

## 論文の内容の要旨

# アプタマーを用いた可逆的標識による 細胞分離技術の開発

Development of non-destructive cell separation method using aptamer-based reversible labeling

安西 悠

### 1. 研究の背景と目的

アプタマーとは、一本鎖 DNA または RNA から成る核酸分子であり、その高次構造により、抗体と同様に標的分子に対して親和性を有する、いわば「核酸製の抗体」のことをいう。このようなアプタマーは、タンパク質から成る抗体に対して、体内でタンパク質分解酵素の影響を受けないこと、分子量が抗体よりも十分に小さいことなどから、抗体に代わるツールとして医薬分野をはじめ様々な分野での応用が注目されている。

細胞の表現型を理解するためには、細胞を可能な限り傷害せずに識別する技術が必要である。その識別技術として、蛍光抗体を用いた免疫蛍光法が広く行われている。これは抗体が細胞表面上に存在する抗原を特異的に認識して結合するという抗原抗体反応を基礎としたものである。しかし、この抗原抗体反応では細胞を標識し識別した後に、その抗体を抗原から細胞非侵襲的に解離させるという脱標識が困難であることから、免疫蛍光法は不可逆的な標識方法であるといえる。そこで本研究では、抗体に代わる標識物としてアプタマーを用い、細胞を標識し識別した後に、適当な条件における核酸分解酵素反応によりそのアプタマーを分解することで、細胞非侵襲的に脱標識するという可逆的な細胞標識技術を確立することを目的とした (図1)。

### 2. 実験方法と実験結果

用いた細胞はヒト急性白血病T細胞株 (CCRF-CEM 細胞)、用いたアプタマーはこの細

胞に結合する一本鎖 DNA アプタマーである。またコントロール DNA としては、その配列のみをランダムに並べ替えた DNA を用い、いずれも DNase free の滅菌水を用いて溶解した。また、No DNA コントロールとしては、DNase free の滅菌水を用いた。

#### (1) アプタマーを固定した磁気ビーズによる細胞分離技術の開発

第一の方法として、表面上記アプタマーを固定した磁気ビーズを用いて細胞を磁気的に分離する方法の開発を行った。ここではアプタマーの 5'末端をビオチンで修飾し、ストレプトアビジン磁気ビーズに固定する方法を用いた。このアプタマー固定磁気ビーズを用いて細胞を分離し、その後、核酸分解酵素として Benzonase を適用して、細胞と結合した磁気ビーズ上のアプタマーを分解することにより、細胞から磁気ビーズを解離させた (図 2)。さらにそれらの細胞を培養し、その増殖能を測定した。一方で、磁気ビーズを解離した細胞を同条件で再度、同様な操作を行う第二磁気分離についても検討した。

まず磁気ビーズへのアプタマー固定量については、固定後に DNA インターカレーターである SYBR Gold を用いてアプタマーを染色後、蛍光輝度の解析により検討した。その結果、200 pmol/mg beads の条件で輝度が飽和したことから、以下ではこの条件で固定した磁気ビーズを用いた。続いて上記で作成したアプタマー固定磁気ビーズを、培地中で  $5 \times 10^4$  個の細胞と結合させた。結合後、同培地で 3 回洗浄することで分離できなかった細胞を除去し、ビーズ分画に含まれる細胞数を血球計算盤で計数した。条件として温度、結合時間、細胞数に対するビーズ数について検討したところ、室温で 30 分間、細胞に対するビーズ数が 10 という条件が最も高効率で分離でき、はじめの細胞数の約 60 % の細胞が分離できた。一方でコントロール DNA、No DNA コントロールの磁気ビーズではいずれも無視できる分離効率であった。

