

# 博士論文

グアニン四重鎖構造をもつ E- カドヘリン結合性 DNA アプタマー  
を介した上皮細胞接着現象の研究

丸山 亮

## 目次

第 1 章：本研究の背景および目的	4
1.1 細胞接着と接着タンパク質	5
1.1.1 細胞接着と細胞機能	5
1.1.2 細胞-ECM 接着とインテグリンファミリー	8
1.1.3 細胞-細胞間接着とカドヘリンファミリー	8
1.2 細胞培養足場材料の設計と応用	11
1.3 核酸アプタマー	14
1.3.1 核酸アプタマーの特徴	14
1.3.2 核酸アプタマーの獲得法	14
1.3.3 核酸アプタマーとグアニン四重鎖構造	15
1.3.4 細胞表面タンパク質を標的とする核酸アプタマー	18
1.4 E-cadherin 結合性 DNA アプタマー (E-cadherin-binding DNA aptamer, EBA)	21
1.4.1 EBA の獲得	21
1.4.2 EBA の性能	24
1.5 本研究の目的	26
1.6 本論文の構成	27
第 2 章：材料と手法	28
2.1 細胞・試薬・装置	29
2.1.1 細胞リスト	29
2.1.2 Oligo DNAs	29
2.1.3 細胞培養関連試薬・材料	30
2.1.4 抗体及び細胞染色関連試薬・材料	31
2.1.5 Western blotting 関連試薬・材料	32
2.1.6 その他の試薬・材料	33
2.1.7 装置・機器及びソフトウェア	34
2.2 実験手法	41
2.2.1 円偏光二色性 (Circular dichroism, CD) スペクトル測定	41
2.2.2 融解温度 (Melting temperature, $T_m$ ) 測定	43
2.2.3 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーを利用した細胞染色	43
2.2.4 表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance, SPR) センサーによる相互作用解析	44
2.2.5 細胞培養	44
2.2.6 Oligo DNA 修飾基板の調製	46
2.2.7 細胞接着評価	46
2.2.8 トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) 処理による E-cadherin のノックダウン	46
2.2.9 Western blotting によるタンパク質発現量の定量	47
2.2.10 相補鎖導入による細胞接着評価	49

2.2.11 エンドヌクレアーゼ処理による細胞剥離 .....	50
2.2.12 免疫染色 .....	50
2.2.13 細胞生存率評価 .....	52
2.2.14 細胞増殖能評価.....	52
2.2.15 RNA 抽出.....	52
2.2.16 mRNA-sequencing による遺伝子発現量解析.....	53
2.2.17 統計解析 .....	53
<b>第 3 章： 分光学的手法に基づいたグアニン四重鎖構造解析法の提案と E-cadherin 結合性 DNA アプ タマーの構造推定 .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1 序論.....</b>	<b>56</b>
<b>3.2 結果と考察.....</b>	<b>59</b>
3.2.1 分光学的手法に基づいたグアニン四重鎖構造解析法の構築.....	59
3.2.2 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーの構造推定 .....	69
<b>3.3 結論.....</b>	<b>74</b>
<b>第 4 章： E-cadherin 結合性 DNA アプタマーを介した細胞接着様式と機能解析.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 序論.....</b>	<b>76</b>
<b>4.2 結果と考察.....</b>	<b>77</b>
4.2.1 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーによる細胞染色 .....	77
4.2.2 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーの細胞接着モチーフ解析 .....	79
4.2.3 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーの細胞選択性.....	84
4.2.4 相補鎖導入による細胞接着制御及びエンドヌクレアーゼ処理による細胞剥離.....	91
4.2.5 E-cadherin 結合性 DNA アプタマー修飾基板における細胞接着班染色 .....	96
4.2.6 E-cadherin 結合性 DNA アプタマー修飾基板における細胞生存率及び増殖能.....	99
4.2.7 mRNA-sequencing による遺伝子解析.....	102
<b>4.3 結論.....</b>	<b>106</b>
<b>第 5 章： 総括.....</b>	<b>107</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>110</b>
<b>謝辞.....</b>	<b>116</b>

## 第 1 章：本研究の背景および目的

## 1.1 細胞接着と接着タンパク質

### 1.1.1 細胞接着と細胞機能

細胞接着とは、組織形成において単一の細胞が別の細胞または細胞外マトリクス (Extracellular matrix, ECM) に付着する現象であり、個々の細胞が生物の三次元組織を形成するために重要な機能である。細胞接着の基本単位は細胞接着分子・受容体、ECM から構成される複合体であり、これらの相互作用は細胞接着による組織形成だけでなく、分化、遊走、増殖など他の様々な細胞機能に影響を与えている (図 1)<sup>1,2</sup>。細胞接着は、大きく分けて細胞-ECM 間接着と細胞-細胞間接着の二種類に分類される。一般的に、細胞-ECM 間接着は組織の完全性を維持するために重要であり、細胞接着性糖タンパク質群<sup>3</sup>とインテグリンファミリーと呼ばれる細胞表面タンパク質群の相互作用等によって誘発される<sup>4</sup>。一方、細胞-細胞間接着はカドヘリンファミリーと呼ばれるカルシウムイオン依存性接着タンパク質群のホモフィリック結合等によって誘起され、細胞認識、発達中の細胞選別において重要な役割を果たしていることが知られている<sup>5</sup>。これらの細胞接着によって誘発されるシグナル伝達経路は、独立した個別のカスケードではなく、いくつかのシグナル伝達分子を介して交差的に機能している。例えば、クラスター化されたインテグリンは接着斑を形成し、アクチン細胞骨格に結合する<sup>6</sup> (図 1A)。 $\alpha$ -カテニン、 $\beta$ -カテニン、および p120-カテニンからなるカドヘリンベースの接着結合は、カドヘリン-アクチン相互作用において接着斑と同様の役割を果たす<sup>7</sup> (図 1B)。アクチン-ミオシンネットワークは細胞の内部収縮機構を形成し、インテグリンとカドヘリンによって伝達されるさまざまな力に応じて細胞内張力を生成する (図 1C)。細胞内張力の生成が動的に調整されることで、シグナル伝達、ならびに増殖、分化、遊

走などの基本的な生物学的プロセスが制御される<sup>8</sup>.

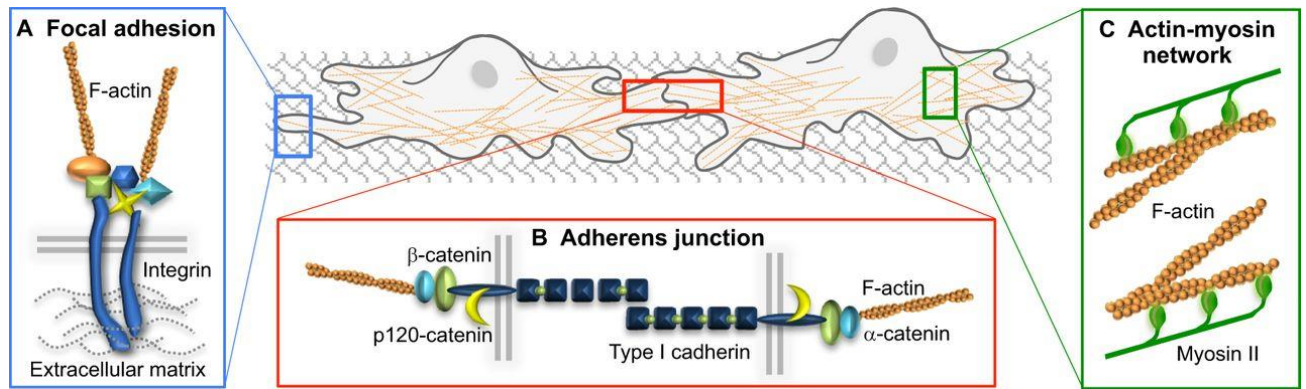


図 1. インテグリンとカドヘリンによる細胞内力覚制御. 文献[8]より引用. Mui, K. L., Chen, C. S. & Assoian, R. K. The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *J. Cell Sci.* 129, 1093–1100 (2016).

### 1.1.2 細胞-ECM 接着とインテグリンファミリー

インテグリンは、細胞-ECM 間細胞接着の主要な細胞表面分子であり、1987 年に Hynes らによってインテグリンファミリー受容体が発見されて以来、最も研究されている細胞接着受容体の一つである<sup>9</sup>。インテグリンファミリーは、 $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットを含む膜貫通タンパク質であり、ECM と細胞内シグナル伝達及びアクチン細胞骨格の間の橋渡しとして機能するヘテロダイマーを形成する<sup>10</sup>。インテグリンファミリーは ECM タンパク質であるフィブロネクチン<sup>11</sup>、ビトロネクチン<sup>12</sup>、ラミニン<sup>13</sup>等の受容体とカルシウムイオンやマグネシウムイオン等の二価の金属イオン依存的に結合し<sup>14</sup>、細胞-ECM 間接着を形成する。これらのインテグリン受容体は三アミノ酸配列 Arg-Gly-Asp (RGD) を共通して有しており、インテグリンの認識部位となっている<sup>15</sup>。インテグリンの細胞外ドメインが ECM と結合することで、インテグリンの細胞内ドメインは、Paxillin を含む細胞接着斑形成<sup>16,17</sup>を伴うアクチン骨格形成を制御し、細胞機能を誘起する<sup>18</sup>。

### 1.1.3 細胞-細胞間接着とカドヘリンファミリー

細胞-細胞間接着による組織形成において最も重要な相互作用の一つはカドヘリンファミリーによる相互作用である。カドヘリンファミリーは、細胞認識、発達中の細胞選別において重要な役割を果たしていることが知られているカルシウムイオン依存性細胞-細胞間接着タンパク質群である<sup>5</sup>。特に E-cadherin はカドヘリンファミリーの一つで、主に上皮細胞に発現している 120 kDa の細胞表面タンパク質であり、全てのカドヘリンのプロトタイプとされている<sup>19</sup>。E-cadherin は細胞接着の他、細胞の組織化、増殖、分化にも関与しており、癌細胞ではその発現が低下し、癌の潤滑・転移の



原因の 1 つとなっている<sup>20</sup>。E-cadherin の細胞外ドメインは多数のホモフィリック結合により細胞間接着を担っており、細胞内ドメインはカテニンを介してアクチン細胞骨格に結合している<sup>21</sup>。E-cadherin のホモフィリック結合によって形成される E-cadherin/ $\beta$ -catenin の複合体は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングにおける T cell factor (TCF)/lymphoid enhancer factor (LEF) を介した遺伝子転写の減少を引き起こすことが報告されている (図 2)<sup>22,23</sup>。

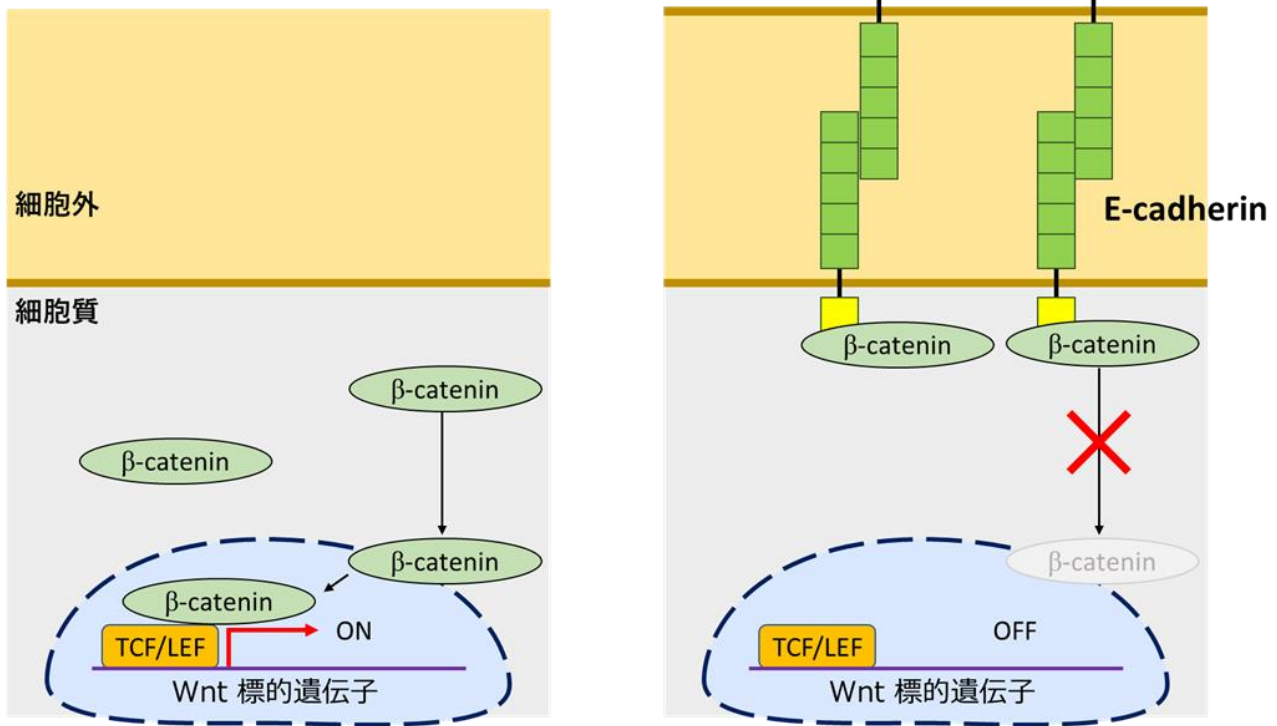


図 2. E-cadherin のホモフィリック結合と Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリング.

## 1.2 細胞培養足場材料の設計と応用

細胞培養の主な目的は、生体内における現象を単純な系で再現すること、特定の分子を大量に生産すること、薬剤スクリーニングや再生医療への応用等である。細胞の機能は培養環境に大きく左右されることが知られており、なかでも、細胞と足場材料の接着、さらに細胞同士の接着が細胞の増殖や分化に大きく影響している<sup>24</sup>。従って、上述した目的を達成するために適した細胞培養足場材料を再現性の高い品質で構築することは非常に重要な課題である。細胞の接着や増殖の機能を促進するために最も使用される細胞培養足場材料は、フィブロネクチン<sup>11</sup>、ビトロネクチン<sup>12</sup>、ラミニン<sup>13</sup>等の天然のタンパク質である。更に、細胞接着タンパク質と免疫グロブリン IgG の融合タンパク質等も足場材料として報告されている<sup>25</sup>。これらのタンパク質材料は、生体適合性が高く、細胞の接着や増殖等の細胞機能を促進する。一方、タンパク質材料は高価であることに加え、熱力学的安定性や保存性が低く、動物などの生体内で生産された動物由来成分であるために製造元やロット間で品質の差が生じ、異なる施設や研究グループにおいて再現性の高い実験を行うことが容易ではない。再生医療、薬効、毒性評価などのツールとしての利用が期待されるヒト多能性幹 (iPS) 細胞<sup>26</sup>の培養では、フィーダー細胞であるマウス胎児由来線維芽細胞を予め接着させた表面、またはマトリジェル (マウス肉腫由来基底膜マトリックス) をコートした表面などの非ヒト由来の動物細胞・動物由来成分からなる足場材料の上で培養されている<sup>27</sup>。これらヒト iPS 細胞用足場材料は、細胞の増殖能や多能性を維持するが、様々な不確定因子を含んでいることから、臨床応用における安全性が懸念されていることに加え、動物性由来成分が含まれているために、やはり製造元やロット間で品質の差が生じる恐れがある。一方、Polystyrene, Polyethylene glycol (PEG) 等の合成高分子<sup>28,29</sup>や

RGD peptide<sup>29</sup> 等の短い化学合成ペプチドから構成される細胞培養足場材料は動物由来成分を含まず、製造元やロット間による品質の差や不確定因子の混入を防ぐことができる。しかし、これらの非動物由来成分から構成される細胞培養足場材料は生体適合性や細胞接着及び増殖等の機能促進の面では動物由来成分に劣る。各細胞培養足場材料の特徴を表 1 に示す。もし、非動物由来成分で細胞接着分子と選択的に結合する生体適合性の高い分子を獲得し、非天然型の高度な結合様式を細胞に提供することができれば、再現性の高い品質で細胞機能を制御する足場材料の構築が可能となる。

表 1. 細胞培養足場材料の特徴

特徴	動物由来	非動物由来
種類	フィーダー細胞, タンパク質等	高分子, 化学合成ペプチド等
生体適合性	高い	低い
細胞機能制御	優れている	劣っている
生産コスト	高価	安価
品質	不均一	均一
不確定因子の混入	あり	なし
リガンド選択性	低い	低い

## 1.3 核酸アプタマー

### 1.3.1 核酸アプタマーの特徴

核酸アプタマーは分子認識能をもつ一本鎖 DNA/RNA であり、1990 年に Tuerk らによって報告されたバクテリオファージの T4 DNA polymerase に対する RNA アプタマー<sup>30</sup>の獲得以来、低分子<sup>31</sup>、タンパク質<sup>32</sup>、細胞小器官<sup>33</sup>、細胞<sup>34</sup>などの様々な標的に対して高い結合能をもつものがすでに多数報告されている。血管内皮細胞増殖因子に結合し、加齢黄斑変性症の医薬品として日本で初めて認可された核酸アプタマー<sup>35</sup>をはじめとし、様々な核酸アプタマーが臨床試験に進んでおり、抗体に代わる新たな分子認識素子として注目されている。核酸アプタマーは、生物を利用せずにスクリーニングが可能であること、任意の箇所に化学修飾が導入できること、核酸アプタマー同士の連結が容易に行えること<sup>36</sup>、熱安定性や保存性が高いこと、相補配列を利用することで意図した高次構造変化を誘起することができることなどの抗体には無い多くの特徴を有する化学合成可能な生体高分子である<sup>37</sup>。

### 1.3.2 核酸アプタマーの獲得法

核酸アプタマーは Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX)<sup>30</sup>、または In Vitro Selection<sup>31</sup> と呼ばれるスクリーニング法によって選抜される。核酸アプタマーは大きく分けて DNA アプタマーと RNA アプタマーに分けられる。本研究で取り扱うのは DNA アプタマーであるので、本項では DNA アプタマーの SELEX 法に関して述べる。SELEX はランダム配列核酸ライブラリーから標的分子に対する高い特異性と親和性を有するアプタマーを同定するための分子

進化技術である。一般的に、SELEX は以下の五つの過程:①ランダムな一本鎖 DNA ライブラリーの設計, ②ランダムライブラリーと標的分子の混合, ③標的分子と結合した DNA 配列の抽出, ④ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction, PCR) による結合性 DNA の増幅, ⑤増幅した DNA の一本鎖化を 1 サイクルとし, ~20 サイクルに及ぶ選抜を繰り返す<sup>38</sup>。①で設計するライブラリーは, 20–60 塩基程度のランダム配列と PCR の間にプライマー結合部位として機能する固定配列を両端に持つ。従って, 理論上, ランダム DNA ライブラリーは  $4^{20}$ – $4^{60}$  種類の構造多様性を持ち, 標的分子に対して様々な結合能を示す DNA 配列が獲得できる。②及び③の過程において, 一般的に標的分子となるタンパク質や低分子は磁性粒子等の個体担体に固定化され<sup>39</sup>, 洗浄等の操作によって高い結合能を示す DNA 配列のみを抽出することを可能とする。

### 1.3.3 核酸アプタマーとグアニン四重鎖構造

核酸アプタマーの結合能はその構造に強く依存し, 様々な高次構造を形成するものが報告されている<sup>40</sup>。グアニン (Guanine, G) 含有量の多い核酸配列 (図 3A) は, G-カルテット構造 (図 3B) を分子内に有し, グアニン四重鎖 (図 3C-H)を形成しているものがある<sup>41</sup>。グアニン四重鎖構造は核酸アプタマーにおける重要な高次構造の一つであり, これまでにグアニン四重鎖構造形成核酸アプタマーが多数報告されている<sup>42</sup>。G-カルテットは 4 つのグアニンとカリウムイオンなどの 1 価の金属イオンが Hoogsteen 水素結合によって平面上に並んだ構造を取っている。グアニン四重鎖は G-カルテットが二段以上重なり, G-カルテットと G-カルテットを繋ぐ三つのループ構造から形成される。グアニン四重鎖は配向性の違いから, パラレル型 (図 3C, D), アンチパラレル型 (図 3E-

G), ハイブリッド型の大きく分けて三つの構造をとる<sup>43</sup>. 更に, グアニン四重鎖は一本鎖で形成されるもの (図 3D, F, G, H) に加えて, 四本鎖 (図 3C), 二本鎖 (図 3E) で形成されるものがある. グアニン四重鎖構造の構造トポロジーは円偏光二色性 (Circular dichroism, CD) スペクトル測定によって推定することができる<sup>44,45</sup>. パラレル型グアニン四重鎖構造の CD スペクトルは 240 nm 付近に負, 265 nm 付近に正のコットン効果が観察され (図 3I), アンチパラレル型グアニン四重鎖構造は 240 nm と 290 nm 付近に正, 265 nm 付近に負のコットン効果が観察される (図 3J). 構造内にパラレル型とアンチパラレル型両方の構造を有するハイブリッド型グアニン四重鎖の CD スペクトルは 240 nm 付近に負, 265 nm と 290 nm 付近に正のコットン効果が確認される (図 3K).



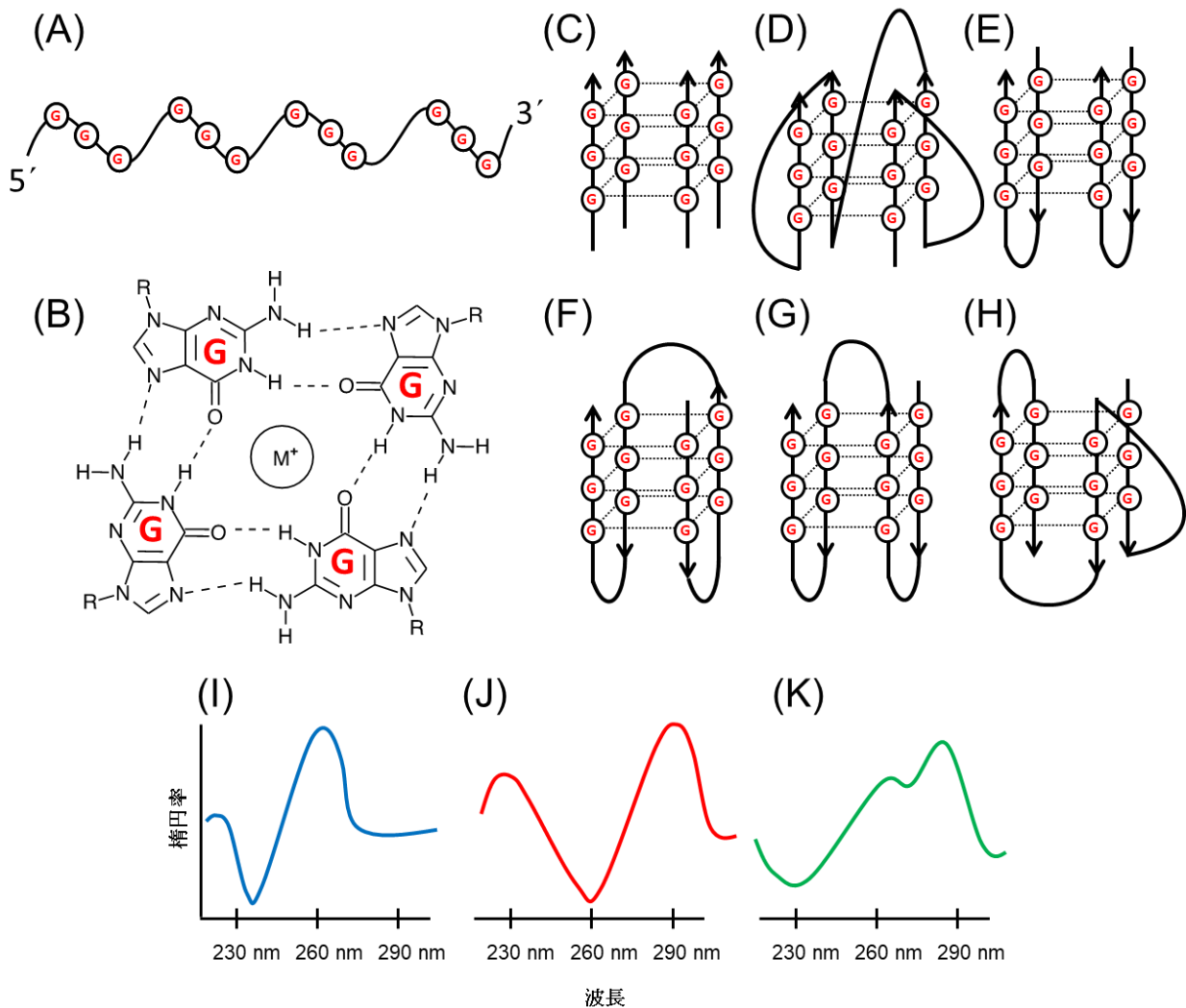


図 3. G-カルテットと三段グアニン四重鎖構造のトポロジー.

(A) G リッチ配列. (B) G-カルテット構造.  $M^+$  は一価の金属イオンを示す. (C) 四本鎖平行型グアニン四重鎖構造. (D) 一本鎖平行型グアニン四重鎖構造. (E) 二本鎖アンチ平行型グアニン四重鎖構造. (F, G) 一本鎖アンチ平行型グアニン四重鎖構造. (H) 一本鎖ハイブリッド型グアニン四重鎖構造. (I-K) グアニン四重鎖の典型的な CD スペクトル. 平行型を青色 (I), アンチ平行型を赤色 (J), ハイブリッド型を緑色で示している (K).

### 1.3.4 細胞表面タンパク質を標的とする核酸アプタマー

これまでに細胞表面タンパク質を標的とする核酸アプタマーが数多く報告されている。ヌクレオリン結合性アプタマーは *in vitro* において前立腺癌細胞, 乳癌細胞, HeLa 細胞に対して細胞増殖を抑制することが報告されている<sup>46</sup>。受容体型チロシンキナーゼである Met 結合性アプタマーは, Met に結合し, Met のリガンドである 肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor, HGF) の結合を阻害し, 癌細胞の遊走を抑制することが報告されている<sup>47</sup>。更に, Met 結合性アプタマー配列を最適化し, ダイマーとして利用した Dimerized-SL-1 は, HGF 阻害ではなく HGF 模倣試薬として Met の働きを活性化することも報告された<sup>48</sup>。ラミニンの受容体である  $\alpha6\beta4$  インテグリン結合性アプタマーは, 前立腺癌細胞のラミニンコート表面への接着を阻害することが報告された<sup>49</sup>。細胞表面タンパク質に結合する核酸アプタマーの中には, 標的細胞を選択的に捕捉する基板に応用されているものも報告されている。上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 結合性アプタマーを固定化した表面においては, ヒトとマウスのグリオブラストーマ細胞を特異的に捕捉することに成功している<sup>50</sup>。2019 年には, ヒト ES 細胞に対する Cell-SELEX によって獲得された幹細胞特異的 DNA アプタマー (Apt19S)<sup>51</sup>を固定化した基板において間葉系幹細胞の選択的捕捉と分化能の制御に成功している (図 4)<sup>52</sup>。以上のように, 細胞表面

タンパク質を標的とし、細胞機能を制御する核酸アプタマーは数多く報告されているが、細胞接着を誘導し、高い生存率と増殖能を維持したまま、細胞機能を制御できる細胞培養足場材料として機能するような核酸アプタマーは未だ報告されていない。

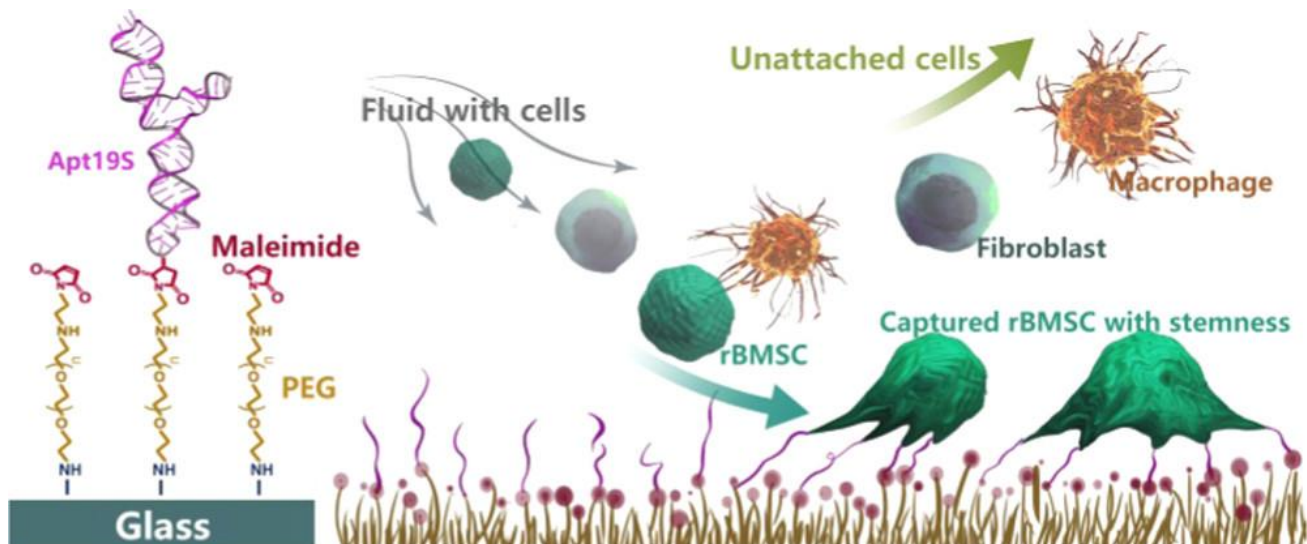


図 4. Apt19S 修飾基板による間葉系幹細胞の選択的捕捉と分化能制御. 文献 [52] より引用.

