学の Szostak と Ellington によって 1990 年に独立に確立された。現在ではアプタマーを専門とする企業も世界に数社あり、診断薬、治療薬の開発を行っている³⁷⁾。Gold は、現在は Somalogic 社となる会社を興し、アプタマーを用いたタンパク質解析チップを提案している。彼らは特にフォトアプタマーと呼ばれるアプタマーを調製し、それらをマイクロアレイし、その上に血液やタンパク質溶液を接触させた後、Antibody-Linked Oligonucleotide Assay (ALONA), あるいはアプタマーには結合せず、タンパク質のリシン残基にだけ反応する染料でタンパク質だけを染める方法での検出を目論んでいる。多種類のアプタマーのアレイまでには至っていないが、4 種類や 17 種類のアナライトの検出のためのアプタマー・アレイが報告されている³⁸⁾。

アレイではないがアプタマーを用いたセンシングについては、DNA にインターカレートするルテニウム錯体の結合状態が、アプタマーがタンパク質を相互作用するか否かで変化することを利用した検出法や、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた検出法が提案されている¹⁾。最近では、電気化学的手法でのセンシングも報告されている³⁹⁾。まだ、決定的な方法とはなっていないものの、アプタマーは抗体とは違う特徴をいろいろ備えている¹⁾。今後大きく展開されるものと期待される。

9 低分子マイクロアレイ (第 10 章)

低分子化合物をアレイしたチップは、分析の手段ではなく、ケミカルバイオロジーの手法の一つ、あるいは医薬のハイ・スループット・スクリーニングのために研究されている^{3,41)}。チップ上で様々な有機化合物を合成し、その中から医薬として有望な化合物をスクリーニングしていく方法は、コンビナトリアル・ケミストリーとしても進展してきた¹⁾。酵素機能のプロファイリン

グにも用いられている⁴²⁾。最近では、この他にも有機化学的な側面からのマイクロアレイ研究は多くなされており、ケミカルゲノミクス（化学遺伝学）として世界で研究が行われるようになってきており、今後創薬の手段としての有用性が高まるものと期待される³⁾。

10 抗原マイクロアレイ

自己抗体を測定するための自己抗原マイクロアレイが Robinson ら⁴³⁾によって報告されている。8つの異なる自己免疫疾患に対応する 196 種類のタンパク質、ペプチド、その他の生体分子をポリリジン被覆ガラススライドに 1152 個マイクロアレイした。自己免疫疾患の患者の血清タンパク質を蛍光標識して、抗原認識パターンを調べたところ、自己抗体は、各々の疾患に正確に一致していた。また、既知の 15 種類の自己抗原をポリスチレン上に固定化して自己免疫疾患の診断を行えることは Feng らが報告している⁴⁴⁾。

さらに、このマイクロアレイを自己抗体のエピトープ・マッピングに使うことを考え、髄索プロテオームをマイクロアレイし、自己免疫脳脊髄炎の自己抗体のエピトープ解析も行われた⁴⁵⁾。未知の自己免疫疾患の解明にも繋がるのが期待される^{46~49)}。Lueking ら^{50,51)}はヒト・タンパク質マイクロアレイを使って自己免疫疾患血清の解析を行っている。サル HIV の 430 のペプチド・タンパク質のマイクロアレイを用いて、ワクチン接種に対する免疫応答が調べられ、生存率との関係が予測できる結果となった⁵²⁾。病原性微生物の抗原を固定化して血清中の抗体を測定する例は Mezzasoma ら⁵³⁾によって報告されている。脂質は自己免疫疾患などの自己抗原となることが知られており、抗原マイクロアレイとして脂質が固定化されている⁵⁴⁾。

また、環境や食物アレルギーをマイクロアレイした研究は、最近多く報告されている^{55~70)}。ただし、様々な抗原を同一の方法で固定化するのは困難で、例えば Fall ら⁶⁰⁾は、アレルギーによっては基板上に固定化できないものがあつたことを認めている。これに対し、我々は、光固定化法という新しい方法をマイクロアレイ製造に導入し、様々なアレルギーを固定化できることを報告している⁷¹⁾。

また、小分子のステロイド検出のために、ステロイド結合ウシ血清アルブミン（ハプテン結合複合体）をマイクロアレイした基板を用意し、その基板上での抗ステロイド抗体とステロイドの競争反応を利用した例が報告されている⁷²⁾。

11 ペプチド・マイクロアレイ（第 11 章）

ペプチド・マイクロアレイは前述のように Fodor らによって最初に実現されたものである

が、光マスクが高価であること、合成に時間がかかること、高レベルのクリーンルームが必要、などの問題があった。そこで、新しい固定化法がいくつか報告されている⁷³⁾。Pelloisら⁷⁴⁾は、デジタル光リソグラフィと脱保護時の光生成酸を用いることでペプチドの効率的で応用範囲の広いパラレル合成を報告している。

最近では ready-to-use の製品も多く出回るようになってきており、タンパク質キナーゼと基質との相互作用のようなタンパク質相互作用の検出用などに用いられるようになってきている。オランダの PepsScan Systems は、タンパク質キナーゼの同定とアッセイ用に 1,200 個のペプチドをアレイした PepChip を提供している。ドイツの Jerini Peptide Technologies は、20,000 個まで可能な PepStar ペプチドチップを提供するとともに、キナーゼ基質のリン酸化部位を同定するための PhosphoSite-Detector マイクロアレイキットも販売している。読み取り（検出）は、リン酸転移を放射性同位元素あるいはリン酸化チロシン特異的抗体で行う。Sigma の PEPscreen プラットホームはエピトープ、タンパク質-タンパク質相互作用あるいはタンパク質-リガンド相互作用のマッピングに使用されている。また、相互作用を表面プラズモン共鳴イメージングで測定する方法も報告されている⁷⁵⁾。

ペプチドの代わりにペプチド (N 置換グリシン) をマイクロアレイした研究が Reddy と Kodadek によって報告されている⁷⁶⁾。マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ユビキチンを使い、特異的な結合パターンを観察した。

12 糖鎖マイクロアレイ (第12章)

「第三の生体分子」といわれる糖鎖のマイクロアレイも最近数多く作成されるようになってきた。これまでに多糖、オリゴ糖、および単糖のマイクロアレイが報告されており、糖鎖ゲノミクスの分野での応用が行われている⁷⁷⁻⁸¹⁾。

13 レクチン・マイクロアレイ (第13章)

細菌の共生、病原性、細胞間相互作用、免疫侵入などで細菌表面の糖鎖は重要な役割を果たしている。しかし糖鎖の動的多様性のため、細菌グリカンの分析は困難であった。そこで、Mahalらは、糖タンパク質の分析用にレクチン・マイクロアレイを開発した⁸²⁾。これにより大腸菌の系統化ができ、細菌の指紋を容易に得られるようになった。加えて病原大腸菌の動的変化も迅速に観察可能になった。