次に分離した細胞に対して、細胞から磁気ビーズを解離させるために、Benzonase を添加し 37°C で反応させた。反応時間、Benzonase 濃度の検討のために、経時的サンプリングをして磁気ビーズが 1 個でも結合している細胞数を計数したところ、反応時間 0 の時点でも 100% として、Benzonase 無添加の場合は 30 分後でも 90 % 超であったのに対し、Benzonase を添加した場合は、30 分以内に 20 % 以下となった (図 3)。

次に、以上の操作による細胞への傷害を検討するために、Benzonase 処理後の細胞増殖能を測定した。磁気ビーズが解離した細胞を回収し、培地交換を 3 回行うことで Benzonase を除去して、5 日間の培養を開始した。コントロールは、通常の継代培養時と同条件で調整した同数の細胞を培養し、同様にして細胞数の計数を行った。その結果、両者の増殖能に顕著な差は見られなかった。これより、上記操作は少なくとも細胞の増殖能には大きな影響を与えないことが分かった。

さらに、上記 Benzonase 処理後に同培地で 3 回洗浄して、その上清に含まれる磁気ビーズが解離した細胞に対して再度、同様な操作を行ったところ、1 回目の結果とほぼ同等の

結果を得た。これより、1回目の操作は、上記アプタマーが認識する標的を傷害するものでないことが示唆され、さらに、少なくとも2回の分離・解離という操作は、少なくとも細胞の増殖能には大きな影響を与えず、通常の継代培養を行ったときと同様の増殖能を示すことが分かった。

## (2) 蛍光アプタマーによる細胞の標識とその脱標識技術の開発

次に第二の方法として、蛍光ラベルしたアプタマーを用いて、蛍光輝度を指標にオンチップセルソーターで細胞を分離するための技術開発を行った。ここでは5'末端を FITC で修飾したアプタマーを用いた。これを用いて細胞を標識し、その後に上記同様に Benzonase を適用して、蛍光アプタマーを分解することで細胞を脱標識した。さらにそれらの細胞を培養し、その増殖能を測定した。一方で、脱標識した細胞を同条件で再度、同様な操作を行う第二蛍光標識についても検討した。

具体的には、まず蛍光アプタマーを、5 g/L グルコース、5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 % FBSを添加したD-PBS中で $5 \times 10^4$ 個の細胞と氷上で結合させた。4°Cの同バッファーで3回洗浄後、励起波長 488 nmのアルゴンレーザーを搭載した共焦点レーザー走査型顕微鏡（油浸対物レンズ 100 倍）で蛍光像を取得した。このとき同時に、CCDカメラを用いて位相差像も取得した。ただしこの際、オンチップセルソーターの現状に合わせ、ディッシュ基板底面からの対物レンズの焦点位置については固定することにした。本実験では、底面から7 μmだけZ軸上向きに対物レンズを固定したとき、最も多くの細胞の赤道面に焦点が合うことを確認したため、この位置に固定して観察を行った。細胞が示す蛍光輝度は画像解析ソフトを用いて求め、細胞を含む領域の総蛍光量から、細胞を含まない等面積の領域の総蛍光量を差し引き、さらにその値を、観察時に同時に取得した位相差像から求めた面積で割ることによって得た値を、その細胞の蛍光輝度とした。このときの結合条件として、結合時間、蛍光アプタマー濃度について検討したところ、結合時間 30 分、濃度は 4 pmol/μLで蛍光輝度が飽和した。このとき、蛍光アプタマーを結合させた細胞のうち約 95 %は、その蛍光輝度を指標に、コントロールDNAもしくはNo DNAコントロールを用いた場合の細胞と識別することができることがわかった（図4、5）。

次に、Benzonase (0.4 U/μL) を含む 37°Cの同バッファーに置換し、37 °Cで反応させ、その後に 4 °Cの同バッファーで3回洗浄し、上記同様に観察した。その結果、蛍光アプタマーで標識した細胞の蛍光輝度は、1分以内にコントロール DNA および No DNA コントロールを用いた場合の蛍光輝度とほぼ同等なほどまで小さくなった。一方で、Benzonase 無添加の場合は、蛍光輝度に顕著な変化はなかった（図6）。