Defined Substrate by Aptamer Modification with the Balanced Properties of Selective Capture and Stemness Maintenance of Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11, 15170–15180 (2019).

## 1.4 E-cadherin 結合性 DNA アプタマー (E-cadherin-binding DNA aptamer, EBA)

### 1.4.1 EBA の獲得

私は修士論文時に磁性粒子を用いた SELEX (図 5) によって E-cadherin 細胞外ドメインに結合する DNA アプタマーに関する研究を行った<sup>53</sup>. E-cadherin 細胞外ドメインに結合する DNA アプタマーの獲得のために, E-cadherin の細胞外ドメインと免疫グロブリン IgG の Fc 部分のフュージョンタンパク質 (E-cadherin Fc フュージョンタンパク質) を標的とした. 34 塩基のランダム配列を有する一本鎖 DNA ライブラリーを免疫グロブリン IgG Fc 部分を修飾した磁性粒子と混合し (ネガティブセレクション), 結合しなかった配列を E-cadherin Fc フュージョンと混合し (セレクション), E-cadherin の外部ドメインに結合する DNA 配列のみを抽出した. PCR により結合した DNA を増幅し, 増幅した DNA を一本鎖化した. SELEX は 6 サイクル行い, 次世代シーケンサーによって配列を解析した. 配列解析から獲得したファミリー配列を最適化し, E-cadherin との相互作用を表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance, SPR) センサーにより解析した結果, 解離定数 0.61 nM と非常に高い結合能を有する E-cadherin-binding DNA アプタマー (EBA) を獲得している (図 6).

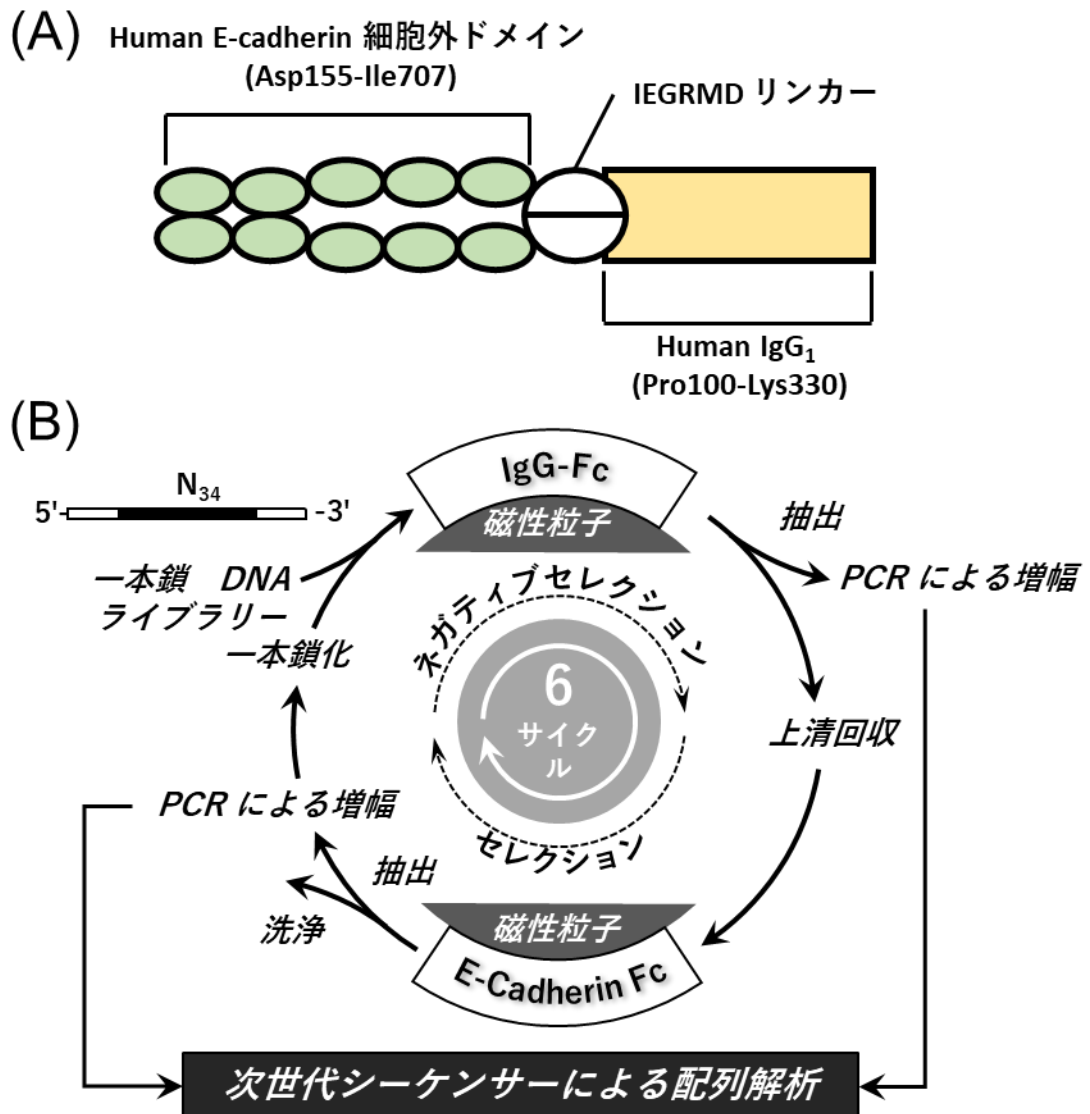


図 5. 磁性粒子を用いた SELEX による E-cadherin-binding DNA アプタマーの選抜概略図. 文献 [53] より引用, 改変. 丸山亮. 細胞接着性 DNA の構造推定および機能評価. 2017 年度 修士論文 1-72

(A) Recombinant Human E-cadherin Fc Chimera (E-cadherin Fc) の概略図. (B) 磁性粒子を用いた SELEX による E-cadherin-binding DNA アプタマーの選抜概略図.

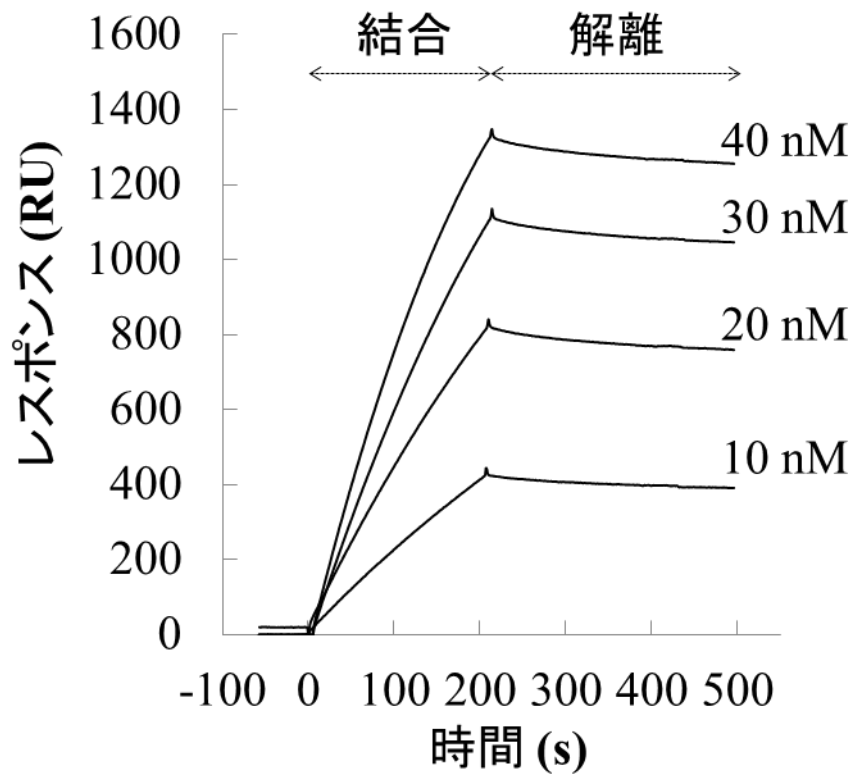


図 6. SPR センサーによる E-cadherin Fc フュージョンタンパク質に対する EBA の結合能評価. 文献 [53] より引用. 丸山亮. 細胞接着性 DNA の構造推定および機能評価. 2017 年度 修士論文 1-72

センサーチップに固定化した EBA に対し, 10-40 nM の E-cadherin Fc フュージョンタンパク質をインジェクションした. インジェクション開始からレスポンスが上昇し (結合, 0-200 s), インジェクション終了後もレスポンスが殆ど下がらず (解離, 200-500 s), 高い結合能を有していることが明らかとなっている.

#### 1.4.2 EBA の性能

EBA は 配列内に 22 塩基のグアニンを有する 34 塩基の一本鎖 DNA 配列である (図 7A).

EBA の CD スペクトルを測定した結果, 240 nm 付近に負, 265 nm 付近に正のコットン効果が確認され, 既報の三段平行型グアニン四重鎖 T95-2T<sup>54</sup>に類似したトポロジーを有することが明らかとなっている (図 7B). EBA の熱力学的安定性の指標となる融解温度 (Melting temperature,  $T_m$ ) の DNA 濃度依存性を測定した結果, 四本鎖で平行型グアニン四重鎖構造を形成することが報告されている TQ<sup>55</sup> と異なり,  $T_m$  値が DNA 濃度非依存的であった (図 7C). 以上の結果から, EBA は一本鎖の三段平行型グアニン四重鎖構造 (図 3D) を形成していることが明らかとなっている. ストレプトアビジン修飾基板にビオチン修飾 EBA を固定化し, EBA 修飾基板を作製した. EBA 修飾基板に主に E-cadherin を多く発現していることが予想されるヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞株 A549 細胞を播種した結果細胞接着が観察された. 興味深いことに, EBA 修飾基板上に接着した細胞は, 二価の金属イオンキレート剤 EDTA による洗浄によっても剥離せず, 二価の金属イオン依存的な細胞-ECM 間接着とは異なる接着様式をとっていることが示唆されている (図 7D).



(A) 5'-GGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT-3'

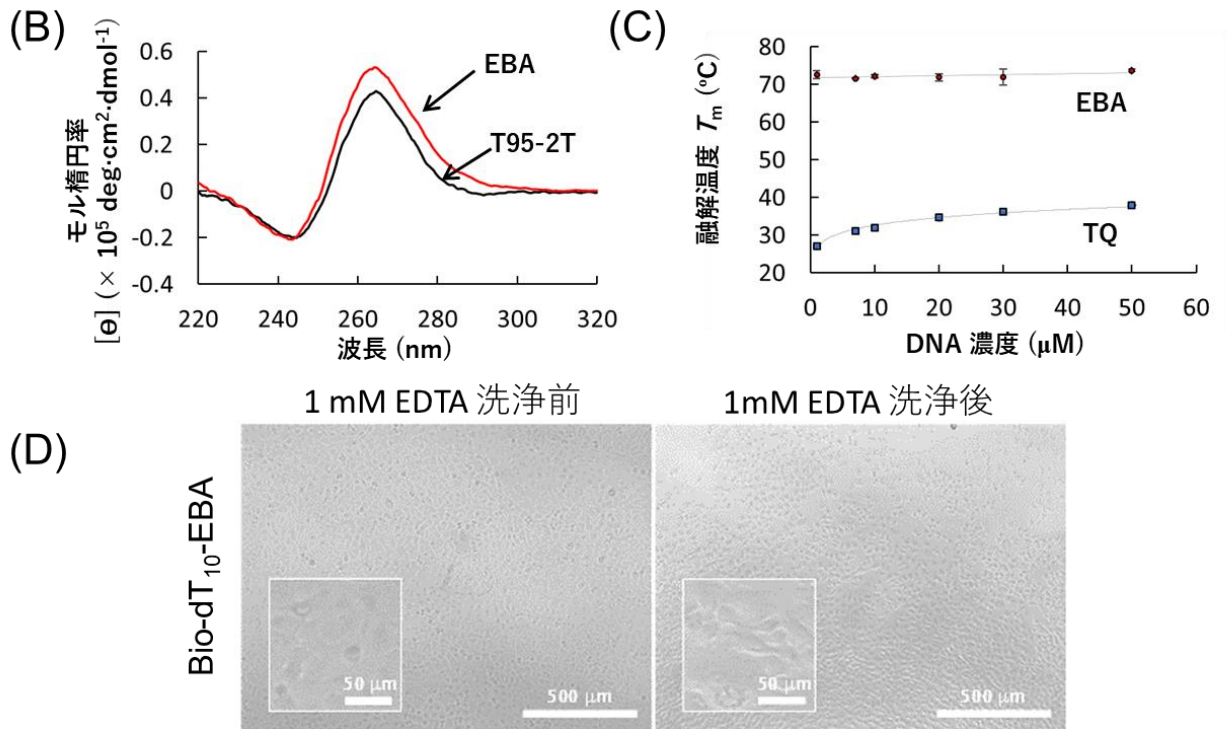


図 7. EBA の性能. 文献 [53] より引用, 改変. 丸山亮. 細胞接着性 DNA の構造推定および機能評価. 2017 年度 修士論文 1-72

(A) EBA の配列. 上部の数字は塩基番号を示し, グアニンを青色で示している. (B) EBA 及び T95-2T の CD スペクトル. (C) EBA 及び TQ の融解温度の DNA 濃度依存性. (D) EBA の細胞接着評価. A549 細胞を EBA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し, 24 時間後 (左) と 1 mM EDTA 洗浄後 (右) の位相差画像.

## 1.5 本研究の目的

本研究では, 細胞接着を誘導し, 高い生存率と増殖能を有したまま細胞機能を制御する DNA アプタマーを利用した細胞培養足場材料の構築を目的とした. 本目的を達成するために, E-cadherin 結合性 DNA アプタマー (EBA) を介した上皮細胞接着現象の研究を行った. 具体的には, まだ明らかになっていない EBA の構造を推定し, EBA 修飾基板における細胞接着様式を解析した. 最後に, EBA 修飾基板における細胞生存率や増殖能等の細胞機能を評価した. EBA を介した接着現象の詳細が明らかとなれば, DNA アプタマーを利用した新しい細胞培養足場材料の構築における重要な知見となる.

## 1.6 本論文の構成

第 1 章では、本研究の背景及び目的を述べた。

第 2 章では、本研究で用いた材料と手法について述べる。

第 3 章では、グアニン四重鎖構造推定のための分光学的手法に基づいた独自の解析法の構築と EBA の構造解析について報告する。

第 4 章では EBA 修飾基板における細胞接着現象に関する解析を報告する。具体的には、EBA 修飾基板における細胞接着様式の解析と EBA 修飾基板が細胞機能に与える影響の評価を行った。

第 5 章では、総括として上記の研究成果のまとめと展望について述べる。

## 第 2 章 : 材料と手法

## 2.1 細胞・試薬・装置

### 2.1.1 細胞リスト

- ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞株 A549 (Cat. No.: RCB0098, Riken Cell Bank, Japan)
- ヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 (Cat. No.: JCRB0134, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Japan)
- ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7 (Cat. No.: JCRB0403, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Japan)
- ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa (Cat. No.: JCRB9004, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Japan)
- ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13 (Cat. No.: JCRB1154, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Japan)
- ヒト脂肪由来初代間葉系幹細胞 ADSC (Cat. No.: PT-5006, Lonza, Switzerland)
- ヒト骨髄由来初代間葉系幹細胞 BMSC (Cat. No.: PT-2501, Lonza, Switzerland)
- ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 HUVEC-2 (Cat. No.: 354151, Corning, USA)

### 2.1.2 Oligo DNAs

- Oligo DNAs (Sigma-Aldrich, USA) (表 2, 表 3, 表 4, 表 5)
- FITC 修飾 Oligo DNAs (Sigma-Aldrich, USA) (表 6)
- ビオチン修飾 Oligo DNAs (Thermo Fisher Scientific, USA) (表 7)

### 2.1.3 細胞培養関連試薬・材料

- Dulbecco's PBS (-) <DPBS (-)> (Cat.No.: 041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (Cat.No.: 044-29765, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (Cat.No. D5796-500ML, Sigma-Aldrich, USA)
- Serum, Fetal Bovine, BSE Tested, EC Approved <FBS> (Cat.No.: S1820, Biowest, France)
- Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN) Antibiotic Mixture (Cat.No.: 15640055, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Penicillin-Streptomycin Solution (×100) (Cat. No.: 168-23191, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- 0.5% Trypsin-EDTA (10X), no Phenol Red (Cat.No.: 15400054, Thermo Fisher Scientific, USA)
- EDTA Solution (Cat.No.: 2103-100, BioVision, USA)
- Recombinant Human TGF-β1 (293) (Cat. No.: 100-21, PEPROTECH, USA)
- Immobilizer Streptavidin (Cat. No.: 436014, Thermo Scientific Nunc, USA)
- 100 mm/Tissue Culture Dish (Cat.No.: 3020-100, AGC TECHNO GLASS CO.,LTD., Japan)
- Microplate 12 well with Lid (Cat. No.: 3815-012, AGC TECHNO GLASS CO.,LTD., Japan)
- Microplate 6 well with Lid (Cat. No.: 3810-006, AGC TECHNO GLASS CO.,LTD., Japan)
- MicroWell 96-Well Microplates, F 96 well plate, cell culture, clear, with lid, Sterile (Cat.No.: 167008, Thermo Scientific Nunc, USA)

- 35 mm イーザーグリップディッシュ (Cat.No.: D11530H, Matsunami glass, Japan)

#### 2.1.4 抗体及び細胞染色関連試薬・材料

- Purified Mouse Anti-E-Cadherin (Cat.No.: 610181, BD Biosciences, USA)

- Purified Mouse Anti-N-Cadherin (Cat.No.: #610920, BD Biosciences, USA)

- Purified Mouse Anti-Paxillin (Cat.No.: 610052, BD Biosciences, USA)

- Rabbit Anti-GAPDH antibody (Cat.No.: ab181603, Abcam, UK)

- Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Cat. No.: 115-035-062, Jackson ImmunoResearch, USA)

- Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Cat. No.: 711-035-152, Jackson ImmunoResearch, USA)

- Alexa Fluor 594 anti-mouse/human CD324 (E-Cadherin) Antibody (Cat.No.: 147306, BioLegend, USA)

- Chicken anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Cat.No.: A21200, Thermo Fisher Scientific, USA)

- Live-Dead Cell Staining Kit (Cat.No.: 501-100, BioVision, USA)

- Paraformaldehyde (Cat. No.: 160-16061, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)

- glycine (Cat. No.: 077-00735, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)

- Triton X-100 (Cat. No.: 596-18621, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)

- Glycerol (Cat. No.: 072-04945, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)

- NEO micro cover glass (Cat.No.: C025361, Matsunami glass, Japan)

### 2.1.5 Western blotting 関連試薬・材料

- Albumin, from Bovine Serum (BSA) (Cat. No.: 017-15124, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- RIPA buffer (Cat. No.: 08714-04, Nacalai tesque co. ltd, Japan)
- 4×Laemmli buffer (Cat. No.: 1610747, Bio-Rad, USA)
- 2-Mercaptoethanol, 99% (Cat. No.: M3148-25ML, Sigma-Aldrich, USA)
- Protein Assay Reagent A (Cat.No.: 500-0113, Bio-Rad, USA)
- Protein Assay Reagent B (Cat.No.: 500-0114, Bio-Rad, USA)
- Protein Assay Reagent S (Cat.No.: 500-0115, Bio-Rad, USA)
- 10% Mini-PROTEAN TGX (Cat.No.: 456-1036, Bio-Rad, USA)
- Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS PAGE (Cat. No.: 02525-35, Nacalai tesque co. ltd, Japan)
- methanol (Cat. No.: 138-14521, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Nitrocellulose Membrane, Precut, 0.2 μm, 7 x 8.4 cm (Cat.No. 1620146, Bio-Rad, USA)
- Extra thick blot paper Filter paper (Cat.No. 1703965, Bio-Rad, USA)
- SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Cat.No.: 34075, Thermo Fisher Scientific, USA)
- セルスクレーパー (Cat. No.: 9000-220, IWAKI, Japan)
- Sodium Dodecyl Sulfate (Cat. No.: 196-08675, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol <Tris> (Cat. No.: 015-20093, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)



### 2.1.6 その他の試薬・材料

- Recombinant Human CDH1 Protein, Fc Chimera <E-cadherin Fc chimera> (Cat.No.: CDH1-274H, Creative Biomart, USA)
- Potassium Chloride (Cat.No.: 163-03545, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Dipotassium hydrogen phosphate (Cat.No.: 167-04305, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Potassium Dihydrogen Phosphate (Cat.No.: 160-04275, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- 1mol/l Sodium Hydroxide Solution (Cat.No.: 192-02175, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Sodium Chloride (Cat.No.: 192-13925, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- 10w/v% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate Solution (Cat.No.: 161-24801, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Liquid paraffin (Cat.No.: 164-00476, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)
- Nuclease BAL-31 (Cat.No.: M0213S, New England Biolabs, USA)
- Sensor Chip SA (Cat.No.: BR100032, GE Healthcare, USA)
- absorption cuvettes ultra Micro suprasil quartz (Cat.No.: Z600377-1EA, Hellma, Germany)
- 8 SERIES MICRO MULTI-CELL (Cat.No.: 208-98097-11, SIMADZU, Japan)
- RNeasy Mini Kit (Cat.No.: 74104, QIAGEN, Germany)
- QIAshredder (Cat.No.: 79654, QIAGEN, Germany)
- TruSeq stranded mRNA sample prep kit (Cat.No.: 20020594, Illumina, USA)

### 2.1.7 装置・機器及びソフトウェア

- Centrifuges 5424 R (Eppendorf AG., Germany)
- Thermal cycler (Cat.No.: TP600, TAKARA BIO, Japan)
- NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Jasco J-1500 CD spectrometer (JASCO, Japan)
- UV-Visible Spectrophotometer UV-2450 (SIMADZU, Japan)
- Biacore X100 (GE Healthcare, USA)
- OLYMPUS IX51 (OLYMPUS, Japan)
- Zeiss Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany)
- PowerPac HC Power Supply (Cat.No. 1645052, Bio-Rad, USA)
- Mini-PROTEAN Tetra Cell (Cat.No. 165-8000, Bio-Rad, USA)
- Trans-Blot SD Cell (Cat.No. 1703940JA, Bio-Rad, USA)
- ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, USA)
- Illumina HiSeq 2500 (Illumina, USA)
- Origin 7.0 (Lightstone Corp., Japan)
- ImageJ (NIH, USA)
- R software (R Development Core Team, New Zealand)
- Enrichr (Icahn School of Medicine at Mount Sinai, USA)

表 2. VEGF\_Pu22T12T13T 及び一塩基アデニン置換配列

ID	配列 (5' to 3')
VEGF_Pu22T12T13 (VPT)	CGGGGCGGGCCTTGGGCGGGGT
VPT_G2A	CAGGGGCGGGCCTTGGGCGGGGT
VPT_G3A	CGAGGGGCGGGCCTTGGGCGGGGT
VPT_G4A	CGGAGCGGGCCTTGGGCGGGGT
VPT_G5A	CGGGACGGGCCTTGGGCGGGGT
VPT_G7A	CGGGGCAGGCCTTGGGCGGGGT
VPT_G8A	CGGGGCGAGCCTTGGGCGGGGT
VPT_G9A	CGGGGCGGACCTTGGGCGGGGT
VPT_G14A	CGGGGCGGGCCTTAGGGCGGGGT
VPT_G15A	CGGGGCGGGCCTTGAGCGGGGT
VPT_G16A	CGGGGCGGGCCTTGGACGGGGT
VPT_G18A	CGGGGCGGGCCTTGGGCAGGGT
VPT_G19A	CGGGGCGGGCCTTGGGCGAGGT
VPT_G20A	CGGGGCGGGCCTTGGGCGGAGT
VPT_G21A	CGGGGCGGGCCTTGGGCGGGAT

表 3. T95-2T 及び一塩基アデニン置換配列

ID	配列 (5' to 3')
T95-2T	TTGGGTGGGTGGGTGGGT
T95-2T_T1A	ATGGGTGGGTGGGTGGGT
T95-2T_T2A	TAGGGTGGGTGGGTGGGT
T95-2T_G3A	TTAGGTGGGTGGGTGGGT
T95-2T_G4A	TTGAGTGGGTGGGTGGGT
T95-2T_G5A	TTGGATGGGTGGGTGGGT
T95-2T_T6A	TTGGGAGGGTGGGTGGGT
T95-2T_G7A	TTGGGTAGGTGGGTGGGT
T95-2T_G8A	TTGGGTGAGTGGGTGGGT
T95-2T_G9A	TTGGGTGGATGGGTGGGT
T95-2T_T10A	TTGGGTGGGAGGGTGGGT
T95-2T_G11A	TTGGGTGGGTAGGTGGGT
T95-2T_G12A	TTGGGTGGGTGAGTGGGT
T95-2T_G13A	TTGGGTGGGTGGATGGGT
T95-2T_T14A	TTGGGTGGGTGGGAGGGT
T95-2T_G15A	TTGGGTGGGTGGGTAGGT
T95-2T_G16A	TTGGGTGGGTGGGTGAGT
T95-2T_G17A	TTGGGTGGGTGGGTGGAT
T95-2T_T18A	TTGGGTGGGTGGGTGGGA

表 4. VEGF\_Pu22 及び一塩基アデニン置換配列

ID	配列 (5' to 3')
VEGF_Pu22 (VP)	CGGGGCGGGCCGGGGGCGGGGT
VP_G2A	CAGGGGCGGGCCGGGGGCGGGGT
VP_G3A	CGAGGGGCGGGCCGGGGGCGGGGT
VP_G4A	CGGAGCGGGCCGGGGGCGGGGT
VP_G5A	CGGGACGGGCCGGGGGCGGGGT
VP_G7A	CGGGGCAGGCCGGGGGCGGGGT
VP_G8A	CGGGGCGAGCCGGGGGCGGGGT
VP_G9A	CGGGGCGGACCGGGGGCGGGGT
VP_G12A	CGGGGCGGGCCAGGGGCGGGGT
VP_G13A	CGGGGCGGGCCGAGGGGCGGGGT
VP_G14A	CGGGGCGGGCCGAGGCGGGGT
VP_G15A	CGGGGCGGGCCGGGAGCGGGGT
VP_G16A	CGGGGCGGGCCGGGACGGGGT
VP_G18A	CGGGGCGGGCCGGGGGCAGGGT
VP_G19A	CGGGGCGGGCCGGGGGCGAGGT
VP_G20A	CGGGGCGGGCCGGGGGCGGAGT
VP_G21A	CGGGGCGGGCCGGGGGCGGAT

表 5. EBA 及び一塩基アデニン置換配列

ID	配列 (5' to 3')
EBA	GGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G1A	AGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G2A	GAGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G3A	GGAGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G4A	GGGATGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G9A	GGGGTGGTAGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G10A	GGGGTGGTGAGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G11A	GGGGTGGTGGAGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G12A	GGGGTGGTGGGAGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G13A	GGGGTGGTGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
EBA_G21A	GGGGTGGTGGGGGATACTGTAGGGGTGGTGGGCT
EBA_G22A	GGGGTGGTGGGGGATACTGTGAGGGTGGTGGGCT
EBA_G23A	GGGGTGGTGGGGGATACTGTGGAGGTGGTGGGCT
EBA_G24A	GGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGAGTGGTGGGCT
EBA_G25A	GGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGATGGTGGGCT
EBA_G30A	GGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTAGGCT
EBA_G31A	GGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTAGCT
EBA_G32A	GGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTAGCT

表 6. FITC 修飾 Oligo DNA 配列

ID	配列 (5' to 3')
FITC-dT <sub>10</sub> -EBA	FITC-TTTTTTTTTTTGGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
FITC-dT <sub>10</sub> -R <sub>34</sub>	FITC-TTTTTTTTTTTNN

表 7. ビオチン修飾 Oligo DNA 配列

ID	配列 (5' to 3')
Bio-dT <sub>10</sub> -EBA	Biotin-TTTTTTTTTTGGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
Bio-dT <sub>10</sub> -Loop 1T	Biotin-TTTTTTTTTTGGGG <b>TTT</b> GGGGGATACTGTGGGGGTGGTGGGCT
Bio-dT <sub>10</sub> -Loop 2T	Biotin-TTTTTTTTTTGGGGTGGTGGG <b>TTTTTTTTT</b> GGGGTGGTGGGCT
Bio-dT <sub>10</sub> -Loop 3T	Biotin-TTTTTTTTTTGGGGTGGTGGGGGATACTGTGGGG <b>TTTT</b> GGGCT



## 2.2 実験手法

### 2.2.1 円偏光二色性 (Circular dichroism, CD) スペクトル測定

Jasco CD spectrometer (Cat.No.: J-1500, JASCO, Japan) を用いて各 ssDNA サンプルの CD スペクトル測定を行った。 VEGF\_Pu22T12T13T 及び一塩基アデニン置換配列 (表 2) は 40 mM KCl を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2), VEGF\_Pu22 及び一塩基アデニン置換配列 (表 4) は 70 mM KCl を含む 25 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0), その他配列は全て DPBS (-) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) でそれぞれ 4 μM に希釈し, Thermal cycler (Cat.No.: TP600, TAKARA BIO, Japan) を用いて 94°C で 2 分間加熱した後, 0.1°C/sec. の速さで 25°C まで冷却することでサンプルのアニーリングを行った。 absorption cuvettes ultra Micro suprasil quartz (Cat.No.: Z600377-1EA, Hellma, Germany) に 110 μL のサンプルを入れ, 窒素雰囲気下, 表 8 の条件で楕円率の測定を行った。 各サンプルの希釈に使用した緩衝液をブランクとして測定し, ベースライン補正及びスムージングを行った。

表 8. CD スペクトル測定条件

---

セル長	1 cm
温度	室温
オペレーター	CD
データモード	CD
Ch2 モード	HT
開始波長	320 nm
終了波長	220 nm
解像度	0.5 nm
バンド幅	1.0 nm
感度	100 mdeg
レスポンス	1 sec
走査速度	100 nm/min
積算回数	3 回

---

### 2.2.2 融解温度 (Melting temperature, $T_m$ ) 測定

UV-Visible Spectrophotometer UV-2450 (SIMADZU, Japan) を用いて融解温度曲線の測定を行った。VEGF\_Pu22T12T13T 及び一塩基アデニン置換配列は 40 mM KCl を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2), VEGF\_Pu22 は 70 mM KCl を含む 25 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0), その他配列は全て DPBS (-) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) でそれぞれ 4  $\mu$ M に希釈し, Thermal cycler (Cat.No.: TP600, TAKARA BIO, Japan) を用いて 90°C で 2 分 30 秒間加熱した後, 1.5°C/min. の速さで 4°C まで冷却することでサンプルのアニーリングを行った。光路長 1 cm の 8 SERIES MICRO MULTI-CELL (Cat.No.: 208-98097-11, SIMADZU, Japan) に 120  $\mu$ L のサンプルを入れ, 更に 40  $\mu$ L の Liquid paraffin (Cat.No.: 164-00476, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) を加えることでサンプルの蒸発を防いだ。窒素雰囲気下で, サンプルを 4°C まで冷却後 10 分間維持し, 295 nm における吸光度の温度変化を 110°C まで測定することで融解温度曲線を得た。得られた融解温度曲線を Origin 7.0 にインポートし, FFT Filter Enter Number of Points 20 でスムージングした後, Calculus Differentiate を行った。得られた曲線の変曲点を融解温度とした。

### 2.2.3 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーを利用した細胞染色

A549 細胞を  $1.0 \times 10^6$  cells になるように 35 mm イージーグリップディッシュ (Cat.No.: D11530H, Matsunami glass, Japan) に播種した。播種から 24 時間後, 1 mL DPBS (-) (Cat.No.: 041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) で三回洗浄し, 1  $\mu$ M FITC 修飾 Oligo DNA サンプルと Alexa Fluor 594 anti-mouse/human CD324 (E-Cadherin) Antibody (Cat.No.: 147306, BioLegend, USA)

(1:500=Antibody : DPBS (-)) を 1 mL 加え、氷上で 1.5 時間静置した。静置後、1 mL DPBS (-) で三回洗浄し、蛍光顕微鏡 (Zeiss Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany)) で観察を行った。

#### 2.2.4 表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance, SPR) センサーによる相互作用解析

各ビオチン修飾 Oligo DNAs (Thermo Fisher Scientific, USA) サンプルを DPBST (0.05(w/v)% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) でそれぞれ 500 nM に希釈し、Thermal cycler (Cat.No.: TP600, TAKARA BIO, Japan) を用いて 94°C で 2 分間加熱した後、0.1°C/sec. の速さで 25°C まで冷却することでサンプルのアニーリングを行った。ランニングバッファーを DPBS (-)T として、Sensor Chip SA (Cat.No.: BR100032, GE Healthcare, USA) を Biacore X100 (GE Healthcare, USA) にセットした。Wizard の immobilization プログラムを Flow rate: 10 µL/min., Prime before run 有り, Aim for immobilized level: 1000 RU, Wash solution: 1 M NaCl/ 50 mM NaOH に設定し、各ビオチン修飾 Oligo DNAs サンプルを流路に固定化した。Wizard の Binding analysis プログラムを Flow rate: 10 µL/min., Contact time: 120 sec., Dissociation time: 600 sec., Wash solution: 1 M NaCl/ 50 mM NaOH, Wash time: 60 sec., Stabilization time: 600 sec. に設定し、80 nM E-cadherin Fc chimera または 10(v/v)% FBS を各 Oligo DNA サンプルを固定化した流路にインジェクションした。得られたレスポンスを比較することで各 Oligo DNA サンプルと E-cadherin Fc chimera との相互作用を評価した。

#### 2.2.5 細胞培養

本研究では細胞接着評価の細胞として、ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞株 A549, ヒト乳癌由来細

胞株 MCF-7, ヒト肝癌由来細胞株 HuH-7, ヒト子宮頸癌由来細胞株 HeLa, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 UE7T-13, ヒト脂肪由来初代間葉系幹細胞 ADSC, ヒト骨髄由来初代間葉系幹細胞 BMSC, ヒトさい帯静脈血管内皮細胞株 HUVEC-2 を使用した. A549 細胞は Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (Cat.No. D5796-500ML, Sigma-Aldrich, USA) に Serum, Fetal Bovine, BSE Tested, EC Approved <FBS> (Cat.No.: S1820, Biowest, France) を 10(v/v)%, Penicillin-Streptomycin Solution (×100) (Cat. No.: 168-23191, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) を 1(v/v)% の割合で混合した培地で培養した. その他の細胞は D-MEM (High Glucose) with L-Glutamine and Phenol Red (Cat.No.: 044-29765, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) に Serum, Fetal Bovine, BSE Tested, EC Approved <FBS> (Cat.No.: S1820, Biowest, France) を 10(v/v)%, Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN) Antibiotic Mixture (Cat.No.: 15640055, Thermo Fisher Scientific, USA) を 1(v/v)% の割合で混合した培地で培養した. 全ての細胞は 100 mm/Tissue Culture Dish (Cat.No.: 3020-100, AGC TECHNO GLASS CO.,LTD., Japan) に培地量 10 mL, CO<sub>2</sub> 濃度 5%, 37°C で培養し, 4 日に一度の頻度で継代を行った. 継代の際には 2 mL の Dulbecco's PBS (-) <DPBS (-)> (Cat.No.: 041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) で二度洗浄した後, 0.05% Trypsin-EDTA (0.5% Trypsin-EDTA (10X), no Phenol Red (Cat.No.: 15400054, Thermo Fisher Scientific, USA) を DPBS (-) で希釈) を 2 mL 加え, 37°C で 5 分間静置し, 細胞を剥離した. 剥離した細胞懸濁液に 2 mL の培地を加え, 500G で 4 分間遠心した後, 上澄みを培地に置換し, 4×10<sup>5</sup> cells/dish となるように細胞を播種した. Oligo DNA 修飾基板に細胞を播種する場合は, 2 mL の 0.05% Trypsin-EDTA の代わりに 5 mL の 1 mM EDTA (EDTA Solution (Cat.No.: 2103-100, BioVision, USA) を DPBS (-) で希釈) を

使用し、静置時間を 10 分間とした。

#### 2.2.6 Oligo DNA 修飾基板の調製

各ビオチン修飾 Oligo DNAs (Thermo Fisher Scientific, USA) サンプルを DPBST (0.05(w/v)% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) でそれぞれ 500 nM に希釈し、Thermal cycler (Cat.No.: TP600, TAKARA BIO, Japan) を用いて 94°C で 2 分間加熱した後、0.1°C/sec. の速さで 25°C まで冷却することでサンプルのアニールリングを行った。ストレプトアビジンコート 96 well プレート (Immobilizer Streptavidin (Cat. No.: 436014, Thermo Scientific Nunc, USA) の各ウェルを 300 μL の DPBST で 3 回洗浄し、100 μL の 500 nM ビオチン修飾 Oligo DNAs サンプルを加え、室温で一時間インキュベートした。インキュベート後、各ウェルを 300 μL の DPBST で三回洗浄した。

#### 2.2.7 細胞接着評価

Oligo DNA 修飾基板に各細胞を細胞数  $3 \times 10^4$  cells/well になるように播種した。播種から 24 時間後、300 μL の 1m M EDTA (EDTA Solution (Cat.No.: 2103-100, BioVision, USA) を Dulbecco's PBS (-) <DPBS (-)> (Cat.No.: 041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) で希釈) で洗浄した。洗浄前後の細胞数を位相差顕微鏡 (OLYMPUS IX51 (OLYMPUS, Japan)) で撮影し、細胞数をカウントした。

#### 2.2.8 トランスフォーミング増殖因子 -β1 (TGF-β1) 処理による E-cadherin のノックダウン

A549 細胞を培地量 1 mL, 細胞数  $1 \times 10^5$  cells/dish になるように 100 mm/Tissue Culture Dish

(Cat.No.: 3020-100, AGC TECHNO GLASS CO.,LTD., Japan) に播種し, 24 時間後, TGF- $\beta$ 1 (0.1(w/v)% Albumin, from Bovine Serum (BSA) (Cat. No.: 015-15125, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan), DPBS (-)) を 1  $\mu$ g/mL 含む培地で培地交換を行った. 培地交換から 96 時間後の細胞を Western Blotting および細胞接着評価に用いた.

### 2.2.9 Western blotting によるタンパク質発現量の定量

TGF- $\beta$ 1 処理を行った細胞の培地を除去し, 5 mL の Dulbecco's PBS (-) <DPBS (-)> (Cat.No.: 041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) で二回洗浄後, 500  $\mu$ L の RIPA buffer (Cat. No.: 08714-04, Nacalai tesque co. ltd, Japan) を加え, 氷上で 30 分インキュベートした. セルスクレーパー (Cat. No.: 9000-220, IWAKI, Japan) で細胞を破碎し, 懸濁液を 4°C, 13000 rpm, 10 分間の条件で遠心した. 上清を回収し, 総タンパク質の定量 (Protein Assay Kit, (Protein Assay Reagent A (Cat.No.: 500-0113, Bio-Rad, USA), Protein Assay Reagent B (Cat.No.: 500-0114, Bio-Rad, USA), Protein Assay Reagent S (Cat.No.: 500-0115, Bio-Rad, USA)) を行った. 上清 260  $\mu$ L に対して, 100  $\mu$ L の 4 $\times$ Laemmli buffer (Cat. No.: 1610747, Bio-Rad, USA), 40  $\mu$ L の 2-Mercaptoethanol, 99% (Cat. No.: 131-14572, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) を加え, よく混合した後, 卓上遠心機にかけ, 95°C で 5 分間インキュベートした後, 室温まで冷ました. 10% Mini-PROTEAN TGX (Cat.No.: 456-1036, Bio-Rad, USA) を泳動装置 Mini-PROTEAN Tetra Cell (Cat.No. 165-8000, Bio-Rad, USA) にセットし, 各ウェルを 1 mL の Running buffer (25 nM 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol <Tris> (Cat. No.: 015-20093, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan), 192 mM glycine (Cat. No.: 077-00735,

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan), 35 mM Sodium Dodecyl Sulfate (Cat. No.: 196-08675, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)) で洗浄した。総タンパク質の定量から各サンプルの総タンパク質が等しくなるようにサンプルをアプライし、マーカーとして Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS PAGE (Cat. No.: 02525-35, Nacalai tesque co. ltd, Japan) 2  $\mu$ L をアプライした。電圧を 100 V に設定し、10 分間泳動した後、200 V に変更し、更に 35 分間泳動した。メンブレン (Nitrocellulose Membrane, Precut, 0.2  $\mu$ m, 7 x 8.4 cm (Cat.No. 1620146, Bio-Rad, USA)) とゲルを数分間 Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 10(v/v)% methanol (Cat. No.: 138-14521, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)) に浸し、ブロットイングフィルター (Extra thick blot paper Filter paper (Cat.No. 1703965, Bio-Rad, USA)), メンブレン, ゲル, ブロットイングフィルターの順で重ね、セミドライ泳動装置 Trans-Blot SD Cell (Cat.No. 1703940JA, Bio-Rad, USA) にセットした。電圧 15 V, 電流 3 A の条件で 60 分泳動した後、メンブレンを切り出し、5(w/v)% BSA-TBST に一時間浸して、ブロッキングを行った。Purified Mouse Anti-E-Cadherin (Cat.No.: 610181, BD Biosciences, USA), Purified Mouse Anti-N-Cadherin (Cat.No.: #610920, BD Biosciences, USA), Rabbit Anti-GAPDH antibody (Cat.No.: ab181603, Abcam, UK) を 5% BSA-TBST でそれぞれ 1:1000, 1:1000, 1:2000 に希釈し、4 °C でオーバーナイトした。オーバーナイトしたサンプルを洗浄液 TBST (0.05(w/v)% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate, 25 mM 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol <Tris> (Cat. No.: 015-20093, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan), 150 mM Sodium Chloride (Cat.No.: 192-13925, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan), pH 7.5)) で 10 分間洗浄し、洗浄液を換え更に 50 分間洗浄した。Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Cat. No.: 115-035-062,



Jackson ImmunoResearch, USA) と Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Cat. No.: 711-035-152, Jackson ImmunoResearch, USA) を 5% BSA-TBST でそれぞれ 1:5000, 1:10000 で希釈し, 1 時間インキュベートした. インキュベート後, 洗浄液 TBST で 10 分間洗浄し, 洗浄液を換え更に 50 分間洗浄した. インキュベート後のサンプルを取り出し, SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Cat.No.: 34075, Thermo Fisher Scientific, USA) に 5 分間浸し, 溶液を吸い取った後, ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare, USA) で測定を行った. 得られたバンドのインテンシティーを ImageJ で定量した.

#### 2.2.10 相補鎖導入による細胞接着評価

Bio-dT<sub>10</sub>-EBA と cEBA (5'-AGCCACCCACCCCCACAGTATCCCCACCCACCCC-3') を DPBST (0.05(w/v)% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) でそれぞれ 500 nM に希釈し, Thermal cycler (Cat.No.: TP600, TAKARA BIO, Japan) を用いて 94°Cで 2 分間加熱した後, 0.1°C/sec. の速さで 25°C まで冷却することでサンプルのアニーリングを行った. ストレプトアビジンコート 96 well プレート (Immobilizer Streptavidin (Cat. No.: 436014, Thermo Scientific Nunc, USA) の各ウェルを 300 μL の DPBST で三回洗浄し, 100 μL の 500 nM ビオチン修飾 Oligo DNA サンプルを加え, 室温で一時間インキュベートした. インキュベート後, 各ウェルを 300 μL の DPBST で三回洗浄した. A549 細胞を細胞数 3×10<sup>4</sup> cells/well になるように播種した. 播種から 24 時間後, 300 μL の 1m M EDTA (EDTA Solution (Cat.No.: 2103-100, BioVision, USA) を Dulbecco's PBS (-) <DPBS (-)> (Cat.No.: 041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical

Corporation, Japan) で希釈) で洗浄した。洗浄前後の細胞数を位相差顕微鏡 (OLYMPUS IX51 (OLYMPUS, Japan)) で撮影し、細胞数をカウントした。

#### 2.2.11 エンドヌクレアーゼ処理による細胞剥離

Oligo DNA 修飾基板に A549 細胞を細胞数  $3 \times 10^4$  cells/well になるように播種した。播種から 24 時間後、培地を除去し、200  $\mu$ L の DPBS (-) (Cat.No.: 041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) で洗浄後、Nuclease BAL-31 (Cat.No.: M0213S, New England Biolabs, USA) の酵素と Reaction Buffer (600 mM NaCl, 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, 0 or 1 mM EDTA, pH 8.0) の混合溶液 (Nuclease : buffer = 10  $\mu$ L : 300  $\mu$ L) または Reaction Buffer のみを 300  $\mu$ L 加え、37°C で 30 分間インキュベートした後、培地に置換し、位相差顕微鏡 OLYMPUS IX51 (OLYMPUS, Japan) で撮影した。

#### 2.2.12 免疫染色

本研究で使用している基板 Immobilizer Streptavidin (Cat. No.: 436014, Thermo Scientific Nunc, USA) はウェルの底が厚いため蛍光顕微鏡観察が困難であったため下記の手法で染色を行った。Immobilizer Streptavidin と MicroWell 96-Well Microplates, F 96 well plate, cell culture, clear, with lid, Sterile (Cat.No.: 167008, Thermo Scientific Nunc, USA) のウェルの底を切り出し、Microplate 6 well with Lid (Cat. No.: 3810-006, AGC TECHNO GLASS CO.,LTD., Japan) に両面テープで固定した。4 mL の DPBS (-)T (0.05(w/v)% Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) で三回洗浄し、4 mL の 500 nM Bio-dT<sub>10</sub>-EBA を加え、室温で 1 時間イン

キュベートした。再度 4 mL DPBST で三回洗浄した後，細胞濃度  $1 \times 10^5$  cells/mL の A549 細胞を 5 mL 播種した。24 時間後，培地を除去し，4 mL の Dulbecco's PBS (-) <DPBS (-)> (Cat.No.: 041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) で三回洗浄した後，4 mL の 4(w/v)% paraformaldehyde-DPBS (-) (paraformaldehyde (Cat. No.: 162-16065, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)) を加え，室温で 15 分間インキュベートした。再び 4 mL DPBS (-) で洗浄後，4 mL の 5(w/v)% glycine-DPBS (-) (glycine (Cat. No.: 072-05285, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)) を加え，15 分間インキュベートした。DPBS (-) で洗浄後，4 mL の 0.5% Triton X-100-DPBS (-) (Triton X-100 (Cat. No.: 596-18621, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)) を加え，5 分間インキュベートした。両面テープで貼り付けた底面を Microplate 12 well with Lid (Cat. No.: 3815-012, AGC TECHNO GLASS CO.,LTD., Japan) に移し替え，2 mL の 5% BSA-DPBS (-) (Albumin, from Bovine Serum (BSA) (Cat. No.: 015-15125, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)) に 30 分間浸し，ブロッキングを行った。Purified Mouse Anti-Paxillin (Cat.No.: 610052, BD Biosciences, USA) を 5% BSA-DPBS (-) で 1:500 に希釈し，各ウェルに 2 mL 加え 4°C でオーバーナイトした。サンプルを三回 2 mL の DPBS (-) で 5 分間洗浄し，Chicken anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Cat.No.: A21200, Thermo Fisher Scientific, USA) を 5% BSA-DPBS (-) で 1:1000 に希釈し，各ウェルに 2 mL 加え，1 時間遮光してインキュベートした。サンプルを三回 2 mL の DPBS (-) で 5 分間洗浄し，乾燥を防ぐため 50% glycerol-DPBS (-) (Glycerol (Cat. No.: 072-04945, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan)) を 2 mL 添加し，カバーガラス NEO micro cover glass (Cat.No.: C025361, Matsunami glass, Japan) を被せた。蛍光観察は

Zeiss Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) でカバーガラス側から行った。

#### 2.2.13 細胞生存率評価

Oligo DNA 修飾基板に各細胞を細胞数  $1 \times 10^4$  cells/well になるように播種した。播種から 48 時間後、300  $\mu$ L の Dulbecco's PBS (-) <DPBS (-)> (Cat.No.: 041-20211, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japan) で 2 回洗浄し、Live-Dead Cell Staining Kit (Cat.No.: 501-100, BioVision, USA) 中の Solution A (1 mM Live-Dye) と Solution B (1 mg/mL PI) を 1  $\mu$ L/mL となるように DPBS (-) で希釈した溶液を 200  $\mu$ L 加え、15 分間静置した後、位相差顕微鏡 (OLYMPUS IX51 (OLYMPUS, Japan)) で撮影した。撮影した画像を ImageJ により解析し、細胞数をカウントした後、生存率を算出した。

#### 2.2.14 細胞増殖能評価

Oligo DNA 修飾基板に各細胞を細胞数  $3 \times 10^3$  cells/well になるように播種した。播種から 2, 24, 48 時間後の細胞数を位相差顕微鏡 (OLYMPUS IX51 (OLYMPUS, Japan)) でカウントした。

#### 2.2.15 RNA 抽出

EBA 修飾基板及び MicroWell 96-Well Microplates, F 96 well plate, cell culture, clear, with lid, Sterile (Cat.No.: 167008, Thermo Scientific Nunc, USA) に各細胞を細胞数  $1 \times 10^4$  cells/well になるように播種した。播種から 24, 48, 72 時間後の RNA を抽出した。RNeasy Mini Kit (Cat.No.: 74104, QIAGEN, Germany) 中の Buffer RLT を 350  $\mu$ L ずつ各ウェルに加え、マイクロピペットで細胞を破碎し、懸濁液を回収した。懸濁液を QIAshredder (Cat.No.: 79654, QIAGEN, Germany) で更にホモジナイズした。

70 (v/v)% エタノールを, 350  $\mu$ L 加え, ピペットでよく混和した. 溶液を RNeasy MinElute Spin Column にアプライし, Centrifuges 5424 R (Eppendorf AG., Germany) で 10000 rpm, 15 秒遠心し, ろ液を捨てた. 更に, 700  $\mu$ L の Buffer RW1 を加え, 10000 rpm で 15 秒遠心操作し, ろ液を捨てた. RNeasy MinElute Spin Column を新しい 2 mL コレクションチューブにセットし, Buffer RPE 500  $\mu$ L を加え, 10000 rpm で 15 秒間遠心し, ろ液を捨てた. 再度 Buffer RPE 500  $\mu$ L を加え, 10000 rpm で 1 分間遠心した. RNeasy MinElute Spin Column を 1.5 mL コレクションチューブにセットし, RNase フリー水 30  $\mu$ L をカラムのメンブレン部分にゆっくりと加え, 15000 rpm で 1 分間遠心し, RNA 溶液を回収した.

#### 2.2.16 mRNA-sequencing による遺伝子発現量解析

ライブラリーの調製は, メーカーの指示に従って, TruSeq stranded mRNA sample prep kit (Cat.No.: 20020594, Illumina, USA) を使用して行った. シーケンスは, 75 base のシングルエンドモードの Illumina HiSeq 2500 (Illumina, USA) プラットフォームで実行された. Illumina Casava1.8.2 ソフトウェアは, ベースコールに使用された. 配列決定されたリードは, Bowtie2 バージョン 2.2.3 および SAMtools バージョン 0.1.19 と組み合わせて TopHat バージョン 2.0.13 を使用し, ヒト参照ゲノム (hg19) 配列にマッピングされた. Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments (FPKM) は, Cufflinks バージョン 2.2.1 を使用して計算された.

#### 2.2.17 統計解析

融解温度, 細胞密度, SPR レスポンス, 相対発現量は平均値 $\pm$ 標準誤差を示す. 2 群間の統計的有

意差検定は R software (R Development Core Team, New Zealand) を使用し, ウェルチの t 検定を行っ

た. 本博士論文では p 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした.

### 第 3 章：分光学的手法に基づいたグアニン四重鎖構造解析法の提案と E-cadherin 結合性 DNA アプタマーの構造推定

### 3.1 序論

グアニン含有量の多い核酸配列は、非ワトソンクリック塩基対部位である G-カルテット構造を分子内に有し、グアニン四重鎖構造を形成しているものがある<sup>41</sup>。グアニン四重鎖は生体内に数多く存在し、遺伝子制御やテロメアの維持など、生物学的プロセスにおける役割についての知見が増えつつある<sup>56-61</sup>。また、生体外においても構造や特徴を活用した低分子、核酸、タンパク質のセンサー等に応用されている<sup>62-65</sup>。従って、グアニン四重鎖の構造及び機能の解明は新薬やセンサー等の開発にとって非常に重要であり、本博士論文における細胞足場材料としての応用においても例外ではない。グアニン四重鎖構造の解析にはいくつかの実験手法が報告されており、それぞれ異なる水準で構造情報を提供する<sup>43</sup>。最も高次元にグアニン四重鎖の構造を決定するには X 線結晶構造解析と NMR 分光法が使用される<sup>54,66-71</sup>。しかし、X 線結晶構造解析における核酸の結晶化には多くの最適条件の決定が必要であるため、解析が長期に及び、結晶化に至らないことがほとんどである。一方、NMR 分光法においては結晶化よりも最適条件の決定が容易であるが、特殊なパルスシーケンスを使用するには専門知識が必要であるだけでなく、シグナルの帰属が非常に困難である。従って、グアニン四重鎖の構造を推定するために、単純な技術や操作によって高次構造に関する情報をより正確に獲得する分析法が求められている。グアニン四重鎖構造の推定には G-カルテット形成グアニンの同定が重要となる。配列に含まれる多数のグアニンから G-カルテット形成グアニンを決定することができれば、その配列が形成するグアニン四重鎖の高次構造の候補を絞ることが可能であり、特に一本鎖の平行型グアニン四重鎖の場合、ループ構造内の相互作用を除いた高次構造をただ一つに決定することができる。G-カルテット形成グアニンの推定には電気泳動に基づく硫酸ジメチル



(Dimethyl sulfate, DMS) フットプリントが報告されている<sup>72</sup>。DMS はグアニンの N7 位をメチル化するため、脱プリンが容易になる。その後、ピペリジンの添加により脱塩基部位での切断が誘導されるが、G-カルテット形成グアニンは Hoogsteen 水素結合により N7 位がメチル化から保護され、切断がほとんど起こらない。DMS フットプリントではこの特徴を利用することで G-カルテット形成グアニンの推定を行うことができる。しかし、DMS フットプリントには放射性同位体標識が必要であり、特殊な測定環境が要求される。以上のように、高度な専門技術と放射性同位体標識なしでグアニン四重鎖構造の G-カルテット形成グアニンに関する立体構造情報を提供する方法は未だに報告されていない。

本章では、三段パラレル型グアニン四重鎖構造を形成する E-cadherin 結合性 DNA アプタマー (E-cadherin-binding DNA aptamer, EBA) の構造推定を目的とし、三段パラレル型グアニン四重鎖における G-カルテット形成グアニンを推定する新しい分光学的手法に基づく分析法を提案する。本手法は核酸配列の網羅的な一塩基アデニン置換体の円偏光二色性 (Circular dichroism, CD) スペクトル測定と紫外可視分光光度計による融解温度 (Melting temperature,  $T_m$ ) 測定を併用することで G-カルテット形成グアニンを推定する。本手法の構築のために、VEGF\_Pu22T12T13 (VPT)<sup>72</sup>, T95-2T<sup>54</sup>, VEGF-Pu22 (VP)<sup>72</sup> の 3 種類の三段パラレル型グアニン四重鎖に関して CD スペクトル測定及び  $T_m$  測定を行った。VPT 及び T95-2T は、NMR 分光法によって高次構造が決定されており、VP の G-カルテット形成グアニンは、DMS フットプリントを使用して推定されている<sup>73,74</sup>。最後に、本章で構築した分析法を利用して EBA の構造推定を行った結果、EBA が三つの長いループ構造を持つにも

関わらず，熱力学的安定性の高いユニークな構造を形成することが示唆された．本章で提案するパラレル型グアニン四重鎖における G-カルテット形成グアニンを推定する新しい分光学的手法に基づく分析法は高度な専門技術と放射性同位体標識を必要とせず，グアニン四重鎖構造を推定するための方法の選択肢の一つになりえる．

## 3.2 結果と考察

### 3.2.1 分光学的手法に基づいたグアニン四重鎖構造解析法の構築

本研究の目的は三段の平行型グアニン四重鎖構造を形成する EBA の構造を推定することである。本目的を達成するために、三段平行型グアニン四重鎖における G-カルテット形成グアニンを推定する新しい分析法の構築を試みた。先行研究より、グアニン四重鎖形成核酸配列の G-カルテット形成グアニンの一つをアデニン (Adenine, A) に置換すると、グアニン四重鎖構造のトポロジーや熱力学的安定性などの構造特性が変化することが報告されている<sup>75</sup>。グアニン四重鎖構造のトポロジーと熱力学的安定性に関する情報はそれぞれ CD スペクトル測定<sup>44,45</sup>,  $T_m$  測定<sup>76</sup>によって獲得することができる。以上の理由から、本研究では、グアニン四重鎖構造形成核酸配列のグアニンを網羅的にアデニン置換し、CD スペクトル測定及び  $T_m$  測定によってトポロジーと熱力学的安定性を評価することで G-カルテット形成グアニンの推定が可能であるという仮説を立て、高次構造が既知である VPT<sup>72</sup>, T95-2T<sup>54</sup>, VP<sup>72</sup> の三つの配列で検証した。

はじめに、VPT と一塩基アデニン置換体の CD スペクトルを測定した (図 8)。VPT は VP<sup>72</sup> の 12 番目と 13 番目のグアニンをチミンに置換した 22 塩基の配列であり、NMR 分光法によって高次構造が決定されている<sup>18</sup>。VPT は配列内に三つ以上のグアニンが連続する部位 (以後、G-run と明記する) を四つ有しており (図 8A)、三段の平行型グアニン四重鎖構造を形成する (図 8B)。VPT のそれぞれの G-run のグアニンを、一塩基ずつアデニンに置換し (表 2)、CD スペクトルを測定した (図 8C)。VPT の CD スペクトルは平行型グアニン四重鎖に特有の 265 nm に正、240 nm に負のコットン効果が確認された<sup>77</sup> (図 8C, 破線)。G-カルテット形成グアニンである G3, G4,

G5 (G-run I), G7, G8, G9 (G-run II), G14, G15, G16 (G-run III), G18, G19, G20 (G-run IV) をそれぞれアデニンに置換した配列では, VPT と比較して大きく CD スペクトルが変化した (図 8C). 特に G19 をアデニンに置換した配列においてはグアニン四重鎖構造のトポロジーが平行型からアンチ平行型に変化していることが明らかとなった. この結果は, グアニン四重鎖形成核酸配列の一部を置換することによって, 本来形成する高次構造や機能に大きな影響を与えうることを示している. この結果は G-カルテット形成グアニンをアデニンに置換したことにより, VPT のトポロジーが変化したことを示している. 一方, G-カルテット非形成グアニンである G2 (G-run I), G21 (G-run IV) をアデニンに置換した場合には VPT と比較して CD スペクトルにほとんど変化がなく, トポロジーに影響を与えないことが確認された (図 8C). 以上の結果から, NMR 分光法によって決定された VPT<sup>72</sup> の G-カルテット形成グアニンを, 網羅的な一塩基アデニン置換と CD スペクトル測定によって推定できることが示された.

