

博士論文

**Characterization of fibroblast growth factor receptor-binding DNA  
aptamer and its biological applications**

(繊維芽細胞増殖因子受容体に結合する DNA アプタマーの解析と  
その生物学的応用)

江口 晃弘

# Characterization of fibroblast growth factor receptor-binding DNA aptamer and its biological applications

## (繊維芽細胞増殖因子受容体に結合する DNA アプタマーの解析とその生物学的応用)

山東研究室, 37-187120, 江口晃弘

### 第 1 章：緒言

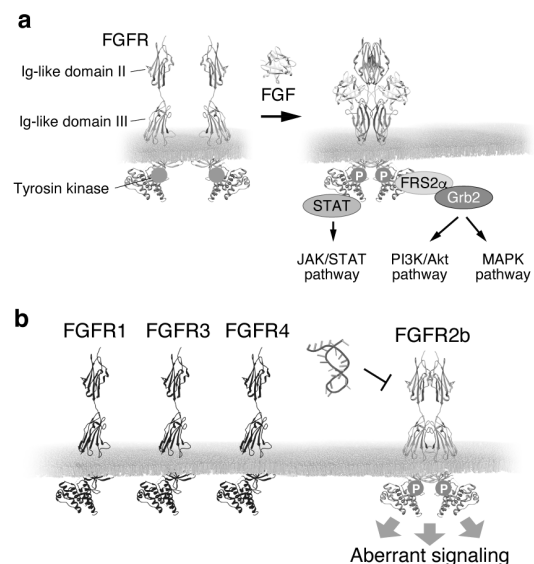
線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) は、線維芽細胞増殖因子 (FGF) の結合により二量体化し活性化する。FGFR の二量体化は細胞内のチロシンキナーゼドメインを近接させ、その結果自己リン酸化が起きる。このリン酸化により下流のシグナル伝達タンパク質のリクルートと活性化が誘導され、増殖・遊走・分化など様々な細胞機能が誘導される (Figure 1a)。FGFR は 4 つのファミリーメンバー (FGFR1-4) から構成され、FGF は 22 のファミリーメンバー (FGF1-14, FGF16-23) から構成される。FGFR の細胞外ドメインは 3 つの免疫グロブリン様ドメイン (Ig-like domain I-III) が繋がった構造をしており、FGFR1-3 は Ig-like domain III が異なるエクソンによってコードされた IIIb と IIIc と呼ばれる 2 つのスプライシング変異体を持つ<sup>1</sup>。

FGFR は様々ながんにおいて過剰発現や変異が見られるがん関連遺伝子でもある<sup>2,4</sup>。FGFR ファミリーメンバーの 1 つである FGFR2b はヒト胃癌細胞株 KATO-III において初めて増幅が確認されたがん関連タンパク質であり、胃癌、肺癌、卵巣がん、乳がんなどの様々ながんにおいて遺伝子異常や過剰発現が見られる<sup>5</sup>。特に胃癌においては 4-9% の症例において FGFR2b の増幅が見られることが知られている<sup>2,4</sup>。FGFR ファミリーメンバーはそれぞれ特異的な機能を発揮するため、他のファミリーメンバーに影響を与えずに FGFR2b を特異的に標的化することが FGFR2b 関連のがん治療において極めて重要である。これまでに AZD4547 や BGJ398 など FGFR に対する多くのチロシンキナーゼ阻害剤が開発され臨床試験が行われているが<sup>6</sup>、これらの薬剤は FGFR のキナーゼドメインの構造的な類似性に起因する特異性の低下により、他の FGFR ファミリーメンバーの活性化を阻害してしまう問題がある。このため、FGFR2b 特異的な阻害剤の開発には大きな関心が寄せられている。

DNA アプタマーは抗体と同等の高い親和性や特異性で標的に結合する分子であり、熱的に安定であることや化学合成可能であること等の様々な利点を有することから抗体の代替物として注目されている<sup>7</sup>。また、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法により多様な標的に対する DNA アプタマーが取得可能である。本研究では FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの取得を行い、その FGFR2b 過剰発現がんでの FGFR2b シグナルに対する作用に関する研究を行った (Figure 1b)。

