

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14985

研究課題名(和文)強力な鎮痛作用を示す新規オピオイド受容体核酸リガンドの創製と分子作用機序の解明

研究課題名(英文)Creation of novel DNA ligands with potent analgesic action against MOR opioid receptor and elucidation of molecular mechanisms.

研究代表者

池本 光志 (IKEMOTO, Mitsushi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：50356424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：G Protein Coupled Receptors (GPCRs)を標的とするDNAアプタマー創製を目的とし、GPCRsの生理機能を活用した新規探索法を開発した。本探索法は、探索感度と探索効率においてCell SELEX法を凌駕する技術であることが明らかとなった。本探索法を利用して、鎮痛関連GPCRsであるオピオイド受容体(MOR)を認識するDNAアプタマーを探索した結果、Apt-MORと命名したDNAアプタマーを得た。Apt-MORは、MORに対して特異的かつ高親和性に結合し、アゴニスト活性を示した。従って、新規探索法とApt-MORは、鎮痛創薬技術開発に資する有用なツールとなり得る。

研究成果の概要(英文)：We have established a novel DNA aptamer screening method utilizing the physiological functions of GPCRs to develop DNA aptamers targeting G protein coupled receptors (GPCRs). As a result of many studies, this method was more sensitive and efficient than Cell SELEX method. As a result of a search using this screening technology, we obtained a DNA aptamer, designated Apt-MOR, which recognized MOR opioid receptor, an analgesic-related GPCR. This DNA aptamer bound specifically to MOR with high affinity and functioned as an agonist for MOR. Therefore, this novel screening method and Apt-MOR DNA aptamer can be available tools for developing analgesic drug discovery technology.

研究分野：神経分子薬理学

キーワード：アプタマー DNA GPCRs オピオイド受容体 探索方法 鎮痛 創薬基盤技術 Cell SELEX法

1. 研究開始当初の背景

(1) G蛋白質共役型受容体(GPCRs)は、痛み、高次脳機能等の生命維持機能に必須な7回膜貫通型受容体であり、大きな遺伝子ファミリーを形成する。また、生体内でホモ・ヘテロ二量体を形成して多彩な生理機能を発揮する(引用文献)。生理活性物質をリガンドとするGPCRsは、ヒトでは約340個存在し、約120個は生理機能が不明である。さらに、受容体活性部位に結合して薬理作用を示す「古典的リガンド」と、受容体活性部位以外に結合して受容体構造を変化させることで薬理作用を示す「アロステリックリガンド」が存在する。アロステリックリガンドは、受容体サブタイプの厳密な識別と微妙な受容体活性調節機能を有することから、副作用を回避した次世代医薬として期待されている。

(2) 麻薬性(耐性、身体依存ならびに精神依存)を発現しない鎮痛薬の開発は、基礎医学研究者にとって長年の研究テーマであり、いくつかの優れた鎮痛薬が開発されてきた。現在、慢性神経疼痛、がん性疼痛等の治療を進める上で新規鎮痛薬の開発に対する期待は大きい。モルヒネを凌駕する鎮痛薬の開発は困難を極めている。モルヒネは、使用法を誤ると、麻薬性、すなわち、鎮痛耐性、身体依存、精神依存現象を示すことから、その使用は医療的・法的に厳格に制限されている。従って、モルヒネの鎮痛効果を凌駕し、麻薬性を持たず、かつ一般家庭で安全に使用できる新規鎮痛薬の開発は、次世代医薬品開発において重要な研究課題のひとつである。

(3) 核酸アプタマーは、タンパク質等の標的因子の立体構造を認識して分子機能を調節するDNA/RNA分子である。核酸アプタマーは、作成コスト、複合体作成、化学修飾、免疫原性回避、分子設計等において抗体より著しく優れており、抗体に代わる次世代バイオ素材・医薬として注目されている。GPCRs等をはじめとする細胞膜受容体に結合する核酸リガンド取得法としては、PCRを利用するCell SELEX法が知られている(引用文献)。しかし、Cell SELEX法は、PCR増幅バイアスのために高親和性核酸アプタマーの取得が困難、多大な労力や作業時間を要する等の問題が指摘されている。このため、抗体を凌駕する核酸アプタマー取得法としての地位を築くには至っていない。核酸ライブラリーは、天文学的な配列多様性を有しており、標的GPCRsに対する未知のアロステリックリガンド機能や特異的・高親和性結合性を示す核酸リガンドの宝庫と考えられる。従って、核酸ライブラリーの潜在的ポテンシャルを十二分に活用し、副作用を低減した核酸医薬開発を推進するためには、Cell SELEX法に代わる次世代スクリーニング法の開発と抗体を凌駕する核酸