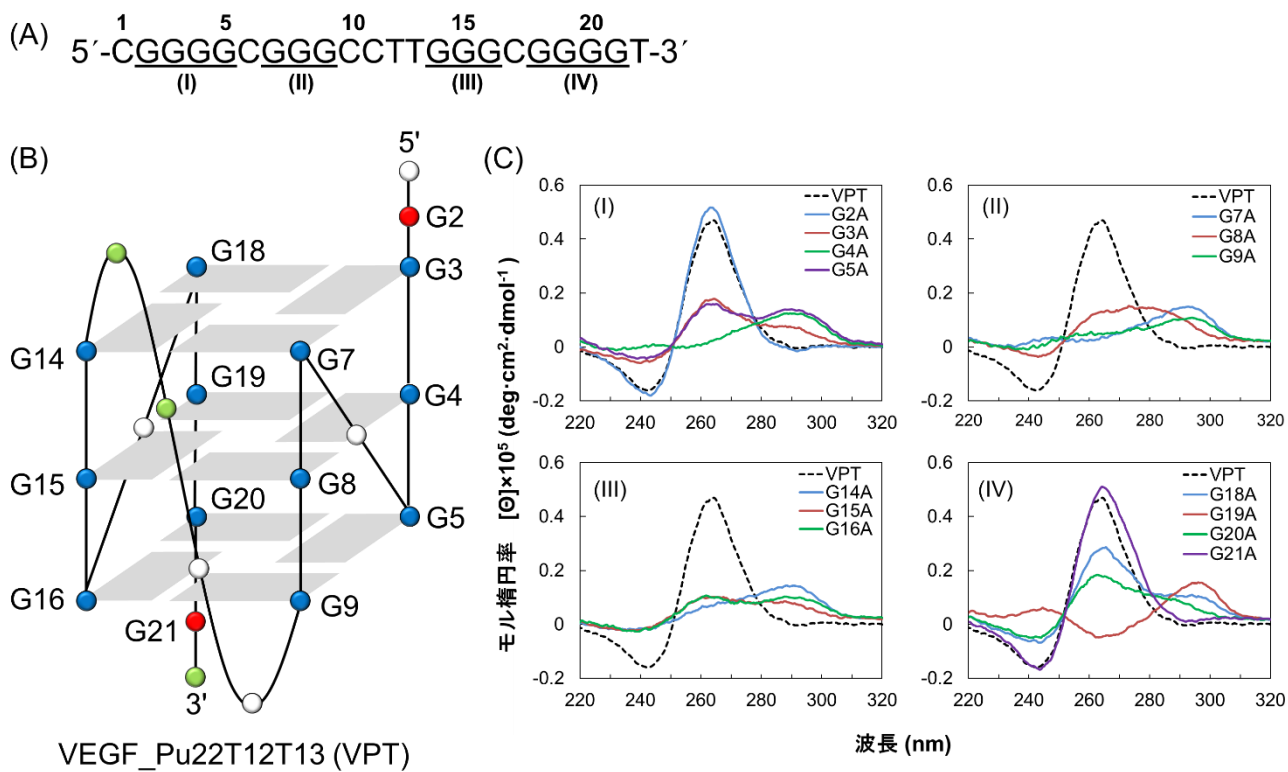


図 8. VPT と一塩基アデニン置換体の CD スペクトル.

(A) VPT の配列. 上部の数字は塩基番号を示し, 下線は G-run を示している. (B) VPT の三次元構造. PDB ID 2M27 を元に作成した. 青色は G-カルテット形成グアニン, 赤色は G-カルテット非形成グアニン, 白色はシトシン, 緑色はチミンをそれぞれ示している. (C) VPT と一塩基アデニン置換体の CD スペクトル. ssDNA 濃度: 4  $\mu$ M, バッファー: 40 mM KCl, 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2).

次に、T95-2T と一塩基アデニン置換体の CD スペクトルを測定した (図 9C). T95-2T は配列内に G-run を四つ有しており、全てのグアニンが G-カルテット形成部位である単純な 18 塩基の配列である<sup>54</sup> (図 9A). T95-2T は NMR 分光法によって高次構造が決定されており、三段の平行型グアニン四重鎖構造を形成する (図 9B)<sup>19</sup>. T95-2T のそれぞれの G-run のグアニンを、一塩基ずつアデニンに置換し (表 3), CD スペクトルを測定した (図 9C). T95-2T の CD スペクトルは平行型グアニン四重鎖に特有の 265 nm に正、240 nm に負のコットン効果が確認された (図 9C, 破線). 一方、一塩基アデニン置換配列では VPT の結果と異なり、G-run III の G11 を除く全ての置換配列で CD スペクトルの変化が確認されなかった. この結果は、T95-2T では G-カルテット形成グアニンをアデニンに置換した場合でも、CD スペクトルだけでは構造変化の情報を獲得することができないということを示しており、グアニン四重鎖構造核酸配列の違いによって一塩基アデニン置換が高次構造に与える影響が異なる可能性があることを示している. T95-2T の一塩基アデニン置換による構造への影響を更に調査するために、T95-2T の  $T_m$  測定を行った. グアニン四重鎖構造の熱力学的安定性の指標となる  $T_m$  値は、295 nm における温度依存的な吸光度の変化から算出することができる<sup>76</sup>. 測定の結果、T95-2T の  $T_m$  値は  $74.4 \pm 0.8$  °C と高い熱力学的安定性を有していることが確認された. 一方、T95-2T の G-カルテット形成グアニンを一塩基アデニン置換した配列は全て  $T_m$  が大きく低下した (図 9D). この結果は、G-カルテット形成グアニンの一塩基アデニン置換によって、グアニン四重鎖構造の熱力学的安定性が低下することを示すものである. 以上の結果から、G-カルテット形成グアニンの一塩基アデニン置換配列の CD スペクトル測定によってトポロジーの変化が確認されなかった場合でも、 $T_m$  測定を併用することによって、G-カルテット形成グアニ

ンを推定することができることが示唆された.

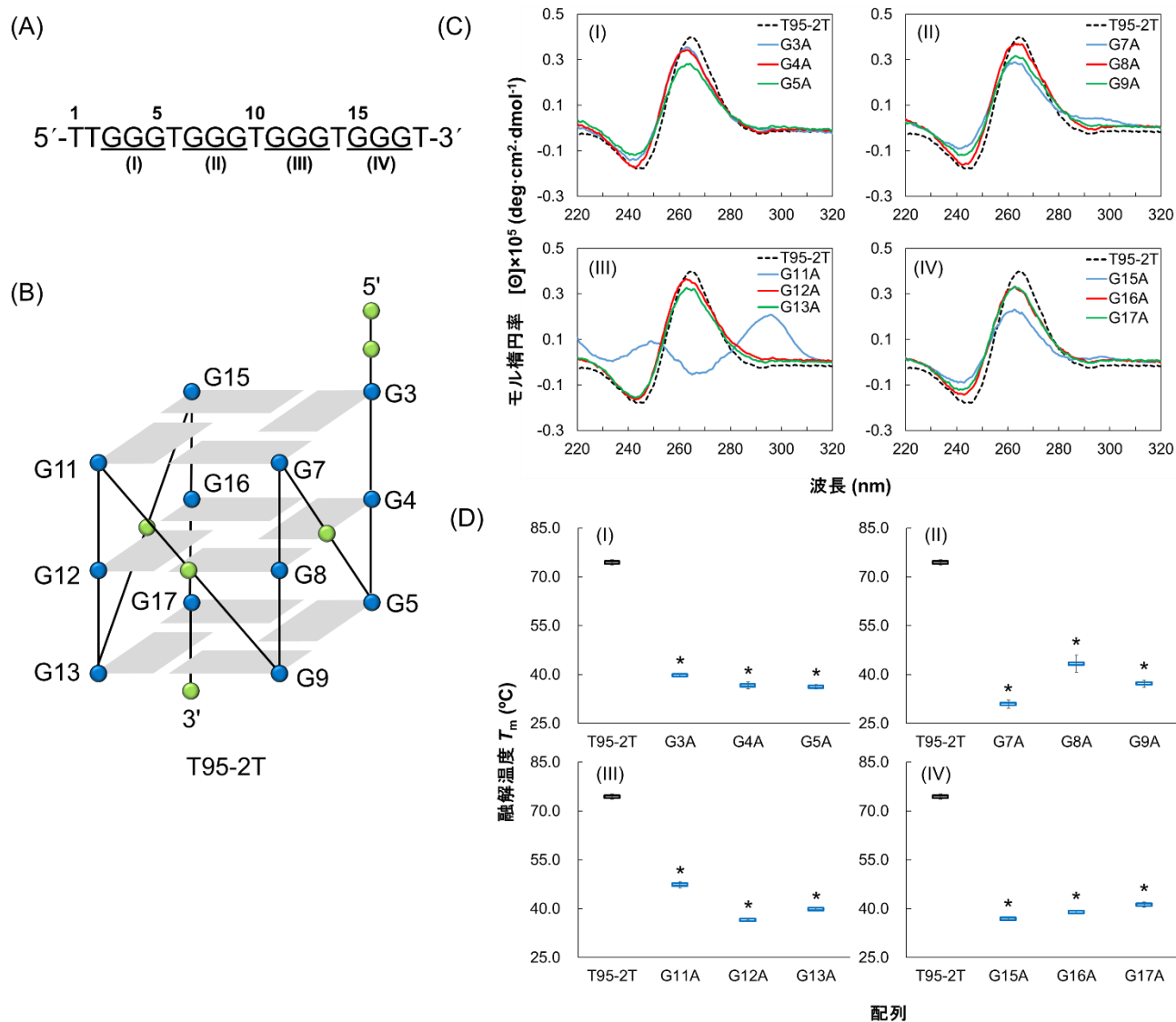


図 9. T95-2T と一塩基アデニン置換体の CD スペクトル及び  $T_m$  値.

(A) T95-2T の配列. 上部の数字は塩基番号を示し, 下線は G-run を示している. (B) T95-2T の三次元構造. PDB ID 2LK7 を元に作成した. 青色は G-カルテット形成グアニン, 緑色はチミンをそれぞれ示している. (C) T95-2T と一塩基アデニン置換体の CD スペクトル. (D) T95-2T と一塩基アデニン置換体の  $T_m$  値. T95-2T の  $T_m$  値 =  $74.4 \pm 0.8$  °C を黒色, G-カルテット形成グアニン置換の  $T_m$  値を青色で示している. 全ての  $T_m$  値は  $n \geq 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. \*は T95-2T との有意差 (t 検定,  $p < 0.05$ ) を示している. ssDNA 濃度:  $4 \mu\text{M}$ , バッファー: DPBS (-) ( $137 \text{ mM NaCl}$ ,  $2.7 \text{ mM KCl}$ ,  $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ , and  $1.5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4).



これまでの結果を元に、VEGF のプロモーター領域に存在する VP<sup>72</sup> の CD スペクトル測定及び  $T_m$  測定を行った。VP は DMS フットプリントにより G-カルテット形成グアニンが推定されている 22 塩基の三段平行型のグアニン四重鎖である<sup>18</sup>。VP は VPT, T95-2T と同様に配列内に四つの G-run を有しており (図 10A), 図 10B のような構造を形成していることが推定されている。VP のそれぞれの G-run のグアニンを、一塩基ずつアデニンに置換し (表 4), CD スペクトルを測定した (図 10C)。VP の CD スペクトルは平行型グアニン四重鎖に特有の 265 nm に正, 240 nm に負のコットン効果が確認された (図 10C, 破線)。CD スペクトル測定の結果から、G-run IV の G19 をアデニンに置換した場合、グアニン四重鎖構造を形成していないことが明らかとなった。この結果は G19 が VP のグアニン四重鎖構造形成に重要、つまり G-カルテット形成グアニンの一つであることを示している。G19 は先行研究の DMS フットプリントによって G-カルテット形成グアニンであることが明らかとなっており、アデニン置換体による CD スペクトル測定によっても G-カルテット形成グアニンを推定できることが示された。次に、グアニン四重鎖構造を形成していない G19 置換を除いた一塩基アデニン置換配列の  $T_m$  測定を行った (図 10D)。測定の結果、全ての G-run で、VP と比較して  $T_m$  値の低い置換配列、つまりアデニン置換によって熱力学的安定性が下がった連続配列を  $T_m$  値の低いものから三つ (G-run IV の場合二つ) ずつ選択すると、先行研究の DMS フットプリントによって推定された G-カルテット形成グアニンと一致することが明らかとなった。G-run III では他の G-run と比較して VP 及びアデニン置換配列間の  $T_m$  値の差が小さくなっている。 $T_m$  値の差が小さいのは、G-run III では G-カルテット形成部位になり得るグアニンが五つ存在しており、一つの G-カルテット形成グアニンがアデニンに置換された場合でも、本来 G-

カルテット非形成部位であったグアニンが新たな G-カルテット形成グアニンとして安定なグアニン四重鎖構造を形成する可能性が高いためであると考察した。また、先行研究において、三段のアンチパラレル型グアニン四重鎖形成核酸配列のグアニンを網羅的に一塩基アデニン置換すると、中段のグアニンをアデニンに置換した場合に最も熱力学的安定性が低下することが報告されている<sup>75</sup>。

一方、本研究で検証した三段のパラレル型グアニン四重鎖形成核酸配列においては熱力学的安定性の指標である  $T_m$  の低下傾向は各 G-run で異なっていた。この結果は、グアニン四重鎖構造のトポロジーの違いによって、アデニン置換による影響が異なることを示している。

VPT, T95-2T, VP の三つの三段パラレル型グアニン四重鎖構造の分光学的解析の結果から、図 11 に示す新たな分析法を提案する。手順は以下の通りである。1. 三段パラレル型グアニン四重鎖構造を形成する核酸配列とその配列に含まれる全ての G-run のグアニンを一塩基ずつ網羅的にアデニンに置換した配列を用意する。2. CD スペクトル測定を行い、置換前後のトポロジーの変化を観察する。置換配列においてトポロジーに大きな変化が確認された場合は、置換されたグアニンが G-カルテット形成グアニンであることが推定される。3. CD スペクトル測定において大きなトポロジー変化が無かった置換配列は  $T_m$  測定を行う。三段のグアニン四重鎖形成核酸配列の G-カルテットは三つの連続したグアニンによって形成されているため、各 G-run において  $T_m$  値の低い置換配列を手順 2. で推定された G-カルテット形成グアニンと合わせて三つになるように選択することで全ての G-カルテット形成グアニンが推定される。以上のように、定性的な CD スペクトル測定に定量的な  $T_m$  測定を加えることで、G-カルテット形成グアニンの推定を行うことができる。

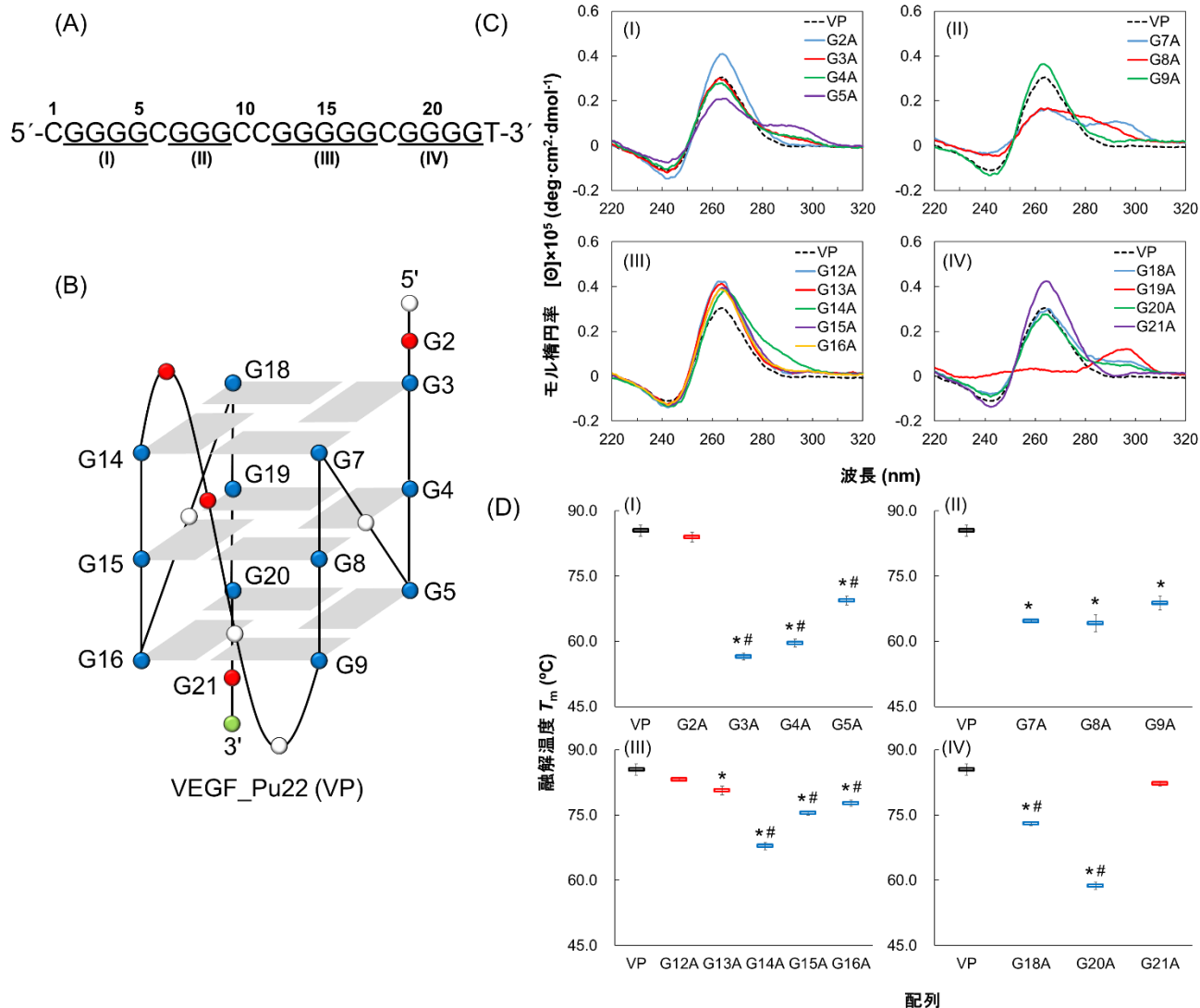


図 10. VP と一塩基アデニン置換体の CD スペクトル及び  $T_m$  値.

(A) VP の配列. 上部の数字は塩基番号を示し, 下線は G-run を示している. (B) VP の三次元構造. PDB ID2M27 を元に作成した. 青色は G-カルテット形成グアニン, 赤色は G-カルテット非形成グアニン, 白色はシトシン, 緑色はチミンをそれぞれ示している. (C) VP と一塩基アデニン置換体の CD スペクトル. (D) VP と一塩基アデニン置換体の  $T_m$  値. VP の  $T_m$  値 =  $85.5 \pm 1.3$  °C を黒色, G-カルテット形成グアニン置換の  $T_m$  値を青色, G-カルテット非形成グアニン置換の  $T_m$  値を赤色で示している. 全ての  $T_m$  値は  $n \geq 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. \* は VP との有意差, # は G-カルテット非形成グアニン置換との有意差 (t 検定,  $p < 0.05$ ) を示している. ssDNA 濃度: 4  $\mu$ M, バッファー: 70 mM KCl, 25 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0).

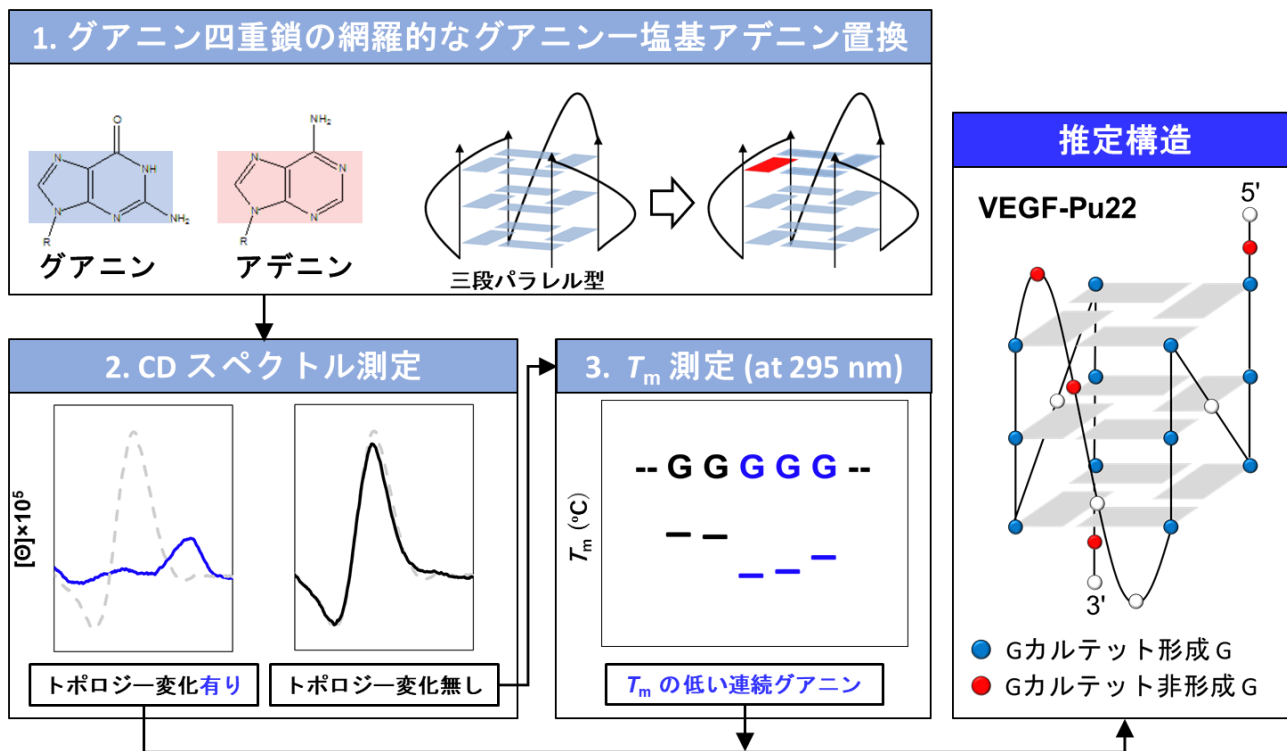


図 11. 分光学的手法に基づいた三段パラレル型グアニン四重鎖構造解析法.

1. グアニン四重鎖形成核酸配列の網羅的なグアニン-塩基アデニン置換. 2. CD スペクトル測定. アデニン置換配列のトポロジーが置換前と大きく変化した場合, 置換したグアニンが G-カルテット形成グアニンであることが推定される. 置換前後でトポロジーに大きな変化が確認されなかった場合,  $T_m$  測定に進む. 3.  $T_m$  測定によって熱力学的安定性の低い連続したグアニンを選択することで G-カルテット形成グアニンが推定される.

### 3.2.2 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーの構造推定

1.4.2 で述べたように、EBA は一本鎖三段平行型グアニン四重鎖を形成し、配列内に G-run を四つ有している (図 12A). 3.2.1 で構築した三段平行型グアニン四重鎖構造解析法を利用し、EBA の構造推定を行った. EBA のそれぞれの G-run のグアニンを、一塩基ずつアデニンに置換し (表 5), CD スペクトルを測定した (図 12B). EBA の CD スペクトルは平行型グアニン四重鎖に特有の 265 nm に正, 240 nm に負のコットン効果が確認された (図 12B, 破線). CD スペクトル測定の結果, EBA の G-run III の G9 をアデニンに置換した場合, トポロジーが大きく変化し, グアニン四重鎖構造を形成していないことが示された. 従って, G9 は G-カルテット形成グアニンであると推定される. 次に, EBA 及び一塩基アデニン置換配列の  $T_m$  測定を行った (図 13B). G-run I 及び G-run III においては,  $T_m$  値の低い順に連続したグアニンを三つずつ選択することで, G2, G3, G4 (G-run I), G22, G23, G24 (G-run III) がそれぞれ G-カルテット形成グアニンであることが推定された. G-run II においては CD スペクトル測定の結果から推定された G9 に加え, G10, G11 が G-カルテット形成グアニンであることが推定される. G-run IV はグアニンが三つであるため, G30, G31, G32 全てのグアニンが G-カルテット形成グアニンであり, 熱力学的安定性が EBA と比較して大きく低下していた. 本手法によって推定した G-カルテット形成グアニンを元に EBA の推定構造を作成した結果, EBA は三つの長いループを持つグアニン四重鎖構造を形成していることが明らかとなった (図 14). 一般的に, グアニン四重鎖の熱力学的安定性はループ配列が長くなるほど低くなる<sup>78</sup>. EBA は三つのループ配列塩基数の合計が 19 塩基であるにも関わらず, 全てのループが 1 塩基で構成されている T95-2T に匹敵する熱力学安定性を有している (T95-2T の  $T_m$  値 =

74.4±0.8 °C, EBA の  $T_m$  値 = 71.1±0.3 °C). これまでに報告された生体内において最も長いループ構造を持つグアニン四重鎖は Bcl2-1245 であり, 中央に 13 塩基のループ配列を有している<sup>79</sup>. しかし, Bcl2-1245 の両端のループ構造はそれぞれ 1 塩基で構成されており, ループ配列塩基数の合計は 15 塩基である. EBA は生体内条件に近い DPBS (-) 中でループ配列塩基数の合計が 19 塩基であるにもかかわらず, 高い熱力学的安定性を有しており, これまでに報告のないユニークな構造を形成している可能性が示唆された.