### 第 2 章：FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの取得および評価

本章では、FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの取得を行い、アプタマーの構造および FGFR2b に対する結合特性の評価を行った。はじめに SELEX 法により

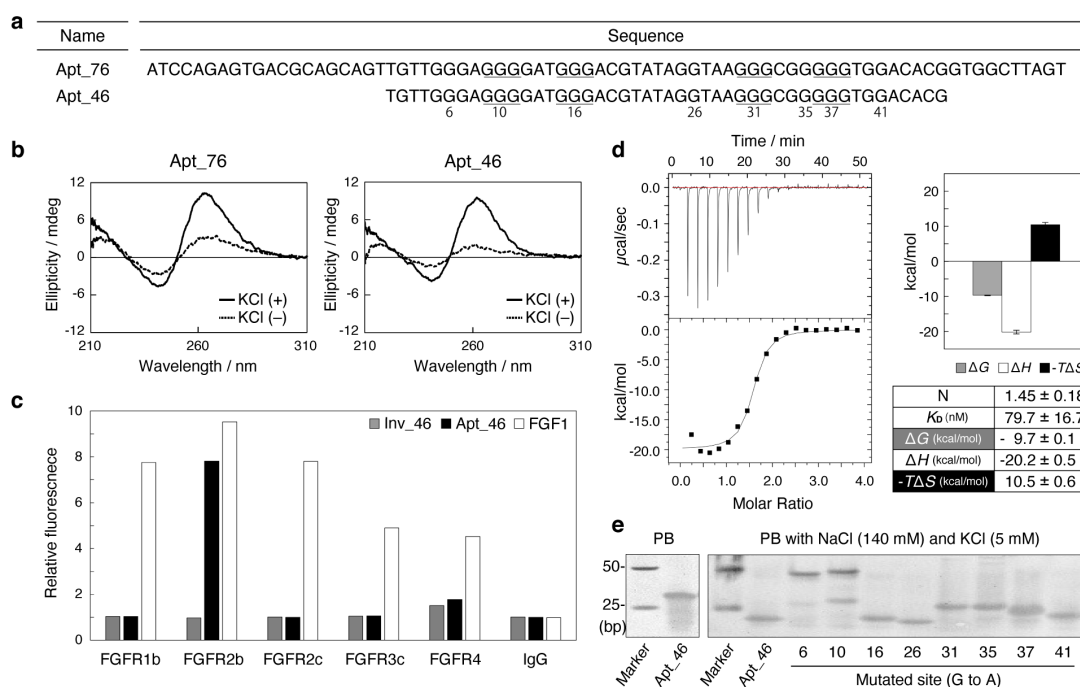


**Figure 1.** Targeting FGFR signaling. (a) FGFRs are dimerized and phosphorylated by the binding of FGFs and transduce intracellular signaling. (b) FGFRs consist of four family members and each has specific role in multiple cellular functions. The aptamer only inhibits the signaling of one of the family members, FGFR2b.

FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの取得を行った。6 サイクル後の DNA プールから塩基配列解析を行ったところ、76 塩基からなる FGFR2b 結合性 DNA アプタマー”Apt\_76”が同定された (Figure 2a)。Apt\_76 の配列には連続するグアニン配列 (G-tracts) が多数含まれていたことから、グアニン四重鎖 (G4) 構造を形成することが示唆された。そこで G4 構造の形成を円偏光二色性測定により確認した (left in Figure 2b)。円偏光二色性スペクトルが1価のカリウムイオン依存的に変化し、265 nm において正のピークを、240 nm において負のピークを示したことから、Apt\_76 は平行型の G4 構造を形成することが示唆された。