14 細胞マイクロアレイ

生体分子をマイクロアレイして細胞を相互作用させるのではなく、細胞そのものをプローブとしてマイクロアレイして、生体分子との相互作用を調べるシステムがいくつか報告されている。Schwenkらは、株化細胞を化学固定化し、ポリリシン被覆スライドガラス上にマイクロアレイし、各種抗体との反応性を検討した⁸³⁾。一方、我々は血清中の抗体の有無を調べるためのパネル血球を化学固定化しマイクロアレイしたものを考案した⁸⁴⁾。輸血のための血液分析では、血球の血液型だけでなく、血清中の抗体の型が問題になる場合がある。このような抗体は不規則抗体と呼ばれ、通常はパネル血球との凝集反応で調べられるが、熟練を要する。パネル血球のマイクロアレイでは、その上への抗体の結合量を測ることで容易に定量的に判別できる特徴がある。

15 組織マイクロアレイ

プローブを固定化してターゲット分子を検出する通常のマイクロアレイとは異なるタイプの組織マイクロアレイも近年盛んに用いられるようになってきた^{85~89)}。1枚のスライドに数百の組織切片を載せることができ、全部の処理に1枚分わずかの液で染色でき、組織ライブラリーを1枚の組織マイクロアレイスライドにまとめることができるので、解析にかかる労力と試薬を節約できる特徴がある。腫瘍プロファイル、がん細胞の遺伝子増幅スクリーニング、cDNAアレイによるディファレンシャルエクスペクション、マーカーによる予測、抗体検査、FISH、IHC、mRNA ISH等に適していると考えられている。一つの組織内あるいは一種類の細胞に対して複数の解析を一度に行うことを目的とした Multiplex-immunostain chip (MIチップ)も開発されている⁸⁷⁾。特に最近では、固体試料の超高密度マイクロアレイの調製法も開発され、組織標本の標準化を含め注目される分野になってきている⁸⁹⁾。

16 対細胞（遺伝子制御）の DNA、siRNA マイクロアレイ（第14章第1節）

遺伝子の機能を評価するために様々なプラスミドDNAをマイクロアレイし、その上で細胞を培養して発現を観測する方法が開発された⁹⁰⁾。この方法は、DNAを溶解させた数nl程度のゼラチン水溶液をスライドガラス上にマイクロスポッティングして乾燥させ、そのスポットを遺伝子導入用のリポフェクション試薬で処理する。その上に接着依存性細胞を播種し、このスポット上で増殖した細胞に、各スポットのゼラチンに封入した各種プラスミドDNAを取り込ませて形質転換した細胞マイクロアレイを作成するものである。192種類の異なるcDNAを発現する細胞マ

マイクロアレイを用いて、形質点幹細胞の表現型の変化からチロシンキナーゼ情報伝達にかかわるタンパク質やアポトーシス、細胞接着に関与するタンパク質の cDNA が同定された。

このような方法は、リバーストランスフェクションという方法として知られるようになった。これは、導入したい核酸と細胞の播種の順番が異なることから名付けられた。通常のトランスフェクションでは、細胞播種してから核酸を加えるが、リバーストランスフェクションでは核酸を添加した後に細胞を播種する。リバーストランスフェクション法は、遺伝子導入デバイスの開発や同一の実験条件下でハイスループット解析ができる利点があり、様々な改良が加えられている。siRNA についてもマイクロアレイしてその上で細胞培養する手法が報告されている⁹¹⁻⁹⁴。なかでも、レンチウイルスのマイクロアレイは、Sabatini ら⁹³)によって報告されている。短いヘアピン RNA あるいは cDNA をコードするレンチウイルスをマイクロアレイした基板上で哺乳動物細胞を培養するもので、感染効率を高めたハイスループットスクリーニングが期待できる。

また通常、これらは接着依存性細胞の結果であるが、非接着性細胞を用いた試みも報告されている¹⁾。BSA コートしたスライドガラスをポリエチレングリコールオレイルエーテル-NHS で処理した基板上で、非接着依存性細胞を増殖可能な形で容易に固定化できることを見出した。そこで、インクジェットプリンターを用いてリポフェクション試薬とプラスミド DNA の混合液を、この基板上にマイクロスポットし、その上に非接着依存性細胞を固定化培養することで形質転換非接着依存性細胞マイクロアレイを作製することに成功した。遺伝子の代わりに、薬剤や抗原をスポットし、この上で肥満細胞を培養し、種々の抗アレルギー薬や、アレルギー物質のスクリーニングが行われている。

17 対細胞（表現型依存）の抗体、タンパク質、基材マイクロアレイ（第14章第2節，第3節）

上述の方法とは別に、細胞が細胞膜表面に表現しているタンパク質をもとに探索を行う目的のマイクロアレイも開発されている。抗体マイクロアレイ上で血球表面の抗原を、従来のフローサイトメトリー法を代替して、測定しようとする試みである⁹⁵。通常のフローサイトメトリーが最大6種類同時測定が可能であるのに対し、この場合、アレイした抗体の種類だけマルチ解析できる特徴がある。抗体マイクロアレイによる血液型同定についてもいくつか報告がある^{96,97}。

再生医工学や組織工学では、マトリックスとなる合成バイオマテリアルと細胞との相互作用が重要な役割を担っている。我々は、各種細胞診断や細胞のプロファイリングに利用できることを明らかにしてきている^{71,98}。その他、様々な生体高分子（タンパク質、抗体、ペプチド、多糖）、合成高分子をマイクロアレイして、その上で細胞の接着、増殖、分化を観察するものが報告され

ている⁹⁹⁻¹⁰⁵)。Langerらは、細胞に最適な遺伝子発現を誘起したり、細胞の接着性を制御するための生分解性バイオマテリアル探索のためにマイクロアレイを利用している^{106,107})。

18 おわりに

このように、DNAマイクロアレイから始まり、生体分子から細胞、組織まで様々なマイクロアレイが開発されるようになってきている。様々なものがマイクロアレイできるようになった今日、臨床応用のためには、具体的にマイクロアレイするコンテンツ(バイオマーカー)をどのように集めていくかが今後ますます重要になる。

