

20111015B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ヒトソマトスタチン受容体を標的とする
RNAアプタマーの創製とその応用による
新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発

(H21-ナノ-若手-013)

平成21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 藤原 俊伸

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

ヒトソマトスタチン受容体を標的とする
RNAアプタマーの創製とその応用による
新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発

(H21-ナノ-若手-013)

平成21年度～平成23年度 総合研究報告書

研究代表者 藤原 俊伸

平成24(2012)年 5月

目 次

I.	総合研究報告	
	ヒトソマトスタチン受容体を標的とする RNA アプタマーの創製と その応用による新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発	1
	藤原 俊伸 (公益財団法人 微生物化学研究会・微生物化学研究所・主席研究員)	
II.	分担研究報告	
	1. GPCR 結合性および作動性 RNA アプタマースクリーニングの ための新規レポーターアッセイ系の開発	19
	近藤 昭彦 (神戸大学大学院工学研究科・教授)	
	2. 原子間力顕微鏡(AFM)を用いたアプタマー作成系の構築	25
	荻野 千秋 (神戸大学大学院工学研究科・准教授)	
	3. 蛍光蛋白質を利用した、受容体の発現量・局在性・ シグナル伝達能評価系の確立	27
	田中 勉 (神戸大学自然科学系先端融合研究環・助教)	
	4. 糖部開環型三環性ヌクレオシドアナログを導入した 蛍光性核酸プローブによる一塩基多型の検出	33
	上野 義仁 (岐阜大学大学院工学研究科・准教授)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV.	研究成果の刊行物・別刷	

ヒトソマトスタチン受容体を標的とするRNAアプタマーの創製と その応用による新規腫瘍診断薬および抗腫瘍薬の開発

研究代表者：藤原 俊伸 （公財）微生物化学研究会・微生物化学研究所・主席研究員

研究要旨

ソマトスタチン（SST）は内因性の環状ペプチドであり、様々な組織の細胞表面に発現しているソマトスタチン受容体（SSTR）と結合し、生理活性を発揮する。SSTRはG蛋白質共役型受容体（GPCR）であり、これまでに5つのサブタイプが同定され、それぞれ組織特異的な発現がみられる。そして、内分泌腫瘍の殆どがSSTRを高密度に発現しており、SSTRの高発現に基づいて、腫瘍の診断や治療が可能である。これまでに、RI標識したSSTおよびSSTアナログを用いたSSTRを標的とする腫瘍イメージングが行われている。また、抗腫瘍作用を有するSSTアナログの開発も盛んに行われている。しかしながら、従来の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面のSSTRのみならず、正常細胞に発現しているSSTRとも交差反応するために、診断精度・治療上の安全性に問題が指摘されている。そのため、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。我々は、酵母を用いてヒトSSTRからのリガンド刺激を検出・スクリーニング可能な系を開発してきた。そして、出芽酵母にヒトSSTRを発現させ、酵母内在性G蛋白質を介してのアゴニスト活性を、GFP蛍光を利用して解析可能な系の構築に成功した。この系では、SSTRの作動性を、フローサイトメーターを活用して簡便かつ定量的に評価できる。また、酵母を用いるため、大規模かつ迅速なリガンドスクリーニングが可能である。そこで、このスクリーニング系を応用し、SSTRの各サブタイプと特異的に結合できる、また特異的に作動させる人工リガンドをRNAという高分子マテリアルを利用し、創製する。

A. 研究目的

内分泌腫瘍の診断には、そのソマトスタチン受容体 (SSTR) 高発現性にに基づき、RI 標識したソマトスタチン (SST) および SST アナログを用いた SSTR を標的とする腫瘍イメージングが有効である。さらに、抗腫瘍作用を有する SST アナログの開発も進んでいる。しかしながら、既存の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面の SSTR のみならず、正常細胞に発現している SSTR と交差反応する。さらに、SSTR には SST に対してほぼ同様の親和性を有するサブタイプが 5 つ存在する。そのため、診断精度・治療上の安全性に問題が指摘されて、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。我々はこれまでに、酵母を用いてヒト G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) からのリガンド刺激を検出・スクリーニング可能な系を開発してきた (Ishii et al., 2008)。ヒト GPCR の中でも SSTR は、酵母において機能的に発現し、リガンドである SST 刺激に应答して酵母内シグナル伝達経路が作動する (MCB., 1995, Yeast 2000)。そして、我々は出芽酵母にヒトの SSTR を発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性を、GFP 蛍光を利用して解析可能な系の構築に成功している。この系では、SSTR の作動性を、フローサイトメーターを活用して簡便かつ定量的に評価できる。そこで、本研究では、内分泌腫瘍の診断および治療薬のリード化合物として、SSTR 作動性 RNA アプタマーの創製を試みる。

本研究計画で最重要であるのは各 SSTR サブユニットを標的とした RNA アプタマーの創製である。既に酵母を用いた SSTR リガンド大規模スクリーニング系を有していること、そして代表者が RNA 工学を専門とすることから速やかに創製可能と考えており、既に予備実験も開始している。一方、我々の研究チームは蛍光性のヌクレオシドアナログを導入することにより RNA を光らせる技術 (特願 2008-061751 号) および修飾塩基を利用した RNA アプタマーの無菌的製造ラインを有している。そこで、本研究計画での達成目標は、①創製した RNA アプタマーをそれ自身が発光する蛍光性 RNA アプタマーへと変換し、次世代診断薬を開発すること、②作動性 RNA アプタマー自身あるいはその構造に基づく新規抗腫瘍薬の開発である。

RNA アプタマーは、RNA 結合部位を持たない標的や細胞表面受容体に対して創製可能であり (Ishii et al., 2008)、抗体を凌ぐ強い結合力と特異性を併せ持つものもこれまでに創製されている。これは RNA が立体構造を形成して機能しうること、そして標的物質の表面構造を広範囲に認識することが可能であるためである。このことは、リガンドに対して同じ親和性を有する SSTR の各サブタイプそれぞれに特異的に結合する RNA アプタマーが創製可能であるということの意味する。本研究では、① RNA を光らせる技術を利用し、サブタイプ特異的結合 RNA アプタマーを内分泌腫瘍の診断薬として利用