アプタマー開発が必要である。

4) 新規探索方法の開発

研究代表者は、抗体を凌駕する核酸アプタマーの創製を目指し、次世代スクリーニング技術の開発を進めてきた。その過程で培養細胞の細胞膜上に発現するGPCRs等の膜受容体の細胞生理機能を利用して核酸アプタマーの探索同定を行う新規方法を考案するに至り、そのプロトタイプを開発を進めてきた。

2. 研究の目的

研究代表者は、GPCRsの細胞生理機能を利用してGPCRに結合する核酸アプタマーの探索同定を行う新規探索法のプロトタイプを開発を進めてきた。本研究計画では、本探索法を用い、モルヒネ鎮痛効果を凌駕する高親和性核酸リガンドの創製と分子作用機序の解明を目的として以下の検討を行った。

(1) 代表的な鎮痛関連GPCRsであるオピオイド受容体(MOR)を標的因子として設定し、新規探索法を活用して同受容体に対する高親和性核酸リガンドの探索・同定を行う。また、このプロセスで得られた技術的知見をフィードバックさせ、新規探索法の高感度化を目指した精査と技術改良を行う。

(2) 上記で同定した核酸リガンドの高機能化(最適化と安定性向上等)と分子認識機能解析を試み、強力な鎮痛作用を示す核酸リガンドのMOR受容体結合部位と結合様式を立体構造的に解明することに挑戦する。

3. 研究の方法

MOR結合DNAアプタマー探索同定

研究代表者が独自に考案した新規探索法ならび改良型Cell SELEX法を利用して、合成一本鎖DNA核酸ライブラリーからMORに結合するDNAアプタマーの探索・同定を実施した。探索・同定には、独自に構築したテトラサイクリン依存的にMORを発現誘導する293安定発現細胞株(Flp-In-T-REx 293 HA-MOR細胞)を用いた。また、DNA核酸ライブラリーは、40塩基長の任意配列を含む76塩基長の本鎖DNA(1ナノモル)を化学合成により作成した。尚、スクリーニング進行状況は、各サイクルに於いて行うPCR反応をReal Time PCR法にて行い、融解曲線解析を併用することで、PCR増幅状況と増幅DNAアプタマー集団のプロファイリングをモニタリングすることによりスクリーニングの適切な進行を確認した。

Apt-MOR分子特性解析

細胞生物学的および細胞組織化学的手法を併用し、Apt-MORのMOR結合活性およびリガンド生理機能解析を実施した。細胞生理機能は、293T細胞にpGloAMPルシフェラーゼアッセイシステム(Promega)を組み込んだ細胞アッセイ系を構築し、生細胞内cAMP量変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 新規探索法の開発と有用性の検証

新規探索法の開発

新規探索方法の高感度化を目指し、開発中の新規探索方法を詳細に精査した。具体的には、スクリーニングに使用する Flp-In T-REx 293 HA-MOR 安定細胞培養株の細胞培養条件（培養培地種類、培養時間等）、スクリーニング条件（ブロッキング剤種類、濃度、細胞処理方法等）等を精査し改善することによって探索条件を最適化し、新規探索法のプロトタイプを完成させることに成功した。尚、本新規探索法は、特許申請準備中である。

改良型 Cell SELEX 法の開発

新規探索法の精査と高感度化を指向した技術改良を進めるため、汎用されている Cell SELEX 法との比較解析実験を実施した。従来の Cell SELEX 法では、MOR に特異的かつ高親和性に結合する核酸アプタマーの取得は困難と想定されることから、図 1 に示す改良型 Cell SELEX 法を独自に考案し、合成一本鎖 DNA ライブラリーよりスクリーニングを実施した。