文 献

- 1) 伊藤嘉浩,「バイオテクノロジー総覧」,日本能率協会総合研究所編,通産省資料出版会(2005)
- 2) 山本重夫監修,「バイオ解析・診断技術のテーラメイド医療への応用」,シーエムシー出版(2006)
- 3) 三原久和・小島英理・馬場嘉信編,「ナノバイオ計測の実際」,講談社(2007)
- 4) 軽部征夫監修,「バイオセンサ・ケミカルセンサ事典」,テクノシステム(2007)
- 5) 久原哲監修,「DNAチップ活用テクノロジーと応用」,シーエムシー出版(2007)
- 6) 関根光雄編,「新しいDNAチップの科学と応用」,講談社(2007)
- 7) A. Kozarova, S. Petrinac, A. Ali, J. W. Hudson, *J. Proteome Res.*, **5**, 1051-1059 (2006)
- 8) L. Bonetta, *Nat. Methods*, **3**, 571-577 (2006)
- 9) H.-J. Mueller, T. Roeder, *Microarrays*, Elsevier Academic Press (2006)
- 10) 稲澤譲治編,「新世代マイクロアレイ」,バイオテクノロジージャーナル,2007年5-6月号
- 11) D. M. Denkbar, E. D. Dawson, M. Mehlmann, C. L. Moore, J. M. Smagala, M. W. Shaw, N. J. Cox, R. D. Kuchta, K. I. Rowlen, *Anal. Chem.*, **79**, 2084-2090 (2007)
- 12) L. Sage, *Anal. Chem.*, 137 A-142 A (2004)
- 13) 横溝義男,原田最之,西村紀,「疾患プロテオミクスの最前線」,戸田年総,荒木令江編,メディカルドゥ(2005)
- 14) J. S. Albala, I. Humphery-Smith eds., "Protein Arrays, Biochips, and Proteomics," Marcel Dekker (2003)
- 15) M. Cretich, F. Damin, G. Pirri, M. Chiari, *Biomol. Eng.*, **23**, 77-88 (2006)
- 16) C.-S. Chen, H. Zhu, *BioTechniques*, **40**, 423-429 (2006)
- 17) D. P. Funeriu, J. Eppinger, L. Denizot, M. Miyake, J. Miyake, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 622-627 (2005)

- 18) Y. Fang, A. F. Frutos, B. Webb, Y. Hong, A. Ferrie, F. Lai, J. Lahiri, *BioTechniques*, **33**, S 62-S 65 (2002)
- 19) Y. Fang, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3158-3159 (2006)
- 20) J. T. Groves, S. G. Boxer, *Acc. Chem. Res.*, **35**, 149-157 (2002)
- 21) A. Espejo, M. T. Bedford, *Methods Mol. Biol.*, **264**, 173-181 (2004)
- 22) J. R. Newman, A. E. Keating, *Science*, **300**, 2097-2101 (2003)
- 23) S. H. Kim, A. Tamrazi, K. E. Carlson, J. R. Daniels, I. Y. Lee, J. A. Katzenellenbogen, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4754-4755 (2004)
- 24) M. A. Stiffler, V. P. Grantcharova, M. Sevecka, G. MacBeath, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5913-5922 (2006)
- 25) R. B. Jones, A. Gordus, J. A. Krall, G. MacBeath, *Nature*, **439**, 168-174 (2006)
- 26) A. Gordus, G. MacBeath, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13668-13669 (2006)
- 27) S. Nishizuka, L. Charboneau, L. Young, S. Major, W. C. Reinhold, M. Waltham, H. Kouos-Mehr, K. J. Bussey, J. K. Lee, V. Espina, P. J. Munson, E. Petricoin, III, L. A. Liotta, J. N. Weinstein, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **100**, 14229-14234 (2003)
- 28) D. Mattoon, G. Michaud, J. Merkel, B. Schweitzer, *Expert Rev. Proteomics*, **2**, 879-889 (2005)
- 29) S. A. Sieber, T. S. Mondala, S. R. Head, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15640-15641 (2004)
- 30) O. Andersson, M. Kozlowski, T. Garachtchenko, C. Nikoloff, N. Lew, D. J. Litman, G. Chaga, *J. Proteome Res.*, **4**, 758-767 (2005)
- 31) J. Ingvarsson, M. Lindstedt, C. A. K. Borrebaeck, C. Wingren, *J. Proteome Res.*, **5**, 170-176 (2005)
- 32) S. F. Kingsmore, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 310-320 (2006)
- 33) 伊藤嘉浩, 山辺敏雄, 「抗体エンジニアリングの最前線」, 植田充美監修, シーエムシー出版, p. 97-106 (2004)
- 34) C. Steinhauer, C. Wingren, A.-C. M. Hager, C. A. K. Borrebaeck, *Biotechniques*, **33**, S 38-S 45 (2002)
- 35) 伊藤嘉浩, 福崎英一郎, 「抗体エンジニアリングの最前線」, 植田充美監修, シーエムシー出版, p.115-122 (2004)
- 36) 和田章, 阿部洋, 伊藤嘉浩, 「抗体医薬の最前線」, 植田充美監修, シーエムシー出版, p. 213-225 (2007)
- 37) 河瀬博之, 「RNA と創薬」, 中村義一編, メディカルドゥ, p.71-77 (2006)
- 38) 池袋一典, 「バイオセンサ・ケミカルセンサ事典」, 軽部征夫監修, テクノシステム, p.253-258 (2007)
- 39) B. R. Baker, R. Y. Lai, M. S. Wood, E. H. Doctor, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3138-3139 (2006)
- 40) K. Stadtherr, H. Wolf, P. Lindner, *Anal. Chem.*, **77**, 3437-3443 (2005)
- 41) F. G. Kuruvilla, A. F. Shamji, S. M. Sternson, P. J. Hergenrother, S. L. Schreiber, *Nature*, **416**, 653-657 (2002)
- 42) Q. Zhu, M. Uttamchandani, D. Li, M. L. Lesaicherre, S. Q. Yao, *Org. Lett.*, **5**, 1257-1260 (2003)