する。一方で、これまでの RNA アプタマーの創製は、上記のように標的に対する結合性で選択され、その後機能を評価するという手順が取られていた。従って、結合性と機能性が必ずしも一致するとは限らない。我々が開発した SSTR 作動性の評価・スクリーニング系では、② RNA アプタマーを、結合性かつ作動性を基盤に選択、創製することが可能であり、RNA アプタマーを創製する行程として他に例をみない。作動性で選択された RNA アプタマーはそれ自身を修飾すること、またはその構造を解析することによる新規化合物のスクリーニングにより抗腫瘍薬開発に応用する。技術的制約がある高等真核細胞を用いるのではなく、酵母を利用することにより、大規模なスクリーニングが可能であることが本研究の特色であり利点である。酵母そのものを用いた SELEX 法は有効ではないが、得られる RNA アプタマーの評価を行う上では非常に強力なツールである。(図 1)

B. 研究方法

H21 年度では、微量リガンド検出系の構築および酵母を用いた RNA アプタマー創製系の構築を目指して以下の点に関して研究を進めた。

・微量リガンド検出系の構築

ソマトスタチン (SST) は内因性の環状ペプチドであり、様々な組織の細胞表面に発現しているソマトスタチン受容体

(SSTR) と結合し、生理活性を発揮する。SSTR は G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) であり、これまでに 5 つのサブタイプが同定され、それぞれ組織特異的な発現がみられる。そして、内分泌腫瘍の殆どが SSTR を高密度に発現しており、SSTR の高発現に基づいて、腫瘍の診断や治療が可能である。これまでに、RI 標識した SST および SST アナログを用いた SSTR を標的とする腫瘍イメージングが行われている。また、抗腫瘍作用を有する SST アナログの開発も盛んに行われている。しかしながら、従来の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面の SSTR のみならず、正常細胞に発現している SSTR とも交差反応するために、診断精度・治療上の安全性に問題が指摘されている。そのため、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。我々は、酵母を用いてヒト SSTR からのリガンド刺激を検出・スクリーニング可能な系を開発してきた。そして、出芽酵母にヒト SSTR を発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性を、GFP 蛍光を利用して解析可能な系の構築に成功した (図 2)。この系では、SSTR の作動性を、フローサイトメーターを活用して簡便かつ定量的に評価できる。また、酵母を用いるため、大規模かつ迅速なリガンドスクリーニングが可能である。そこで、このスクリーニング系を応用し、SSTR の各サブタイプと特異的に結合できる、また特異的に作動させる人工リガンドを RNA という高分子材料を

利用し、創製を試みた。我々はこれまでに、5種類あるヒト・ソマトスタチン受容体のうち SSTR5 を出芽酵母に発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性を、レポーター遺伝子(GFP)を利用して解析できるシステムをすでに確立している。SSTR2 については、これまで nM オーダーのリガンドを検出することが不可能であったが、酵母 Ga をヒト Ga に置き換えた酵母変異体株を用いることで微量のリガンドを検出することを試みた。SSTR2 は初期の膵臓ガン発生において、血管新生を抑制する因子の発現を促進し、浸潤ガンへの転化を阻止する働きがある。一方、これまでに確立した SSTR5 の酵母スクリーニング系を応用し、SSTR5 のリガンド認識に重要なアミノ酸残基の特定を試みた。

・酵母を用いた RNA アプタマー創製系の構築

我々はこれまでに、5種類あるヒト・ソマトスタチン受容体のうち SSTR2 および SSTR5 を出芽酵母に発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性をレポーター遺伝子(GFP)を利用して解析できるシステムをすでに確立している(図2)そこで、このシステムを活用し RNA アプタマーの取得を試みた。具体的には、60 塩基のランダム配列が、プライマー結合配列および T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含む一定の配列に挟まれたような $10^{14} \sim 10^{16}$ 分子種からなる鋳型 DNA のプールを調製した。そ

して、この鋳型 DNA のプールから転写反応を行い、ランダム RNA プールを調製した。この RNA プールと SSTR を発現していない細胞とを混合し、非特異的に細胞に結合する RNA を排除する。そして、次に非特異的な結合性を有しなかった RNA プールを、SSTR を発現させた酵母と混合し、特異的に結合する RNA アプタマーの取得を試みた。

H22 年度では、結合性を基盤とした RNA アプタマー創製系の構築、酵母を用いたアンタゴニスト選択法開発、そして蛍光性アプタマーの機能性検証を目指して以下の点に関して研究を進めた。

・結合性を基盤とした RNA アプタマー創製系の構築

生体内で重要な機能を持つ生理活性ペプチドの一つであるソマトスタチンは、細胞膜上にある G タンパク質共役型のソマトスタチン受容体 (SSTR) に結合することによって、標的細胞に作用する。ヒトの SSTR には、5種類のサブタイプが知られており、組織特異的な発現様式を示す。一方、SSTR は、内分泌腫瘍において発現の亢進が見られること、原発細胞により固有の発現パターンを示すことなどから、がんの診断においてきわめて重要なマーカータンパク質であり、治療薬のターゲットとしても注目を浴びている。

研究代表者藤原が率いる研究グループでは、5種のヒト SSTR のうち SSTR2 および SSTR5 を発現する出芽酵母を開

発し、酵母内在性 G タンパク質を介したレポーター(GFP)遺伝子の活性化によって、アゴニスト活性を測定できるシステムの確立にすでに成功している。そして、SSTR に対する RNA アプタマーを取得する目的で、このシステムを活用し酵母細胞を用いた SELEX を行った。しかしながら、RNA アプタマー作成を目的とする場合には、酵母表層提示系をスクリーニング系として用いると、大量の RNA が非特異的に酵母に結合してしまうという問題点が浮上し、その解決法の考案が急務であることが判明した。

そこで、ヒト SSTR を安定発現する接着性の培養細胞および組換えタンパク質を用いた SELEX 法を用いることで上記の問題を回避し、目的の RNA アプタマーの取得を目指した。そして、1) レンチウイルスベクターを用いて、ヒト SSTR を安定発現する接着性の培養細胞を作成し、これまでに TGF β 受容体に対する SELEX で実績がある Ohuchi 等の方法 (*Biochimie*) で SELEX 法を実施することにした。

