

Selection of DNA aptamer for human hepatic carcinoma based on cell-SELEX

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/29985

Cell-SELEX 法を用いたヒト肝がん細胞に対する DNA アプタマーの選抜

金田 彦彦¹・仁宮一章²・清水宣明²

¹〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学

²〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学環日本海域環境研究センター

Kazuhiko KANEDA¹, Kazuaki NINOMIYA² and Nobuaki SHIMIZU²:

Selection of DNA aptamer for human hepatic carcinoma based on cell-SELEX

1. 緒言

がんは日本人の死亡原因の第一位を占め、日本人の約3分の1ががんで亡くなっている。しかし、現在がんに対する画期的な治療法はまだ確立されていない。その原因の一つとしてがん細胞と正常細胞を識別することが困難であることが挙げられる。この問題を解決するために、がん細胞を特異的に認識する生体物質が必要とされている。これまで、生体物質として抗体が広く用いられてきた。しかし、新規な抗体を得るには多くの時間、手間、資金が必要、ターゲットが限られるといった問題点がある。そこで近年、抗体に代わる生体物質としてアプタマーが注目されている。DNA アプタマーとは、特異的に分子を認識する single-strand DNA (ssDNA) である。これまでに、様々なタンパク質やアミノ酸などに対するアプタマーが SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)法という手法により選抜されている。近年、細胞に対するアプタマーの選抜法として Cell-SELEX 法という手法が考案された。

本研究では、ヒト肝がん細胞である HepG2 細胞を特異的に認識する DNA アプタマーの獲得を目的として Cell-SELEX 法により DNA アプタマーの選抜を行った。

2. 理論

2.1 DNA アプタマー

ある物質を特異的に認識する ssDNA を DNA アプタマーと呼ぶ。通常2本鎖状態で二重らせん構造をとる DNA 分子であるが、これを一本鎖状態にすることによりステム型、バルジ型、シュードノット型、あるいはカルテット型等の様々な立体構造をとる (Fig.1)

この様々な立体構造により、物質を特異的に認識すると考えられている。DNA アプタマーの立体構造は塩基配列に依存しているので、DNA アプタマーの立体構造は塩基配列を変えることにより無限に存在し、理論上ではあらゆる物質に対する DNA アプタマーが獲得可能と言われている。またアプタマーには、(1) 熱や pH の変化に対する安定性が非常に優れている、(2) PCR 法を用いるこ

とにより迅速かつ安価に増幅が可能である、(3) 様々な化学修飾が可能であるといった特徴を持っており、がんの診断や治療への応用が期待されている。

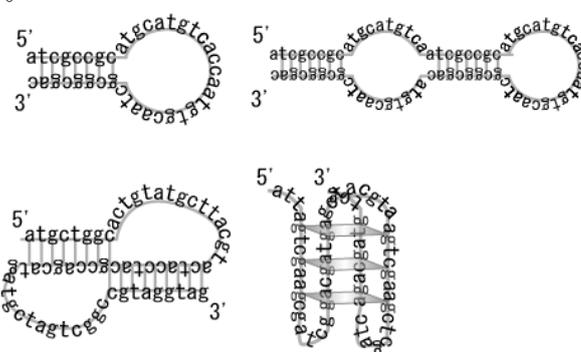


Fig. 1 Schematic drawing of various structures of DNA aptamer.

2.2 Cell-SELEX 法

SELEX 法とは、ランダム配列を持つランダム ssDNA ライブラリーからターゲットと結合する DNA アプタマーだけを選抜してくる手法である。これまで、細胞に対する DNA アプタマーを獲得するときには、ターゲットとして細胞の膜タンパク質を用いて SELEX 法が行われてきた。近年、Cell-SELEX 法と呼ばれる、ターゲットとして細胞自体を用いる手法が開発された。この手法には従来の SELEX 法と比べ、(1) 膜タンパク質の解析が不要、(2) 細胞表面に存在する様々な膜タンパク質のアプタマーを同時に選抜できる、(3) 目的細胞とより特異的に結合するアプタマーを選抜できるといった特長がある。