- 43) W. H. Robinson, C. DiGennaro, W. Hueber, B. B. Haab, M. Kamachi, E. J. Dean, S. Fournel, D. Fong, M. C. Genovese, H. E. de Vegvar, K. Skriver, D. L. Hirschberg, R. I. Morris, S. Muller, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, J. S. Smolen, P. O. Brown, L. Steinman, P. J. Utz, *Nat. Med.*, **8**, 295-301 (2002)
- 44) Y. Feng, X. Ke, R. Ma, Y. Chen, G. Hu, F. Liu, *Clin. Chem.*, **50**, 416-422 (2004)
- 45) W. H. Robinson, P. Fontoura, B. J. Lee, H. E. de Vegvar, J. Tom, R. Pedotti, C. D. DiGennaro, D. J. Mitchell, D. Fong, P. P. Ho, P. J. Ruiz, E. Maverakis, D. B. Stevens, C. C. Bernard, R. Martin, V. K. Kuchroo, J. M. van Noort, C. P. Genain, S. Amor, T. Olsson, P. J. Utz, H. Garren, L. W. Steinman, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1033-1039 (2003)
- 46) C. G. Fathman, L. Soares, S. M. Chan, P. J. Utz, *Nature*, **345**, 605-611 (2005)
- 47) P. J. Utz, *Immunol. Rev.*, **204**, 264-282 (2005)
- 48) K. L. Graham, M. Vaysberg, A. Kuo, P. J. Utz, *Proteomics*, **6**, 5720-5724 (2006)
- 49) M. G. Kattah, G. R. Alemi, D. L. Thibault, I. Balboni, P. J. Utz, *Nat. Methods*, **3**, 745-751 (2006)
- 50) A. Lueking, A. Possling, O. Huber, A. Beveridge, M. Horn, H. Eickhoff, J. Schuchardt, H. Lehrach, D. J. Cahill, *Mol. Cell Proteomics*, **2**, 1342-1349 (2003)
- 51) A. Lueking, O. Huber, C. Wirths, K. Schulte, K. M. Stielner, U. Blume-Peytavi, A. Kowald, K. Hensel-Wiegel, R. Tauber, H. Lehrach, H. E. Mayer, D. J. Cahill, *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1382-1390 (2005)
- 52) H. E. Neuman de Vegvar, R. R. Amara, L. Steinman, P. J. Utz, H. L. Robinson, W. H. Robinson, *J. Virol.*, **77**, 11125-11138 (2003)
- 53) L. Mezzasoma, T. Bacarese-Hamilton, M. Di Cristina, R. Rossi, F. Bistoni, A. Crisanti, *Clin. Chem.*, **48**, 121-130 (2002)
- 54) J. L. Kanter, S. Narayana, P. P. Ho, I. Catz, K. G. Warren, R. A. Sobel, L. Steinman, W. H. Robinson, *Nat. Med.*, **12**, 138-143 (2006)
- 55) T. Bacarese-Hamilton, F. Bistoni, A. Crisanti, *BioTechniques*, **33**, S 24-S 29 (2002)
- 56) S. Whiltshire, S. O'Malley, J. Lambert, K. Kukanskis, D. Edgar, S. F. Kingsmore, B. Schweitzer, *Clin. Chem.*, **46**, 1990-1993 (2000)
- 57) T.-E. Kim, S.-K. Park, N.-Y. Cho, S.-Y. Choi, T.-S. Yong, B.-H. Nahm, S. Lee, G. Noh, *Exp. Mol. Med.*, **34**, 152-158 (2002)
- 58) R. Hiller, S. Laffer, C. Harwanegg, M. Huber, W. M. Schmidt, A. Twardosz, B. Barletta, W. M. Becker, K. Blaser, H. Breiteneder, M. Chapman, R. Cramer, M. Duchene, F. Ferreira, H. Fiebig, K. Hoffmann-Sommergruber, T. P. King, T. Kleber-Janke, V. P. Kurup, S. B. Lehrer, J. Lidholm, U. Muller, C. Pini, G. Reese, O. Scheiner, A. Scheynius, H. D. Shen, S. Spitzauer, R. Suck, I. Swoboda, W. Thomas, R. Tinghino, M. Van Hage-Hamsten, T. Virtanen, D. Kraft, M. W. Muller, R. Valenta, *FASEB J.*, **16**, 414-416 (2002)
- 59) B. I. Fall, B. Eberlein-Koenig, H. Behrendt, R. Niessner, J. Ring, M. G. Weller, *Anal. Chem.*, **75**, 556-562 (2003)
- 60) B. Jahn-Schmid, C. Harwanegg, R. Hiller, B. Bohle, C. Ebner, O. Scheiner, M. W. Mueller, *Clin. Exp. Allergy*, **33**, 1443-1449 (2003)
- 61) C. Harwanegg, S. Laffer, R. Hiller, M. W. Mueller, D. Kraft, S. Spitzauer, R. Valenta, *Clin. Exp.*

- Allergy*, **33**, 7–13 (2003)
- 62) J. Harris, D. E. Mason, J. Li, K. W. Burdick, B. J. Backes, T. chen, A. Shipway, G. Van Heeke, L. Gough, A. Ghaemmaghami, F. Shakib, F. debaene, N. Wissinger, *Chem. Biol.*, **11**, 1361–1372 (2004)
- 63) K. Deinhofer, H. Sevik, N. Balic, C. Harwanegg, R. Hiller, H. rumpold, M. W. Mueller, S. Spitzauer, *Methods*, **32**, 249–254 (2004)
- 64) C. Harwanegg, R. Hiller, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **4**, 539–548 (2004)
- 65) M. Benson, M. Olsson, M. Rudemo, G. Wennergren, L. O. Cargelt, *Clin. Exp. Allergy*, **34**, 1001–1006 (2004)
- 66) T. Bacarese-Hamilton, A. Ardizzoni, J. Gray, A. Crisanti, *Methods in Molecular Biology, Protein Arrays*, **264**, 271–284 (2004)
- 67) S. J. Lebrun, W. N. Petchpud, A. Hui, C. S. McLaughlin, *J. Immunol. Methods*, **300**, 24–31 (2005)
- 68) S. Woehrl, K. Vigl, S. Zehetmayer, R. Hiller, R. Jarisch, M. Prinz, G. Stingl, T. Kopp, *Allergy*, **61**, 633–639 (2006)
- 69) N. K. Renault, L. Mirotti, M. J. C. Alcocer, *Biotechnol. Lett.*, **29**, 333–339 (2007)
- 70) H. Ott, C. M. Schroeder, S. Stanzel, H.-F. Merk, J. M. Baron, *Allergy*, **61**, 1146–1152 (2006)
- 71) Y. Ito, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 924–932 (2006)
- 72) H. Du, Y. Lu, W. Yang, M. Wu, J. Wang, S. Zhao, M. Pan, J. Cheng, *Anal. Chem.*, **76**, 6166–6171 (2004)
- 73) B. T. Houseman, J. H. Huh, S. J. Kron, M. Mrksich, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 270–274 (2002)
- 74) J. P. Pellois, X. Zhou, O. Srivannavit, T. Zhou, E. Gulari, X. Gao, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 922–926 (2002)
- 75) K. Inamori, M. Kyo, Y. Nishiya, Y. Inoue, T. Sonoda, E. Kinoshita, T. Koike, Y. Katayama, *Anal. Chem.*, **77**, 3979–3985 (2005)
- 76) M. M. Reddy, T. Kodadek, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **102**, 12672–12677 (2005)
- 77) 久野敦, 内山昇, 平林淳, 「バイオチップの最新技術と応用」, 松永是監修, シーエムシー出版, p.161–167 (2004)
- 78) T. Feizi, F. Fazio, W. Chai, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 637–645 (2003)
- 79) 佐藤智典, 「ナノバイオ計測の基礎」, 三原久和, 小島英理, 馬場嘉信編, 講談社, p.42–51 (2007)
- 80) S. E. Tully, M. Rawat, L. C. Hsieh-Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7740–7741 (2006)
- 81) J. L. de Paz, C. Not, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2766–2767 (2006)
- 82) K.-L. Hsu, K. T. Pilobello, L. L. Mahal, *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 153–157 (2006)
- 83) J. M. Schwenk, D. Stoll, M. F. Templin, T. O. Joos, *Bio Techniques*, **33**, S 54–S 61 (2002)
- 84) Y. Ito, T. Yamauchi, M. Uchikawa, Y. Ishikawa, *Biomaterials*, **27**, 2502–2506 (2006)
- 85) 小賀厚徳, バイオベンチャー, **4**, 18–21 (2004)
- 86) 古屋智子, 池本健三, 河内茂人, 佐々木功典, バイオベンチャー, **4**, 31–34 (2004)
- 87) D. L. Rimm, *Nat. Methods*, **2**, 492–493 (2005)
- 88) M. J. LeBaron, H. R. Crismon, F. E. Utama, L. M. Neilson, A. S. Sultan, K. J. Johnson, E. C. Andersson, H. Rui, *Nat. Methods*, **2**, 511–513 (2005)