具体的には、ヒト SSTR を安定に発現する異種細胞クローンを得るため、チャイニーズ・ハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞を宿主とし、ヒト SSTR2 cDNA-HA を持つレンチベクターを pLenti6 をバックボーンとして安定発現型の遺伝子導入を試みた。細胞—ディッシュ間の接着性を高めるためにコラーゲン・コートを施した 60mm ディッシュに、ヒト腎由来の 293T 細胞を 2×10^6 個まき

こみ、24 時間後におよそ 80% コンフルエントとなるように準備を行った。この細胞にウイルスベクターを発現させるため、発現ベクタープラスミド DNA pLenti-hSSTR2-HA、分割プロウイルス DNA である pLP1、pLP2、エンベロープ発現プラスミドである pVSV-G を重量比 5:5:5:1 総量 $15 \mu\text{g}$ を無血清 DMEM 培地 $250 \mu\text{l}$ 中で DNA トランスフェクション試薬 FugeneHD $15 \mu\text{l}$ と反応させたのち培地に加え、約 20 時間後に培地交換を行うまで 293T 細胞と接触させた。その後は半量の培地で培地交換することに培養上清を回収・冷蔵保存し、最終的な 48 時間後の回収の後に総量を $0.45 \mu\text{m}$ ポアサイズのフィルターを通すことで、細胞破片をのぞき、遺伝子導入用ウイルス上清を得た。並行して行った GFP 発現ベクターの解析から、ベクターのタイターとして $0.5-1.0 \times 10^6$ cfu/ml の上清 35ml が得られたものと考えられる。また、引き続き行った薬剤耐性コロニーの出現頻度からも、この予測の妥当性が明らかとなった。

CHO-K1 細胞への遺伝子導入は、50% コンフルエントの培養条件で、 $8 \mu\text{g/ml}$ のポリブレンを添加したウイルス上清によって行った。6 時間のインキュベーション後、3 容の DMEM/F12 培地でポリブレン濃度を $2 \mu\text{g/ml}$ まで落とした後、さらに 18 時間培養を続けた後に新鮮な培地に交換した。その 4 時間後、酵素処理によって細胞をディッシュから解離し、90mm ディッシュ 5 枚に植継いだ。この

48 時間後、4 枚のディッシュは、5 μ g/ml の blasticidin を含む培地で交換することにより、ベクター導入を受けた細胞の選択を開始した。約 2 日に一度の blasticidin 存在下での増殖と植継ぎを繰り返し、クローン取得を試みた。細胞における SSTR2-HA の発現は、HA タグに対するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体染色によって解析を行った。そのため、18mm 径の円形カバーグラスを 12-well プレートのウェルに敷き、poly-D-lysine コートしたのち細胞をまきこんだ。細胞の接着と伸展を 24 時間程度待ったのち、4%パラホルムアルデヒドを含む HEPES-buffered saline で 10 分間固定した後、TBS ですすいだ。さらに、残存するパラホルムアルデヒドの活性を除くために、0.2M Tris-HCl, pH 8.5 中で 1 時間処理または 1 晩の冷蔵保存を行った。また、細胞膜の透過性を増すために抗体処理前に、0.2% Triton-X100 を含む TBS で、5 分間の処理を行った。抗原抗体反応は、抗 HA ラットモノクローナル抗体(3F10)を 100ng/ml の濃度で用い、室温 1 時間行った。次いで、非特異的な染色をできるだけ抑制するために、TBST で 3 回すすいだ後、さらに洗浄を 15 分間ずつ 3 回繰り返した。また、二次抗体として、Alexa594 標識の抗ラット二次抗体を 100ng/ml の濃度で用い、1 次抗体と同様の条件で反応と洗浄を行い、蛍光顕微鏡下の観察と写真撮影により発現を解析した。

このように作成したヒト SSTR2 発現

CHO-K1 細胞を用いて Ohuchi 等の方法 (Biochimie) に従って SELEX 法を実施した。具体的には、60 塩基のランダム配列が、プライマー結合配列および T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含む一定の配列に挟まれたような鋳型 DNA のプールを調製した。そして、この鋳型 DNA のプールから転写反応を行い、ランダム RNA プールを調製した。そして、まずこの RNA プールを SSTR が発現していない CHO-K1 細胞をセミコンフルエントまで培養した Dish に加え、非特異的に細胞表面に結合する RNA を排除した。そして、次に非特異的な結合性を有しなかった RNA プールを、SSTR を発現させた CHO-K1 細胞をセミコンフルエントまで培養した Dish に加え特異的に結合する RNA プールを選択した。この作業を 10 回程度繰り返し、得られた RNA を逆転写し、クローニングベクターへとサブクローニングし配列を解析した。さらに、上記 cell-based SELEX 法とは独立に、GST 融合 SSTR2 および SSTR5 組換えタンパク質を用いた SELEX を実施した。GST 融合 SSTR2 および SSTR5 は Abnova 社より購入した。そして、上記と同様に調製したランダム RNA プールと、GST とを反応させ、非特異的に GST に結合する RNA を排除した。そして、次に非特異的な結合性を有しなかった RNA プールを、SSTR2 および SSTR5 と反応させ、特異的に結合する RNA プールを選択した。この作業を 10 回程度繰り返し、得られた RNA を逆転写し、クロー

ニングベクターへとサブクローニングし配列を解析した。RNA の選択にはニトロセルロース膜を使用している。従って、ニトロセルロース膜に非特異的に結合する RNA も本実験前に排除している。

・酵母を用いた酵母を用いたアンタゴニスト選択法開発

結合性を基盤に創製されたアプタマーの機能性は、これまでに構築した酵母リガンド応答解析系で検証できる。一方、機能性をもたないアプタマーがアンタゴニストであるかどうかをより簡便に検証する目的で、リガンドの結合によりシグナル伝達が引き起こされたときに、簡便に検証できる系の構築を試みた。具体的には CAN1 というカナバニン透過酵素が発現するような改変酵母を作成した。この酵母では培地中にカナバニンが存在するときに SSTR が作動すると、カナバニンを酵母が細胞内に取り込んで細胞死に至る (図 3)。この際、アンタゴニストが存在するとリガンド結合からのシグナル伝達が阻害され細胞は増殖できる。