本改良法は、テトラサイクリン投与依存的に MOR を発現誘導する 293 安定化細胞株 (Flp-In T-Rex 293 HA-MOR) をスクリーニングに使用する点で従来法とは全く異なる。本構築細胞株の使用により、テトラサイクリン投与によって単クローン化細胞に MOR を人為的に発現させることが可能となり、スクリーニング時における細胞膜表面 MOR 発現量を顕著に増加させることを可能にただけでなく、カウンターセクション（非特異的結合核酸アプタマーの除去プロセス）時におけるバックグラウンドの顕著な低減に成功した。また、スクリーニング過程で選別されてくる一群の核酸アプタマーの回収効率を向上させるため、回収されてくる核酸アプタマーを、ビオチン化 PCR プライマーを用いた PCR 反応を行うことでビオチン化標識し、ストレプトアビジン磁性ビーズ (Dynabeads MyOne™ Streptavidin C1, Invitrogen) と反応させることによって回収率の向上も併せて実現した。

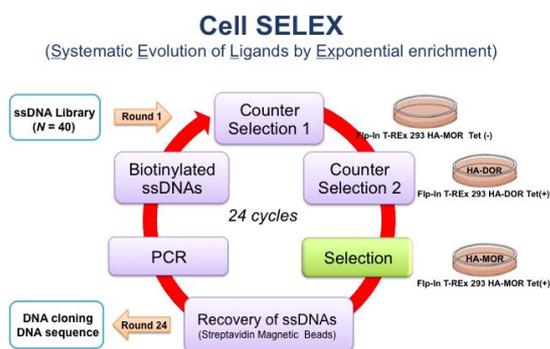


図 1 改良型 Cell SELEX 法の概要

本改良法を用いて MOR アプタマーの 1 次スクリーニングを実施するにあたり、医薬品への実用応用展開を考慮し、RNA より安定性（ヌクレアーゼ抵抗性）ならびに合成コストの点で優位性がある DNA を選択した。また、DNA ライブラリーは、40 塩基長の任意配列を含む 76 塩基長の一本鎖 DNA（1 ナノモル）を化学合成により作成し、全量を使用した。

1 次スクリーニングは、図 1 に示した方法により、合計 24 サイクル実施した。各サイクルにおいて実施した PCR 反応は 20 サイクルに設定し、Real Time PCR 法を用いて PCR 増幅状況を毎回リアルタイムでモニタリングして直線の増幅領域にあることを全スクリーニング過程において確認した。尚、1 次スクリーニングは、図 2 に示す条件を設定し、MOR に対して高親和性結合活性を示す DNA アプタマーが濃縮されるようにした。

Round	Condition of DNA Binding		Component of Binding Buffer				Washing Condition		
	Dish Size	Incubation Time	Testes DNA	Yeast tRNA	BSA	FBS	Volume	Frequency	Time
	(cm)	(min)	(ng/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)	(%)	(ml)	(time)	(min/time)
1	Φ9.0	60	0.03	0	0.33	0	3	1	1
2	Φ9.0	60	0.07	0	0.67	0	3	1	1
3	Φ9.0	60	0.10	0	1.00	0	3	1	1
4-6	Φ6.0	60	0.10	0	1.00	0	3	2	2
7-9	Φ3.5	60	0.10	0	1.00	0	2	3	3
10-12	Φ3.5	45	0.10	0.10	1.00	0	3	3	3
13-15	Φ3.5	30	0.10	0.20	1.00	0	3	3	5
16-18	Φ3.5	15	0.10	0.40	1.00	0	3	3	10
19-21	Φ3.5	15	0.10	0.40	1.00	10	4	4	15
22-24	Φ3.5	15	0.10	0.40	1.00	20	5	5	20

図 2 1 次スクリーニング条件

1 次スクリーニングの濃縮効率をモニタリングするために、PCR 増幅されてきた DNA アプタマーの融解曲線パターンを 3 サイクル毎に解析した。その結果、22-24 サイクルにおいて、牛血清中に含まれる成分に非特異的に吸着する DNA アプタマーを排除したところ、特定の DNA アプタマー集団が顕著に濃縮された (図 3)。