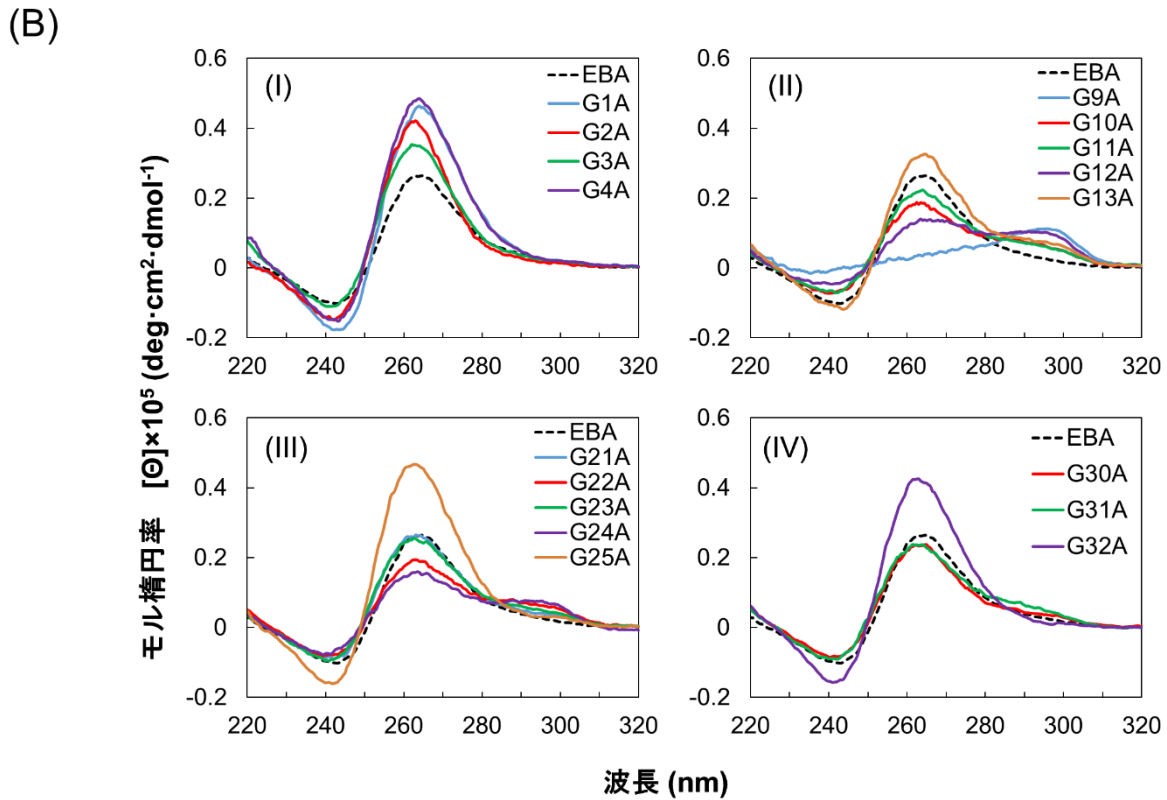


図 12. EBA と一塩基アデニン置換体の CD スペクトル.

(A) EBA の配列. 上部の数字は塩基番号を示し, 下線は G-run を示している. (B) EBA と一塩基アデニン置換体の CD スペクトル. ssDNA 濃度: 4  $\mu$ M, バッファー: DPBS (-) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4).

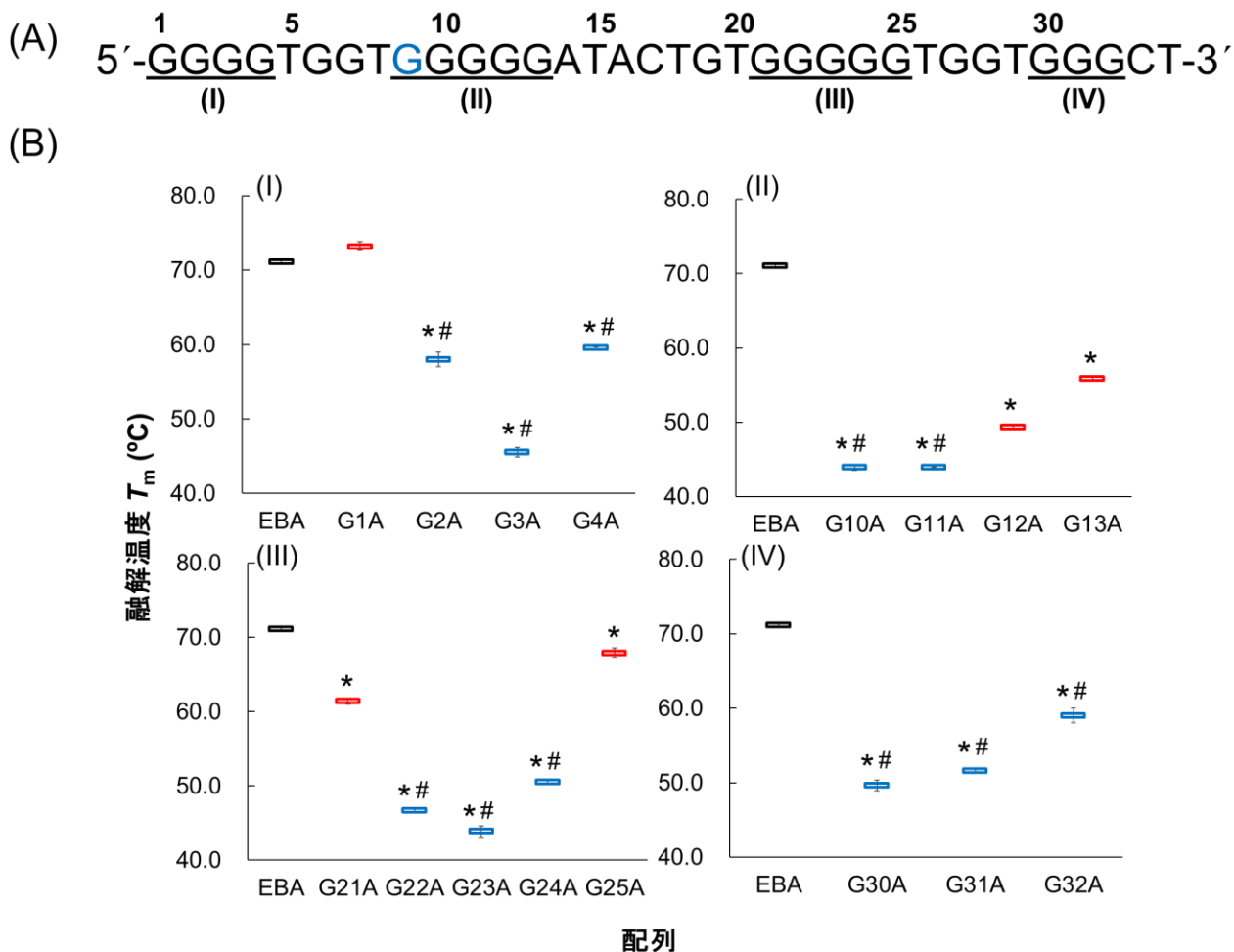


図 13. EBA と一塩基アデニン置換体の CD スペクトル.

(A) EBA の配列. 上部の数字は塩基番号を示し, 下線は G-run を示している. CD スペクトルによって G-カルテット形成グアニンと推定された G9 を青色で示している. (B) EBA と一塩基アデニン置換体の  $T_m$  値. EBA の  $T_m$  値 =  $71.1 \pm 0.3$  °C を黒色, G-カルテット形成グアニン置換の  $T_m$  値を青色, G-カルテット非形成グアニン置換の  $T_m$  値を赤色で示している. 全ての  $T_m$  値は  $n \geq 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. \*は EBA との有意差, # は G-カルテット非形成グアニン置換との有意差 (t 検定,  $p < 0.05$ ) を示している. ssDNA 濃度:  $4 \mu\text{M}$ , バッファー: DPBS (-) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , and 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4).



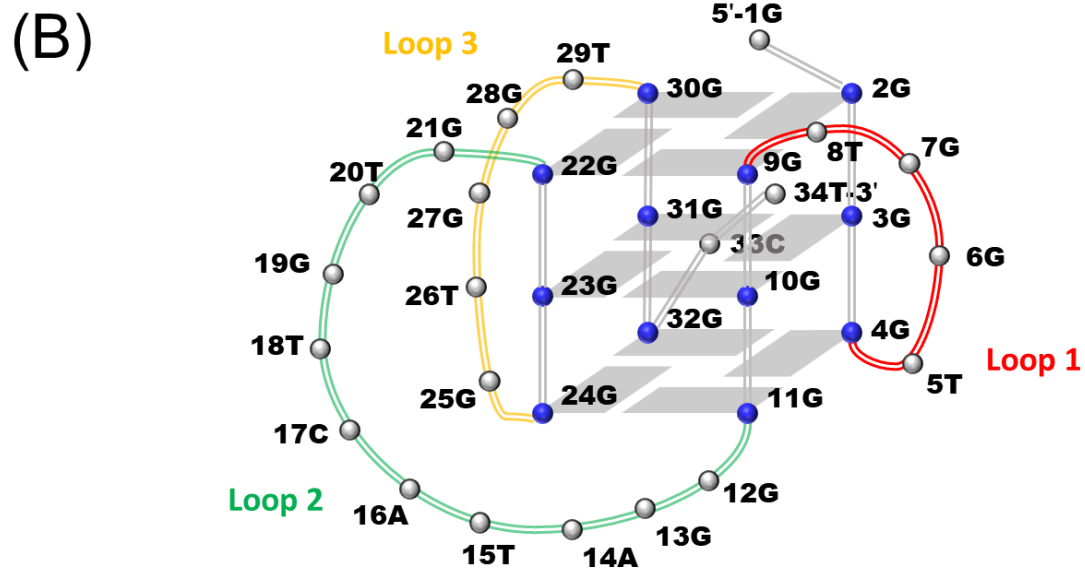


図 14. EBA の配列と推定構造.

(A) EBA の配列. 上部の数字は塩基番号を示し, G-カルテット形成グアニンを青色で示している.

Loop 1 配列を赤色, Loop 2 配列を緑色, Loop 3 配列を黄色の下線で示している. (B) EBA の推定

構造. G-カルテット形成グアニンを青色で示している. Loop 1 配列を赤色, Loop 2 配列を緑色,

Loop 3 配列を黄色で示している.

### 3.3 結論

本章では、三つの既知の三段平行型グアニン四重鎖構造形成配列を元に、円偏光二色性 (Circular dichroism, CD) スペクトル測定と紫外可視分光光度計による融解温度 (Melting temperature,  $T_m$ ) 測定を併用した G-カルテット形成グアニン推定法を構築した。本研究で構築した分光学的手法に基づく分析法は高度な専門技術と放射性同位体標識、特殊な測定環境を必要とせず、グアニン四重鎖構造を推定するための方法の選択肢の一つになりえる。構築した解析法を元に EBA の構造推定を行った結果、EBA が三つの長いループ配列を有しているにも関わらず、高い熱力学的安定性を有しているユニークな構造を形成していることが示唆された。

## 第 4 章 : E-cadherin 結合性 DNA アプタマーを介した細胞接着様式と機能解析

## 4.1 序論

DNA アプタマーは、安価に化学合成が可能で、熱安定性や保存性が高く、標的分子に対して高い結合能を有する生体高分子である<sup>37</sup>。細胞表面タンパク質を標的とし、細胞機能を制御する核酸アプタマーは数多く報告されているが、細胞接着を誘導し、高い生存率と増殖能を維持したまま、細胞機能を制御できる細胞培養足場材料として機能するような核酸アプタマーは未だ報告されていない。本章では、DNA アプタマーを利用した細胞培養足場材料の構築を目指し、EBA 修飾基板における細胞接着様式の解析と EBA 修飾基板が細胞機能に与える影響の評価を行った。具体的には、EBA による細胞表面染色、EBA の細胞接着モチーフ解析、細胞選択性、相補鎖導入による細胞接着制御及びエンドヌクレアーゼによる細胞剥離、細胞接着斑染色を評価した結果、EBA 修飾基板における細胞接着が EBA と E-cadherin の相互作用によって誘起されていることが示唆され、細胞生存率と細胞増殖能が通常培養環境と同等であることを明らかにした。更に、EBA がシグナル伝達に与える影響を遺伝子発現解析によって評価した結果、EBA が E-cadherin と  $\beta$ -catenin の複合体形成を誘発し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを負に調節する可能性があることが示された。

## 4.2 結果と考察

### 4.2.1 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーによる細胞染色

1.4.1 で示したように, EBA は E-cadherin の細胞外ドメインに対して解離定数 0.61 nM と高い結合能を有していることが SPR センサーによる相互作用解析から明らかになっている. EBA が細胞表面上の E-cadherin に結合することを確認するために, FITC 修飾 EBA と Alexa Fluor 594 修飾 E-cadherin 抗体を利用したヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞株 A549 細胞の E-cadherin 共染色を行った (図 15). 染色の結果, EBA と塩基数の等しいコントロール配列であるランダム 34 塩基配列 R<sub>34</sub>(表 6) と比較して, EBA では E-cadherin 抗体と同様に, E-cadherin の局在が予想される細胞膜が染色されていることが示された (図 15). 1.4.1 で示した SPR センサーによる結果と E-cadherin 抗体との共染色の結果から, EBA が細胞表面の E-cadherin と結合することが示唆された.

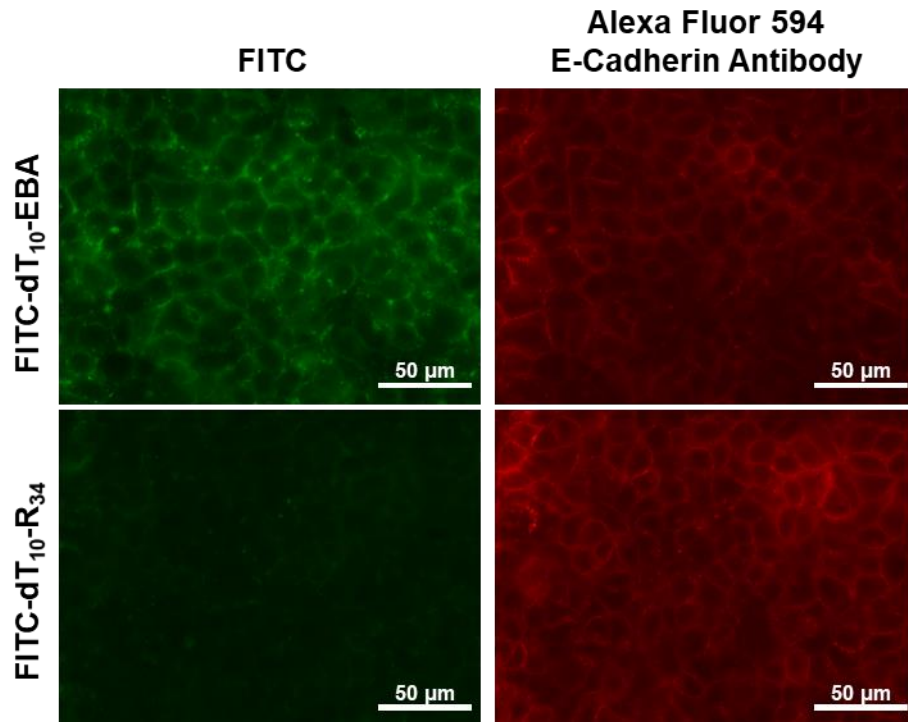


図 15. EBA と E-cadherin 抗体による E-cadherin の共染色.

A549 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュに  $1 \times 10^6$  cells 播種し, 24 時間後に染色後, 蛍光顕微鏡画像を取得した. 緑色の蛍光は FITC, 赤色の蛍光は Alexa Fluor 594 を示している. FITC 修飾 DNA 濃度:  $1 \mu\text{M}$ , Alexa Fluor 594 修飾 E-cadherin 抗体濃度:  $2 \mu\text{g/mL}$ .

#### 4.2.2 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーの細胞接着モチーフ解析

1.4.2 において, EBA 修飾表面上に A549 細胞が接着することが示された. 更に, EBA 上に接着した細胞は二価の金属イオンキレート剤である EDTA による洗浄でも剥離が起こらず, 細胞-ECM 間接着ではない細胞-DNA 間の新しい結合様式をとっていることが示唆されている. 第 3 章において, EBA は三つの長いループ構造を有するグアニン四重鎖を形成することが示されたが, 細胞接着能と EBA の構造との関係性は明らかとなっていない. EBA の細胞接着モチーフを明らかにするために, EBA の各ループ構造をチミン (Thymine, T) に置換したビオチン修飾配列 (表 7) をストレプトアビジン基板に固定化し, 細胞接着の様子を位相差顕微鏡で撮影した (図 16). 位相差顕微鏡画像を元に, EDTA 洗浄前後の細胞接着数を定量した結果を図 17A に示す. 定量結果から, EDTA 洗浄前後共に細胞接着数は EBA, Loop 1T, Loop 2T, Loop 3T の順で減少していった. 特に, EBA の Loop 3 を全てチミンに置換した Loop 3T において最も顕著に細胞接着数が減少した. この結果は, EBA の細胞接着能において Loop 3 構造が重要な役割を担っていることを示すものである. 各ループ構造の置換による細胞接着能の変化と E-cadherin との関係性を明らかにするために, SPR センサーによる相互作用解析を行った (図 17B). SPR センサーによる相互作用解析の結果から, 各 DNA 配列と E-cadherin との結合量は EBA, Loop 1T, Loop 2T, Loop 3T の順で減少しており, この結果は細胞接着能での結果と一致していた. 以上の結果は, EBA の Loop 3 が細胞接着能に重要であることに加え, EBA 修飾基板における細胞接着現象と, EBA と E-cadherin の結合との間に相関関係があることを示している. EBA の細胞接着モチーフに関する情報を更に詳しく考察するため, 各ループ置換配列の CD スペクトル及び  $T_m$  測定を行った (図 18). CD スペクトルの結果から, EBA,

Loop 1T, Loop 3T において 265 nm 付近に正, 240 nm 付近に負のコットン効果が確認され, パラレル型グアニン四重鎖構造形成の傾向があることが明らかとなった (図 18A). 一方,  $T_m$  測定の結果から, 各ループ置換配列の熱力学的安定性は EBA と比較して大きく下がっていることが示された (図 18B). 特に EBA の Loop 2 を全てチミンに置換した Loop 2T ではトポロジーの変化と熱力学的安定性の低下が顕著であった. この結果は, EBA の高次構造形成において Loop 2 が最も重要な役割を担っていることを示している. 細胞接着評価は細胞培養条件である 37°C で行っているため,  $T_m$  値が 37°C を下回っている Loop 2T と Loop 3T は高次構造が不安定になっていることが予想される. 実際に細胞接着量は, EBA, Loop 1T よりも Loop 2T, Loop 3T の方が少なくなっている (図 17A). 一方, Loop 2T が EBA と比較して最もトポロジー, 熱力学的安定性共に変化しているにもかかわらず, 最も細胞接着が少なかったのは Loop 3T であった. この結果は, EBA の細胞接着能には, 高次構造の安定性よりも Loop 3 配列の有無が重要であることを示唆している. しかし, Loop 1T, Loop 2T は細胞接着モチーフと予想される Loop 3 構造を有しているにもかかわらず EBA よりも細胞接着量が低下していることから, Loop 3 構造だけでなく, EBA の安定なパラレル型グアニン四重鎖の高次構造も細胞接着において重要な役割を担っていると考えられる.



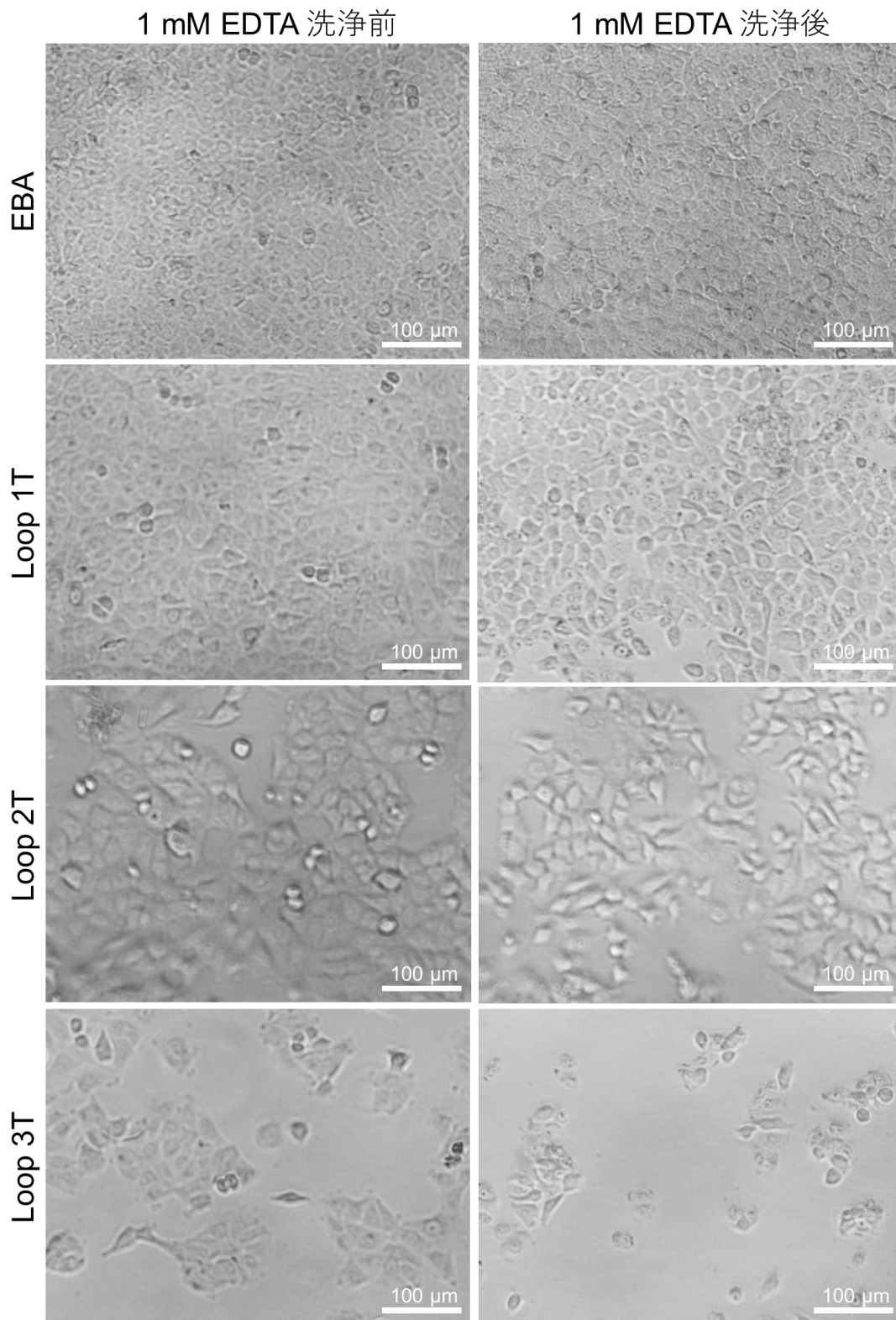


図 16. EBA 及び EBA のループ構造置換配列修飾基板における細胞接着.

A549 細胞を各 DNA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し, 24 時間後 (左) と 1 mM EDTA 洗浄後 (右) の位相差画像.

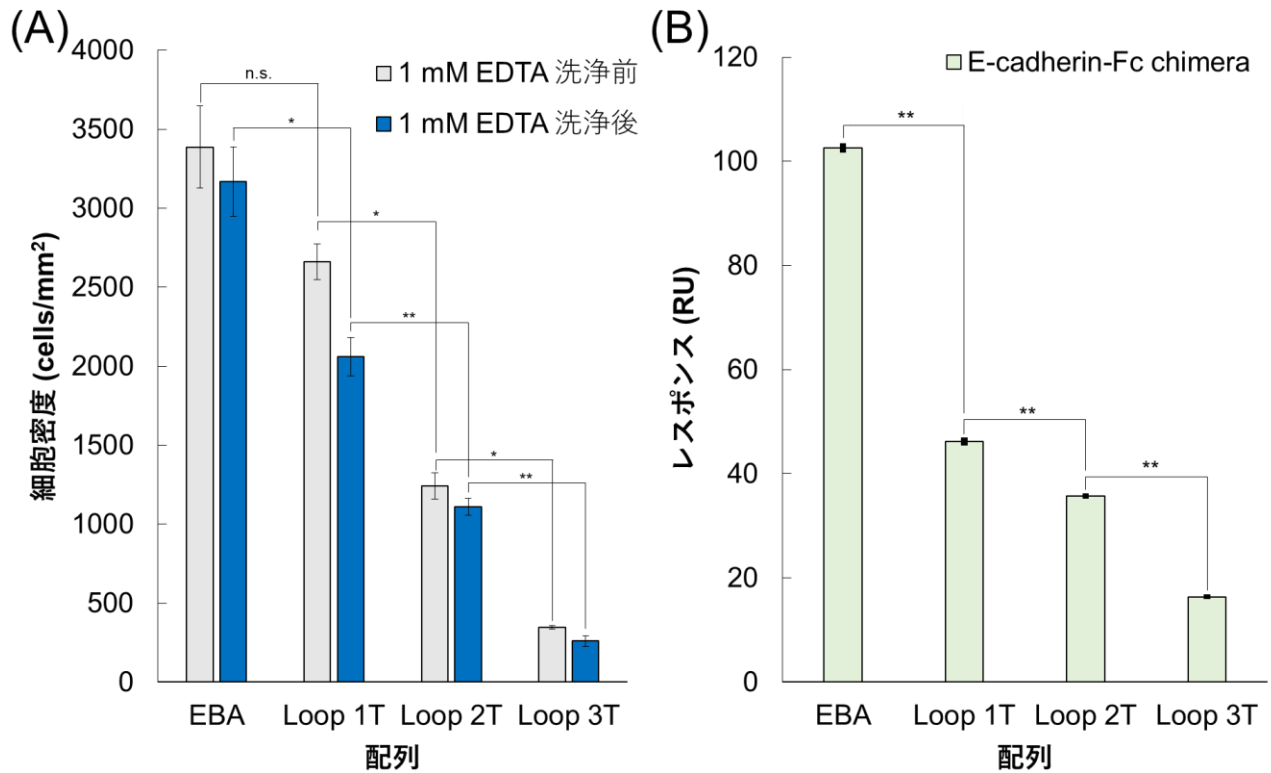


図 17. EBA 及び EBA のループ構造置換配列修飾基板における細胞接着と E-cadherin との相互作用解析.

(A) A549 細胞を各 DNA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し, 24 時間後 (灰色) と 1 mM EDTA 洗浄後 (青色) における細胞密度. 細胞密度は  $n \geq 6$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. (B) 各 DNA 修飾センサーチップに 80 nM E-cadherin-Fc chimera を添加した際の SPR レスポンス. レスポンスは  $n \geq 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. \*は有意差 (t 検定,  $p < 0.05$ ), \*\*は有意差 (t 検定,  $p < 0.01$ ) を示している. n.s. は統計的に有意差が無いことを示している.