- 89) N. Blow, *Nature*, **448**, 959–964 (2007)
- 90) J. Ziauddin, D. M. Sabatini, *Nature*, **411**, 107–110 (2001)
- 91) 三宅正人, 吉川智啓, 「遺伝子医学 Mook 5」, 原島秀吉, 田畑泰彦編, p.135–140 (2006)
- 92) M. Isalan, M. I. Santori, C. Gonzalez, L. Serrano, *Nat. Methods*, **2**, 113–118 (2005)
- 93) S. N. Bailey, S. M. Ali, A. E. Carpenter, C. O. Higgins, D. M. Sabatini, *Nat. Methods*, **3**, 117–122 (2006)
- 94) E. Uchiyama, S. Yamada, T. Nomura, K. Matsumoto, S. Fujita, M. Miyake, J. Miyake, *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 152–155 (2007)
- 95) L. Belov, O. de la Vega, C. G. Remedios, S. P. Mulligan, R. I. Christopherson, *Cancer Res.*, **61**, 4483–4489 (2001)
- 96) C. X. Zhang, H. P. Liu, Z. M. Tang, N. Y. He, Z. H. Lu, *Electrophoresis*, **24**, 3279–3283 (2003)
- 97) C. J. Campbell, N. O’Looney, M. C. Kwan, J. S. Robb, A. J. Ross, J. S. Beattie, J. Petrik, P. Ghazal, *Anal. Chem.*, **78**, 1930–1938 (2006)
- 98) Y. Ito, M. Nogawa, *Biomaterials*, **24**, 3021–3026 (2003)
- 99) I. K. Ko, K. Kato, H. Iwata, *Biomaterials*, **26**, 4882–4891 (2005)
- 100) K. Kato, M. Toda, H. Iwata, *Biomaterials*, **28**, 189–1297 (2007)
- 101) R. Kato, C. Kaga, M. Kunimatsu, T. Kobayashi, H. Honda, *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 485–495 (2006)
- 102) M. Veiseh, O. Veiseh, M. C. Martin, F. Asphaphani, M. Zhang, *Langmuir*, **23**, 4472–4479 (2007)
- 103) X. Qian, S. J. Metallo, I. S. Choi, H. Wu, M. N. Liang, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.*, **74**, 1805–1810 (2002)
- 104) L. Nimrichter, A. Gargir, M. Gortler, R. T. Altstock, A. Shtevi, O. Weisshaus, E. Fire, N. Dotan, R. L. Schnaar, *Glycobiology*, **14**, 197–203 (2004)
- 105) C. Kuschel, H. Steuer, A. N. Maurer, B. Kanzok, R. Stoop, B. Angres, *BioTechniques*, **40**, 523–531 (2006)
- 106) D. G. Anderson, S. Levenberg, R. Langer, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 863–868 (2004)
- 107) D. G. Anderson, D. Putnam, F. B. Lavik, T. A. Mahmood, R. Langer, *Biomaterials*, **26**, 4892–4897 (2005)

第19章 アプタマー医薬

和田 章^{*1}, 阿部 洋^{*2}, 伊藤嘉浩^{*3}

1 はじめに

アプタマー (aptamer) はラテン語 aptus (英語で fix を表す) に由来して提唱された造語である。当初は, 1990年に, Goldら¹⁾やSzostackら²⁾により相次いで報告された分子認識性核酸を, 従来の抗体 (antibody) と区別するために用いられていた。現在ではアミノ酸からなるペプチドもアプタマーとしてつくられるようになった。本章では, 核酸アプタマーとペプチドアプタマーの医薬応用についての現状を概観した後, その獲得法や新しい機能化法までを解説する。

2 アプタマーの特徴と医薬応用

標的分子に対して特異的に結合するアプタマーは, 試験管内においてテイラーメイドかつ迅速に創製できることから, タンパク質・抗体に代わる機能性生体分子としての利用が期待されている。特に, 医薬・診断薬・試薬としてのアプタマーの開発は世界中で展開されている。以下に, アプタマー医薬の利点を挙げる³⁾。

- (1) オリゴ核酸・ペプチドともに比較的 low molecular weight であり, 容易に化学合成が可能である。
- (2) テイラーメイドアプタマー獲得のためのオートメーション化が可能である。
- (3) 生体内での安定性獲得のため, 非天然核酸や非天然アミノ酸の導入からポリエチレングリコール修飾まで, 様々な化学修飾が安価に行える。
- (4) 抗原性が低く, 免疫拒絶反応を起こしにくい。
- (5) 低分子量であるため, 生体透過性に優れている。

近年, 世界初の核酸アプタマー医薬である Macugen (米国 Eyetech 社) が FDA に認可され, 2007年時点で加齢黄斑変性症治療薬としての試験治療 (フェーズ IV) が行われている⁴⁾。Macugen は, VEGF₁₆₅ を標的としたわずか 27 残基の RNA で構成されており, 様々な化学修飾に

* 1 Akira Wada (獨理化学研究所 中央研究所 伊藤ナノ医工学研究室 研究員)

* 2 Hiroshi Abe (獨理化学研究所 中央研究所 伊藤ナノ医工学研究室 研究員)

* 3 Yoshihiro Ito (獨理化学研究所 中央研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員)

抗体医薬の最前線

表1 アプタマー医薬の例

核酸アプタマー	標的蛋白質	適応症	開発会社	治験段階
Macugen	VEGF	加齢黄斑変性症	Eyetech	FDA承認
AS1411	Nucleolin	癌	Antisoma	フェーズ I/II
REG1	FIX	血栓	Regado Biosciences	フェーズ I
ARC183	Thrombin	血栓	Archemix	フェーズ I
NU172	Thrombin	血栓	Nuvelo/Archemix	治療前