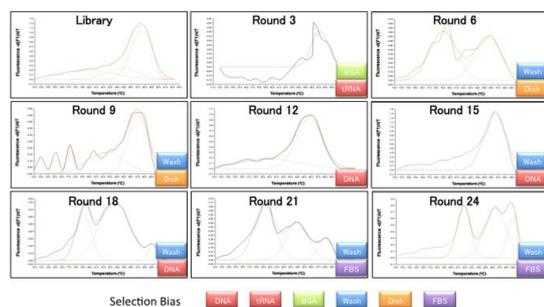


図 3 融解曲線パターン解析

最終セクションを終えた DNA アプタマーの DNA 塩基配列解析を行うため、PCR フラグメントを T-ベクターにサブクローニング後、大腸菌 DH5 に形質転換した。アンピシリンを含む LB 培地上で増殖してきたコロニーの

中から任意の 107 個のコロニーを選別し、これらコロニーに含まれる T-ベクター中にサブクローニングされている DNA アプタマー塩基配列を DNA シークエンサーにて解析した。その結果、16 種類の塩基配列の異なる DNA アプタマーが含まれていた。次に、2 次スクリーニングとして、取得した全 DNA アプタマーに対し、テトラサイクリン投与により MOR を発現誘導させた Flp-In T-REx 293 HA-MOR 細胞膜表面に対する MOR 結合活性 (100 nM 以下) を蛍光免疫細胞化学法により評価した。その結果、1 種類の DNA アプタマー (命名:Apt-MOR、特許申請準備中) のみが高親和性 MOR 結合活性を示した。尚、Apt-MOR の選別頻度は 0.93% (=1/107) であった (図 4)。

新規探索法の有用性評価

新規探索法のスクリーニング効率と感度を評価するために、Apt-MOR 濃縮効率を指標に新規探索法と改良型 Cell SELEX 法の比較実験を実施した。その結果、新規探索法は、Apt-MOR を 4 回目のスクリーニングで 20 倍の効率で選別濃縮出来ることが明らかとなった (図 4)。また、改良型 Cell SELEX 法によるスクリーニングで最も濃縮された DNA アプタマー (MOR1) は、新規探索法による 1 回目のスクリーニングで濃縮されただけでなく、同法では全く検出されなかった DNA アプタマー (MOR3~MOR9) の濃縮にも成功した (図 4)。従って、新規探索法は、改良型 Cell SELEX 法に対して少なくとも 6 倍以上の作業効率と 20 倍以上の濃縮効率を持つことが明らかとなり、Cell SELEX 法に対する有用性と優位性が実証された (図 4)。

No	Clone Name	Selected Ratio (%)			
		Round 1	Round 3	Round 4	Improved Cell SELEX
1	Apt-MOR	-	-	19.9	1.0
2	MOR 1	2.1	4.7	14.1	82.9
3	MOR 2	-	-	1.9	1.0
4	MOR 3	-	-	57.5	-
5	MOR 4	-	-	1.9	-
6	MOR 5	-	-	0.9	-
7	MOR 6	-	-	0.9	-
8	MOR 7	-	-	0.9	-
9	MOR 8	-	-	0.9	-
10	MOR 9	-	-	0.9	-
Total clones		102	108	106	105

図 4 新規探索法と Cell SELEX 法の比較

(2) Apt-MOR 分子特性解析

Apt-MOR の MOR 結合活性

テトラサイクリン投与により MOR を発現誘導させた Flp-In T-Rex 293 HA-MOR (Flp-In T-Rex 293 HA-MOR(+)) 細胞に対する細胞結合実験により Apt-MOR の MOR 結合特性を解析した。その結果、Apt-MOR は、MOR 受容体に対して少なくとも 10~100 nM の親和性で結合することが明らかとなった。一方、MOR のサブタイプの

オピオイド受容体である DOR および KOR を発現誘導させた Flp-In T-REx 293 HA-DOR 細胞および Flp-In T-REx 293 HA-KOR 細胞には 100 nM 下の暴露条件で Apt-MOR は全く結合活性を示さなかった。さらに、Apt-MOR は、100 nM 下の暴露条件で、MOR の N 末端に融合させている HA タグを FLAG タグおよび Myc タグに交換した FLAG-MOR、Myc-MOR を発現する 293 細胞に HA-MOR と同様の結合活性を示した。従って、Apt-MOR は MOR を特異的かつ高親和性に結合することが明らかとなった。