次に、この 76 塩基の中で結合に関与する最小配列の特定を目指した。多くの DNA アプタマーが G4 構造を持ち、その構造が結合に際して重要であることが報告されていることから、短鎖化した Apt\_76 に関して円偏光二色性測定および FGFR2b への結合の評価を行った。その結果、Apt\_76 内の 46 塩基からなるアプタマー”Apt\_46” (Figure 2a) が Apt\_76 と同様の円偏光二色性スペクトルと FGFR2b への結合能を示す最小構造であることが確認された (right in Figure 2b)。これらの結果より、以後の研究においては Apt\_46 を FGFR2b 結合性 DNA アプタマーとして用いることとした。

Apt\_46 の結合特異性は各種 FGFR-Fc を固定した磁気ビーズに対する Apt\_46 の結合を評価することにより行った。これらのビーズを 5'-FAM 修飾 Apt\_46 および Apt\_46 の逆配列 (Inv\_46) とインキュベートし、FAM の蛍光をフローサイトメトリーにより定量した (Figure 2c)。この際、全ての FGFR に結合する FGF1 を HiLyte Fluor 647 標識し、比較対象として用いた。この結果、FGF1 が全ての FGFR に結合するのに対し、Apt\_46 は



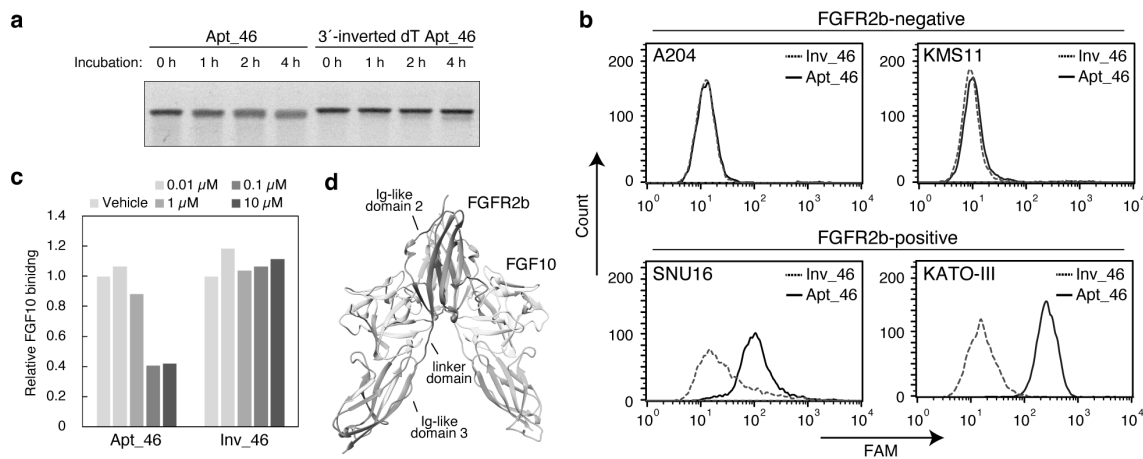
**Figure 2.** Characterization of FGFR2b-binding DNA aptamer. (a) Sequence of Apt\_76 and Apt\_46. The underlined sequences are predicted to form G4 structure by QGRS Mapper. (b) Circular dichroism spectrometry measurement of Apt\_76 and Apt\_46. The aptamers were folded in 20 mM Tris-HCl (pH7.6) containing (solid line) or not containing (broken line) KCl (100 mM). The measurements were conducted in the same buffer at 37 °C. (c) 5'-FAM-labeled Apt\_46 (100 nM), inversed sequence of Apt\_46 (Inv\_46) (100 nM), or HiLyte Fluor 647-labeled FGF1 (100 nM) was incubated with FGFRs-Fc-immobilized magnetic beads for 15 min at ambient temperature. The fluorescent signal from bound molecules were measured using flow cytometry. (d) Isothermal titration calorimetry measurement was conducted in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) at 25 °C. The titration curve was obtained by sequential titration of Apt\_46 (80–100 µM) to the extracellular domain of FGFR2b (4 µM). (e) The mutants of Apt\_46 were folded in 10 mM phosphate buffer (PB) (pH7.6) (left) containing or (right) not containing NaCl (140 mM) and KCl (5 mM). The folded samples (3 pmol) were applied to Native-PAGE using Tris-Borate-EDTA buffer containing or not containing NaCl (140 mM) and KCl (5 mM).