・蛍光性アプタマーの機能性検証

これまでに細胞を用いた SELEX 法により TGF- β III 型受容体に対するアプタマーが創製されている。そこで、このアプタマーの構造に影響を与えない領域に蛍光性ヌクレオチドアナログを導入し (図 4 の丸の位置)、細胞表面上の受容体の発現を検出できる「RNA 診断薬」としての可能性を検証している。これまでに、

335nm で励起し蛍光が 395nm、320nm で励起し蛍光が 450nm の蛍光性ヌクレオチドアナログを用いて検証した。

H23 年度では、結合性を基盤とした RNA アプタマー創製系の構築、酵母を用いたアンタゴニスト選択法開発、そして蛍光性アプタマーの機能性検証を目指して以下の点に関して研究を進めた。

・結合性を基盤とした RNA アプタマー創製系の構築

生体内で重要な機能を持つ生理活性ペプチドの一つであるソマトスタチンは、細胞膜上にある G タンパク質共役型のソマトスタチン受容体 (SSTR) に結合することによって、標的細胞に作用する。ヒトの SSTR には、5 種類のサブタイプが知られており、組織特異的な発現様式を示す。一方、SSTR は、内分泌腫瘍において発現の亢進が見られること、原発細胞により固有の発現パターンを示すことなどから、がんの診断においてきわめて重要なマーカータンパク質であり、治療薬のターゲットとしても注目を浴びている。

研究代表者藤原が率いる研究グループでは、5 種のヒト SSTR のうち SSTR2 および SSTR5 を発現する出芽酵母を開発し、酵母内在性 G タンパク質を介したレポーター (GFP) 遺伝子の活性化によって、アゴニスト活性を測定できるシステムの確立にすでに成功している。そして、SSTR に対する RNA アプタマーを取得

する目的で、このシステムを活用し酵母細胞を用いた SELEX を行った。しかしながら、RNA アプタマー作成を目的とする場合には、酵母表層提示系をスクリーニング系として用いると、大量の RNA が非特異的に酵母に結合してしまうという問題点が浮上し、その解決法の考案が急務であることが判明し、前年度よりヒト SSTR を安定発現する接着性の培養細胞および組換えタンパク質を用いた SELEX 法を用いることで上記の問題を回避し、目的の RNA アプタマーの取得を目指した。そして、レンチウイルスベクターを用いて、ヒト SSTR を安定発現する接着性の培養細胞を作成し、これまでに TGF β 受容体に対する SELEX で実績がある Ohuchi 等の方法 (*Biochimie*) で SELEX 法を実施した。

H22 年度に作成したヒト SSTR2 発現 CHO-K1 細胞を用いて Ohuchi 等の方法 (*Biochimie*) に従って SELEX 法を実施した。具体的には、60 塩基のランダム配列が、プライマー結合配列および T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含む一定の配列に挟まれたような鋳型 DNA のプールを調製した。そして、この鋳型 DNA のプールから転写反応を行い、ランダム RNA プールを調製した。そして、まずこの RNA プールを SSTR が発現していない CHO-K1 細胞をセミコンフルエントまで培養した Dish に加え、非特異的に細胞表面に結合する RNA を排除した。そして、次に非特異的な結合性を有しなかった RNA プールを、SSTR を発現

させた CHO-K1 細胞をセミコンフルエントまで培養した Dish に加え特異的に結合する RNA プールを選択した。この作業を 10 回程度繰り返し、得られた RNA を逆転写し、クローニングベクターへとサブクローニングし配列を解析した。さらに、上記 cell-based SELEX 法とは独立に、GST 融合 SSTR2 および SSTR5 組換えタンパク質を用いた SELEX を実施した。GST 融合 SSTR2 および SSTR5 は Abnova 社より購入した。そして、上記と同様に調製したランダム RNA プールと、GST とを反応させ、非特異的に GST に結合する RNA を排除した。そして、次に非特異的な結合性を有しなかった RNA プールを、SSTR2 および SSTR5 と反応させ、特異的に結合する RNA プールを選択した。この作業を 10 回程度繰り返し、得られた RNA を逆転写し、クローニングベクターへとサブクローニングし配列を解析した。RNA の選択にはニトロセルロース膜を使用している。従って、ニトロセルロース膜に非特異的に結合する RNA も本実験前に排除している。

・酵母を用いた酵母を用いたアゴニスト評価系の構築

結合性を基盤に創製されたアプタマーの機能性は、これまでに構築した酵母リガンド応答解析系で検証できる。一方、機能性をもたないアプタマーがアゴニストであるかどうかをより簡便に検証する目的で、リガンドの結合によりシグナル伝達が引き起こされたときに、簡便に検

証できる系の構築を試みた。具体的には、SSTR5 を細胞表面に発現させた酵母を用いてアゴニストとして作用する環状型リガンドペプチドである S-14 を用いてシグナル応答を検出できるアッセイ系の開発を試みた。アッセイ系の簡便化および迅速化のために、リガンドペプチドを自己分泌させ、さらに酵母細胞表面でトラップする系の確立を目指した。

・蛍光性アプタマーの機能性検証

これまでに細胞を用いた SELEX 法により TGF- β III 型受容体に対するアプタマーが創製されている。そこで、このアプタマーの構造に影響を与えない領域に蛍光性ヌクレオチドアナログを導入し (図 4)、細胞表面上の受容体の発現を検出できる「RNA 診断薬」としての可能性を検証している。これまでに、335nm で励起し蛍光が 395nm、320nm で励起し蛍光が 450nm の蛍光性ヌクレオチドアナログを用いて検証してきたが蛍光強度に不足があったため、新たに 376nm で励起し蛍光が 520nm の蛍光性ヌクレオチドアナログを用いて検証し、導入部位も増やした。

C. 研究結果

H21 度では以下の結果を得た。

・SSTR2 微量リガンド検出系の構築および SSTR5 リガンド認識ドメインの特定

SSTR2 については、これまで nM オー

ダーのリガンドを検出できることが不可能であったが、酵母 Ga をヒト Ga に置き換えた酵母変異体株を用いることで nM オーダーのリガンドを検出することに成功した (図 5)。一方、これまでの SSTR5 の酵母スクリーニング系を応用し、SSTR5 のリガンド認識に重要なアミノ酸残基を特定した。

