

論文内容の要旨

論文題目 RNA アプタマーを用いた細胞機能解析・制御技術の
開発

氏名 岩川 外史郎

多細胞生物の正常な発生・分化や恒常性維持を担うシグナル伝達機構では、細胞外の様々なシグナル分子を細胞表層上の膜受容体が感知することで、細胞内に情報が伝えられる。細胞表層には、膜受容体以外にも、細胞接着分子や膜輸送体など、細胞機能の制御に密接に関与している分子が多数存在している。従って、細胞外シグナル分子や細胞表層分子といった細胞外分子は、細胞機能制御の標的として重要である。また、細胞表層分子の中には、細胞種特異的に発現しているために、細胞集団の分類や分取において指標となっている分子が存在する。従って、細胞表層分子は細胞標識や細胞種特異的な制御技術への応用における標的としても重要である。細胞外分子を標的とした細胞機能解析・制御技術では、標的分子を特異的に認識する抗体が広く利用されているが、品質の均一性や免疫排除などの点において改善の余地がある。そこで、本研究では、抗体と同様に高い親和性と特異性を示し、更にこれらの点が問題となりにくい RNA アプタマーに着目し、以下に述べる2つの研究課題に取り組んだ。

「マウス ES 細胞を特異的に認識する RNA アプタマーの取得」

【研究背景・目的】

Embryonic Stem (ES) 細胞は、自己複製能と多分化能を併せ持っているため、再生医療への応用や分化制御機構の解明において重要な材料になっている。近年、プロテームやトランスクリプトームの解析技術の向上により、ES 細胞の細胞表層分子が多数同定されている。それらの中には、分化初期段階の詳細な分類において指標となる分子や、分化制御機構に深く関わっている分子などが存在すると予想されているが、詳しい解析は行われていない。そこで、本研究では、マウス ES 細胞の細胞表層分子に対する RNA アプタマーの取得を試み、その分子プローブとしての有用性を検証した。RNA アプタマーは、選別と増幅を繰り返す Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) 法によって取得する事ができる。一般的な SELEX 法では、単一種の精製された分子を標的とするが、本研究では、生細胞をそのまま用いて、細胞表層全体を標的とする SELEX 法に着目した。この手法では、細胞表層上でネイティブな構造をとった細胞表層分子を、同時に多種類標的にできるため、生細胞の解析において有用な RNA アプタマーを効率良く取得できると考えられる。

【方法・結果】

選別過程においてマウス ES 細胞に対するポジティブ選別のみを行う SELEX 法を実施し、RNA アプタマーを複数種類取得した（ライン 1、図 1）。一次配列や予測上の二次構造に相同性が認められない事から、それぞれ異なる分子を認識していると予想したが、解析した RNA アプタマーは全て結合活性を競合し、標的分子は同じである事が示された。

ライン 1 で得られた RNA アプタマーとは異なる標的に対する RNA アプタマーを取得するために、SELEX 法の選別過程の改善を検討した（図 1）。ライン 2、3 では、ライン 1 で得られた RNA アプタマーの一つである L1-65 を競合分子として用いて、L1-65 と結合活性を競合しない RNA アプタマーの取得を試みた。また、ライン 3 では、マウス ES 細胞に対してより特異的に結合活性を示す RNA アプタマーを取得するために、マウス結合組織由来の細胞に対するネガティブ選別も行った。その結果、L1-65 ならびに互いの競合活性を競合しない RNA アプタマーが新たに 2 グループ取得された。以上の SELEX 法から得られた、異なる標的分子を認識していると考えられる 3 種類の RNA アプタマーグループに関して、それぞれ 1 クローンずつ選び、更に詳細な解析を行った。