3. 実験方法

3.1 ssDNA の作製

本研究では、50 bp のランダム領域をもつ N50-ssDNA (95 bp) をランダム ssDNA ライブラリーとして用いる。

ssDNA の作製は、以下の手順で行った。まず、5'末端をビオチン修飾した Reverse プライマーを用いて PCR を行い、ビオチン修飾 double strand DNA (dsDNA) を作製する。次に、アビジン修飾

セファロースビーズとビオチン修飾 dsDNA 反応させビーズ表面に dsDNA を固定化する。最後に、NaOH 水溶液を加え dsDNA 間の水素結合を切断しビオチン修飾されていない側の ssDNA をだけを分離、回収する。(Fig. 2)

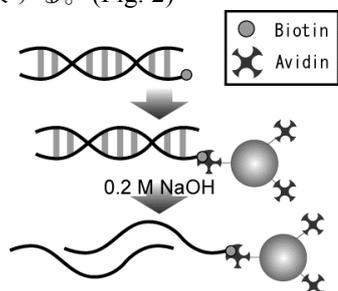


Fig. 2 Separation of ssDNA by streptavidin-coated sepharose beads.

3.2 DNA アプタマーの選抜

Cell-SELEX 法では「増幅」「結合反応」「Wash」「回収」を 1Round とし、この Round 繰り返すことで HepG2 細胞と特異的に結合する DNA アプタマーを選抜する。Round を重ねるに連れて Wash 条件を厳しくし、より結合力の強い DNA アプタマーの獲得を目指す。また、DNA アプタマーの特異性を向上させるため、8~11Round の開始前では、ヒト正常肝細胞を用いてカウンターセレクションを行った。Fig. 3 に Cell-SELEX 法の一連の流れを示す。

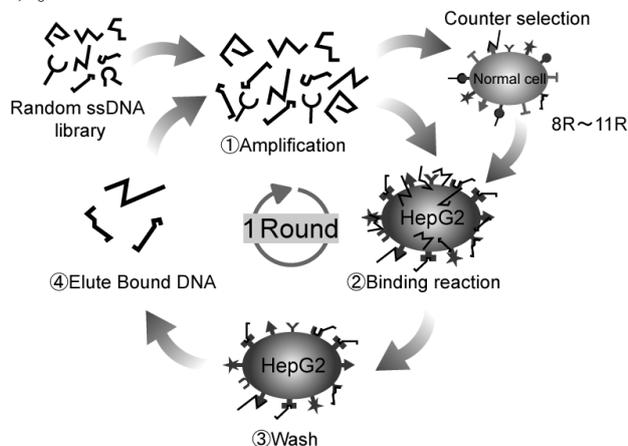


Fig. 3 Schematic drawing of Cell-SELEX process.

3.2 アプタマーの単離

Cell-SELEX 後に回収された ssDNA は選抜されたとはいえ、まだ、様々な塩基配列の DNA アプタマーが混在した状態である。そして、その様々な DNA アプタマーは、それぞれ違う特徴を持っていると考えられる。そこで、大腸菌を用いて TA クローニングを行い、DNA アプタマーの単離を行った。そして単離された DNA アプタマーについて、シーケンサにより塩基配列を決定し、Web 上のデータベース、mfold を使用することで、DNA

アプタマーの平面構造解析を行った。平面構造解析は、そのアプタマーの配列およびアプタマーを溶解した溶液の塩濃度、フォールディング時の温度を入力すると、自動的にその条件で最も安定な平面構造をシミュレーションにより解析される。塩基配列と平面構造の情報を元に、Cell-SELEX 後に回収された ssDNA を分類した。

3.3 DNA アプタマーの機能評価

Cell-SELEX 法で選抜後、単離された DNA アプタマーについて機能評価を蛍光顕微鏡、フローサイトメーターを用いて行った。DNA アプタマーの細胞への結合量を評価するため FITC ($\lambda_{ex}=495nm$, $\lambda_{em}=520nm$) で蛍光修飾した DNA アプタマーを用いてそれぞれの実験を行い、DNA アプタマーの細胞への結合量を蛍光量として検出し評価した。