・酵母を用いた RNA アプタマー創製

酵母表面提示系をスクリーニング系として用いたアプタマー作成では次の問題点が浮上した。RNA が非特異的に酵母に大量に結合し、SSTR 非発現酵母を用いたネガティブスクリーニングの作業後、通常的手法では RNA の回収が不可能であった。また、ネガティブスクリーニングの条件を緩和なものにしたところ、SELEX 終了後に回収されてくる RNA アプタマーは SSTR の発現の有無にかかわらず酵母と結合した。

H22 度および H23 年度では以下の結果を得た。

・結合性を基盤とした RNA アプタマー創製系の構築

blasticidin 存在下での増殖と植継ぎを繰り返して、最終的に細胞の形態の一様性の高いもの 23 クローンを得ることができた。細胞における SSTR2-HA の発現は、HA タグに対するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体染色によって解析を行った結果、SSTR2-HA の発現を確認することができた。また、SSTR2 の生理的な局

在が予期される細胞膜に SSTR2-HA が存在することが確かめられた (図 6)。このような研究結果から、ここで得られたクローン化細胞は、SSTR2 の機能解析とこれを抑制する RNA アプタマーなどの薬剤の開発に、大きく貢献すると期待された。このように作成したヒト SSTR2 発現 CHO-K1 細胞を用いて SELEX 法を実施した。現在、配列を精査すると共に、32P 標識したアプタマーを用いて特異性を検証している。

さらに、上記 cell-based SELEX 法とは独立に、GST 融合 SSTR2 および SSTR5 組換えタンパク質を用いた SELEX を実施した。現在、配列を精査すると共に、32P 標識したアプタマーを用いて特異性を検証している。

・酵母を用いた酵母を用いたアンタゴニスト選択法の開発

図 7 において、横軸がアンタゴニストの BIM23056 の濃度、縦軸が先ほど同様酵母の増殖を示している。図 4 で示すように、アンタゴニストの濃度依存的に酵母の増殖を観測することができた。よって、アンタゴニストの検出に成功した。

・酵母を用いた酵母を用いたアゴニスト選択法の開発

GFP 応答性酵母株において α -factor を自己分泌させることで、アゴニスト依存的なシグナル伝達を検出できることを確認した (図 8 A, Sec)。また、5 種類のアンカータンパク質を α -factor の C 末端

側に融合したところ、すべてにおいてシグナル伝達を活性化することができた (図 8 A, 3'AG-Flo318)。本評価系は、アゴニスト活性を蛍光強度測定によって相対定量することが可能であり、Flo42 をアンカーとして用いることで、最も強くシグナル伝達を活性化できることを明らかとした。また、蛍光抗体染色の結果より、アンカーを融合したもののみが適切に細胞表面にトラップされていることが確認できた (図 8 B)。

次に、標的であるヒト SSTR5 発現した酵母株において、環状型 S-14-Flo42 融合リガンドを自己分泌させたところ、SSTR5 および S-14 を発現する細胞のみが特異的に GFP の蛍光を示し、その他のコントロール細胞は蛍光を示さなかった (図 9 A)。また、リガンドとして SSTR 以外に作用するペプチドリガンドを用いて同様の実験を行ったところ、S-14 以外のペプチドでは GFP 蛍光を示さなかった (図 9 B)。このことから、SSTR5 特異的なアゴニストリガンドを選択的に検出できたといえる。

また、これらの細胞において、抗タグ抗体を用いた Western blotting において特異的なバンドが見られたことから、SSTR5 と S-14 の発現を確認した (図 10)。さらに、蛍光標識抗体による細胞染色により、S-14-Flo42 リガンドペプチドの酵母細胞表層でのトラップに成功していることも確認した (図 11)。

最後に、マルチコピー型プラスミドによりレポーター遺伝子を発現するよう改

変した酵母株を作製したところ、GFPの発現レベルが大幅に向上させることに成功した(図12)。

・蛍光性アプタマーの機能性検証

研究手法で記したように、これまでに得られている TGF- β III 型受容体に対するアプタマーの構造に影響を与えない領域に蛍光性ヌクレオチドアナログを導入し、細胞表面上の受容体の発現を検出できるかを検証した。これまでに、335nmで励起し蛍光が395nm、320nmで励起し蛍光が450nmの蛍光性ヌクレオチドアナログを用いて検証した。しかしながら、蛍光強度が弱く条件の検討が急務である。そこで、研究手法で記したように、これまでに得られている TGF- β III 型受容体に対するアプタマーの構造に影響を与えない領域に蛍光性ヌクレオチドアナログを導入し、細胞表面上の受容体の発現を検出できるかを検証している。

D. 考察

(1) 達成度について

以上結果の項で示すとおり、最終的に、Cell-based SELEX法を実施した。さらに、組換えタンパク質を用いた従来のSELEX法の実施を行った。一方、結合性を基盤としたRNAアプタマー取得法に転換したため、作動性を持たないRNAアプタマーが、アゴニストとして機能しうるのかを検証する系の構築が急務となった。そこで、前年度までに構築済みである酵母を用いた微量のスクリーニング系を改変し、アゴニスト検定系の構築に成功した。

RNAアプタマーの取得も順調に進んでおり、現在その配列の解析および機能の解析にとりかかっている。また、昨年度に続き分担者による研究もきわめて純情に進んだ。

(2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

SSTR2は初期の膵臓ガン発生において、血管新生を抑制する因子の発現を促進し、浸潤ガンへの転化を阻止する働きがある。今回SSTR2に対する高感度リガンド検出系の構築に成功した。このことは、RNAアプタマーのみならず、新規ソマトスタチンアナログの開発に貢献できるのではないかと考えている。

さらにSSTR5のリガンド認識に必須名アミノ酸残基を特定したことは非常に重要な知見であり、現在特許出願に向け検討しているところである。これまで、おぼろげながら判明したい機能ドメイン