FGFR2b にのみ結合することが確認された。

結合親和性の測定は等温滴定型カロリメトリーにより行い、解離定数は  $79.7 \pm 16.7$  nM であった (Figure 2d)。滴定曲線からは大きなエンタルピーの獲得 ( $\Delta H = -20.2 \pm 0.5$  kcal/mol) とエントロピーの損失 ( $-T\Delta S = 10.5 \pm 0.6$  kcal/mol) が確認され、水素結合や静電相互作用の形成が示唆された。これらの相互作用が FGFR2b に対する特異的な結合に寄与していると考えられる。

FGFR2b へ結合に必要な構造及び塩基の評価を、Apt\_46 変異体の解析により行った。変異導入部位の選定に際しては Apt\_46 が G4 構造を形成している点に着目し、G4 構造形成に関与し得る残基を選定した。Apt\_46 の配列中には G4 構造形成部位の候補である G-tracts が 8 つ存在しているため、各 G-tracts に含まれる G を A に置換した 8 つの変異体を用意し (Figure 2a, 変異導入サイト下に塩基番号表記)、変異導入による Aptamer 構造の変化及び FGFR2b への結合能を評価した。Aptamer 構造の変化は非変性 PAGE によって評価した (Figure 2e)。非変性 PAGE でのバンド位置が Apt\_46 と同様となる変異体は G16A 及び G41A のみであり、少なくともこの 2 つの変異体以外は Apt\_46 と異なる構造を形成することが示唆された。Apt\_46 と類似の構造を形成すると考えられる G16A 及び G41A, そして構造の異なる G6A 及び G31A の 4 つの変異体を用いて FGFR2b との相互作用を等温滴定型カロリメトリーで解析したところ、4 つすべての変異体の滴定曲線において Apt\_46 では確認されていたエンタルピーの寄与は認められなかった (Data not shown)。G16 と G41 に関しては、変異体の非変性 PAGE と円偏光二色性スペクトルの結果 (Data not shown) から Apt\_46 と同様の構造を形成することが予想されるため、結合に直接関与する塩基であることが示唆される。その他の変異体は Apt\_46 と異なる構造を取り、且つ FGFR2b への結合能が確認できないことから、FGFR2b への結合には Apt\_46 に存在する特定の構造の形成が必要であること、及び 6 つの G-tracts 全てが構造形成に関与することが示唆された。

### 第 3 章 : Apt 46 の FGFR2b 発現細胞株への作用



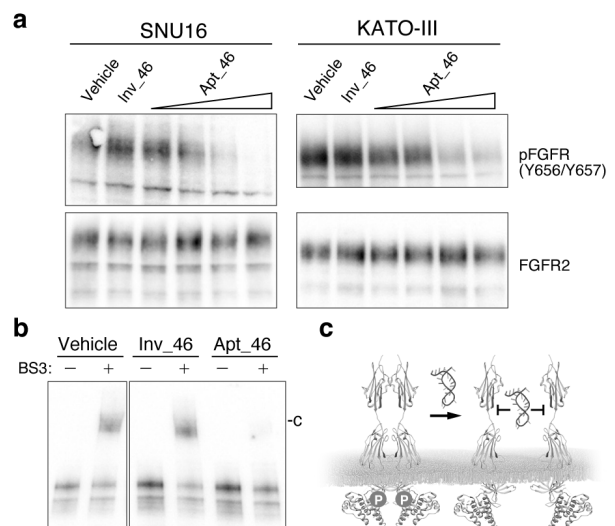
**Figure 3.** (a) Serum stability of Apt\_46. Apt\_46 or 3'-inverted dT-modified Apt\_46 (2 μM) was incubated with 10% heat-inactivated feral bovine serum (FBS) in DPBS for indicated times at 37 °C. The samples were immediately applied to denaturing 10% polyacrylamide gel electrophoresis. (b) FGFR2b-negative cell lines (A204 and KMS11) and FGFR2b-positive cell lines (SNU16 and KATO-III) were incubated with 5'-FAM-labeled Inv\_46 or Apt\_46 (100 nM) in DPBS containing 0.5% bovine serum albumin and 0.1% tRNA for 15 min at 21 °C. The fluorescent signal of bound molecules was measured using flow cytometry. (c) Competition assay between Apt\_46 and FGF10. HiLyte Fluor 647-labeled FGF10 (0.1 μM) and FAM-labeled oligonucleotide samples (0.01–10 μM) were co-incubated with FGFR2b-Fc-immobilized magnet beads for 15 min at ambient temperature. The fluorescent signal of HiLyte Fluor 647-labeled FGF10 bound to the beads was measured using flow cytometry. (d) Putative model of FGFR2b dimer induced by FGF10 binding. The FGFR2b dimer complex model is built by superimposing FGFR2b-FGF10 complex structure (PDB ID: 1NUN) on a known FGFR1c-FGF2 dimer structure (PDB ID: 1FQ9).