4. 結果と考察

4.1 ssDNA の作製

アビジン修飾セファロースビーズにより分離された ssDNA についてポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認した。Fig. 4 よりアビジン修飾セファロースビーズにより分離された ssDNA がポジティブコントロールとして流した N50-ssDNA (Template) と同じ高さにバンドが確認された。このことより、dsDNA から目的の ssDNA が確実に分離、回収できていることが確かめられた。95 bp であるはずの ssDNA が 160 bp 付近にバンドが確認されたのは、ssDNA が直鎖状ではなく独特な立体構造を形成するためである。

以上のことより、今回用いた方法により、N50-ssDNA 増幅できていることが確かめられた。

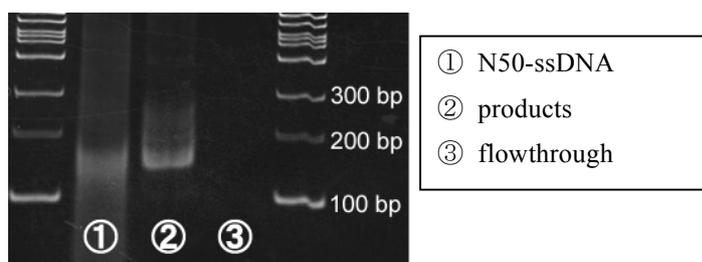


Fig. 4 Confirmation of separated products by streptavidin-coated sepharose beads.

4.1 DNA アプタマーの選抜

本実験では、HepG2 細胞を特異的に認識する DNA アプタマーを選抜するため Cell-SELEX 法の Round を 11Round 行った。また DNA アプタマーの特異性を向上させるために正常ヒト肝細胞を用いてカウンターセレクションを 8~11Round の前の計 4 回行った。

各 Round 後に回収された DNA アプタマーの機能評価を蛍光顕微鏡、フローサイトメーターを用いて行った。Cell-SELEX 法の最初に用いたランダ

μ ssDNA ライブラリー(N50-ssDNA)を 0Round とする。Fig. 5 より HepG2 細胞では、Round を重ねるに連れて蛍光強度が増加していることが明らかとなった。また、正常ヒト肝細胞では、Round を重ねても蛍光強度の増加は見られなかった(Fig. 6)。このことから Cell-SELEX 法の Round を重ねるにつれて、アプタマーの HepG2 細胞への特異性が向上していると考えられる。また、Fig. 5 から 7 Round 以降で蛍光強度の増加が頭打ちになっていることが明らかとなった。これは 7 Round までで、HepG2 細胞に対する DNA アプタマーがほぼ絞り込まれていたため 7 Round 以降では大きな変化が見られなかったのだと考えられる。以上のことより、Cell-SELEX 法の Round を重ねることで、HepG2 細胞と特異的に結合するアプタマーが選抜されていることが確認された。また Cell-SELEX を 11Round 行うことで、HepG2 細胞に対する DNA アプタマーの候補を十分に絞り込むことができていたことがわかった。

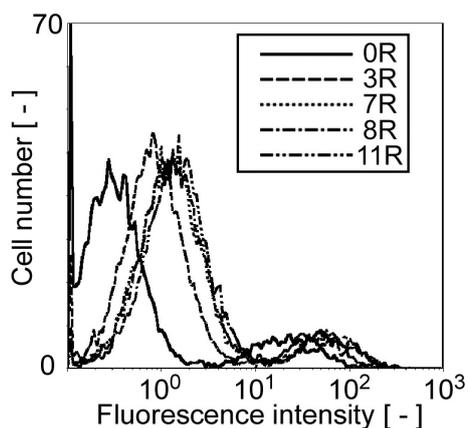


Fig. 5 Flow cytometric assay for the binding of the each round aptamers with HepG2 cells.

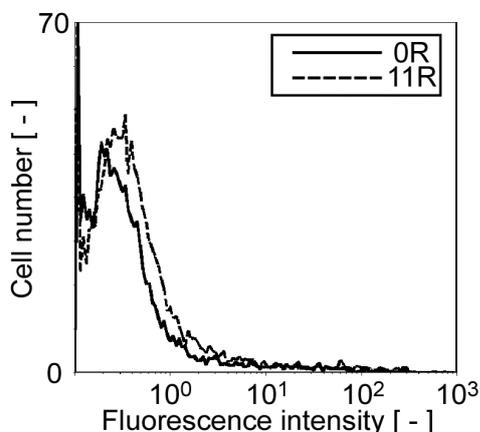


Fig. 6 Flow cytometric assay for the binding of the each round aptamers with human primary hepatocyte cells.