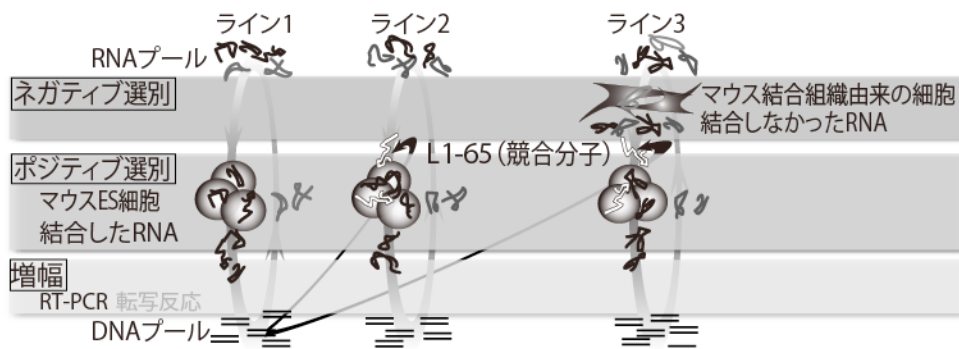


図 1 マウス ES 細胞に対する SELEX 法の概略図

まず、結合活性の特異性を評価した。5 種類の分化したマウス細胞株に対する結合活性を評価

したところ、3種類の RNA アプタマーはいずれも結合活性を殆ど示さず、マウス ES 細胞に対する特異性が認められた。次に、分子プローブとしての有用性を検証するために、蛍光標識した RNA アプタマーを用いて、細胞の蛍光染色を試みた。マウス ES 細胞は、RNA アプタマーによって細胞表層が染色され、特に細胞間領域で強い輝点が観察された (図 2)。また、マウス ES 細胞から分化させた細胞に対する染色では、いずれの RNA アプタマーに関しても、分化の進行に伴う蛍光強度の低下が認められた (図 2)。

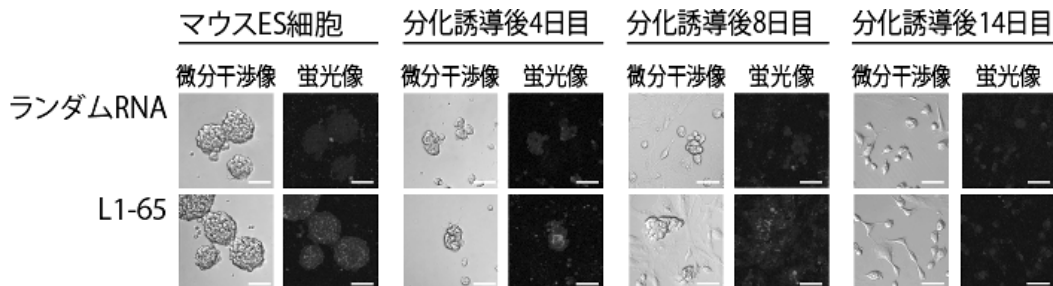


図 2 RNA アプタマーを用いた生細胞に対する蛍光染色

マウス ES 細胞やマウス ES 細胞から分化させた細胞に対して、蛍光標識した L1-65 を用いて蛍光染色を行った。ランダム RNA をネガティブコントロールとして用いた。スケールバーは 50 μm を示す。

【考察・展望】

本研究で取得された RNA アプタマーは、マウス ES 細胞に対して高い結合特異性を示し、また、細胞に対する蛍光染色に利用可能である事が示された。分化初期段階の細胞の解析において、より詳細な細胞の分類を可能にするなど、有用な分子プローブとして利用できる可能性が考えられる。

競合分子を用いた SELEX 法により、結合活性を競合しない RNA アプタマーが取得され、本手法の有効性が示された。競合分子種を更に増やす事で、より多種類の細胞表層分子に対する RNA アプタマーの取得が期待される。その中から、発現パターンの異なる分子に対する RNA アプタマーが見出され、それらを用いた解析や標的分子の同定などにより、分化制御機構に関する新たな知見が得られるかもしれない。