本章では、細胞表面に発現する FGFR2b の挙動に及ぼす Apt<sub>46</sub> の作用を評価した。はじめに Apt<sub>46</sub> の細胞培養環境中での安定性を確認するため、血清耐性の評価を行った (Figure 3a)。その結果、Apt<sub>46</sub> は 10% ウシ胎児血清中で徐々に分解するものの、3'末端の inverted dT 修飾を行うことで安定性が向上することが示された。次に細胞上に発現した FGFR2b への結合能評価を行った。FGFR2b 陽性細胞株 SNU16 および KATO-III、FGFR2b 陰性細胞株 A204 および KMS11 を 5'-FAM 標識 Apt<sub>46</sub> とインキュベートし、フローサイトメトリーを用いてアプタマーの結合を測定し、Apt<sub>46</sub> が FGFR2b 陽性細胞株にのみ結合することを確認した (Figure 3b)。

Apt<sub>46</sub> のエピトープに関する知見を得るため、FGFR2b の天然リガンド FGF10 に対する結合競合アッセイを行なった (Figure 3c)。その結果 Apt<sub>46</sub> の濃度依存的な FGF10 の結合量低下が見られ、Apt<sub>46</sub> と FGF10 のエピトープが部分的に重なっていることが示唆された。FGF10 と FGFR2b の複合体結晶構造によると、FGF10 は Ig-like domain II と III にまたがるエピトープを有している (Figure 3d)。Apt<sub>46</sub> が FGFR2b にのみ結合し、Ig-like domain III の配列が異なる FGFR2c には結合しないという結果を踏まえると、Apt<sub>46</sub> は Ig-like domain III 近傍に結合することが示唆される。Apt<sub>46</sub> が FGFR2b の天然リガンド FGF10 と競合することから、そのアンタゴニスト活性をウエスタンブロットティングにより確認した。その結果、Apt<sub>46</sub> は FGF リガンドによって増強される FGFR2b のリン酸化を阻害した (Data not shown)。