4.2 アプタマーの単離

TA クローニングによってクローン化した中から、45 サンプルについてシーケンサにより塩基配列を決定した (Table. 1)。全体の 82% の 37 サンプルが類似の配列であった(Group 1)。この 37 サンプルの配列の違いは、1 番多いものでも 2 塩基の違いであった。このことは、Cell-SELEX の Round を繰り返し、正常ヒト肝細胞を用いてカウンターセクションを行ったことで、HepG2 細胞と特異性の低い配列を有した DNA アプタマーは淘汰され、特異性の高い配列の DNA アプタマーだけが選抜されたためだと考えられる。

Table. 1 List of selected aptamers for HepG2 cells.

次に塩基配列を決定した 45 サンプルについて、その平面構造をシミュレーションにより解析した。45 サンプルを平面構造により分類すると、6 種類に分類された。1、2 塩基の相違しかない Group 1 を平面構造で分類すると 3 種類(A,B,C)に分類された(Fig. 7)。最も数の多かった A-1 を基準として比較すると同じ種類の DNA アプタマーは似た位置に塩基配列の違いが現れることが判明した。このことより、塩基配列のわずかな違いであっても、その位置や塩基の種類によって構造が変化する可能性があることが明らかになった。

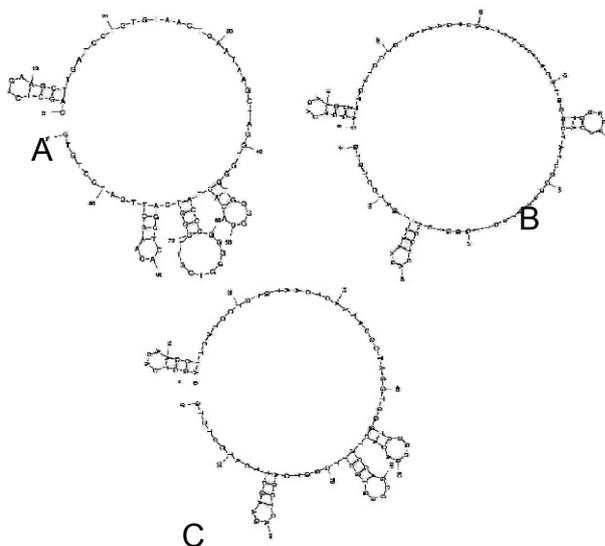


Fig. 7 Secondary structures of aptamers (Group 1).

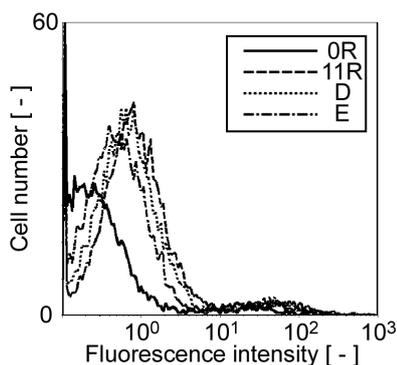
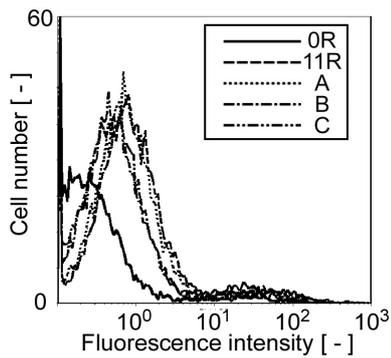


Fig. 8 Flow cytometric assay for the binding of the selected aptamers with HepG2 cells.

