

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14512

研究課題名（和文）増殖因子ミメティクス核酸による細胞分化シグナルの制御と理解

研究課題名（英文）Regulation of cell differentiation signal with oligonucleotide-based growth factor mimetics

研究代表者

植木 亮介 (UEKI, Ryosuke)

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：90755703

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：線維芽細胞増殖因子（bFGF）は、幹細胞の未分化状態の維持と増殖に必須の因子として広く使用されており、現在の再生医療分野で最も重要な増殖因子の一つである。その一方、bFGFは熱的安定性の低さから代替物質の開発が求められてきた。本研究では、bFGFの持つ数々の欠点を克服する、化学合成可能な人工増殖因子の開発を行った。FGFが受容体を二量化させることで細胞内シグナルを誘起するメカニズムに着目し、増殖因子受容体に結合する核酸アプタマーの二量体を数種類合成し、特定の核酸配列がFGFと同様の機能を示すことを見出した。また、ヒトiPS細胞の培養においてbFGFの機能を代替する核酸アプタマーの開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の再生医療分野において、細胞の分化・増殖を制御する増殖因子に大きな注目が寄せられている。特に、iPS細胞の培養、および特定の体細胞への分化誘導プロセスにおいて必須の因子として汎用されている。しかし、天然タンパク質である増殖因子の製造には動物細胞による発現系を要するため、製造コストと品質管理の観点から、その大量供給に大きなハードルが課されている。本研究では、増殖因子の機能を模倣し、細胞の分化シグナルを制御可能な「増殖因子ミメティクス」を開発するための分子設計指針を探る。特に、化学合成可能なDNAを用いて、従来の増殖因子の欠点を克服する有望な代替化合物の開発へ繋げることを目指す。

研究成果の概要（英文）：Fibroblast growth factor (bFGF) is widely used as an essential factor for maintaining and proliferating stem cells in an undifferentiated state, and is one of the most important growth factors in the current field of regenerative medicine. On the other hand, synthetic alternatives to bFGF have been highly sought after due to its low thermal stability. In this study, we developed functional mimetics of bFGF based on oligonucleotide. Focusing on the mechanism by which FGF induces intracellular signal by dimerizing the receptor, several dimer forms of DNA aptamers that bind to the FGF receptor were synthesized.

研究分野：生体関連機能化学

キーワード：DNAアプタマー 受容体 増殖因子

1. 研究開始当初の背景

増殖因子は細胞の増殖・分化の制御を司ることから細胞医工学・再生医療分野において広く注目を集めている。特に、iPS 細胞をはじめとする多能性幹細胞において、増殖因子を培地に添加することで種々の体細胞へと分化が誘導されることが実証されており、臓器移植・創薬スクリーニングへの展開が期待されている。このような増殖因子に基づく幹細胞の分化誘導は長寿・健康社会の実現に向けた基盤技術と位置付けられている。しかしながら、天然タンパク質からなる増殖因子には、熱的安定性の低さ、ロット間の活性差、膨大な製造コスト等の問題点があり、基礎研究の遂行に対して実験の再現性・スケールアップという観点で質的・量的な制限を課している。上記のような背景から、増殖因子の機能を代替する新たな化学ツールの開発は急務の課題である。

2. 研究の目的

申請者らは、人工核酸リガンド分子、DNA アプタマーからなる「増殖因子ミメティクス」の開発に成功している (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 579.). 具体的には、増殖因子が受容体の二量体形成を誘起することで、細胞内シグナル活性化を引き起こすメカニズムに着目し、増殖因子受容体結合性 DNA アプタマーからなる多価リガンド分子を開発した。これまでに、この増殖因子ミメティクスが細胞の増殖・遊走など、増殖因子と同様の生理作用を示すことが見出されている。DNA は化学的に大量かつ均質に合成が可能のため、試験管内での細胞分化誘導における増殖因子の欠点を克服する新たな基盤分子としての発展が期待される。

本研究では、幹細胞の分化・成熟に関連する線維芽細胞増殖因子 (FGF) に着目し、DNA アプタマーから構成される FGF ミメティクスの開発と幹細胞培養への応用を目指す。具体的には、FGF 受容体結合性アプタマーを基本骨格として、クラスタリングされる FGF 受容体の距離・配向を制御可能な FGF ミメティクスを設計し、受容体活性化に最適な設計指針を抽出することを目的とする。また、開発した FGF ミメティクスを用いた、幹細胞の分化シグナル制御への応用を試みる。

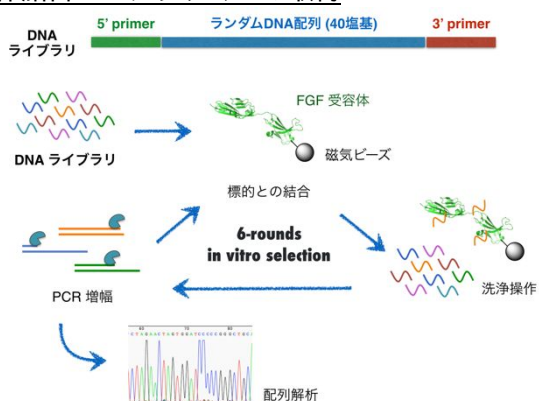
3. 研究の方法

FGF ミメティクスの設計を行うため、試験管内進化法 (SELEX) による FGF 受容体結合 DNA アプタマーの取得を実施した。取得された FGF 受容体結合核酸を用いて、種々の FGF ミメティクスの設計を行い、FGF 受容体の活性化能を評価した。また、ヒト iPS 細胞のフィーダーフリー培養系において FGF の機能を代替可能か検証した。