#### 第 4 章：Apt<sub>46</sub> による FGFR2b シグナル阻害効果およびその作用機序の解明

本章では、がん細胞における FGFR2b の内因性活性化に対する Apt<sub>46</sub> の阻害効果と阻害機構の解析を行った。FGFR2b 過剰発現がん細胞株である SNU16 および KATO-III では、リガンド非添加条件においても FGFR2b のリン酸化が生じる ("Vehicle" lane in Figure 4a) <sup>8</sup>。この細胞に Apt<sub>46</sub> を添加したところ、この内在的なリン酸化が阻害されることが確認された (Figure 4a)。Apt<sub>46</sub> の FGFR2b の内因性活性化に対する阻害のメカニズムを理解するためには、これらの細胞株における異常な FGFR2b 活性の起源を考慮する必要がある。FGFR はリガンド非存在下においても二量体を形成することが報告されていることから <sup>9</sup>、Apt<sub>46</sub> の FGFR2b の内因性活性化に対する阻害作用はリガンド非依存的な二量体形成の阻害によるものであると仮説を立てた。そこで SNU16 細胞を Apt<sub>46</sub> の存在下でインキュベートしたのち、ケミカルクロスリンカー BS3 を作用させ近接するタンパク質同士の架橋を行い、ウエスタンブロットティングによる検出を行うことで FGFR2b の二量体状態を調べた (Figure 4b)。リガンド非添加条件において、クロスリンカーの添加依存的により FGFR2b 単量体由来ではない新たなバンドが高分子側に確認され ("C" in Figure 4b)、リガンド非依存的二量体の形成が示唆された。Apt<sub>46</sub> の添加により高分子側のバンドの強度が減少することが確認され、Apt<sub>46</sub> が FGFR2b のリガンド非依存的二量体の形成を阻害する可能性が示唆された (Figure 4c)。

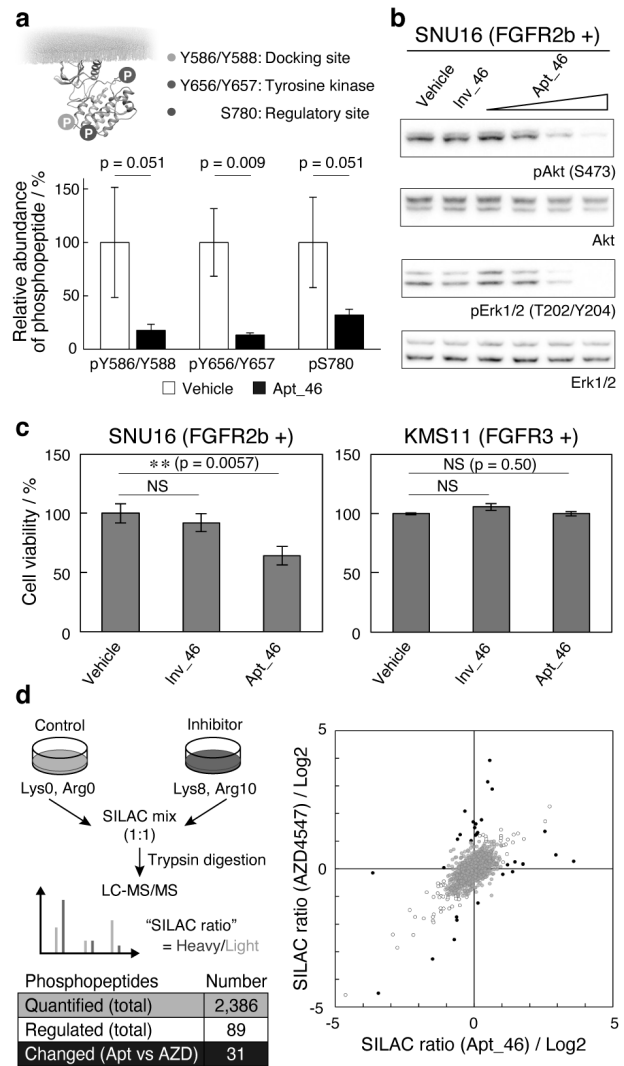


**Figure 4.** Effect of Apt<sub>46</sub> on FGFR2b aberrant signaling. (a) Western blotting of the cell lysates of SNU16 or KATO-III incubated with Inv<sub>46</sub> (2000 nM) or Apt<sub>46</sub> (16, 80, 400, and 2000 nM) for 15 min. (b) Western blotting of the cell lysates of SNU16 incubated with Inv<sub>46</sub> (1 μM) or Apt<sub>46</sub> (1 μM) for 1 h on ice, followed by the incubation with BS3 (500 μM) for 1 h on ice. (c) Suggested inhibitory action of Apt<sub>46</sub>.