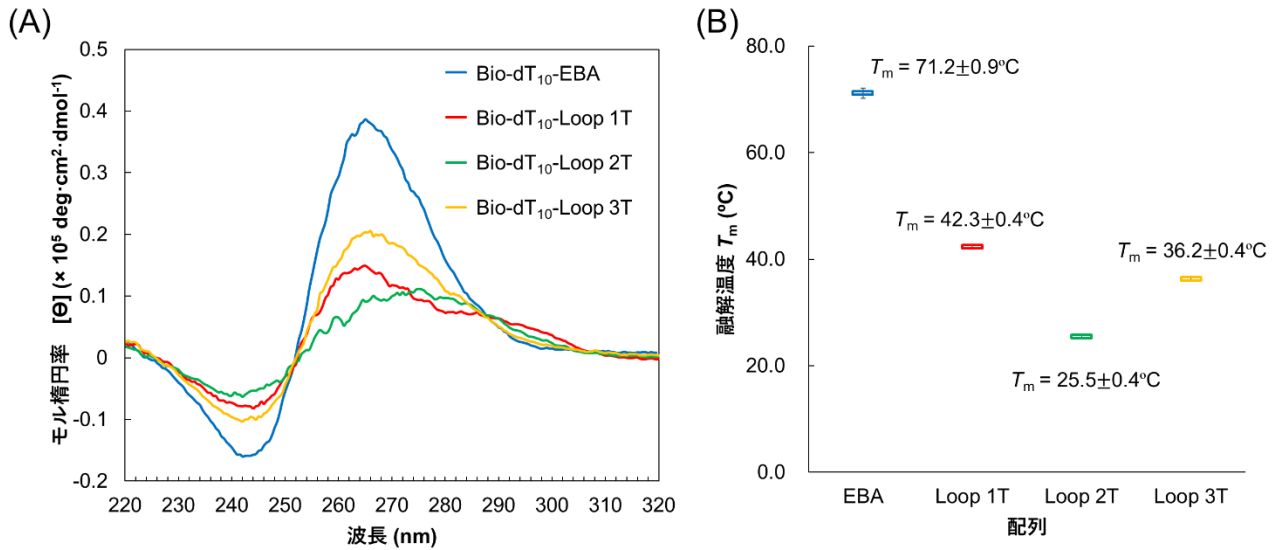


図 18. EBA 及び EBA のループ構造置換配列の CD スペクトル及び  $T_m$  値.

(A) EBA 及び EBA のループ構造置換配列の CD スペクトル. (B) EBA 及び EBA のループ構造置換配列の  $T_m$  値. 全ての  $T_m$  値は  $n \geq 3$ , 平均値 ± 標準誤差で示している. ssDNA 濃度: 4  $\mu$ M, バッファー: DPBS (-) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4).

#### 4.2.3 E-cadherin 結合性 DNA アプタマーの細胞選択性

EBA 修飾基板における細胞接着の細胞選択性を評価するために、異なるカドヘリン種の発現が予想される細胞種を EBA 修飾基板に播種し、接着評価を行った。図 19 は主に E-cadherin の発現が予想される上皮 (様) 細胞である HeLa, HuH-7, A549, MCF-7 細胞の EBA 修飾基板における細胞接着の位相差画像である。一方、図 20 は主に N-cadherin の発現が予想される間葉系幹細胞である ADSC, BMSC, UE7T-13 細胞, 主に VE-cadherin の発現が予想される血管内皮細胞 HUVEC-2 細胞の EBA 修飾基板における細胞接着の位相差画像である。図 19 及び図 20 の位相差画像から細胞数を定量した (図 21)。細胞数の定量結果から、EDTA 洗浄前後共に主に E-cadherin の発現が予想される上皮細胞において多くの細胞接着が確認された。一方、主に N-cadherin の発現が予想される ADSC, BMSC 細胞では細胞接着が起こらず、UE7T-13 細胞では興味深いことに細胞接着が起こったが、EDTA 洗浄によって細胞の剥離が起こった。同様に、主に VE-cadherin の発現が予想される HUVEC-2 細胞においても細胞接着と EDTA による細胞剥離が確認された。この結果から、EBA 修飾表面において、UE7T-13 と HUVEC-2 は細胞-ECM 間接着を形成していることが示された。しかし、二価の金属イオン非依存的な細胞-DNA 間のユニークな接着特性は E-cadherin 発現が予想される細胞でのみ観察されており、EBA は高い細胞選択性を有することが明らかとなった。これらの細胞接着特性が、細胞表面の E-cadherin 発現量に起因することを更に証明するため、TGF- $\beta$ 1 による形質転換を行った。TGF- $\beta$ 1 は転写因子 Snail, Slug, AT-hook 2, delta-crystallin / E2-box factor 1 の誘導を介して、E-cadherin の mRNA 発現を抑制する<sup>80</sup>。TGF- $\beta$ 1 処理の結果、A549 細胞の形質転換の様子が観察された (図 22A)。TGF- $\beta$ 1 処理した細胞の E-cadherin 及び N-cadherin のタンパク質

発現量を Western blotting によって定量した (図 22B). Western blotting の結果から, TGF- $\beta$ 1 処理した A549 細胞の E-cadherin 発現量は約 75% 減少し, N-cadherin の発現量は約 4.5 倍となった (図 22C). TGF- $\beta$ 1 処理によって E-cadherin の発現量が低下した A549 細胞を EBA 修飾表面に播種し, 接着評価を行った. 図 23A は TGF- $\beta$ 1 処理によって E-cadherin の発現量が低下した A549 細胞を EBA 修飾表面に播種し, EDTA 洗浄を行った際の位相差画像を示す. 位相差画像を定量した結果, TGF- $\beta$ 1 処理を行った A549 細胞の接着数は, 処理無しの細胞と比較して約 68% 減少した (図 23B). 以上の結果は, EBA 修飾表面での細胞接着特性が EBA と細胞表面の E-cadherin の結合に起因することを支持するものである.

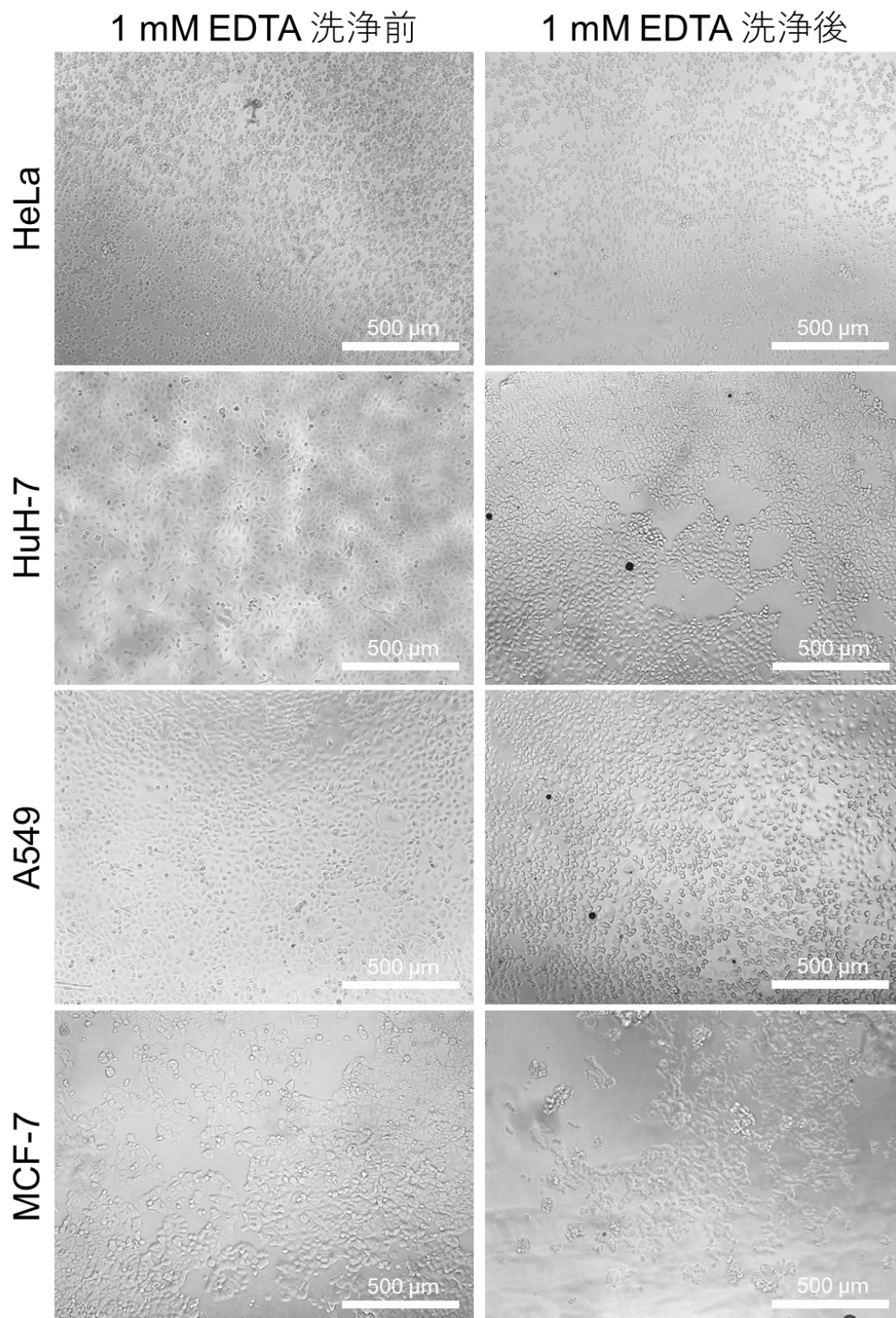


図 19. EBA 修飾基板における上皮 (様) 細胞接着.

各上皮 (様) 細胞を EBA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し, 24 時間後 (左) と 1 mM EDTA 洗浄後 (右) の位相差画像.

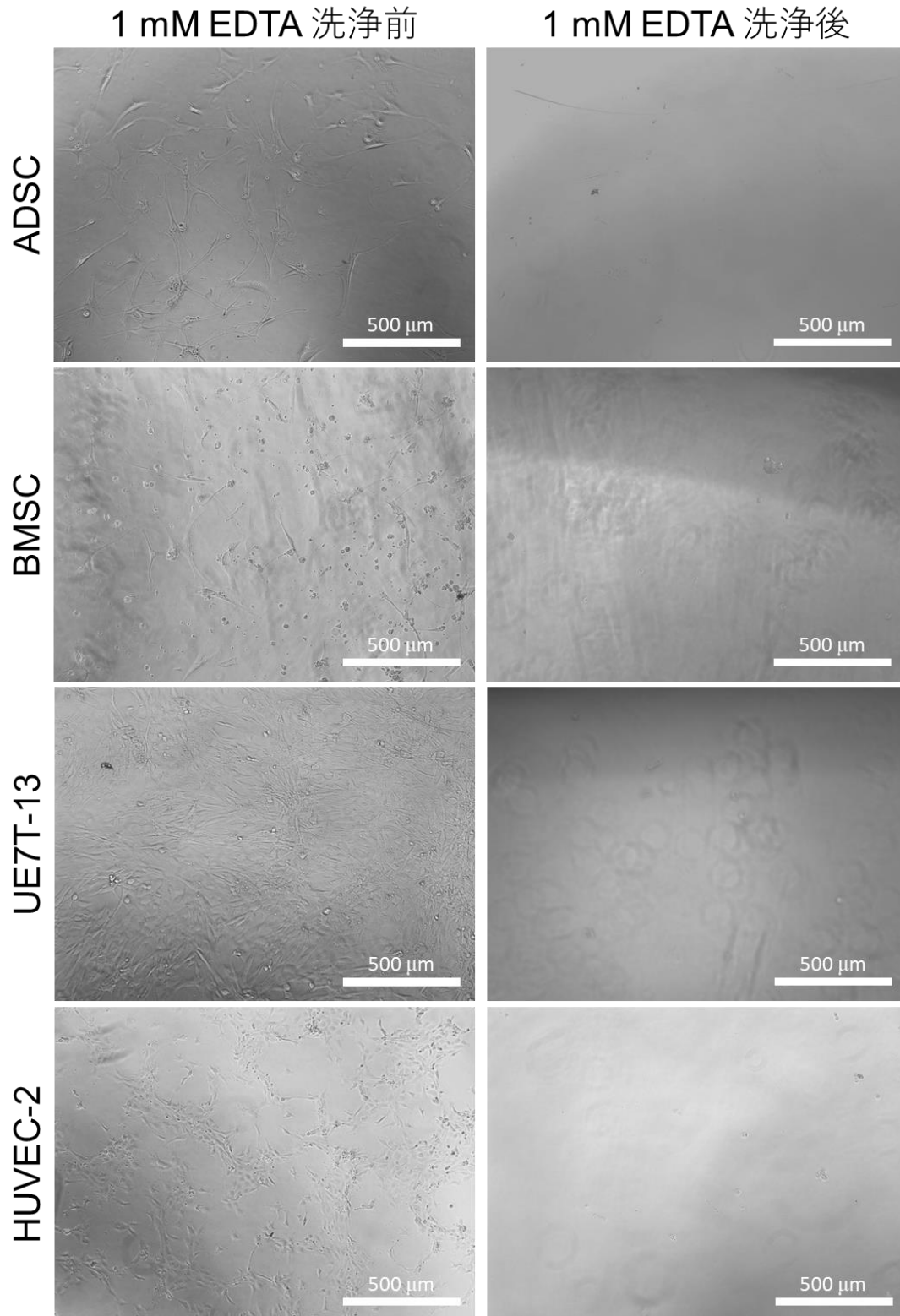


図 20. EBA 修飾基板における間葉系幹細胞及び血管内皮細胞接着.

各細胞を EBA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し, 24 時間後 (左) と 1 mM EDTA 洗淨後 (右) の位相差画像.

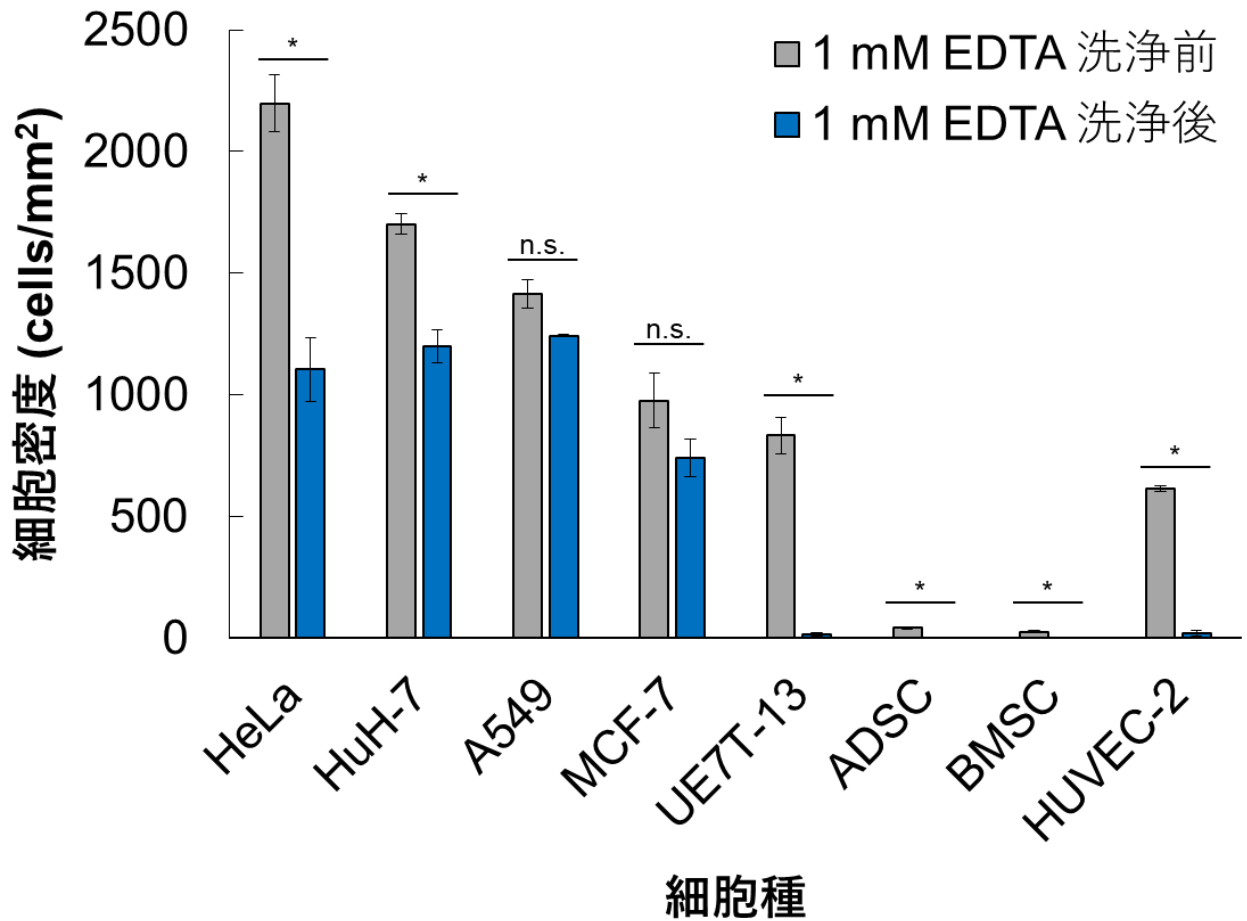


図 21. EBA 修飾基板における細胞接着.

(A) 各細胞を EBA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し、24 時間後 (灰色) と 1 mM EDTA 洗浄後 (青色) における細胞密度. 細胞密度は  $n \geq 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. \*は有意差 (t 検定,  $p < 0.05$ ) を示している. n.s. は統計的に有意差が無いことを示している.



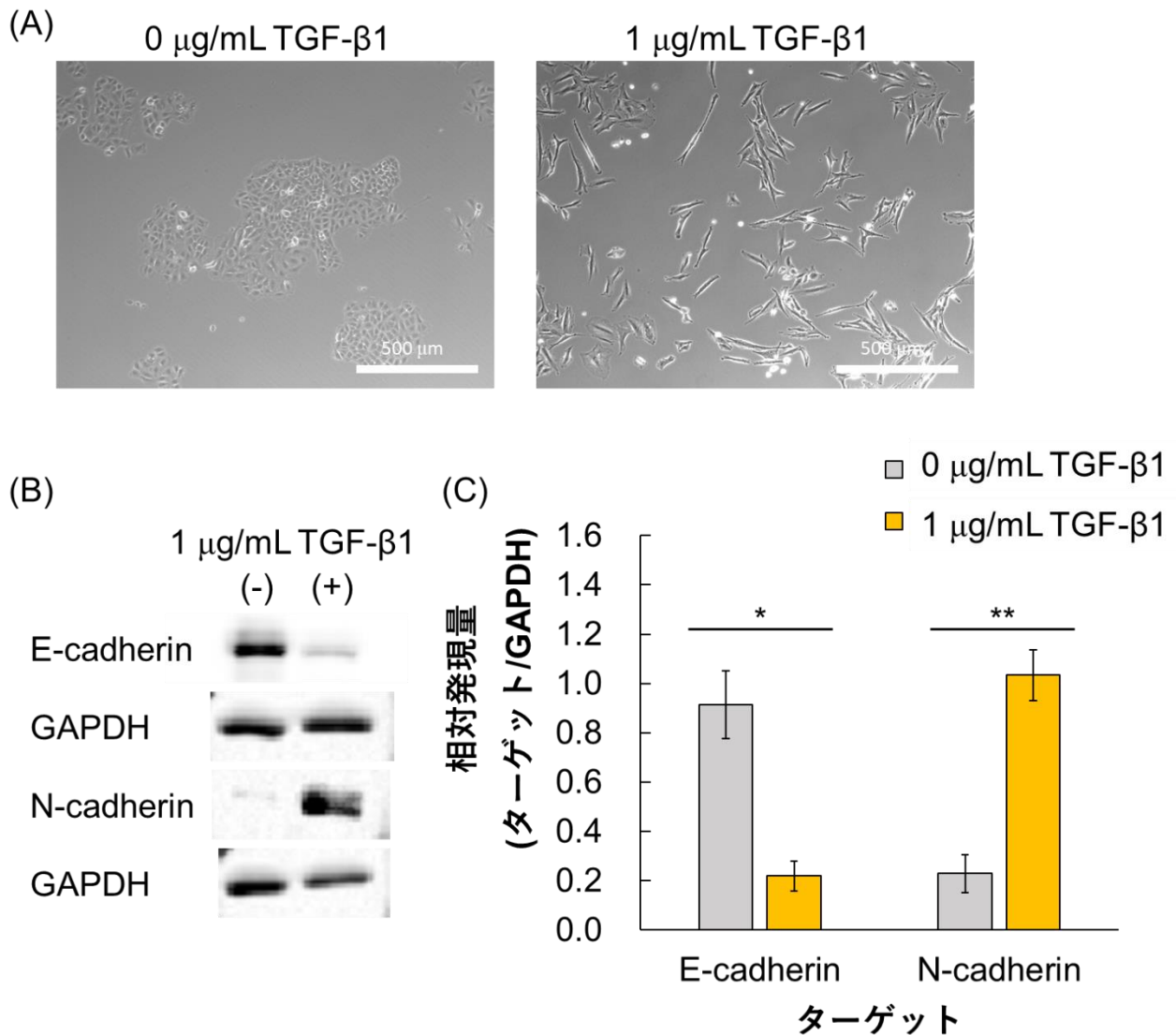


図 22. TGF- $\beta$ 1 処理による E-cadherin のノックダウン.

(A) TGF- $\beta$ 1 処理による A549 細胞の形質転換. A549 細胞を細胞数  $1 \times 10^5$  cells/dish になるように PS 基板に播種し, 24 時間後, TGF- $\beta$ 1 を 0 または 1  $\mu\text{g/mL}$  含む培地で培地交換を行った. 培地交換から 96 時間後の細胞の位相差画像を示している. (B) TGF- $\beta$ 1 処理後の Western blot. (C) TGF- $\beta$ 1 処理による E-cadherin 及び N-cadherin の相対発現量. Western blot の結果を元に Image J で定量した. 内部標準として GAPDH を選択した. 相対発現量は  $n \geq 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. \*は有意差 (t 検定,  $p < 0.05$ ), \*\*は有意差 (t 検定,  $p < 0.01$ ) を示している.

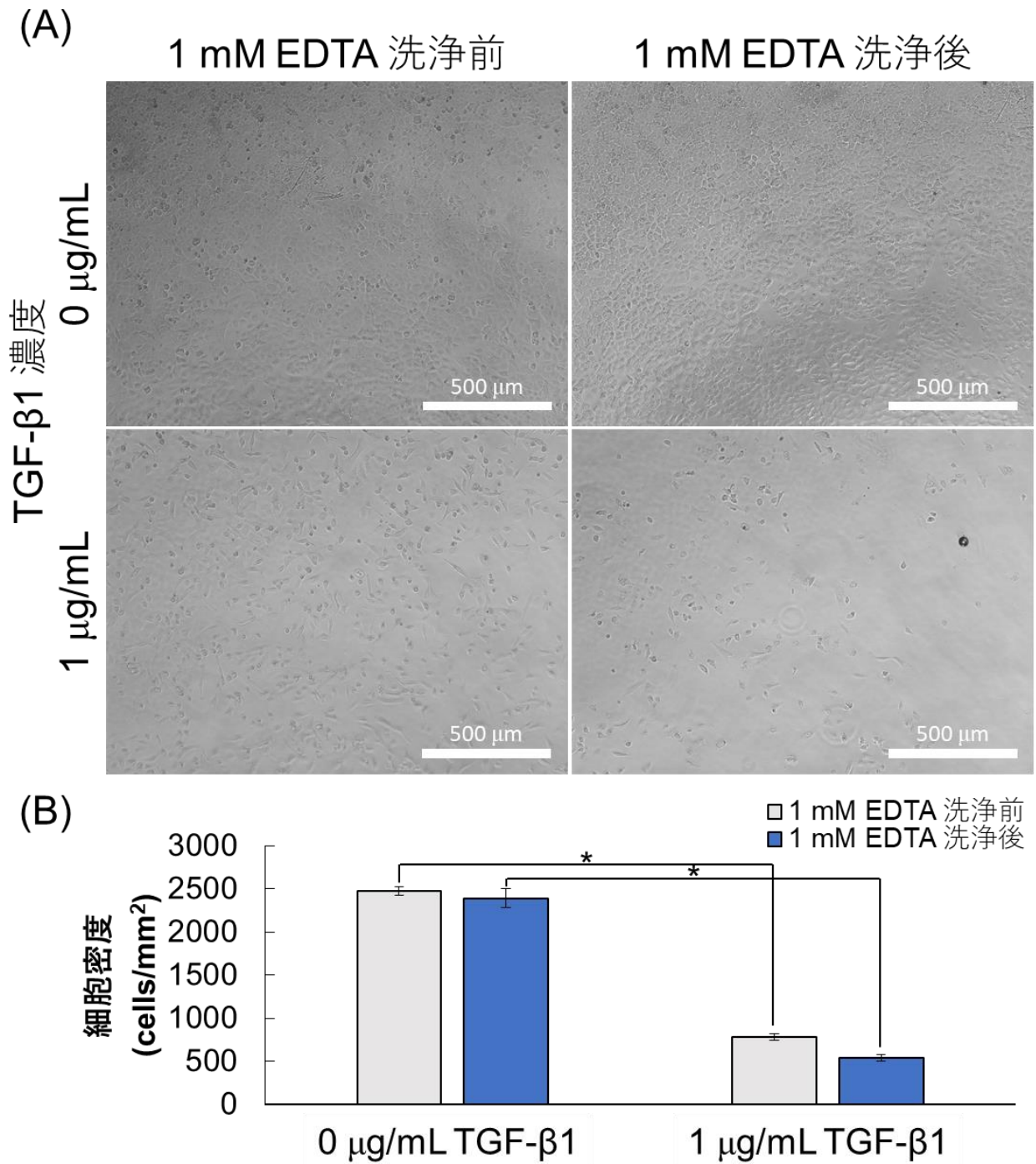


図 23. EBA 修飾基板における E-cadherin ノックダウン細胞の細胞接着.

(A) TGF- $\beta$ 1 処理による E-cadherin ノックダウン細胞の細胞接着. TGF- $\beta$ 1 処理した A549 細胞を EBA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し, 24 時間後 (左) と 1 mM EDTA 洗浄後 (右) の位相差画像. (B) 位相差画像を元に定量した細胞密度. 細胞密度は  $n \geq 6$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. \*は有意差 (t 検定,  $p < 0.01$ ) を示している.

