

論文の内容の要旨

論文題目　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

氏名　丸山　亮

【研究背景と目的】

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¹。従って、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。現在汎用されている細胞培養足場材料はフィブロネクチン²等の天然のタンパク質または、Polystyrene³等の合成高分子や RGD peptide⁴等の短い化学合成である。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で、動物由来成分であるため、不確定因子の混入やロット間による品質の差に課題がある。合成高分子等の非動物由来成分から構成される細胞培養足場材料はこれらの課題を克服することができるが、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。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。本研究ではそのような分子群として核酸アプタマーに着目した。核酸アプタマーは分子認識能をもつ一本鎖 DNA/RNA であり、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⁵、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⁶。これまで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。

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。EBA は E-cadherin の細胞外ドメインに結合することが明らかとなっており、EBA 修飾基板においてヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞株 A549 細胞の二価の金属イオン非依存的な接着が確認されている。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。

【結果と考察】

EBA の構造を推定するために、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 (図 1)。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 (図 1)。

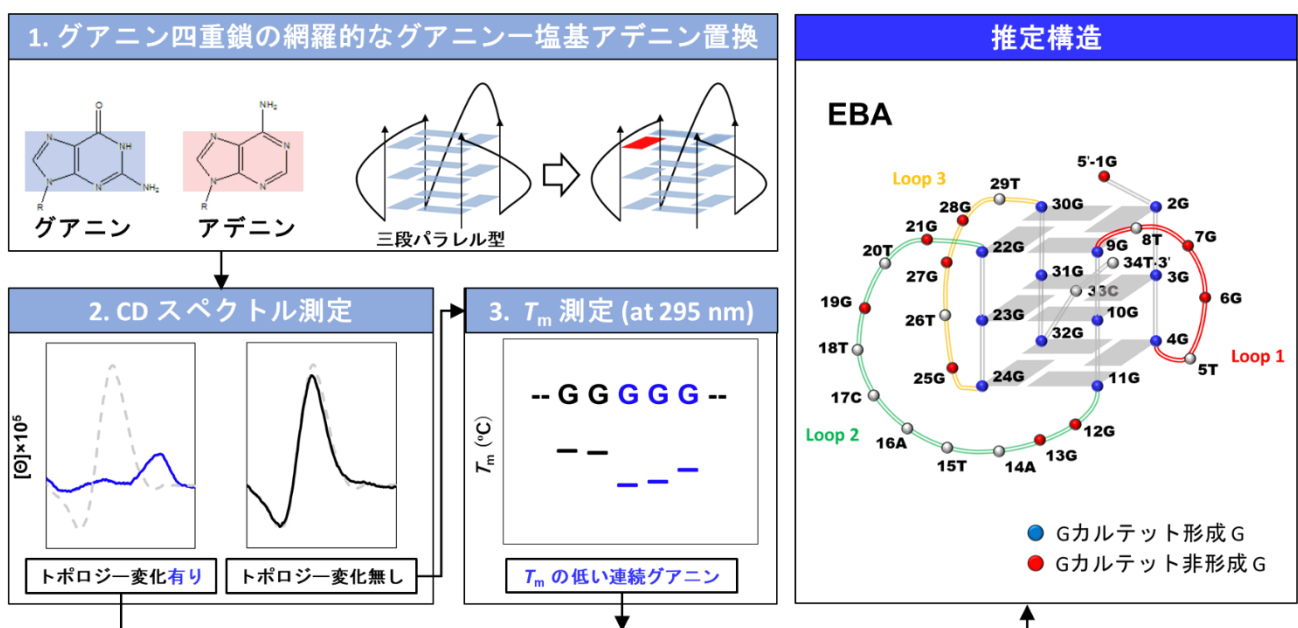


図 1. 分光学的手法に基づいた三段平行型グアニン四重鎖構造解析法と EBA の推定構造。

次に、EBA 修飾基板における細胞接着様式の解析を行った。FITC 修飾 EBA と E-cadherin 抗体による E-cadherin の共染色の結果、EBA が細胞表面上の E-cadherin と結合することが示唆された。EBA の各ループ構造をチミン置換した配列を修飾した基板における細胞接着評価を行った結果、二価の金属イオン非依存的な細胞接着と E-cadherin との結合量が同じ傾向にあることが確認された (図 2A, B)。異なるカドヘリンの発現が予想される細胞腫による細胞接着評価の結果も、EBA と E-cadherin との結合が 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寄与していることを支持していた (図 2C)。更に、EBA 修飾基板において EBA の相補鎖を導入することで細胞接着が抑制され、エンドヌクレアーゼ処理による EBA の分解によって細胞剥離が観察された (図 2D)。以上の結果は、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を示唆している。