Apt<sub>46</sub> による阻害効果を詳細に解析する為、FGFR2b の細胞内ドメインの各リン酸化修飾部位の修飾状態を、LC-MS/MS を用いたラベルフリー定量解析を用いて評価した (Figure 5a). FGFR2b 細胞内ドメインのリン酸化サイトのうち、Y586/Y588, Y656/Y657, および S780 の3サイトが Apt<sub>46</sub> 作用時および vehicle 作用時のどちらの条件においても定量検出された。Y656/Y657 はチロシンキナーゼドメインの活性化ループ内部に位置しており、そのリン酸化はチロシンキナーゼ活性に参与する。Y586/Y588 は下流シグナルタンパク質のドッキングサイトとして機能し、S780 は FGFR2 の活性化を調整する役目を担っている。定量検出された3つのペプチド全てにおいてリン酸化量の減少が見られ、Apt<sub>46</sub> が FGFR2b のチロシンキナーゼ活性、及びそれによる細胞内ドメインの自己リン酸化を阻害することが示唆された。ドッキングサイトである Y586/Y588 のリン酸化阻害が確認されたことから、FGFR2b の下流シグナルに対する影響を調べた。下流シグナルタンパク質である Akt 及び Erk のリン酸化をウエスタンブロッティングにより解析した結果 (Figure 5b), Akt 及び Erk に対する濃度依存的なリン酸化阻害が確認された。

Apt<sub>46</sub> の阻害機能の特異性を評価する為、FGFR3 依存性細胞株 KMS11 に対して Apt<sub>46</sub> を作用させ阻害効果の評価を行った。KMS11 では FGFR3 が過剰発現し、リガンド非存在下で活性化している。Apt<sub>46</sub> を KMS11 に添加した際には FGFR3 およびその下流シグナルの活性化への阻害効果は認められなかった (Data not shown)。また、SNU16 および KMS11 を Apt<sub>46</sub> 存在下で3日間培養し細胞生存率を測定したところ、SNU16 においてのみ細胞増殖が抑制されることが確認された (Figure 5c)。結果として、Apt<sub>46</sub> が FGFR2b の内因性活性化を特異的に阻害していることが示唆された。

Apt<sub>46</sub> の FGFR2b への高い結合特異性を考慮すると、FGFR2b 過剰発現がん細胞に対しより選択的に作用すると期待される。そこで Apt<sub>46</sub> と



**Figure 5.** Effect of Apt<sub>46</sub> on FGFR2b aberrant signaling. (a) Phosphorylation of each tyrosine residue of FGFR2b intracellular domain was measured by quantitative LC-MS/MS measurement. FGFR2b was immunoprecipitated from cell lysates of SNU16 incubated with vehicle or Apt<sub>46</sub> (1 μM) and applied to SDS-PAGE. The protein was extracted from the gel and digested by Lys-C/Trypsin, followed by LC-MS/MS measurement. The bar graph shows mean ± SD (N = 3). An unpaired two-tailed t-test was performed between two conditions. The illustration of the kinase domain of FGFR2b is depicted using a data from the Protein Data Bank (PDB ID: 2PSQ). (b) Western blotting of the cell lysates of SNU16 incubated with Inv\_46 (2000 nM) or Apt<sub>46</sub> (16, 80, 400, and 2000 nM) for 15 min. (c) Cell growth assay of SNU16. The cells were seeded in 96-well plate at the density of 5000 cells/well with Inv\_46 (1 μM) or Apt<sub>46</sub> (1 μM). After 72 h incubation, the cell viability was measure using cell counting kit-8. (d) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)-based phosphoproteomics analysis. The SNU16 cells cultured in heavy medium were incubated with Apt<sub>46</sub> (1 μM) or AZD4547 (1 μM) for 15 min at 37 °C and lysed to extract proteins. The SNU16 cells culture in light medium were incubated with vehicle and lysed. The lysates were mixed at the mass ratio of proteins 1:1 and subjected to quantitative LC-MS/MS measurement. Three independent SILAC samples were prepared and phosphopeptides that were quantified in more than one sample are plotted as "Quantified" in scattering plot.