Apt-MOR 鎖長の至適化

上記細胞結合実験により Apt-MOR の鎖長の至適化 (最短化) を試みた。最初に、Mfold 解析 (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) により 2 次構造を形成する DNA 塩基領域を予測した。次に、予測領域を保持するような短鎖型 Apt-MOR 欠損体を数種類設計して化学合成した。各短鎖型 Apt-MOR 欠損体を濃度 100 nM で Flp-In T-REx 293 HA-MOR(+) 細胞に暴露し、同細胞に結合する Apt-MOR 欠損体を探索した (図 5)。その結果、13~15 塩基長の短鎖型 Apt-MOR 欠損体が結合活性を保持していることが判明した (図 5e and 5f)。

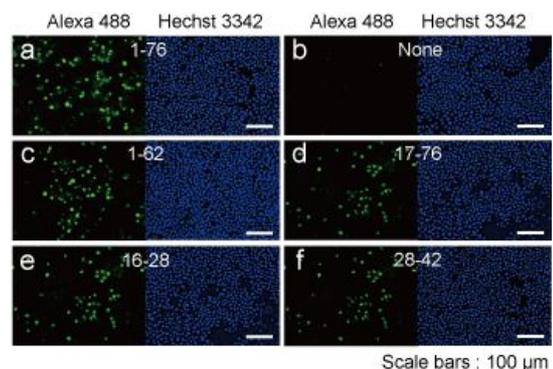


図 5 Apt-MOR 鎖長の至適化

Apt-MOR リガンド活性

MOR は、モルヒネ等のアゴニストが結合すると、アデニルシクラーゼ活性を抑制して細胞内 cAMP 量レベルを減少させる。そこで、Apt-MOR が MOR リガンドとして生理的に機能しているか否かを検討するため、293T 細胞を pGloAMP ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega) を組み込んだ細胞アッセイ系を構築し、生細胞内 cAMP 量の変化を検討した。その結果、100 nM Apt-MOR の投与により統計的に有意な細胞内 cAMP 量の減少が観察された (図 6)。この効果は、MOR に対する拮抗的アンタゴニストとして知られる 10 nM ナロキシンの同時投与により抑制され、MOR アゴニストで強力な鎮痛効果を有するモルヒネとほぼ同程度の効果を示した。従って、Apt-MOR は、MOR アゴニストとして機能し、モルヒネ結合

部位に特異的に結合する「古典的リガンド」に分類される可能性が示唆された。

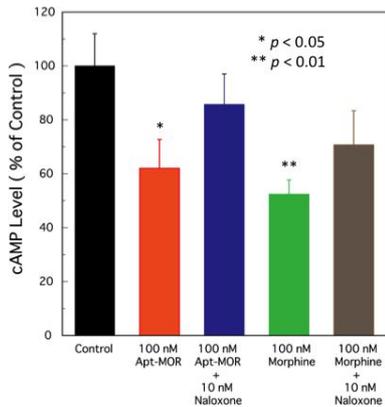


図6 Apt-MORによる細胞内cAMP抑制能

(3) 新規膜小胞(エキソソーム)調製法

新規探索法の高感度化を目指した条件精査の過程で、Flp-In T-REx 293 HA-MOR(+)細胞から分泌された膜小胞にHA-MORが含まれている知見を偶然に得た。また、この現象を調べる過程で、一般に流布している膜小胞(エキソソーム)精製法では、膜小胞の生物物理化学的特性が完全に失われることも見出すに至った。本発見は、新規探索法の高感度化を実現する上で極めて重要な知見と考えられたことから、細胞外分泌時点における生物物理化学的特性を保持した膜小胞の新規調製法を考案し、国内外特許出願を実施した(図7)。