4. 研究成果

4-1. 試験管内進化法 (SELEX) による FGF 受容体結合 DNA アプタマーの取得

FGF ミメティクスの基本骨格として機能する FGF 受容体結合 DNA アプタマーの取得を行なった。両端にプライマー配列を持つ 40 塩基のランダム DNA を化学合成し、FGF 受容体細胞外ドメインの組換えタンパク質と混合した。洗浄操作ののち、結合配列を単離して PCR 増幅するという一連のサイクルを 6 回繰り返して配列解析を実施した。その結果、FGF 受容体に結合する複数の DNA アプタマー配列の単離に成功した。表面プラズモン測定による評価の結果、特定の配列が 10 nM オーダーの解離定数で受容体に結合することが明らかとなり、以後の実験に用いた。



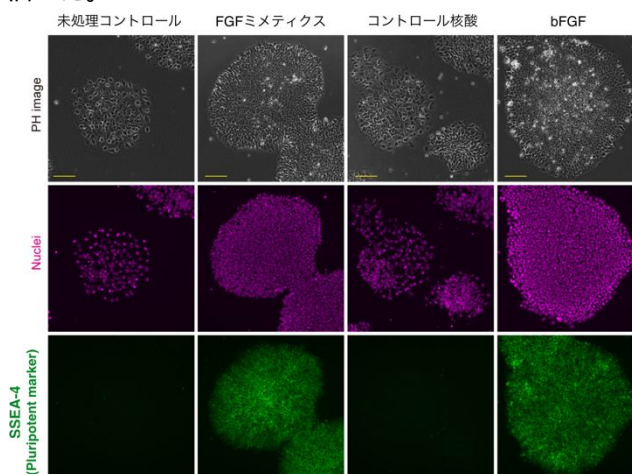
4-2 FGF ミメティクスの設計と機能評価

取得された FGF 受容体結合アプタマーを、距離・配向を変化させながら二量化した FGF ミメティクス候補分子を作成した。FGF 受容体発現細胞にこれらの FGF ミメティクスを作用し、ELISA などの計測系で受容体のリン酸化量を定量した。その結果、いずれの設計 FGF ミメティクスも FGF 受容体活性化能を示し、細胞内のシグナル伝達分子の活性化を誘導することが明らかになった。

4-3 ヒト iPS 細胞のフィーダーフリー培養

上記で設計した FGF ミメティクスのヒト iPS フィーダーフリー培養への応用を試みた。FGF 含有培地と FGF ミメティクス含有培地で 1 週間 iPS 細胞を培養し、その後の未分化マーカー発現量を免疫染色・定量 PCR などの手法で評価した。

その結果、FGF 除去により未分化マーカーの発現量が大幅に低下した一方で、FGF ミメティクスの添加によって未分化マーカーの発現量低下が抑えられることが明らかとなった。この結果から、今回開発した FGF ミメティクスが FGF の代替化合物をして機能することが示唆された。また、興味深いことに 4-2 で評価した受容体活性化能と iPS 細胞の未分化維持能は完全に一致しない結果となった。そのため、本研究は FGF 受容体アゴニスト設計のための新たな知見を与えるものである。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

DNA Aptamer Assemblies as Fibroblast Growth Factor Mimics and Their Application in Stem Cell Culture Ryosuke Ueki*, Saki Atsuta, Ayaka Ueki, Junya Hoshiyama, Jingyue Li, Yohei Hayashi and Shinsuke Sando* (査読あり) Chem. Commun. 55, 2672–2675. (2019)
DOI: 10.1039/c8cc08080a

A chemically unmodified agonistic DNA with growth factor functionality for in vivo therapeutic application Ryosuke Ueki*, Satoshi Uchida, Naoto Kanda, Naoki Yamada, Ayaka Ueki, Momoko Akiyama, Kazuko Toh, Horacio Cabral and Shinsuke Sando* (査読あり) Sci. Adv. 6, eaay2801 (2020)
DOI: 10.1126/sciadv.aay2801

[学会発表] (計 5 件)

Ryosuke Ueki, Satoshi Uchida, Naoto Kanda, Horacio Cabral, Shinsuke Sando "Evaluation of therapeutic potential of oligonucleotide-based growth factor mimetics" Nucleosides, Nucleotides & Oligonucleotides Gordon Research Conference (2017 年 6 月, 米国)

Ryosuke Ueki, Saki Atsuta, Ayaka Utsumi, Yohei Hayashi, Shinsuke Sando "Novel DNA aptamer assemblies that control growth factor signaling and cellular functions" The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry /The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry" (2017 年 11 月, 東京)

Ryosuke Ueki, Naoto Kanda, Shinsuke Sando "Nano-chemical tools for controlling dynamic assembly of cell membrane receptors" The 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry (2017 年 12 月, 京都)

植木 亮介、秋山 桃子、藤井 雅史、黒田 真也、山東 信介「増殖因子ミメティクス核酸による細胞シグナル制御」第 12 回バイオ関連化学シンポジウム (2018 年 9 月, 大阪)

植木 亮介「増殖因子ミメティクス核酸 ～再生医療応用と化学ツールとしての展開～」日本化学会第 99 春季年会 (2019 年 3 月, 神戸)

[図書] (計 1 件)

核酸アプタマーの最前線
星山純也, 植木亮介, 山東信介
Medical Science Digest 2019 年 1 月号 (2019).

出願状況 (計 1 件)

名称 : アプタマー及びその使用
発明者 : 山東 信介, 植木 亮介, 植木 彩香, 熱田 早紀

権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2018/041759
出願年：2018年
国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ

http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/sandolab/Ueki_Ryosuke.html