#### 4.2.4 相補鎖導入による細胞接着制御及びエンドヌクレアーゼ処理による細胞剥離

一本鎖 DNA は相補配列を利用することで意図した高次構造変化を誘起することができる。EBA は一本鎖 DNA であるため、相補鎖導入による高次構造変化によって、細胞接着にどのような影響を与えるか調査した。EBA の相補鎖 cEBA を導入した EBA 修飾基板に、A549 細胞を播種した (図 24)。相補鎖を導入していない表面では細胞接着が確認され、EDTA 洗浄による細胞剥離も少なかった。一方、相補鎖導入によって細胞の接着数は著しく減少した。この結果は、DNA 修飾基板において相補鎖導入による細胞接着制御が可能であること、また、EBA 修飾表面における細胞接着において EBA の高次構造が重要であることを示している。もう一つの DNA のユニークな特徴の一つとして、ヌクレアーゼによる分解が挙げられる。EBA は DNA であるため、ヌクレアーゼによって分解が可能である。この特徴を活かし、EBA 修飾表面における接着細胞のエンドヌクレアーゼによる剥離を試みた (図 25)。エンドヌクレアーゼを含まないバッファーのみの場合は、細胞の剥離が起らなかった。一方で、エンドヌクレアーゼを含むバッファーでインキュベートすることで細胞の剥離が観察された (図 25A)。この結果は、エンドヌクレアーゼによって EBA を分解することで細胞の剥離が可能であることを示しているだけでなく、EBA 修飾基板での細胞接着が細胞-EBA 間によるものであることを強く支持するものである。エンドヌクレアーゼ処理によって剥離した細胞は、PS 基板へ継代直後及び 10 回の継代後も接着、伸展、増殖が確認されている (図 25B)。エンドヌクレアーゼは核酸分解酵素であるため、プロテアーゼやキレート剤と異なり、細胞間接着に大きな影響を与えないことが予想される。図 25 の条件ではインキュベートバッファーに二価の金属イオンキレート剤である EDTA を含んでいたため、細胞間接着が失われ、細胞がバラバラに剥離した。

図 26 はインキュベートバッファの EDTA を除いた際のエンドヌクレアーゼ処理による細胞剥離を示している。エンドヌクレアーゼを含まないバッファでは細胞の剥離は起こっていない。一方、エンドヌクレアーゼを含むバッファでインキュベートすることで細胞が組織的に剥離する様子が観察された (図 26, 赤矢印)。この結果から、EBA 修飾表面ではキレート剤やプロテアーゼを用いず、エンドヌクレアーゼを使用することで細胞を組織的に回収できることが示唆された。

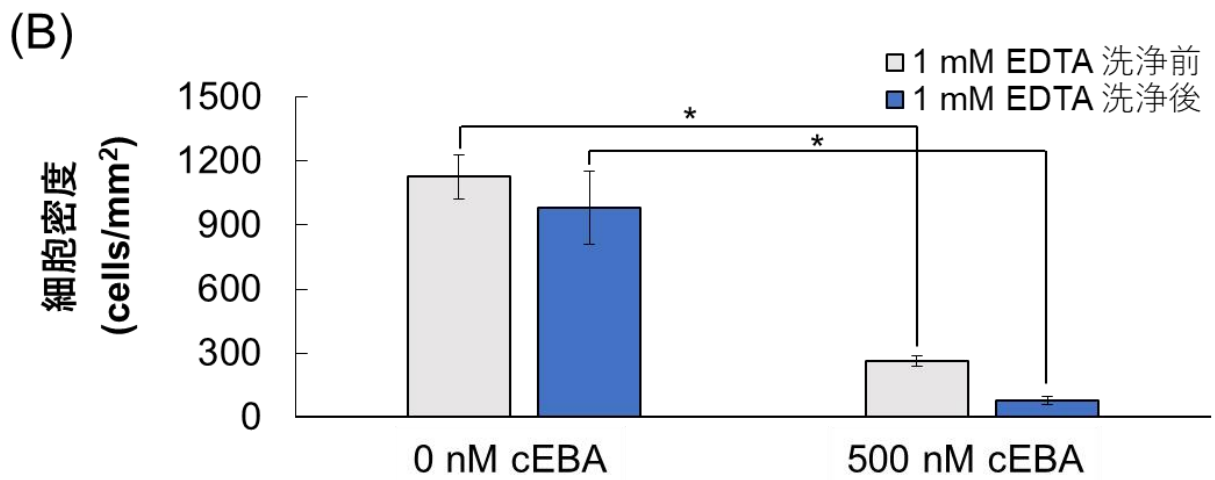
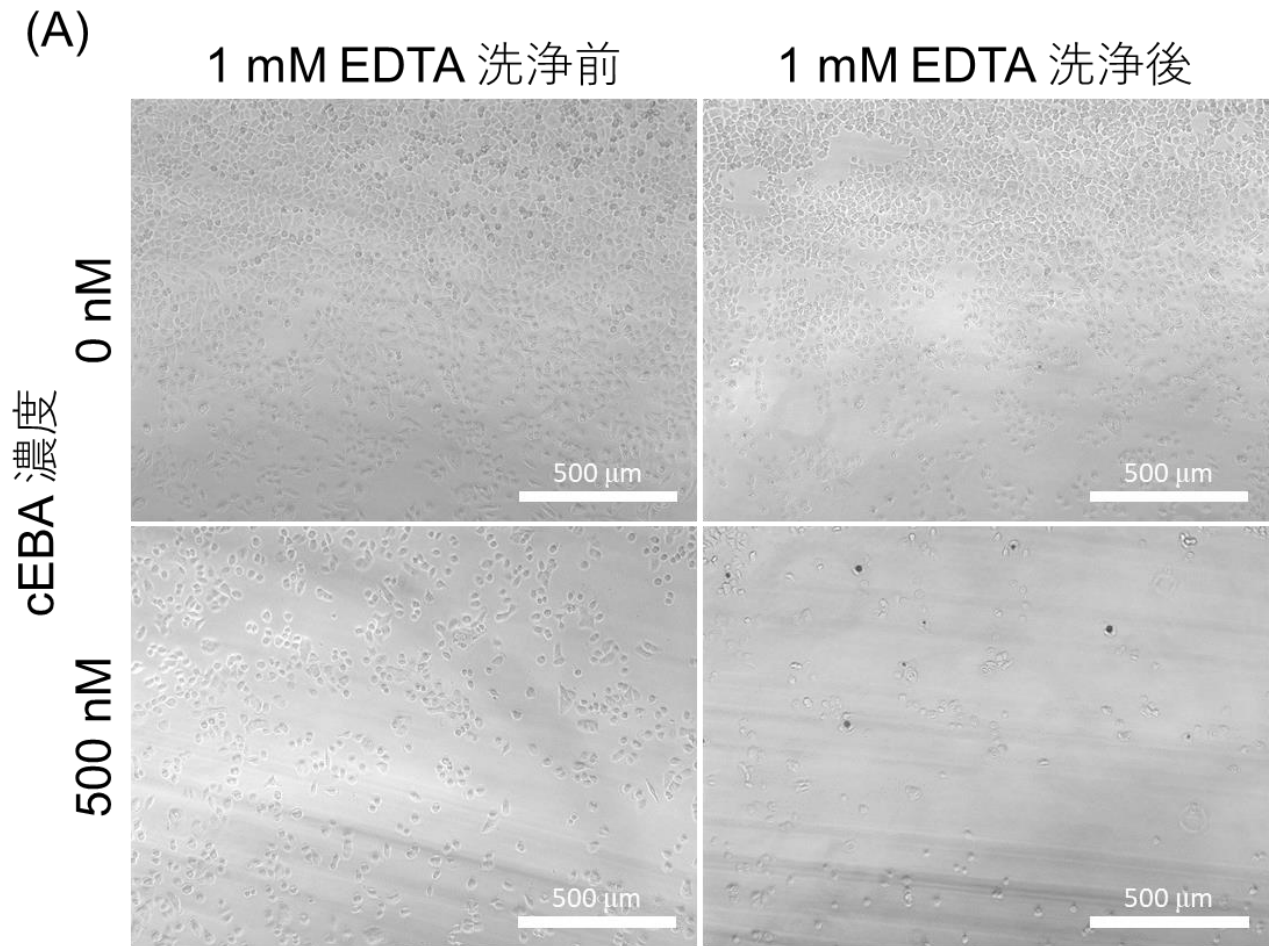


図 24. EBA 相補鎖導入による細胞接着制御.

(A) A549 細胞を cEBA を導入した EBA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し、24 時間後 (左) と 1 mM EDTA 洗淨後 (右) の位相差画像. (B) 位相差画像を元に定量した細胞密度. 細胞密度は  $n \geq 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. \*は有意差 (t 検定,  $p < 0.05$ ) を示している.

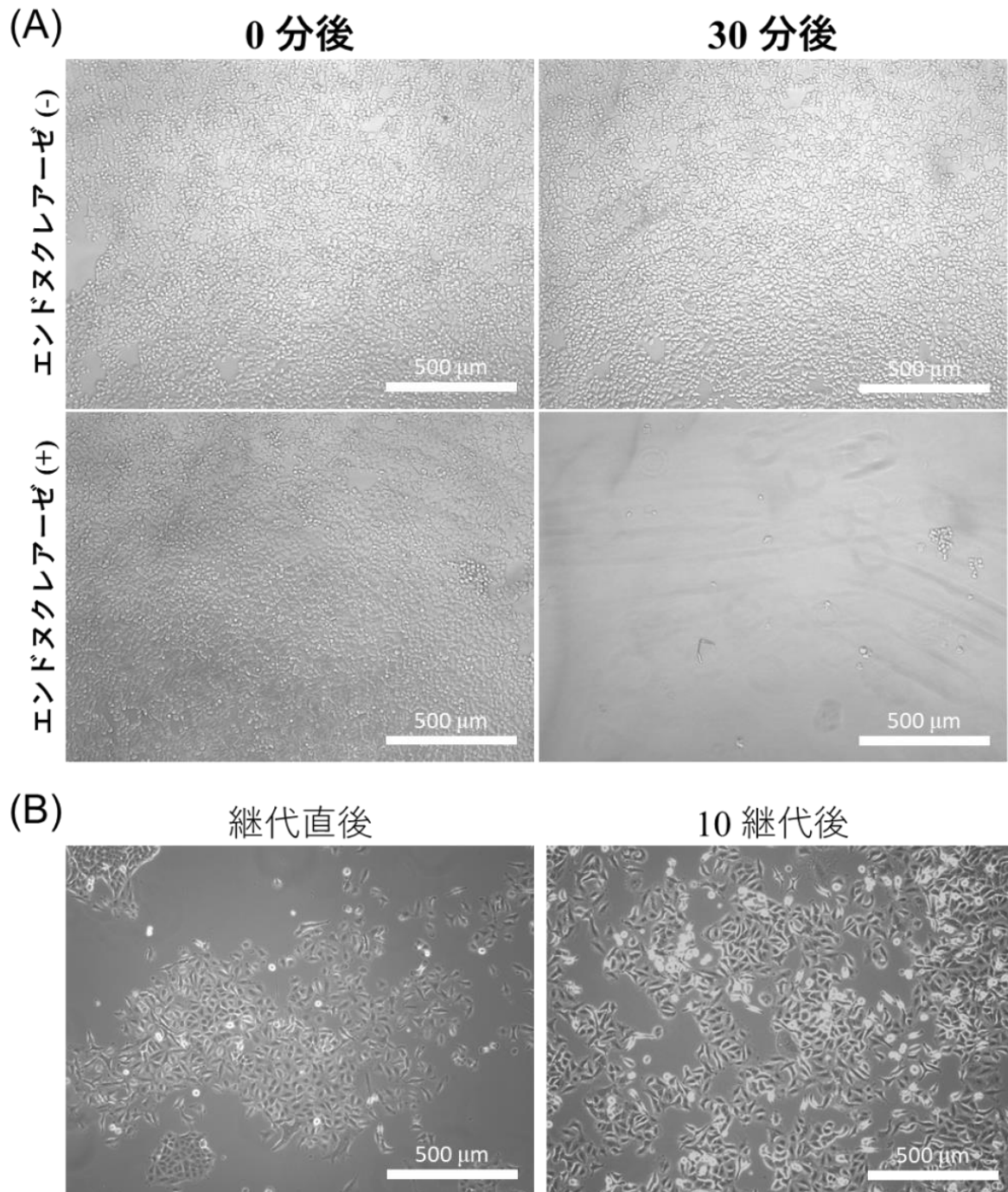


図 25. エンドヌクラーゼによる細胞剥離.

(A) A549 細胞を cEBA を導入した EBA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し, 24 時間後, エンドヌクラーゼ処理を行った. 酵素: Nuclease BAL-31, バッファー: 600 mM NaCl, 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0. (B) エンドヌクラーゼによって剥離した A549 細胞の PS 基板への継代後 24 時間と更に 10 継代後 24 時間の位相差画像.



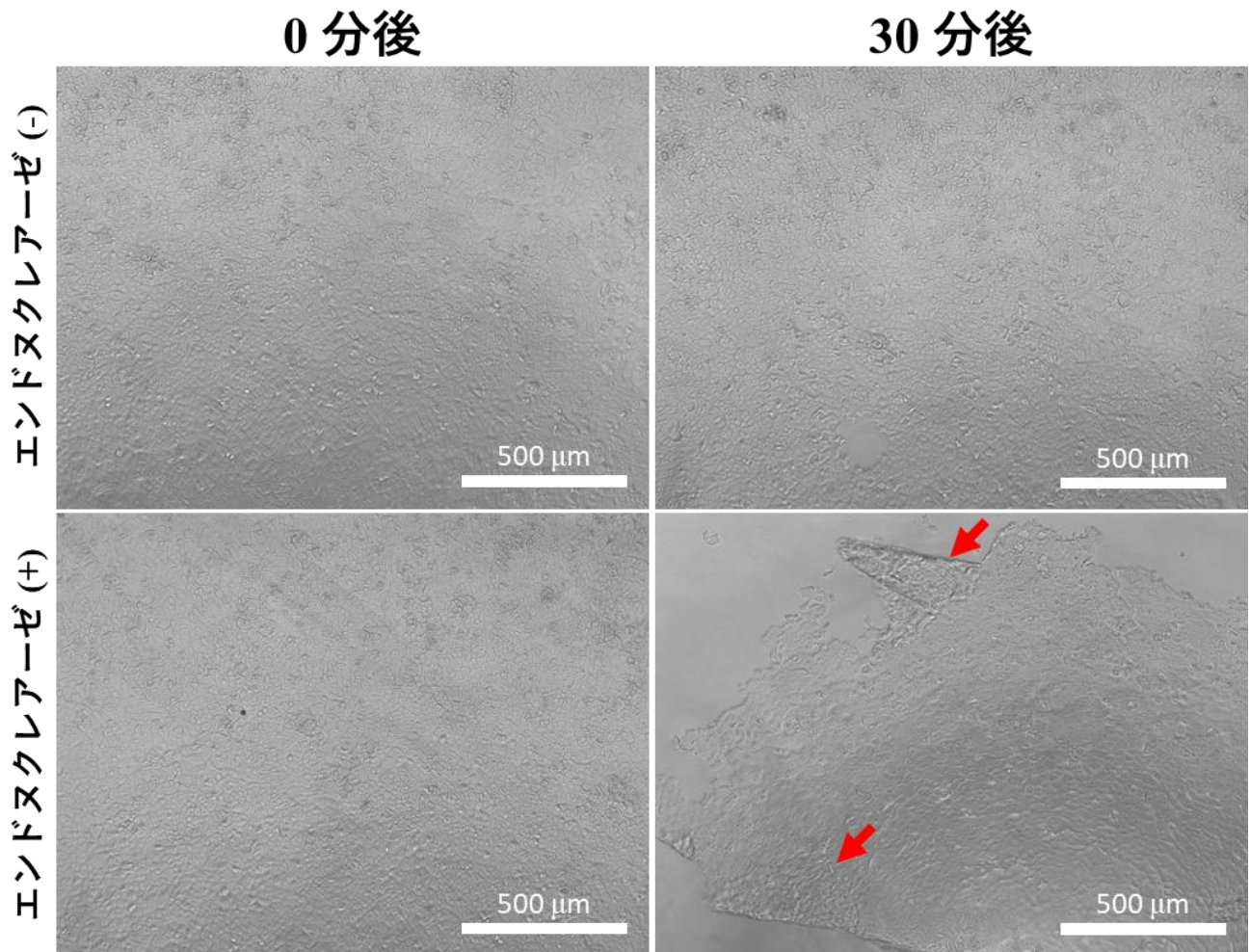


図 26. エンドヌクラーゼによる細胞の組織的剥離.

A549 細胞を cEBA を導入した EBA 修飾基板に  $3 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し, 24 時間後, エンドヌクラーゼ処理を行った. 赤い矢印は細胞が組織的に剥離する様子を示している. 酵素: Nuclease BAL-31, バッファー: 600 mM NaCl, 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0.

#### 4.2.5 E-cadherin 結合性 DNA アプタマー修飾基板における細胞接着班染色

EBA 修飾基板における細胞接着特性を更に詳しく調べるために、細胞接着斑である Paxillin の染色を行った (図 27A). 染色の結果, EBA 修飾基板, PS 基板ともに細胞接着斑である Paxillin が観察された. この結果は, EBA 修飾基板においても細胞-ECM 接着が存在していることを示している. これまでの結果から, EBA と E-cadherin との結合が EBA 修飾基板での細胞接着特性に関与していることが示唆されていたが, 図 21 において HeLa 細胞や HuH-7 細胞, N-cadherin や VE-cadherin の発現が予想される UE7T-13, HUVEC-2 細胞において二価の金属イオン依存的な細胞-ECM 接着が観察されていた. 細胞培養培地中には 10(v/v)% FBS が含まれており, FBS 中には細胞-ECM 間接着を構成する足場タンパク質も存在する. EBA 及び EBA のループ構造置換配列と FBS の相互作用を SPR センサーによって解析した結果, 全ての配列で結合レスポンスが確認された (図 28). この結果から, EBA 及び EBA のループ構造置換配列は, FBS 中に含まれる足場タンパク質等と結合し, 細胞-ECM 間接着を誘起している可能性があることが示唆された. 一方, EBA 及び EBA のループ構造置換配列への FBS の結合量と, 細胞接着数は異なる傾向を示しており, EBA 修飾表面上での細胞接着は EBA と E-cadherin の結合が支配的であることが示唆された (図 17). 以上の結果は, EBA 修飾基板では, E-cadherin が関与する二価の金属イオン非依存的な細胞-EBA 間接着と, 二価の金属イオン依存的な細胞-ECM 間接着が混在していることを示唆している.



## EBA 修飾基板

## PS 基板

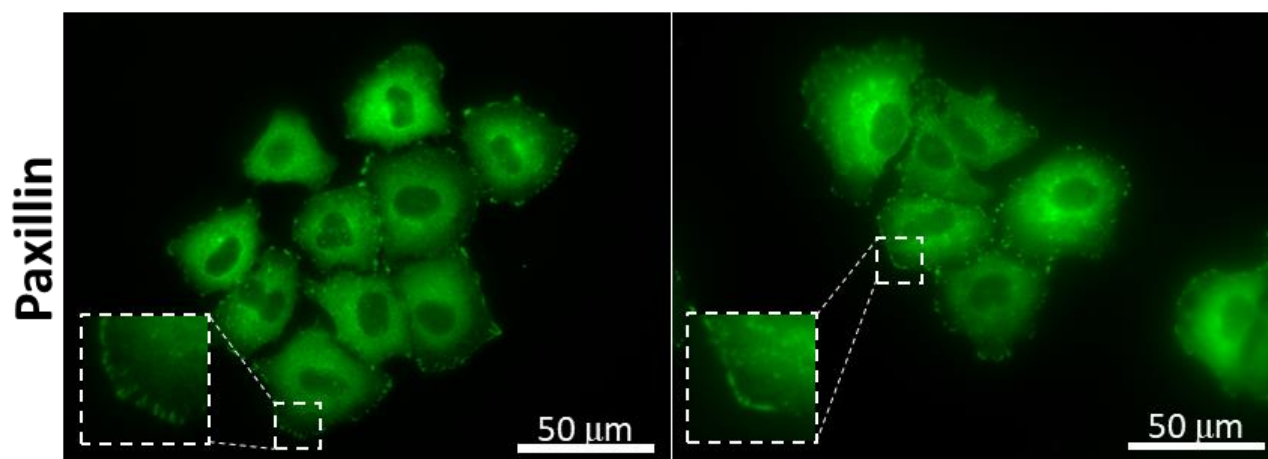


図 27. EBA 修飾基板及び PS 基板上接着細胞の接着斑染色.

A549 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/mL の濃度で播種し、24 時間後に染色後、蛍光顕微鏡画像を取得した.

緑色の蛍光は Paxillin を示している.

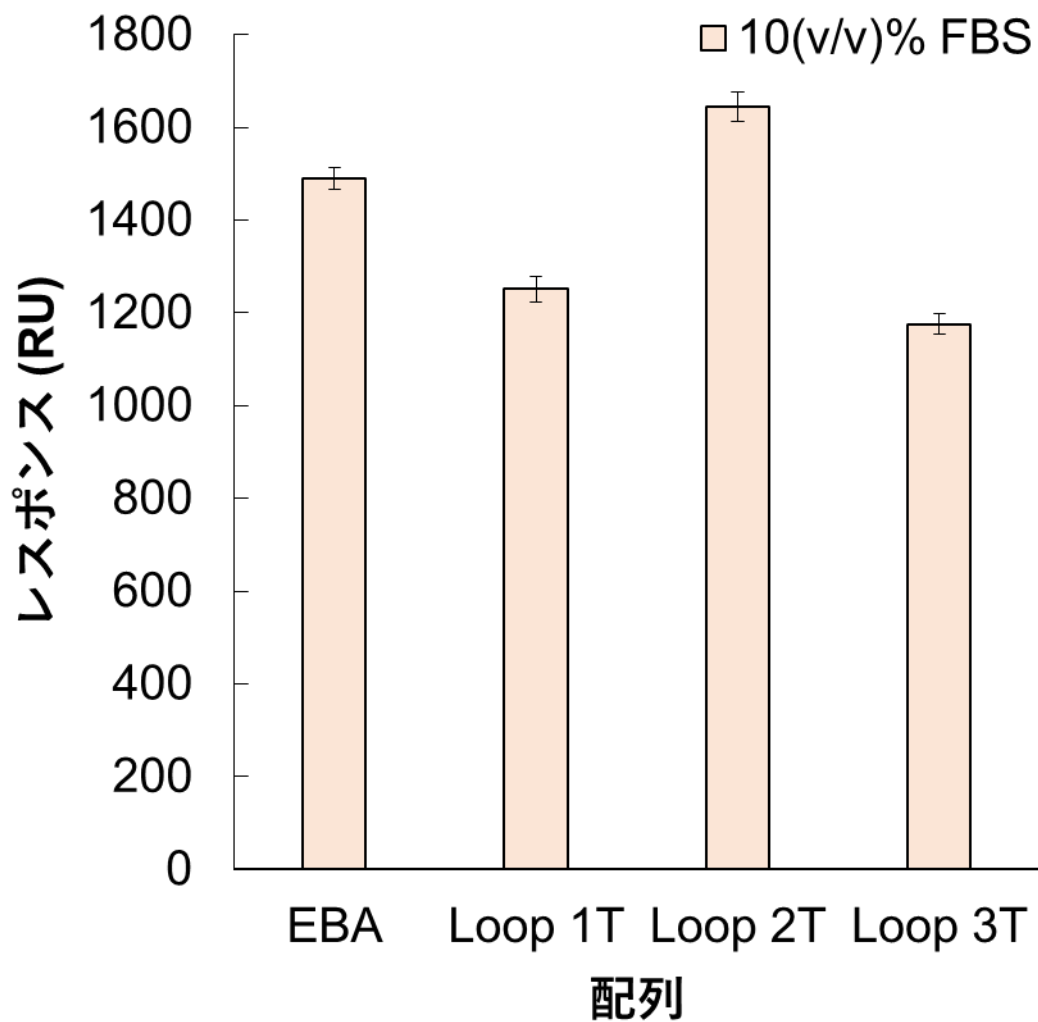


図 28. EBA 及び EBA のループ構造置換配列と FBS の相互作用解析.

各 DNA 修飾センサーチップに 10(v/v)% FBS を添加した際の SPR レスポンス. レスポンスは  $n \geq 3$ , 平均値 $\pm$ 標準誤差で示している.

#### 4.2.6 E-cadherin 結合性 DNA アプタマー修飾基板における細胞生存率及び増殖能

EBA 修飾表面では EBA と E-cadherin の結合によって細胞が接着することが示唆されたが, EBA が接着した細胞に与える影響は明らかとなっていない. EBA 修飾基板が細胞足場材料として有用であることを確かめるため, EBA 修飾基板における細胞生存率と増殖能の評価を行った. 細胞生存率を算出するために, EBA 修飾基板と通常細胞培養ディッシュ (ポリスチレン表面, 以下 PS と明記する) における細胞の Live-Dead 染色を行い (図 29A), 死細胞の数を生細胞の数で除算することで細胞生存率を算出した (図 29B). 解析の結果, EBA 修飾基板における細胞生存率は  $85.1.6\pm6.9\%$  となり, PS 基板の  $87.9\pm4.5\%$  と同等であることが示された. 次に, EBA 修飾基板上での細胞増殖能を, 細胞播種から 2, 24, 48 時間の位相差顕微鏡画像を取得し (図 30A), 細胞数を定量することで評価した (図 30B). 定量の結果, EBA 修飾基板における細胞増殖能は PS 基板と同等であることが示された. 以上の結果から, EBA 修飾基板は, 細胞接着を誘導し, 高い生存率と増殖能を維持する細胞培養足場材料として有用であることが示された.

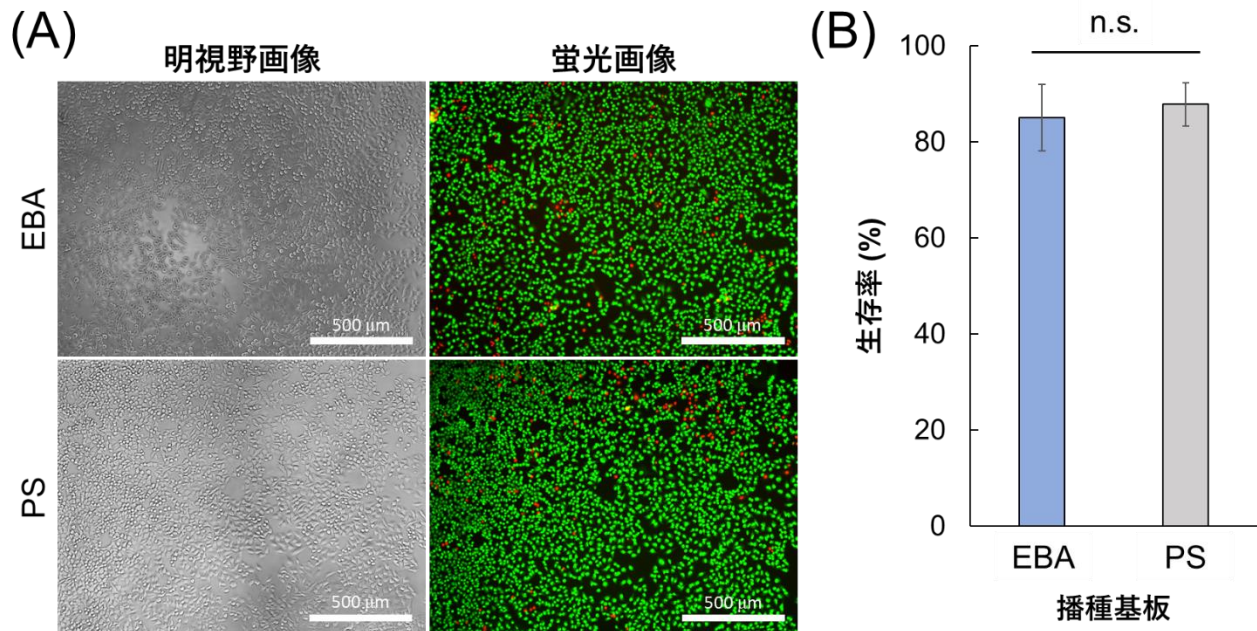


図 29. EBA 修飾基板における細胞生存率.

(A) EBA 修飾基板及び PS 基板上における細胞 Live-Dead 染色. 各基板に A549 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し, 48 時間後に染色を行った. 緑色の蛍光は生細胞, 赤色の蛍光は死細胞を示している. (B) EBA 修飾基板及び PS 基板上における細胞生存率. Live-Dead 染色の結果を元に算出した. EBA 修飾基板の生存率:  $85.16 \pm 6.9\%$ , PS 基板の生存率:  $87.9 \pm 4.5\%$ . 生存率は  $n \geq 3$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. n.s. は統計的に有意差が無いことを示している.

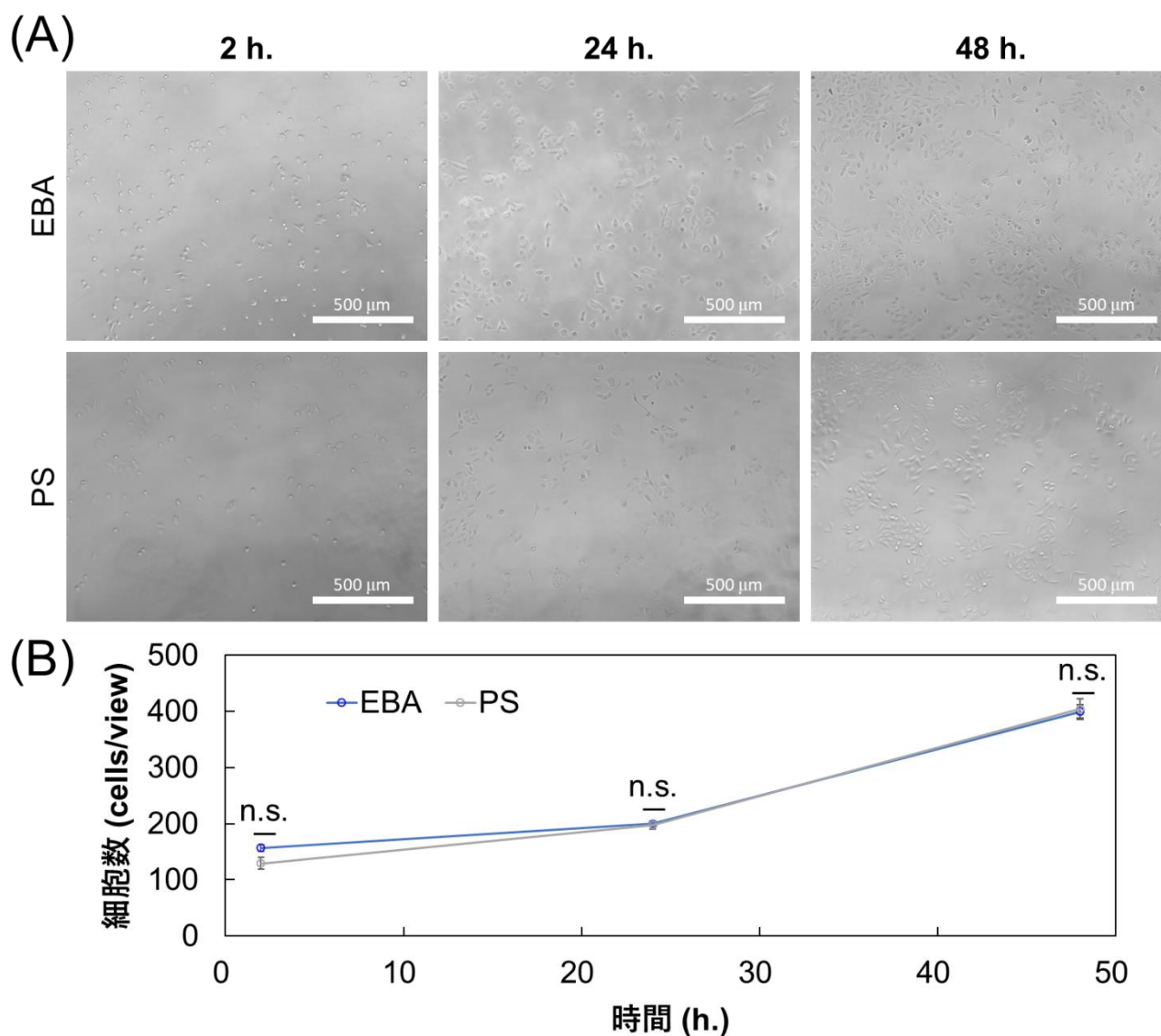


図 30. EBA 修飾基板における細胞増殖能.