全容が明らかになったと考えている

E. 結論

研究実施後に浮上した酵母表層提示系をスクリーニング系として用いたアプタマー作成での問題点は、SSTR2 および SSTR5 を恒常的に発現する接着性の培養細胞を作成し、これらを用いる Cell-based SELEX を行うこと、さらにはこれら細胞から得られた膜画分を用いることで回避を試みた。その結果、これまでに SSTR5 発現細胞由来膜画分を用いた SELEX で数種類の特異的に結合するアプタマーを得た。現在、その配列の解析および標的への結合力の解析を行っている。

また、これまでに得られている TGF- β III 型受容体に対するアプタマーの構造に影響を与えない領域に蛍光性ヌクレオチドアナログを導入し、細胞表面上の受容体の発現を検出できる「RNA 診断薬」としての可能性を検証している。あらたに 376nm で励起し蛍光が 520nm、の蛍光性ヌクレオチドアナログを用いて検証し

ており、現在検出のための至適条件を検討している。

当初の計画からは変更を余儀なくなれたが、受容体に対するアプタマーを得て、その活性を速やかに検証するという点においては 100%の達成度である。また、柔軟な研究計画の変更を行ったため、既知の受容体に対するアプタマーに蛍光ヌクレオチドアナログを導入し、現在その診断薬としての薬理を検証中である。この点においても 100%の達成度が期待される。一方で、アプタマー取得が当初計画より遅れたため、その哺乳細胞に対する薬効を検証する点で遅れが生じている。しかしながら既に酵母を用いた活性を検証済みであり、速やかに哺乳細胞の系へと移行可能である。

F. 研究発表

分担者の項参照

G. 知的財産の出願・登録状況

該当なし

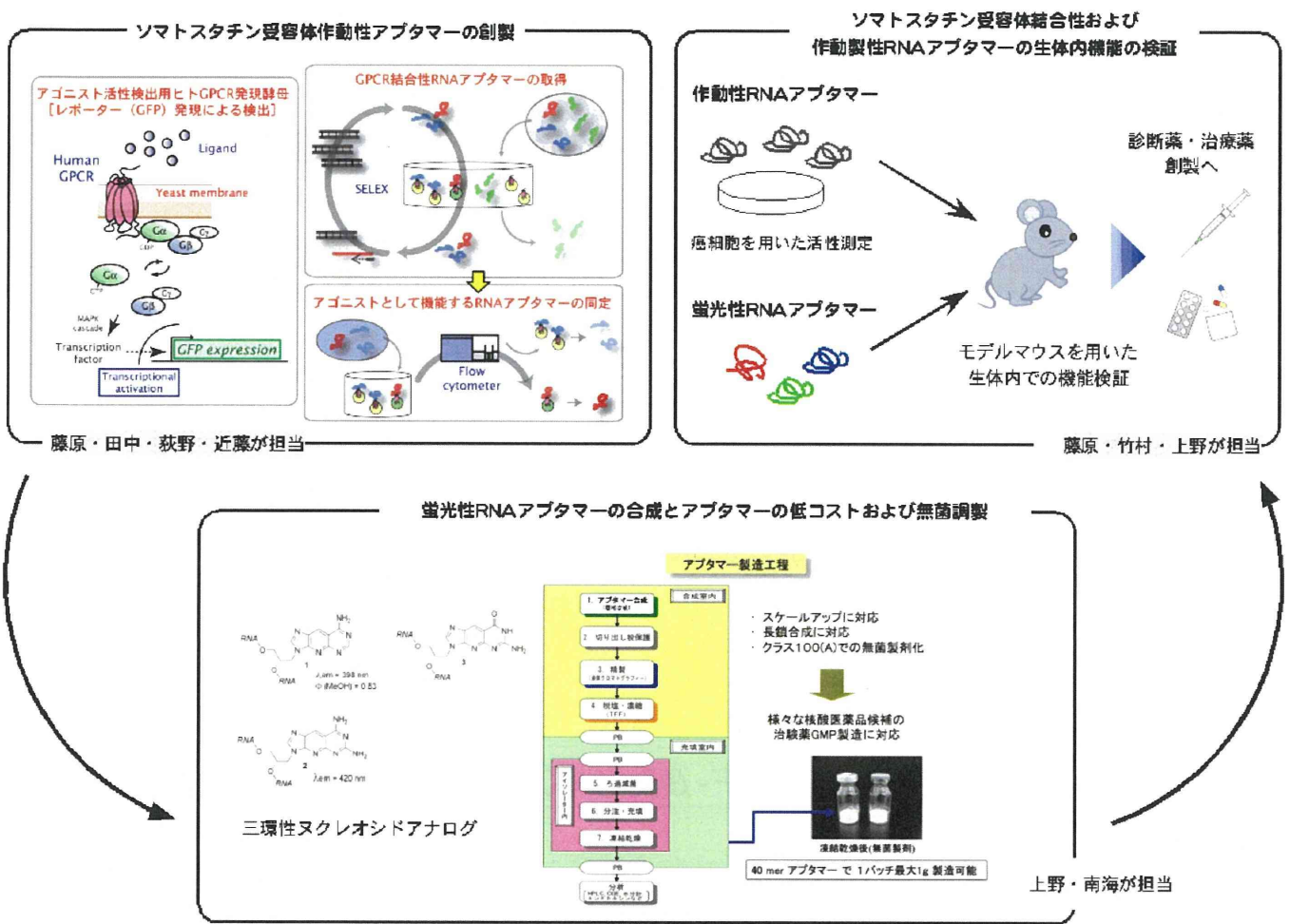
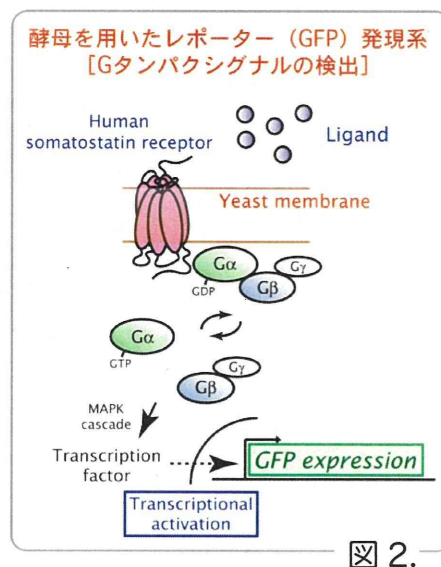