次に、以上の操作による細胞への傷害を検討するために、上記(1)と同様な方法で、Benzonase 処理後の細胞増殖能を測定した。その結果、Benzonase 処理をした細胞と、通常の継代培養時と同条件で調整した細胞の増殖能との間に顕著な差は見られなかった。こ

のことから、上記(1)と同様に、Benzonase 処理は、少なくとも細胞の増殖能には大きな影響を与えないことが分かった。

さらに、上記 Benzonase 処理後に、細胞を 4 °C の同バッファーで 3 回洗浄して、再度、同様な操作を行ったところ、1 回目の結果とほぼ同等の結果を得た。これより、上記(1)と同様に、1 回目の操作は、アプタマーが認識する標的を傷害するものでないことが示唆され、さらに、少なくとも 2 回の標識・脱標識という操作は、少なくとも細胞の増殖能には大きな影響を与えず、通常の継代培養を行ったときと同様の増殖能を示すことが分かった。

### 3. 総括

上記(1), (2)ともに、抗体に代わる標識物としてアプタマーを用いて細胞を標識し識別後、適当な条件における核酸分解酵素反応によりそのアプタマーを分解する、すなわち脱標識するという可逆的な細胞標識ができた。また核酸分解酵素処理を行った細胞は、少なくとも細胞の増殖能には大きな影響を与えず、通常の継代培養を行ったときと同様の増殖能を示すことが分かった。さらにこの可逆的な標識技術は、2 回行っても同様の結果を示したことから、アプタマーが認識する標的分子を傷害するものでないことが示唆された。このことは、2 回目の標識、脱標識の際、すなわち 2 種類目の分子を標的とする第二のアプタマーを用いることで、多段階の細胞分離ができることを示唆している。このことは、従来の抗体を用いた場合における、1 回目の磁気分離に用いた磁気ビーズが解離できない限り、第二の抗体を固定した磁気ビーズを用いて磁気分離できないという問題点を克服し、特にアプタマーを用いた本研究における(1)の技術において大きな利点であると思われる。

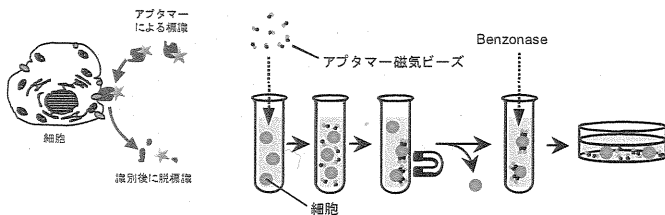


図 1 アプタマーによる細胞標識と脱標識の概念図

図 2 細胞磁気分離の概略図

図 3 Benzonase 処理による細胞からのアプタマー固定磁気ビーズの解離

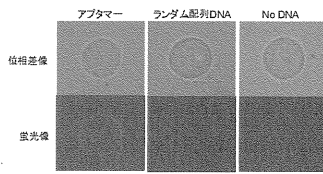


図 4 蛍光アプタマーで標識した細胞

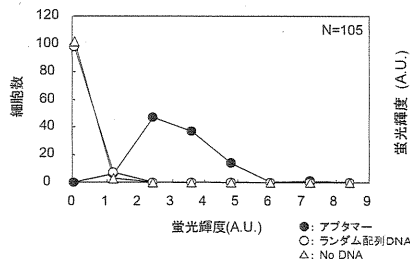


図 5 蛍光アプタマーで標識した細胞の蛍光強度プロファイル

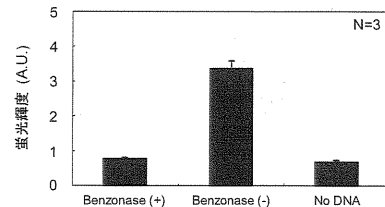


図 6 Benzonase 処理による細胞蛍光強度の低下