よる体内動態特性の改善が図られている。その他にも、表1に示すように、ヌクレオリンに対するアプタマーであるAS1411が、抗ガン治療薬としてフェーズIIの段階にある。また、FIXに対するアプタマーであるREG1及び、トロンビンに対するアプタマーであるARC183は、抗血液凝固剤としてフェーズIの段階にある⁵⁾。

このように核酸アプタマーは治療薬としてすでに医療展開が行われているが、ペプチドアプタマーについては、これからの医薬化が検討され始めている。最初に、ペプチドアプタマーの医薬としての可能性を示した研究としては、細胞増殖を調節するサイクリン依存性キナーゼCdK2に対するペプチドアプタマーの開発が挙げられる⁶⁾。Colasらは、そのペプチドアプタマーが、細胞内のCdK2に結合 ($K_d = 30 \sim 120 \text{ nM}$) することにより、ヒストンH1のリン酸化を阻害することを明らかにした。さらに、そのペプチドの効果により、細胞周期のG1期からS期への移行を遅延させることも見出した。これにより、進行性腫瘍細胞の過剰増殖を抑制する医薬として、ヒトサイクリン依存性キナーゼファミリーを標的とするペプチドアプタマーの有用性が示された。

Kunzらは、抗体医薬の標的抗原として選定されているErbB2受容体の細胞内ドメインに結合することで、下流のリン酸化シグナル伝達を阻害するペプチドアプタマーを開発した⁷⁾。このペプチドアプタマーは、ウイルスベクターにより細胞内で発現させる (図1A)、もしくは細胞透過性ポリアルギニンとの融合により細胞内へ導入することで (図1B)、ErbB2受容体のヘテロ二量化によるAKTキナーゼの活性化を強く抑制することが明らかとなった。その結果、ガン細胞の生存力は減衰すると共に、薬剤に対する感受性が改善され、タキソール (パクリタキセル) 投与によるアポトーシス (細胞死) の誘導が可能となった (図1C)。この成果は、ペプチドアプタマーと従来の抗ガン剤との同時併用の可能性を示し、ガン医療における新たなカクテル療法の開発を啓発するものとなった。

続いてNegel-Wolfrumらは、Stat3のDNA結合ドメインに結合するペプチドアプタマーを開発した⁸⁾。このペプチドを細胞透過性ポリアルギニンと融合させ、ヒト骨髄腫細胞に添加したと

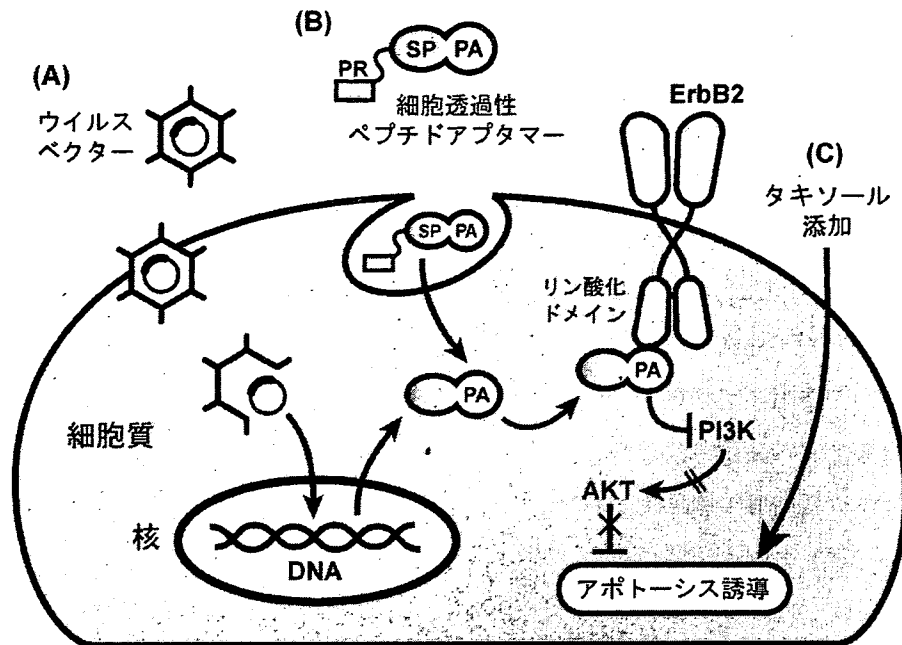


図1 抗ガン剤ペプチドアプタマーの作用機構

(A) ウイルスベクターによるペプチドアプタマー遺伝子の導入と発現；(B) 細胞透過性ポリアルギニン (PR) と足場タンパク質 (SP) を融合した安定化ペプチドアプタマー (PA) の細胞内導入と機能発現；(C) ペプチドアプタマー効果と抗がん剤タキソールによるアポトーシス誘導

ころ、ペプチドの自動的な細胞内進入と共に、Stat 3 への特異的結合による転写阻害が観測された。そして、最終的には細胞のアポトーシスまでも引き起こすことが明らかとなった。特に、このStat 3 の過剰発現による恒常的な活性化は、骨髄腫や悪性黒色腫（メラノーマ）などの典型的な進行ガンの進展・増大に関与することが知られており、新たな抗ガン性ペプチドの誕生が期待されている。また、転写抑制因子BCL 6 は、非ホジキスリンパ腫に代表される血液ガンの腫瘍遺伝子として働いていることが明らかとなり、創薬の新たな標的分子として注目を集めている。PoloやChattopadhyayらは、BCL 6 のN末端近傍のBTB/POZドメインに結合するペプチドインヒビター及び、ペプチドアプタマーを開発した^{9,10}。これらのペプチドは、BCL 6 と転写コリプレッサーSMRT等との相互作用を抑制することで、アポトーシスや細胞周期停止を誘導する機能を発揮した。これらは、将来の血液系ガン治療における新たなペプチド医薬として改良・応用されることが期待されている。

現在、上記の他にも、Bcl-2ファミリーに属する抗アポトーシスタンパク質¹¹・感染性ウイルスのコアタンパク質¹²・ヒト病原菌の毒性因子¹³を標的とする新規ペプチドアプタマーの開発が続々と報告されている。これらは、ペプチドアプタマーがガン治療薬として有用であるだけでなく、抗ウイルス剤・抗菌剤としても応用可能であることを示している。

3 アプタマー獲得法

3.1 核酸アプタマー

核酸アプタマーは、図2に示すような試験管内進化法（Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichmentの大文字部をとってSELEX）により獲得することができる（核酸はRNAもしくはDNA）。まず、ランダム配列のオリゴ核酸ライブラリーから出発し、アフィニティーカラムによる選別を経て、目的の核酸アプタマーが選択される¹⁾。これらの「オリゴ核酸ライブラリー」→「アフィニティー選別」→「PCR増幅」の各過程を「突然変異」→「自然淘汰」→「増殖」に模して試験管内進化と呼ばれる。現在までに、様々なタンパク質や低分子を標的とするアプタマーが得られており、どのような標的分子に結合するアプタマーが報告されているかをデータベース化しているホームページがEllingtonのグループによって作成されている (<http://aptamer.icbm.utexas.edu/>)。