図 1 研究の流れ図



酵母を用いたアンタゴニスト選択法

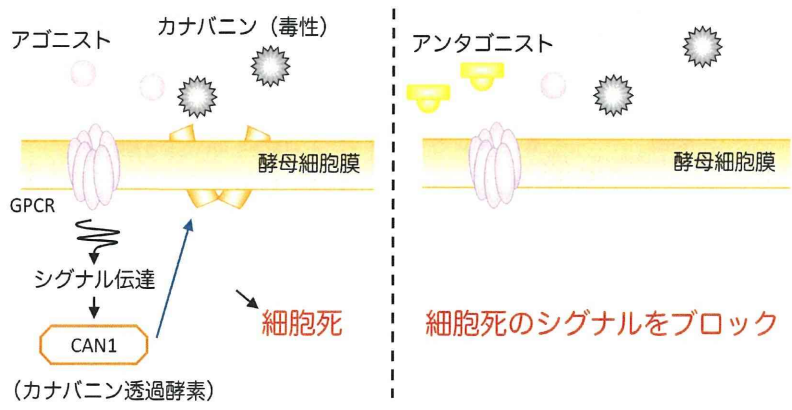


図3 酵母を用いたアンタゴニスト選択法

蛍光性抗TGF-β受容体アプタマーの合成

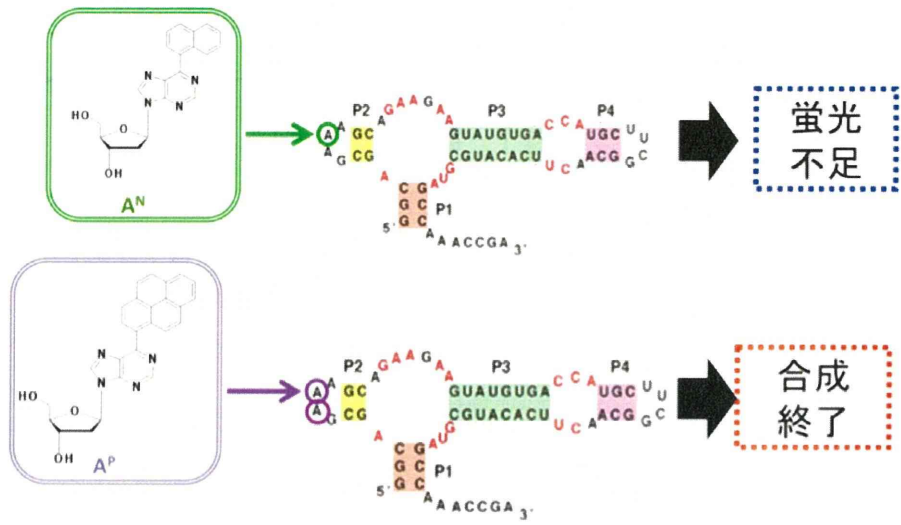
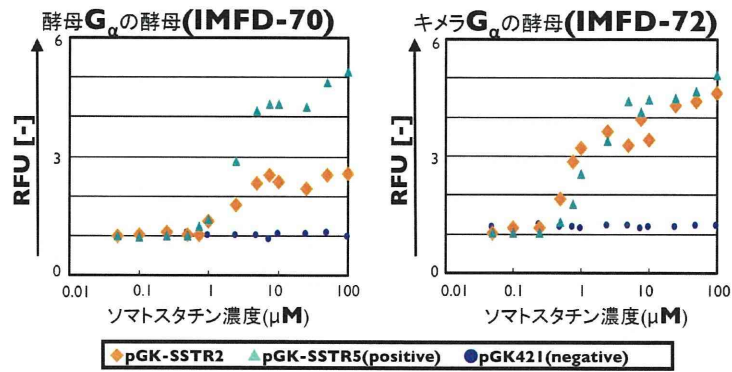


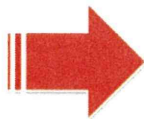
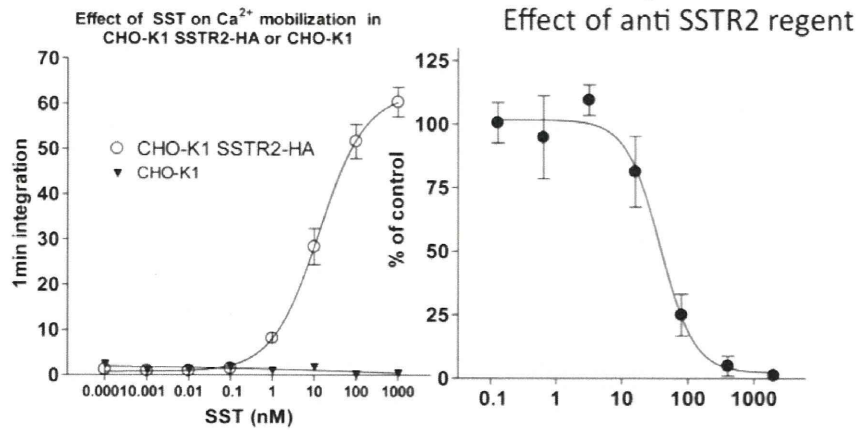
図4 蛍光性アプタマー