AZD4547 が FGFR2b 発現細胞のリン酸化プロテオームに与える影響の比較を行なった (Figure 5d). 本実験条件においては 2,386 のリン酸化ペプチドが定量検出され ("Quantified" in Figure 5d), そのうちの 89 種のリン酸化ペプチドが阻害剤の存在により 2 倍以上存在量が変化するペプチドとして同定された ("Regulated" in Figure 5d). このうちの 31 種のリン酸化ペプチドでは, Apt\_46 刺激条件と AZD4547 刺激条件の間で 2 倍以上の変化量の違いが見られた ("Changed (Apt vs AZD)" in Figure 5d). この結果は AZD4547 が細胞内のチロシンキナーゼにも作用しうる一方で, Apt\_46 の阻害作用が細胞表層の FGFR2b 特異的に働くという違いにより説明されうる.

## **第 5 章：結言**

本研究では, FGFR2b 結合性 DNA アプタマーの開発, 及びその FGFR2b 過剰発現がん細胞株へ与える影響に関して研究を行なった. Apt\_46 は FGFR2b に特異的に結合し, FGFR2b 依存的な細胞シグナルを阻害する特性を持つことを明らかにした. FGFR はがん治療における重要な標的であるが, 数多く開発されているチロシンキナーゼ阻害剤では特異性の低さが問題となっている. 特異性は阻害剤の特性において最も重要な要素の一つであり, Apt\_46 が FGFR2b に高い選択性で結合することは実应用到に際して大きな利点である.

また, Apt\_46 は増殖因子受容体のリガンド非依存的な二量化を阻害することが示唆された. SELEX 法を利用してこれまで多くの増殖因子受容体結合性 DNA アプタマーが取得されてきた. その中には受容体に対してアンタゴニスト活性を示すものもあるが, アプタマーがリガンド非依存的な増殖因子受容体の二量化を阻害することはこれまでに実証されていない. リガンド非依存的な受容体活性化は, がん治療における重要な阻害標的である. しかし, リガンド非依存的な受容体二量化の構造基盤の全容は未だ明らかになっておらず, リガンド非依存的受容体二量体を標的とした阻害剤設計の上で大きな障壁となっている. 現在の実験デザインでは SNU-16 や KATO-III における異常な FGFR2b 活性化がオートクリン型で起こっている可能性を完全には排除できないことに留意すべきであるが, 本研究はリガンド非依存的な受容体二量化を阻害する DNA アプタマーを提唱するものであり, 今後この作用の構造基盤を明らかにすることで二量化受容体を標的とした阻害剤設計指針確立の一助となる.

## **参考文献**

- (1) Ornitz, D. M.; Itoh, N. *WIREs Dev. Biol.* **2015**, *4*, 215–266.
- (2) Matsumoto, K. et al. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 727–732.
- (3) Jung, E. J. et al. *Hum. Pathol.* **2012**, *43*, 1559–1566.
- (4) Deng, N. et al. *Gut* **2012**, *61*, 673–84.
- (5) Hattori, Y. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5983–5987.
- (6) Chae, Y. K. et al. *Oncotarget* **2017**, *8*, 16052–16074.
- (7) Zhou, J.; Rossi, J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 181–202.
- (8) Kunii, K. et al. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2340–2348.
- (9) Sarabipour, S.; Hristova, K. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10262.

## **Published Papers**

- [1] Eguchi, A., Utsumi, A., Hoshiyama, J., Kuwata, K., Nagatoishi, S., Tsumoto, K., Ueki, R., Sando, S. "A DNA Aptamer That Inhibits the Formation of Unliganded Receptor Dimer and Ligand-Independent Signaling in Cancer Cells" *ChemRxiv* **2020**, DOI: <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12925175.v1>.
- [2] Eguchi, A., Nakakido, M., Kuroda, D., Nagatoishi, S., Tsumoto, K., Nagamune, T., Kawahara, M. "An epitope-directed antibody affinity maturation system utilizing mammalian cell survival as readout" *Biotechnol. Bioeng.* **2019**, *16*, 1742–1751. (Publication not related to the doctoral dissertation)