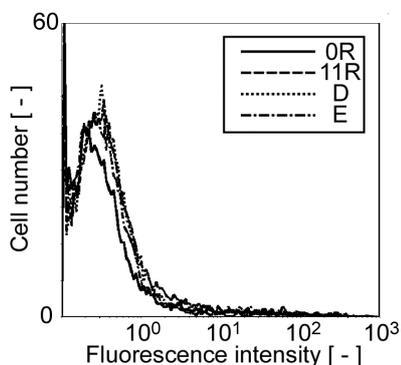
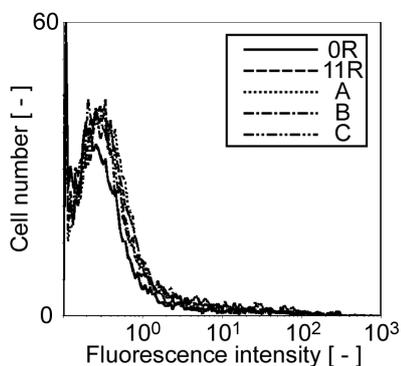


Fig. 9 Flow cytometric assay for the binding of the selected aptamers with human primary hepatocyte cells

4.3 DNA アプタマーの機能評価

4.2 で獲得された 6 種類のアプタマーの中で A、B、C、D、E について機能評価を行った。Fig. 8 より A~E の全ての DNA アプタマーで、蛍光強度がランダムライブラリーと比べ増加していることが確認された。11 Round と比較した場合には A、D では、ほとんど差がない結果となったが B、C、E についてはわずかではあるが 11 Round よりも蛍光強度が弱いという結果になった。また正常細胞に対しては、A~E の全ての DNA アプタマーで、ランダムライブラリーとの差は見られず、弱い蛍光強度となった (Fig. 9)。

以上の結果から、11 Round 後に回収された ssDNA から単離された A~E の DNA アプタマーは正常ヒト肝細胞を認識することなく、HepG2 細胞を特異的に認識していることが確かめられた。また、単離することにより 11 Round より特異性の強い DNA アプタマーが獲得できる可能性があるが、11 Round よりも特異性の強い DNA アプタマーは獲得することができず、最も蛍光強度の強いものでも 11 Round とほぼ同等という結果になった。これは、Table. 1 を見てわかるように Cell-SELEX 法を 11Round 行ったことにより DNA アプタマーがかなり絞り込まれ 11Round 後に回収された ssDNA のほとんどが同じ配列、もしくは似た配列であったためと考えられる。また、45 サンプルの中で、11.1 パーセントしか占めなかったグループ D が 11Round とほぼ同等の蛍光を示したのは、グループ D の塩基配列が PCR により増幅されにくい配列であったため、実際は 11 Round 後に回収された ssDNA の中には多く存在していたが PCR で増幅し TA クローニングを行ったことで、その割合が減少したためだと推測される。またグループ B、C が A よりもわずかに蛍光強度が減少していたのは少しの塩基配列の違いで立体構造が微妙に変化し結合力が弱まったのではないかと推測される。

Cell-SELEX 法により、HepG2 細胞を特異的に認識する 5 種類の DNA アプタマーを獲得することができた。そして、その 5 種類の DNA アプタマーの塩基配列を決定することができた。

5. 結言

本研究により得られた成果を以下に示す。

- 1) ssDNA の作成方法を確立した。
- 2) Cell-SELEX を 11Round、正常ヒト肝細胞によるカウンターセレクションを 4 回行うことで、HepG2 細胞を特異的に認識する DNA アプタマーの候補を選抜することができた。

- 3) Cell-SELEX 後に回収された ssDNA 集団から 45 サンプルを単離し、塩基配列を決定した。
- 4) 回収された 45 サンプルを塩基配列、二次構造により 6 種類に分類し、その内の 5 種類について機能評価を行った。その結果 HepG2 細胞を特異的に認識する DNA アプタマーを得ることができた。

Literature cited

1. Z. Tang, D. Shangguan, H. Sui, K. Sefah, P. Mallikratchy, H. W. Chen, Y. Li, W. Tan. *Anal. Chemist.*, 79, 4900-4907, 2007.
2. J. Tanga, T. Yub, L. Guoa, J. Xiea, N. Shaoc, Z. Hed. *Biosensors Bioelectronics*, 22, 2456–2463, 2007.