「抗 FGF-1 アプタマーによる FGF-1 刺激依存的増殖作用の解明」

【研究背景・目的】

Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1) は、ヒトで 22 種類同定されている FGF ファミリーの一つで、細胞膜上の FGF Receptor (FGFR) を介して、細胞内にシグナルを伝達し、増殖や分化の促進あるいは阻害作用を示し、多様な生命現象に関与している。先行研究において、ヒト軟骨肉腫細胞 (SW1353) において、FGF-1 刺激による細胞増殖作用を促進させる RNA アプタマー (ap.aF) が見出された。ap.aF のように標的分子の機能の亢進に働くアプタマーは非常に稀であるため、その作用メカニズムに興味を持たれるが、詳しい解析は行われていなかった。そこで、本研究では、ap.aF の作用メカニズムの解明を試みた。

【方法・結果】

グルコサミノグリカンの一種であるヘパリンが、ap.aFと同様に、FGF-1の細胞増殖作用を促進させる事が示されている。ヘパリンは、FGF-1をはじめとする様々な生理活性物質と相互作用し、細胞機能の制御に密接に関与している。ap.aFの作用メカニズムの解明に取り組むにあたり、ヘパリンと類似したメカニズムでSW1353の増殖に影響を及ぼしている可能性を考えた。その検証の一つとして、ap.aFとヘパリンのFGF-1に対する結合活性の競合を調べたところ、競合が認められたため、ヘパリンに関する知見を元に以降の解析を進めた。

まず、ヘパリンはプロテアーゼによるFGF-1の分解を防ぎ、安定化に寄与する事から、ap.aFやヘパリンが培地中におけるFGF-1の分解安定性に及ぼす影響を評価した。その結果、ap.aFやヘパリンの明確な安定化効果は認められなかった。

次に、ヘパリンはFGF-1・FGFR複合体形成の促進などに寄与し、FGFシグナルの活性化に働く事から、ap.aFがFGFシグナルに及ぼす影響を評価した。SW1353をap.aFやヘパリンと共にFGF-1で刺激し、一定時間後、FGFシグナルのシグナル伝達分子である Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) や Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2 α (FRS2 α) のリン酸化状態を検出した。その結果、ap.aFやヘパリンはFGF-1刺激によるシグナルの活性化を維持させる事が示された。ただし、FGFシグナルの上流では、ap.aFとヘパリンとの間で作用機序が異なる可能性が示唆された。この可能性を検証するため、表面プラズモン共鳴法により、FGF-1の各FGFRへの親和性に及ぼす影響を評価した。その結果、ヘパリンは各FGFRへの親和性を強めるのに対し、ap.aFはFGFRによって影響が異なり、FGFR1への親和性は強めるが、FGFR3やFGFR4への親和性は弱める可能性が示された。

【考察・展望】

ap.aFは、FGF-1のFGFR1に対する親和性を強める事で、FGF-1刺激によるFGFシグナルの活性化の維持に働き、細胞増殖作用の促進に寄与している可能性が示唆された。この可能性を更に検証するためには、種々のFGFRに関して、FGF-1刺激依存的なリン酸化を解析し、ap.aFやヘパリンの影響を評価する必要があるだろう。また、FGF-1は細胞接着分子であるインテグリン $\alpha v \beta 3$ と相互作用し、下流のシグナル経路を活性化させる事で、細胞増殖の促進に働く事が示されているため、インテグリン $\alpha v \beta 3$ への親和性に及ぼす影響の評価も望まれる。

ap.aFのように、標的分子の機能を亢進させるアプタマーの報告例は極めて少ない。本研究の結果から、リガンドと受容体の複合体を標的としたSELEX法により、同様な活性を示すアプタマーが見出される可能性が考えられる。また、細胞外分子の機能の活性化において、二量体化が重要である分子は少なくない。そこで、予め二量体化させてある分子を標的としたSELEX法を実施する事で、二量体化を促進し、標的分子の機能を亢進させるアプタマーが見出されるかもしれない。