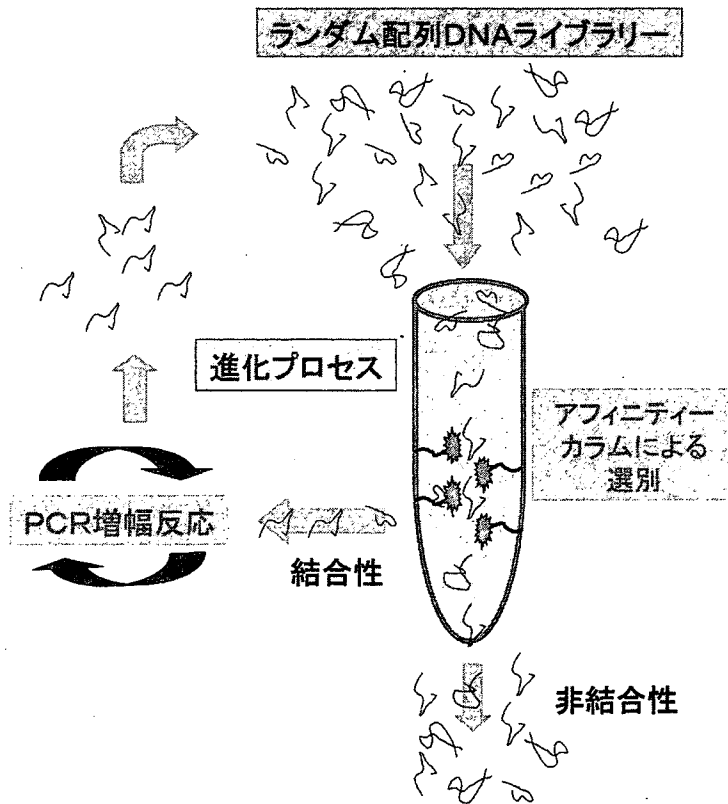


図2 核酸アプタマー獲得法

一本鎖DNAライブラリーあるいはRNAライブラリーを構築し、アフィニティー（標的親和性）を有する核酸（DNA/RNA）を選別・溶出する。さらに、得られた核酸アプタマー候補は、逆転写反応/PCR等により増幅した後、再び一本鎖DNAあるいはRNAとして選別操作に利用する。そして、これらのサイクルを繰り返すことで、目的の核酸アプタマーを獲得する。

これまでは、標的であるタンパク質をカラム上に固定化したアフィニティーカラムによりアプタマーを選別する方法が一般的であった。これに対し、Smithらは、タンパク質と結合する核酸のみを、電気泳動（ゲルシフトアッセイ）により分離し、ヒト neutrophil elastase に対する RNA アプタマーを獲得することに成功した¹⁴⁾。この方法は、タンパク質をカラムに固定化することなく簡便に行える点が画期的である。さらに、免疫沈降法を用いた選別法も報告されている。Pollock及び、Tresimanらは、Hepatitis B Virus (HBV) の表層タンパク質に結合する RNA アプタマーを選別する際、HBV に対する抗体を用いて免疫沈降させ、それらタンパク質に結合する RNA 配列のみを選択している¹⁵⁾。また、遠心分離でタンパク質-核酸アプタマー複合体を分離する方法も考案され、狂牛病原因タンパク質であるプリオンに対する RNA アプタマーの獲得が報告されている。ここでは、タンパク質と RNA の複合体は、25,000 x g における 1 時間の遠心分離で沈降し、洗浄・遠心操作を繰り返すことにより、標的結合性 RNA 候補を回収する。そして、PCR 増幅を行うサイクルを 7 回繰り返した結果、~20nM の解離定数をもつ RNA アプタマーが獲得された¹⁶⁾。

SELEX 法のプロトコールは、比較的単純な操作の繰り返しであることから、そのプロセスを自動化した装置の開発も報告されている。2001年、Ellingtonらは、初のアプタマー自動合成機を報告した。この装置は、タンパク質リガンドを固定化した磁気ビーズによる選別と RT-PCR による増幅の過程を繰り返し、12回サイクルを僅か 2 日間で終えることができる。彼らは、この装置を用いて抗リゾチームアプタマーを獲得している¹⁷⁾。

最近、標的タンパク質を特に定めるのではなく、標的細胞種の細胞表面に特異的に結合する核酸アプタマーを選別する Cell-SELEX 法が報告された¹⁸⁾。Schluesenerらは、Cell-SELEX 法を用いて YPEN-1 血管内皮細胞に特異的に結合する DNA アプタマーを獲得している。この実験では、蛍光標識された DNA ライブラリーと YPEN-1 の混合溶液から、蛍光シグナルを有する細胞のみを分離・分取した後、細胞に結合している蛍光標識 DNA 配列を抽出し、PCR 等により増幅する。さらに、非特異的に結合するアプタマー配列を除去するため、N9 microglial 細胞に対するネガティブセレクションも行う。そして、これらのサイクルを繰り返した結果、YPEN-1 に対して特異的に結合するアプタマーを獲得した。また、同様の方法により、抗ガン作用が期待される白血病細胞を認識する DNA アプタマーも得られており、Cell-SELEX 法の医薬品開発への応用が期待されている¹⁹⁾。

近年、発展が著しい高感度分析機器を利用したアプタマー獲得法も報告されている。一般的な試験管内進化法では、アフィニティーカラム選択あるいはメンブレン濾過などを用いて、核酸配列を選別し、PCR を用いて増幅するサイクルを利用する。しかし、その操作工程における正確な結合活性をモニターすることは困難であった。しかし、表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を用

いた選別法では、リアルタイムで正確な結合活性を測定し、結合機能の高い配列のみを優先的に選択することができる。これによりMisono及びKumarらは、ヒトインフルエンザウイルスのヘマグルチニンに対するRNAアプタマーを獲得することに成功している²⁰⁾。さらに、キャピラリー電気泳動(CE)を用いたSELEX法(CE-SELEX法; capillary electrophoresis SELEX)も報告されている。通常のSELEX法では、約10回以上のサイクルを必要とするが、CE-SELEX法では約4~6回ほどの少ないサイクルで目的のアプタマーが獲得できる。つまり、キャピラリー電気泳動装置の特徴である迅速な分析・微量サンプルでの高い解析能は、SELEX法において最適であるといえる。Bowserらは、この手法を用いて、IgE抗体やNeuropeptide Y (NPY) に対するDNAアプタマーの獲得を報告している^{21, 22)}。