nMオーダーでのリガンド検出に成功

図5 SSTR2 リガンド検出系の構築

ヒト SSTR2 発現 CHO-K1 細胞



ヒト SSTR2 発現 CHO-K1 細胞を用いた細胞 SELEX

図6 ヒト SSTR2 発現 CHO-K1

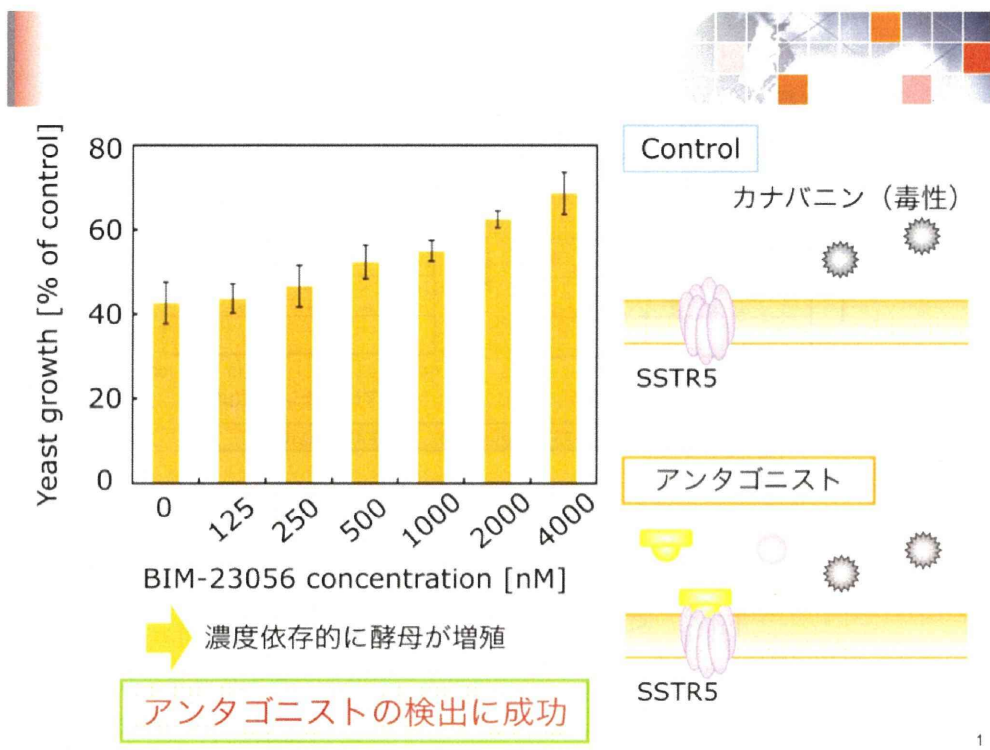


図7 酵母を用いたアンタゴニスト選択法によるアンタゴニスト検出

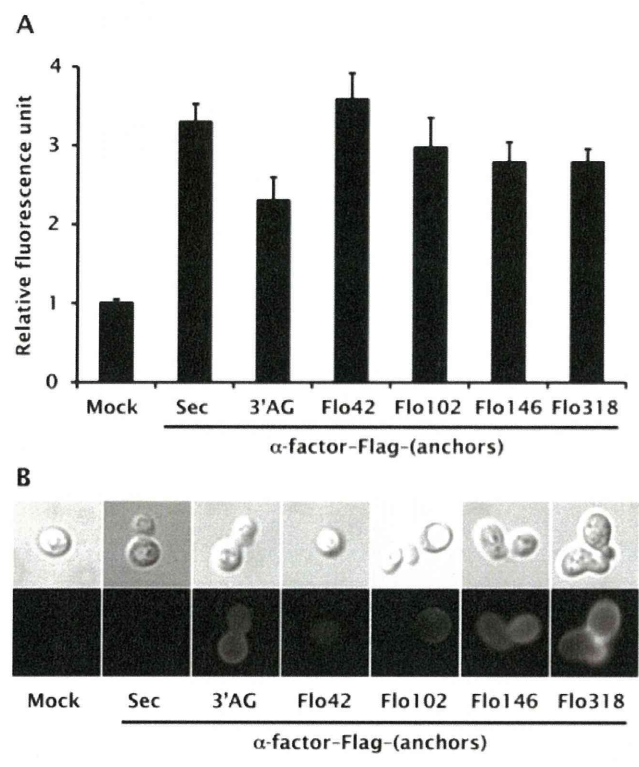


図8 α-factor 自己分泌および表層提示酵母株によるシグナル伝達アッセイ

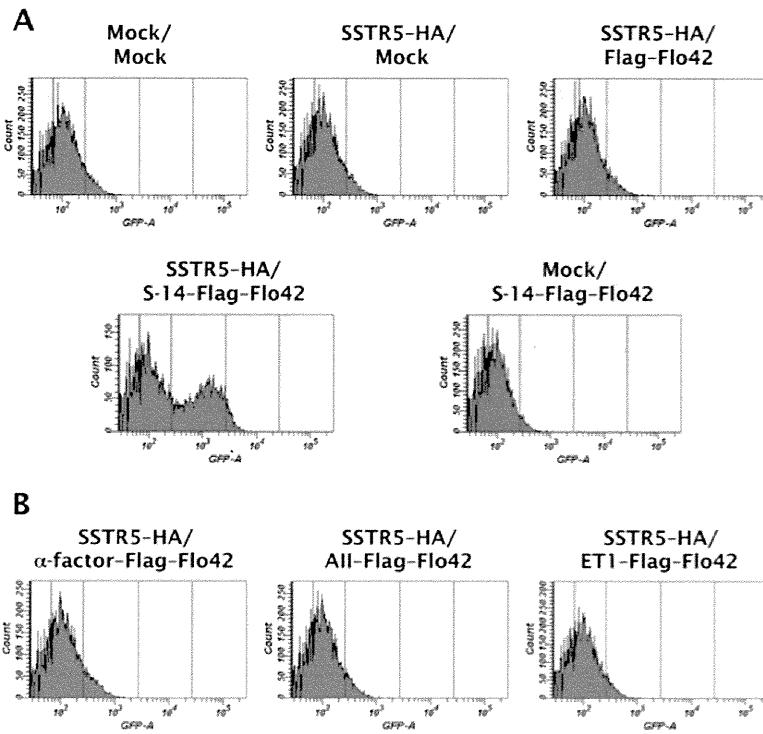


図 9 SSTR5 発現酵母株での S-14 表層提示によるシグナル伝達アッセイ

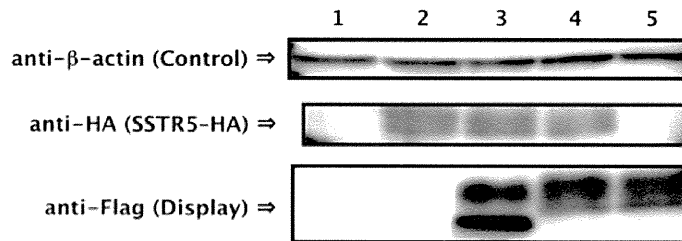


図 10 Western blotting による SSTR5 および S-14 の発現確認