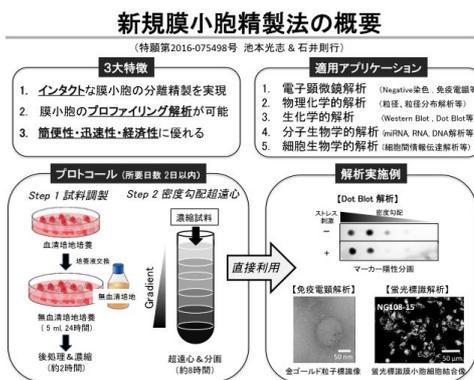


図7 新規膜小胞調整法の概要

本新規膜小胞調製法を利用し、Flp-In T-REx 293 HA-MOR(+)細胞より調製した膜小胞の電子顕微鏡解析を実施した。その結果、Apt-MORが粒径50~100nm程度の膜小胞の膜表面上に発現するMORに結合していること、Apt-MORは細胞情報間伝達能を有する膜小胞であるエキソソームとは粒径、密度等の生物物理化学的特性が明らかに異なる膜小胞群に結合している知見を得た。尚、Apt-MORとMOR

受容体複合体の立体構造解析は、当初予期しなかった膜小胞調製法の研究を優先させたこと、さらには Sf9 昆虫細胞発現系の条件検討に時間を要したため、解析を行うには至らなかった。

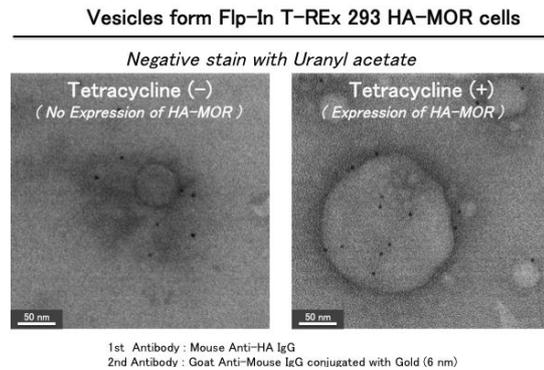


図7 Apt-MOR結合膜小胞の免疫電顕解析像

以上より、GPCRs等の膜受容体の細胞生理機能を利用して新規核酸アプタマーの探索同定を行う新規探索法は、現在汎用されているCell SELEX法と比較し、探索作業効率と探索感度等の両面で格段の有用性・優位性があることが実証された。また、本探索法および改良型Cell SELSX法により探索同定されたDNAアプタマーであるApt-MORは、抗体に遜色ない特異性と高親和性でMORに結合し、モルヒネと同程度の細胞内cAMP量抑制能を示す強力なアゴニストとして機能することが明らかとなった。従って、本新規探索法およびApt-MORは、GPCRsを標的とする鎮痛関連創薬に資する基盤技術として有用である。

<引用文献>

- Raphael R. and Lakshmi A.D., Trend in Pharmacol. Sci., 31, 124-130, 2009.
Tuerk C. and Gold L., Science 249, 505-510, 1990.
Ellington A.D. and Szostak J.W., Nature 346, 818-822, 1990.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

- 石井則行、池本光志、小田原孝行、A novel isolation and preparation method for the biophysical analyses of useful exosomes as diagnostic markers for human diseases、第54回日本生物物理学会大会、2016年11月25日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)
池本光志、石井則行、G蛋白質共役受容体に対するDNAアプタマーの開発、第16回LS-BT合同研究発表会、2017年1月31

日、産総研共用講堂(茨城県・つくば市)
石井則行、池本光志、小田原孝行、ヒト
疾患診断マーカーとして有用なエキソソ
ームの生物物理解析に適した新規分離精
製法の開発、第16回LS-BT合同研究発表
会、2017年1月31日、産総研共用講堂(茨
城県・つくば市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：生物物理学的解析に適した膜小胞の
分離精製法

発明者：石井則行、池本光志

権利者：同上

種類：特許番号：特願第2016-075498

出願年月日：2016年4月4日

国内外の別：国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/bmd/gr/mcm-3/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池本 光志 (IKEMOTO, Mitsushi)

国立研究開発法人・産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：50356424

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

宮岸 真 (MIYAGISHI, Makoto)

国立研究開発法人・産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・グループ長

研究者番号：30323538

石井 則行 (ISHII, Noriyuki)

国立研究開発法人・産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：10261174

山崎 和彦 (YAMAZAKI, Kazuhiko)

国立研究開発法人・産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：003582431