現在、SELEX法に必要とされる操作やPCR増幅を用いないアプタマー獲得法(Non-SELEX法)も、キャピラリー電気泳動を基盤として開発されている²³⁾。このNon-SELEX法では、核酸ライブラリーとタンパク質の溶液から、核酸-タンパク質複合体を形成しているピークのみをCEにより分取する。そして、得られた画分をPCR増幅することなく、再びCEによる分離・分取を繰り返すことで、結合性の高い核酸配列を選択することができる。Kyrlovらは、この方法を利用して、僅か3回のCE分離により、h-rasタンパク質に対するDNAアプタマーを獲得している。

3.2 ペプチドアプタマー

ペプチドアプタマーは、これまで主にYeast two-hybrid system^{24, 25)}・ファージディスプレイ法^{26~28)}などに代表される*in vitro*セレクション法²⁹⁾で獲得されてきた(図3)。これらの手法は、従来の免疫動物を利用した抗体作製法とは異なり、短時間かつ低コストで目的のペプチドアプタマーを獲得することができる。それゆえ、ペプチドアプタマーを抗体医薬代替品として開発する研究が新たに展開されるようになった^{27, 28, 30)}。

これまでのペプチドアプタマー開発に汎用されてきた*in vitro*セレクション法は、酵母や大腸菌などの生細胞を利用することが必須の条件であった(図3)。この場合、たとえ目的のペプチドアプタマーがライブラリー内に存在していても、生細胞に対して毒性を示すようなペプチド配列であれば、自ずと排除されてしまう。また、細胞の生活環を利用するということは、ペプチドライブラリーサイズの制限(~10⁹)、培養・感染時間の確保、偽陽性の高頻度検出等を考慮しなくてはならない。そこで近年、従来のセレクション法の問題点を改善したバイオ技術^{29, 31)}として、リボソームディスプレイ法^{32, 33)}やmRNAディスプレイ^{34, 35)}(*in vitro virus*³⁶⁾)法が次々と開発された(図4)。これらはいずれも、無細胞転写&タンパク質翻訳系を用いたペプチドライブラリーの調整及び、ペプチドとその配列情報をコードするmRNAを連結した対応付け分子を利用することで、従来法の問題点を解決している。つまり、試験管において表現型(ペプチド)と

遺伝子型 (mRNA) を併せ持つ人工分子を構築する点に特徴がある。

リボソームディスプレイ法^{32,33)}の場合 (図4A), 対応付け分子として「ペプチド-リボソーム-mRNA複合体」を利用する。ここでは, ランダムペプチドをコードするmRNAの終止コドン
を除去することで, 解離因子の結合に伴うリボソームの遊離を抑制する。その結果, 翻訳の役目
を終えたりリボソームはmRNA上に留まり, ペプチドとmRNAをつなぎとめることで, 目的の複
合体が形成される。一方, mRNAディスプレイ^{34,35)} (*in vitro* virus³⁶⁾) 法 (図4B) で用いる対応
付け分子は, 「ペプチド-ピューロマイシン-mRNA複合体」である。ここでは, ランダムペプチ

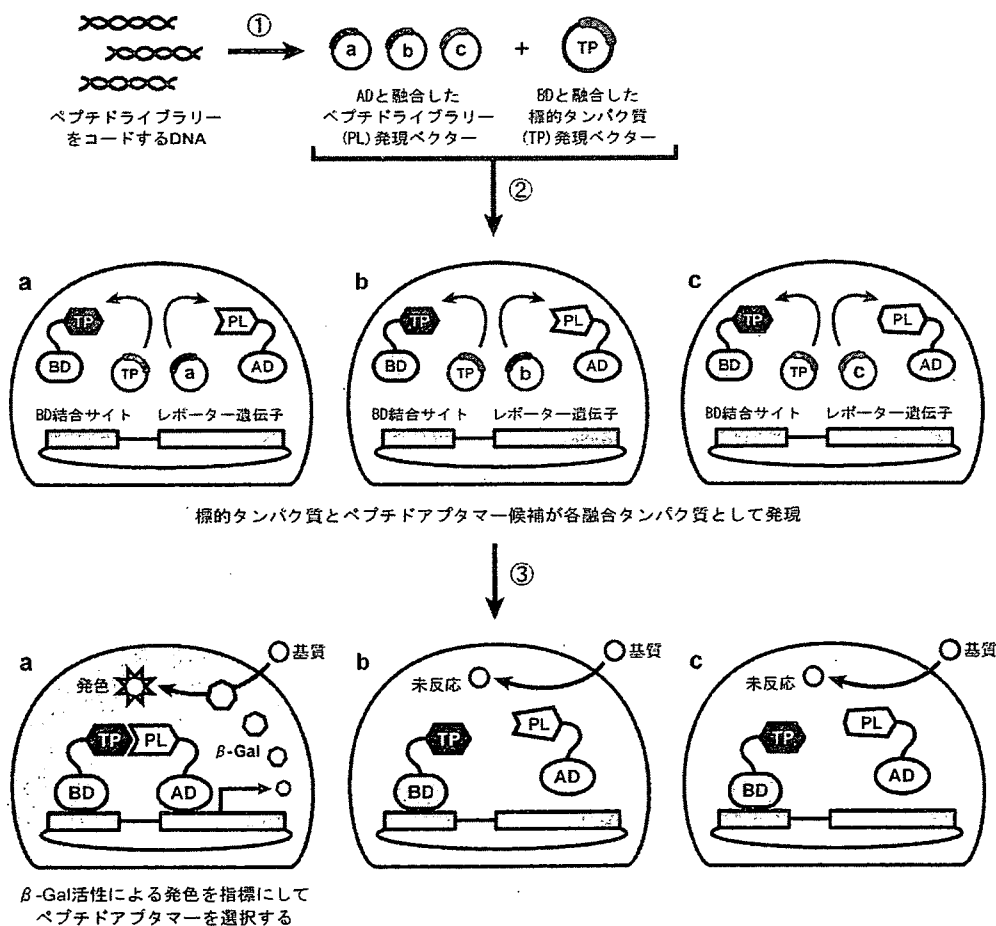


図3-1 Yeast two hybrid systemによるペプチドアプタマー獲得法

① ペプチドライブラリー (PL) をコードするDNAを化学的に合成し, そのPLが転写活性ドメイン (AD) と融合して発現するベクターを構築する。② このペプチドライブラリー-発現ベクター及び, 標的タンパク質 (TP) をレポーター遺伝子に結合するドメイン (BD) と融合して発現するベクターを, レポーター (LacZ) 遺伝子をもつ酵母細胞に共導入する。③ 標的タンパク質と特異的に結合するペプチドアプタマーが存在する細胞では, BDとADが接近することにより転写が促進され, レポーター (LacZ) 遺伝子が発現する (この場合aのみ)。それゆえ, β-ガラクトシダーゼ (β-Gal) 活性により発色した細胞を選択することで, 目的のペプチドアプタマーを同定・獲得する。