(A) EBA 修飾基板及び PS 基板上における細胞数の経時変化. 各基板に A549 細胞を  $3 \times 10^3$  cells/well の濃度で播種し, 2, 24, 48 時間後の細胞の位相差画像. (B) EBA 修飾基板及び PS 基板上における細胞増殖能. 位相差画像の結果を元に算出した. 細胞数は  $n \geq 9$ , 平均値  $\pm$  標準誤差で示している. n.s. は統計的に有意差が無いことを示している.

#### 4.2.7 mRNA-sequencing による遺伝子解析

生存率と増殖能以外に, EBA 修飾基板が細胞機能に与える影響を調査するため, mRNA-sequencing による網羅的な遺伝子発現量解析を行った. 図 31 は EBA 修飾基板及び PS 基板に播種後 48 時間の A549 細胞の FPKM プロットを示している. FPKM は 0.1 以上でカットオフを行った. 解析の結果, EBA 修飾基板上で培養した細胞は, PS 基板上で培養した細胞と比較して, 13522 種の遺伝子中, 186 種の遺伝子の発現が下がり, 174 種の遺伝子の発現が上がっていることが示された. 発現量に変動があった遺伝子群のパスウェイ解析を遺伝子プロファイル解析ツールである Enrichr<sup>81</sup> によって解析した. パスウェイ解析のデータベースは WikiPathways<sup>82-85</sup> を選択した. 解析で得られたパスウェイのうち上位三つを表 9 に示す. 三つのパスウェイのうち, Blood Clotting Cascade WP272 及び Eicosanoid Synthesis WP167 については E-cadherin との直接的な関係性が認められなかった. これらのパスウェイの変化については mRNA-sequencing の対象サンプルを増やし, さらなる調査が必要であると考えている. 一方, Wnt/beta-catenin Signaling Pathway in Leukemia WP3658 は E-cadherin と密接に関係している. Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングは細胞の発達と運命決定の調節因子であり, そのシグナル伝達経路には, 遺伝子転写と細胞接着の両方に重要なタンパク質が多数関与している<sup>86-</sup>  
<sup>88</sup>. Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングの中心的な因子は  $\beta$ -catenin であり, Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングにおける TCF による標的遺伝子転写のコアクチベーターとなっている<sup>89</sup>. 一方で,  $\beta$ -catenin は細胞-細胞間接着においてカドヘリンをアクチン細胞骨格に結合するアダプタータンパク質としても知られている<sup>89</sup>. Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングとカドヘリンを介した細胞-細胞間接着は  $\beta$ -catenin を競合しており, 細胞-細胞間接着による  $\beta$ -catenin のカドヘリンへの結合の増加が, TCF/ $\beta$ -catenin を介した

遺伝子転写の減少を引き起こすことが報告されている<sup>22</sup>。遺伝子発現量に変動があった遺伝子群から Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングにおける TCF/ $\beta$ -catenin の標的遺伝子を更に抽出した結果、EBA 修飾基板で培養した細胞は PS 基板で培養した細胞と比較して、表 9 に示した *SALL4*<sup>90</sup>, *AXIN2*<sup>91</sup>, *DKKI*<sup>92</sup>, *NKDI*<sup>93</sup>, *PTGS2*<sup>94</sup> の計五つの遺伝子発現量が低下していることが明らかとなった。この結果は、EBA 修飾基板では PS 基板と比較して Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングが抑制されることを示唆している。これまでの結果から、EBA 修飾基板では、EBA と E-cadherin の相互作用によって細胞接着が誘起されていることが示唆されており、EBA 修飾基板上での Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングの抑制は、細胞が EBA と E-cadherin の結合を細胞-細胞間接着として認識することで、 $\beta$ -catenin の E-cadherin への結合が増加した結果である可能性がある。

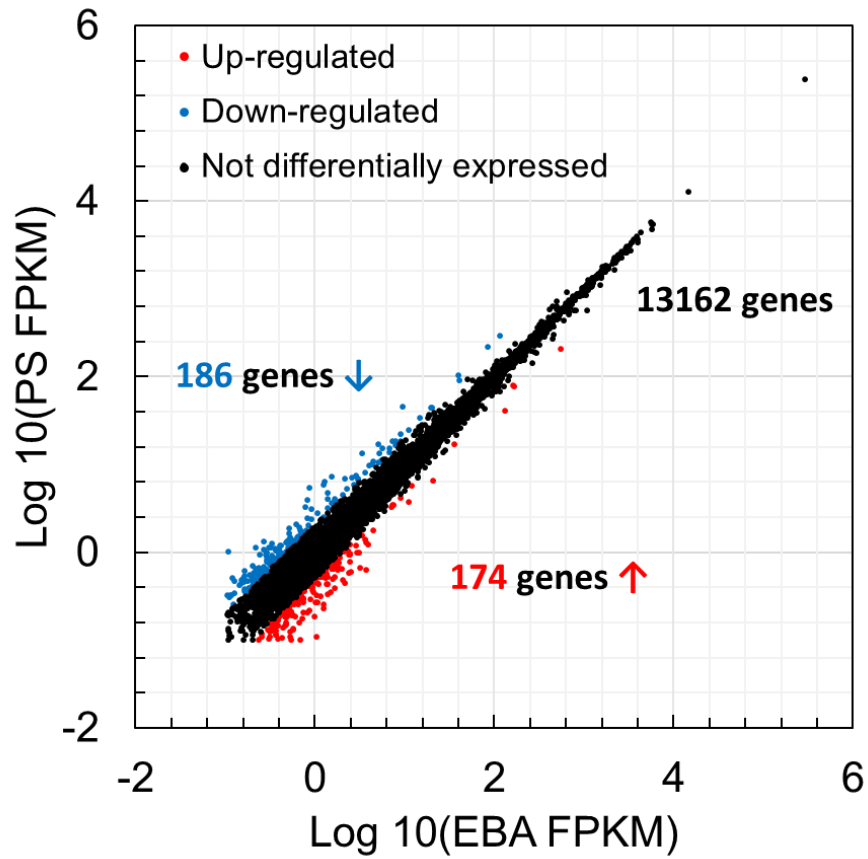


図 31. EBA 修飾基板及び PS 基板上接着細胞の遺伝子発現解析.

A549 細胞を  $1 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し、48 時間後の遺伝子発現解析。発現量が上がった遺伝子群を赤色，発現量が下がった遺伝子群を青色，発現量に変動がなかった遺伝子群を黒色で示している。相対発現量が 2 倍以上を発現量が上がった，0.5 倍以下を発現量が下がった遺伝子群とした。FPKM は 0.1 以上でカットオフを行った。



表 9. Enrichr による WikiPathways 2019 Human 解析 (p <0.05)

パスウェイ	遺伝子名
Blood Clotting Cascade WP272	<i>FGA</i> ↓, <i>FGB</i> ↓, <i>FGG</i> ↓, <i>PLAT</i> ↓
Wnt/beta-catenin Signaling	<i>SALL4</i> ↓, <i>AXIN2</i> ↓, <i>DKK1</i> ↓, ( <i>NKDI</i> ↓, <i>PTGS2</i> ↓)
Pathway in Leukemia WP3658	
Eicosanoid Synthesis WP167	<i>PNPLA3</i> ↓, <i>PLA2G4A</i> ↓, <i>PTGS2</i> ↓

↓ は EBA 修飾基板上で遺伝子発現量が低下したことを示している.

### 4.3 結論

本章では、EBA 修飾基板における接着様式と機能解析を行った。EBA と E-cadherin 抗体との共染色、EBA の細胞接着モチーフ解析、細胞選択性の結果から、EBA 修飾基板上での細胞接着には細胞表面の E-cadherin と EBA の結合が重要であることが示唆された。相補鎖導入による細胞接着制御及びエンドヌクレアーゼによる細胞剥離の結果も EBA 修飾基板上での接着に EBA が重要であることを支持していた。更に、細胞接着斑染色を評価することで、EBA 修飾基板における細胞接着では EBA と E-cadherin の結合と、細胞-ECM 間接着が混在していることを示した。最後に、EBA 修飾基板上における細胞機能を評価した結果、細胞生存率と細胞増殖能が通常培養環境と同等であるだけでなく、EBA が E-cadherin と  $\beta$ -catenin の複合体形成を誘発し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを負に調節する可能性があることが示された。本結果は、DNA アプタマーが細胞機能を調節する新たな細胞培養足場材料になり得ることを示している。

## 第 5 章：総括

細胞表面タンパク質を標的とし、細胞機能を制御する核酸アプタマーは数多く報告されているが、細胞接着を誘導し、高い生存率と増殖能を維持したまま、細胞機能を制御できる細胞培養足場材料として機能するような核酸アプタマーは未だ報告されていなかった。DNA アプタマーを利用した細胞培養足場材料の構築が実現することで、細胞生物学、生体分子科学などの基礎研究の領域のみでなく、正確な細胞機能や分子機構の解明が必要とされる再生医療、薬効、毒性評価のスクリーニングツールなどの医療応用分野においても、その安全性や可能性の向上に大きく貢献することが期待できる。

本博士論文では、EBA の高次構造を明らかとし、EBA 修飾基板における細胞接着特性に関する様々な評価を行ったところ、EBA 修飾基板上での細胞接着は単なる細胞-ECM 間接着ではなく、細胞-ECM 間接着と細胞-DNA 間接着が混在した接着様式であることが明らかとなった。更に、細胞-DNA 間接着が EBA と細胞表面の E-cadherin の結合により誘起されていることが示唆された。EBA 修飾基板上に接着した細胞は、通常培養環境と同等の生存率、増殖能を有しているだけでなく、EBA 修飾基板における二価の金属イオン非依存的な細胞接着には高い細胞選択性があり、相補鎖導入による細胞接着の抑制とヌクレアーゼ処理による細胞の剥離が可能であることは、EBA 修飾基板が細胞接着を制御することができる足場材料であることを示している。更に、EBA 修飾基板上の細胞は、EBA と E-cadherin の結合を細胞-細胞間接着と認識し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングにおける TCF/ $\beta$ -catenin を介した遺伝子転写を減少させる可能性があることが示唆された。本博士論文による成果は、DNA アプタマーが細胞接着を誘起し、高い細胞生存率と増殖能を有したまま細胞接着及び遺伝子発現量等の細胞機能を制御する新たな細胞培養足場材料になり得ることを示している。また、

本博士論文で構築した分光学的手法に基づいたグアニン四重鎖構造分析法は高度な専門技術と放射性同位体標識，特殊な測定環境を必要とせず，グアニン四重鎖を推定するための方法の選択肢の一つになり得る．

本研究では，DNA の基板への固定化手段としてストレプトアビジンとビオチンの非共有結合による相互作用を利用したが，DNA はアミンカップリングやチオール化と金基板を組み合わせた手法等様々な化学的アプローチによって固定化することができるため，完全なるタンパク質フリーの細胞培養足場材料を容易に構築することができる．更に，本研究によって提案した DNA アプタマーを利用した細胞培養足場材料は，異なる分子を標的にした DNA アプタマーを利用することにより，様々な標的細胞，細胞機能を制御することが可能な全く新しい足場材料となることが期待される．

本研究で利用した EBA は E-cadherin に対して高い結合能を有していることが明らかとなっているが，特異性は明らかとなっていない．実際に，EBA 修飾基板では細胞-ECM 間接着が確認されており，この結果は EBA がインテグリン，フィブロネクチン等の細胞-ECM 間接着タンパク質と相互作用することを示唆している．本博士論文で構築した EBA 修飾基板での細胞接着が EBA と E-cadherin の結合によって誘起されていることを証明するためには，他の細胞表面タンパク質との相互作用解析や，siRNA による E-cadherin のノックダウン等を行い，EBA の特異性を評価する必要がある．EBA 修飾基板上で確認された Wnt/ $\beta$ -catenin シグナリングの標的遺伝子発現の抑制に関しては，免疫染色による  $\beta$ -catenin の局在の調査等により詳細な機構を明らかにしたい．また，本博士論文結果から，DNA アプタマーを利用した細胞培養足場材料は，細胞分離及びヌクレアーゼや相補鎖を利用した非侵襲な細胞回収等のツールとしての応用も期待される．

## 参考文献

1. Albelda, S. M. & Buck, C. a. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB journal* **4**, 2868–80 (1990).
2. Weber, G. F., Bjerke, M. A. & DeSimone, D. W. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J. Cell Sci.* **124**, 1183–1193 (2011).
3. Mosher, D. F., Sottile, J., Wu, C. & McDonald, J. A. Assembly of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 810–818 (1992).
4. Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (80-. )*. **238**, 491–497 (1987).
5. Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**, 1451–1455 (1991).
6. Sastry, S. K. & Burridge, K. Focal adhesions: A nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp. Cell Res.* **261**, 25–36 (2000).
7. Gumbiner, B. M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 622–634 (2005).
8. Mui, K. L., Chen, C. S. & Assoian, R. K. The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. *J. Cell Sci.* **129**, 1093–1100 (2016).
9. Hynes, R. O. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549–554 (1987).
10. Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–87 (2002).
11. Pytela, R. *et al.* Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* **40**, 191–8 (1985).
12. Pytela, R., Pierschbacher, M. D. & Ruoslahti, E. A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin (cell-substrate adhesion/affinity chromatography/liposomes/synthetic peptides). *Cell Biol.* **82**, 5766–5770 (1985).
13. Horwitz, A., Duggan, K., Greggs, R., Decker, C. & Buck, C. The cell substrate attachment (CSAT) antigen has properties of a receptor for laminin and fibronectin. *J. Cell Biol.* **101**, (1985).
14. Gailits, J. & Ruoslahti, E. Regulation of the Fibronectin Receptor Affinity by Divalent Cations\*. *J. Biol. Chem.* **263**, 12927–12932 (1988).
15. Pierschbacher, M. D. & Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**, 30–33 (1984).
16. Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z. & Geiger, B. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **120**, 137–148 (2007).
17. Abarzúa, P., LoSardo, J. E., Gubler, M. Lou & Neri, A. Microinjection of Monoclonal Antibody PAb421 into Human SW480 Colorectal Carcinoma Cells Restores the Transcription Activation Function to Mutant p53. *Cancer Res.* **55**, 3490–3494 (1995).
18. Deakin, N. O. & Turner, C. E. Paxillin comes of age. *J. Cell Sci.* **121**, 2435–2444 (2008).
19. Takeichi, M. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J.*

- Cell Biol.* **75**, (1977).
20. Gumbiner, B. M. Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell* **84**, 345–357 (1996).
  21. Van Roy, F. & Berx, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3756–3788 (2008).
  22. Oncology, L. M. N. & Branch, H. *Geldanamycin Abrogates ErbB2 Association with Proteasome-resistant-Catenin in Melanoma Cells, Increases-Catenin-E-Cadherin Association, and Decreases-Catenin-sensitive Transcription.* *Clinic of Pediatrics* **61**, (2001).
  23. Mendonsa, A. M., Na, T. Y. & Gumbiner, B. M. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene* **37**, 4769–4780 (2018).
  24. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
  25. Nagaoka, M. *et al.* E-cadherin-coated plates maintain pluripotent ES cells without colony formation. *PLoS One* **1**, 1–7 (2006).
  26. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–72 (2007).
  27. Xu, C. *et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 971–974 (2001).
  28. Nagatoishi, S., Tanaka, Y. & Tsumoto, K. Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-cation-deficient conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 812–817 (2007).
  29. Iyer, R. K., Chiu, L. L. Y. & Radisic, M. Microfabricated poly(ethylene glycol) templates enable rapid screening of triculture conditions for cardiac tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **89A**, 616–631 (2009).
  30. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science (80-. )*. **249**, 505–510 (1990).
  31. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–22 (1990).
  32. Bock, L. C., Griffin, L. C., Latham, J. A., Vermaas, E. H. & Toole, J. J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**, 564–566 (1992).
  33. Ringquist, S. *et al.* High-Affinity RNA Ligands to Escherichia coli Ribosomes and Ribosomal Protein S1: Comparison of Natural and Unnatural Binding Sites. *Biochemistry* **34**, 3640–3648 (1995).
  34. Morris, K. N., Jensen, K. B., Julin, C. M., Weil, M. & Gold, L. High affinity ligands from in vitro selection: Complex targets. *Biochemistry* **95**, 2902–2907 (1998).
  35. Ng, E. W. M. *et al.* Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 123–132 (2006).
  36. Liu, X., Yan, H., Liu, Y. & Chang, Y. Targeted cell-cell interactions by DNA nanoscaffold-templated multivalent bispecific aptamers. *Small* **7**, 1673–1682 (2011).

37. Kumar Sharma, T. & Shukla, R. Nucleic Acid Aptamers in Detection and Mitigation of Animal Pathogens Mini Review. *Adv. Anim. Vet. Sci.* **2**, 50–55 (2013).
38. Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H. & Ruml, T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1141–1161 (2015).
39. Huang, C. J., Lin, H. I., Shiesh, S. C. & Lee, G. Bin. An integrated microfluidic system for rapid screening of alpha-fetoprotein-specific aptamers. *Biosens. Bioelectron.* **35**, 50–55 (2012).
40. Radom, F., Jurek, P. M., Mazurek, M. P., Otlewski, J. & Jeleń, F. Aptamers: Molecules of great potential. *Biotechnology Advances* **31**, 1260–1274 (2013).
41. Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K. & Neidle, S. Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5402–5415 (2006).
42. O. Tucker, W., T. Shum, K. & A. Tanner, J. G-quadruplex DNA Aptamers and their Ligands: Structure, Function and Application. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 2014–2026 (2012).
43. Huppert, J. L. Four-stranded nucleic acids: Structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1375–1384 (2008).
44. Hardin, C. C., Watson, T., Corregan, M. & Bailey, C. Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry* **31**, 833–841 (1992).
45. Paramasivan, S., Rujan, I. & Bolton, P. H. Circular dichroism of quadruplex DNAs: Applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods* **43**, 324–331 (2007).
46. Bates, P. J., Kahlon, J. B., Thomas, S. D., Trent, J. O. & Miller, D. M. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 26369–77 (1999).
47. Ueki, R. & Sando, S. A DNA aptamer to c-Met inhibits cancer cell migration. *Chem. Commun.* **50**, 13131–13134 (2014).
48. Ueki, R., Ueki, A., Kanda, N. & Sando, S. Oligonucleotide-based Mimetics of Hepatocyte Growth Factor. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **8656**, 589–592 (2015).
49. Berg, K., Lange, T., Mittelberger, F., Schumacher, U. & Hahn, U. Selection and Characterization of an  $\alpha\beta 4$  Integrin blocking DNA Aptamer. *Cit. Mol. Ther. Acids* **5**, (2016).
50. Wan, Y. *et al.* Surface-immobilized aptamers for cancer cell isolation and microscopic cytology. *Cancer Res.* **70**, 9371–9380 (2010).
51. Hou, Z. *et al.* Characterization and target identification of a DNA aptamer that labels pluripotent stem cells. *Cell Research* **25**, 390–393 (2015).
52. Wang, X., Zheng, X., Duan, Y., Ma, L. & Gao, C. Defined Substrate by Aptamer Modification with the Balanced Properties of Selective Capture and Stemness Maintenance of Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 15170–15180 (2019).
53. 丸山亮. 細胞接着性 DNA の構造推定および機能評価. 2017年度 修士論文 1–72
54. Adrian, M. *et al.* Structure and conformational dynamics of a stacked dimeric G-quadruplex formed by the human CEB1 minisatellite. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 6297–6305 (2014).
55. Parkinson, G. N., Ghosh, R. & Neidle, S. Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres.



- Biochemistry* **46**, 2390–2397 (2007).
56. Xu, Y. Chemistry in human telomere biology: Structure, function and targeting of telomere DNA/RNA. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2719–2740 (2011).
  57. Lipps, H. J. & Rhodes, D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends in Cell Biology* **19**, 414–422 (2009).
  58. Moyzis, R. K. *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6622–6 (1988).
  59. Guo, K. *et al.* Formation of pseudosymmetrical G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter region of the RET oncogene. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10220–10228 (2007).
  60. Phan, A. T., Kuryavyi, V., Burge, S., Neidle, S. & Patel, D. J. Structure of an unprecedented G-quadruplex scaffold in the human c-kit promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 4386–4392 (2007).
  61. Cogoi, S. & Xodo, L. E. G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2536–2549 (2006).
  62. Fujita, H. *et al.* Structural and affinity analyses of G-quadruplex DNA aptamers for camptothecin derivatives. *Pharmaceuticals* **6**, 1082–1093 (2013).
  63. Yu, J., Zhang, L., Xu, X. & Liu, S. Quantitative detection of potassium ions and adenosine triphosphate via a nanochannel-based electrochemical platform coupled with G-quadruplex aptamers. *Anal. Chem.* **86**, 10741–10748 (2014).
  64. Huang, H. *et al.* A G-quadruplex-containing RNA activates fluorescence in a GFP-like fluorophore. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 686–91 (2014).
  65. Bai, Y. *et al.* Aptamer/thrombin/aptamer-AuNPs sandwich enhanced surface plasmon resonance sensor for the detection of subnanomolar thrombin. *Biosens. Bioelectron.* **47**, 265–70 (2013).
  66. Kang, C., Zhang, X., Ratliff, R., Moyzis, R. & Rich, A. Crystal structure of four-stranded Oxytricha telomeric DNA. *Nature* **356**, 126–131 (1992).
  67. Laughlan, G. *et al.* The high-resolution crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex. *Science* **265**, 520–4 (1994).
  68. Forman, S. L., Fettingner, J. C., Pieraccini, S., Gottarelli, G. & Davis, J. T. Toward artificial ion channels: A lipophilic G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4060–4067 (2000).
  69. Davis, J. T. G-Quartets 40 Years Later: From 5'-GMP to Molecular Biology and Supramolecular Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed.* **43**, 668–698 (2004).
  70. Marušič, M., Šket, P., Bauer, L., Víglašky, V. & Plavec, J. Solution-state structure of an intramolecular G-quadruplex with propeller, diagonal and edgewise loops. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6946–6956 (2012).
  71. Wei, D. *et al.* Crystal structure of a promoter sequence in the B-raf gene reveals an intertwined dimer quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 19319–19329 (2013).
  72. Siddiqui-Jain, A., Grand, C. L., Bearss, D. J. & Hurley, L. H. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11593–11598 (2002).
  73. Agrawal, P., Hatzakis, E., Guo, K., Carver, M. & Yang, D. Solution structure of the major G-

- quadruplex formed in the human VEGF promoter in K<sup>+</sup>: Insights into loop interactions of the parallel G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **41**, 10584–10592 (2013).
74. Do, N. Q. & Phan, A. T. Monomer-dimer equilibrium for the 5'-5' stacking of propeller-type parallel-stranded g-quadruplexes: NMR structural study. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 14752–14759 (2012).
  75. Tomaško, M., Vorlíčková, M. & Sagi, J. Substitution of adenine for guanine in the quadruplex-forming human telomere DNA sequence G3(T2AG3)3. *Biochimie* **91**, 171–179 (2009).
  76. Mergny, J. L., Phan, A. T. & Lacroix, L. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.* **435**, 74–78 (1998).
  77. Giraldo, R., Suzuki, M., Chapman, L. & Rhodes, D. Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: a circular dichroism study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7658–7662 (1994).
  78. Guédin, A., Gros, J., Alberti, P. & Mergny, J. L. How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7858–7868 (2010).
  79. Agrawal, P., Lin, C., Mathad, R. I., Carver, M. & Yang, D. The major G-quadruplex formed in the human BCL-2 proximal promoter adopts a parallel structure with a 13-nt loop in k<sup>+</sup> solution. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 1750–1753 (2014).
  80. Sioutas, A. *et al.* Oxidant-induced autophagy and ferritin degradation contribute to epithelial-mesenchymal transition through lysosomal iron. *J. Inflamm. Res.* **10**, 29–39 (2017).
  81. Kuleshov, M. V *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90-7 (2016).
  82. Pico, A. R. *et al.* WikiPathways: Pathway Editing for the People. *PLoS Biol.* **6**, e184 (2008).
  83. Kelder, T. *et al.* WikiPathways: building research communities on biological pathways. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1301–D1307 (2012).
  84. Kutmon, M. *et al.* WikiPathways: capturing the full diversity of pathway knowledge. *Nucleic Acids Res.* **44**, D488–D494 (2016).
  85. Slenter, D. N. *et al.* WikiPathways: a multifaceted pathway database bridging metabolomics to other omics research. *Nucleic Acids Res.* **46**, D661–D667 (2018).
  86. Riggleman, B., Schedl, P. & Wieschaus, E. Spatial expression of the Drosophila segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. *Cell* **63**, 549–560 (1990).
  87. Funayama, N., Fagotto, F., McCrea, P. & Gumbiner, B. M. Embryonic axis induction by the armadillo repeat domain of  $\beta$ -catenin: Evidence for intracellular signaling. *J. Cell Biol.* **128**, 959–968 (1995).
  88. Van Es, J. H. *et al.* Notch/ $\gamma$ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* **435**, 959–963 (2005).
  89. Cadigan, K. M. & Nusse, R. Wnt signaling: A common theme in animal development. *Genes and Development* **11**, 3286–3305 (1997).
  90. Böhm, J., Sustmann, C., Wilhelm, C. & Kohlhase, J. SALL4 is directly activated by TCF/LEF in the canonical Wnt signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 898–907 (2006).
  91. Jho, E. -h. *et al.* Wnt/ -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator

- of the Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1172–1183 (2002).
92. Chamorro, M. N. *et al.* FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of  $\beta$ -catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J.* **24**, 73–84 (2005).
93. Rousset, R. *et al.* Naked cuticle targets dishevelled to antagonize Wnt signal transduction. *Genes Dev.* **15**, 658–671 (2001).
94. Longo, K. A. *et al.* Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. *J. Biol. Chem.* **277**, 38239–38244 (2002).

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、丁寧かつ熱心なご指導を戴いた、東京大学大学院 総合文化研究科 吉本敬太郎准教授に深く感謝致します。また、同研究室の吉富徹助教には、日頃の実験から論文執筆と投稿に至るまで、丁寧なご指導を戴きましたことに感謝致します。

東京理科大学 理学部第一部 化学科 由井宏治教授には、論文執筆に関して、丁寧なご指導を戴きましたことに感謝致します。

東京大学大学院 総合文化研究科 陶山明教授、道上達男教授、若杉桂輔准教授、矢島潤一郎准教授には、大変お忙しいところ、博士論文の審査員を快くお引き受け戴きましたことに感謝致します。

日産化学工業株式会社 古性均博士には、様々な実験設備の利用や論文執筆、特許出願に関して、多大なご支援とご指導を戴きましたことに感謝致します。

免疫染色及び Western blotting に関する丁寧なご指導を戴いた、物質・材料研究機構 メカノバイオロジーグループ 中西淳博士、山本翔太博士に深く感謝致します。

RNA シーケンスとデータ解析の受託に関して、大阪大学微生物病研究所 ゲノム情報研究センターに深く感謝致します。

吉岡純矢氏、和久井幸二氏、論文執筆のサポートを戴いた牧野くるみさんをはじめとした研究室の先輩、同期、後輩、秘書、技術補助員の皆様には、研究から私生活に至るまで、あらゆる場面でサポート戴きましたことに感謝致します。

最後に、精神的にも経済的にも私を支えて下さった、家族に感謝致します。