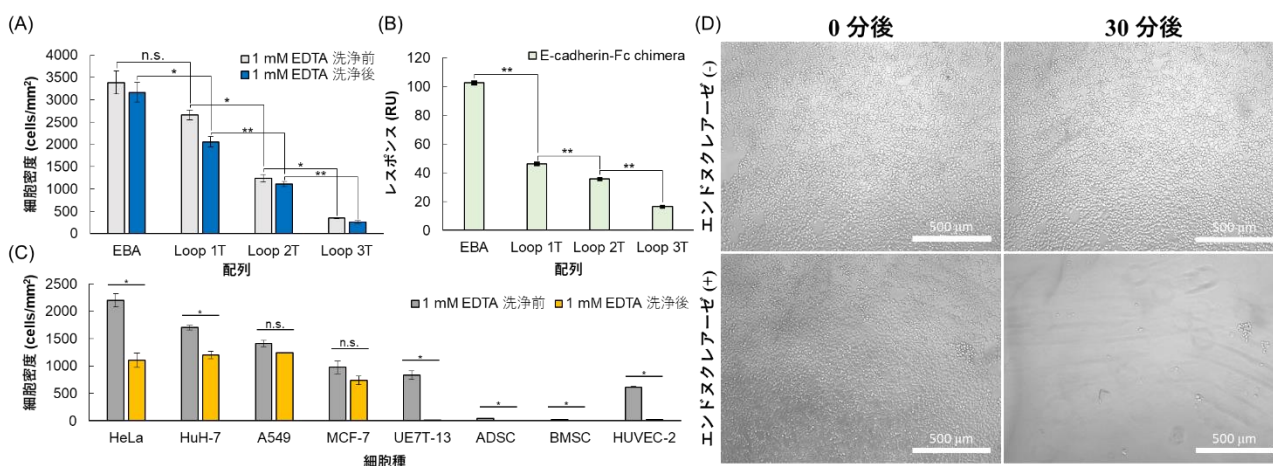


図 2. EBA 修飾基板における細胞接着と E-cadherin との相互作用解析. (A) A549 細胞を EBA 及び EBA の各ループ構造置換配列修飾基板に播種し、24 時間後と 1 mM EDTA 洗浄後における細胞密度. (B) EBA 及び EBA の各ループ構造置換配列修飾センサーチップに 80 nM E-cadherin-Fc chimera を添加した際の SPR レスポンス. (C) 各細胞を EBA 修飾基板に播種し、24 時間後と 1 mM EDTA 洗浄後における細胞密度. (D) エンドヌクレアーゼ処理による細胞剥離. *は有意差 (t 検定, $p < 0.05$), **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。

最後に、EBA 修飾基板が細胞機能に与える影響を評価した。EBA 修飾基板及び通常細胞培養足場材料であるポリスチレン (PS) 表面における細胞生存率と細胞増殖能を評価した結果、EBA 修飾基板における細胞が PS 表面と同等の生存率と増殖能を有していることが明らかになった (図 3A, B)。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 β -catenin の複合体形成を誘発し、Wnt/ β -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 (図 3C)。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。

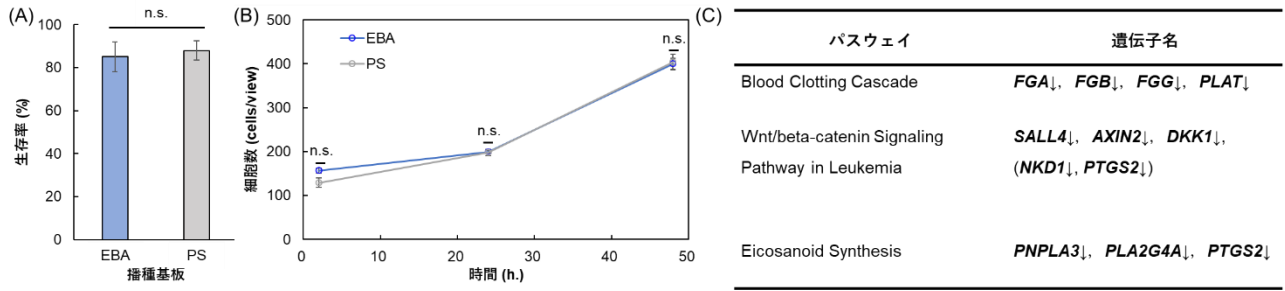


図 3. EBA 修飾基板における細胞機能. (A) A549 細胞を EBA 修飾基板及びポリスチレン (PS) 表面に播種し, 48 時間後における細胞生存率. (B) A549 細胞を EBA 修飾基板及びポリスチレン (PS) 表面に播種した際の増殖能. (C) A549 細胞を播種し, 48 時間後の遺伝子プロファイルのパスウェイ解析. n.s. は統計的に有意差が無いことを示している.

【結論】

本博士論文では, EBA の高次構造を解析し, 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り, 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/ β -catenin シグナリングにおける TCF/ β -catenin を介した遺伝子転写を減少させ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. 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.

【参考文献】

- (1) Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. *Cell* **2006**, *126*, 677–689.
- (2) Pytela, R.; Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E.; Aplin, J. D.; Hughes, R. C.; Jaffe, C. L.; Sharon, N.; Billiau, A.; Edy, V. G.; Heremans, H.; et al. *Cell* **1985**, *40*, 191–198.
- (3) Nagatoishi, S.; Tanaka, Y.; Tsumoto, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *352*, 812–817.
- (4) Iyer, R. K.; Chiu, L. L. Y.; Radisic, M. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2009**, *89A*, 616–631.
- (5) Liu, X.; Yan, H.; Liu, Y.; Chang, Y. *Small* **2011**, *7*, 1673–1682.
- (6) Kumar Sharma, T.; Shukla, R. *Adv. Anim. Vet. Sci.* **2013**, *2*, 50–55.