

(第 12 号様式)

学 位 論 文 の 要 約 (研 究 成 果 の ま と め)

氏 名 加賀城 真理

学位論文名 CBF1 を標的とした Single-Strand DNA Aptamer による
血管新生抑制

学位論文の要約

近年のがん治療は古典的な外科治療・放射線治療・化学療法に加え、がんの特異的な分子にたいする分子標的療法の発展が目覚ましい。特に血管新生阻害剤は、がん治療において一定の効果が得られている。血管新生阻害剤が標的とする分子は主に血管新生を誘導する成長因子 VEGF (vascular endothelial growth factor)や、その受容体 VEGFR (VEGF receptor) であるが、高血圧等の有害事象や長期投与による耐性が問題視されている。そのため我々は血管新生阻害因子である Notch シグナルに注目した。Notch シグナルは、主要な転写因子である CBF1 により制御されている。VEGF 刺激下では Cullin3/RING ubiquitin E3 ligase の基質認識受容体 Bcl6-associated zinc finger protein (BAZF)の発現が増えることで、BAZF の標的基質である CBF1 が分解され、Notch シグナルを抑制する。以上より、CBF1 を標的分子とした血管新生制御剤の開発を試みた。

標的分子に結合する 1 本鎖の核酸であるアプタマーは、その高い特異性と親和性からタンパク質等の制御剤として注目されている。近年では、血管新生を誘導する成長因子 VEGF (vascular endothelial growth factor)に対し阻害活性を有する VEGF 結合型 RNA アプタマー (Pegaptanib)が加齢黄斑変性に対する治療薬 (血管新生阻害剤)として臨床応用されている。

本研究において我々は、VEGF 以外を標的とした新しい血管新生阻害剤のシーズ導出を目的とし、血管内皮細胞増殖抑制を誘導する Notch シグナルの主要転写因子である CBF1 の機能を亢進させる single-stranded DNA (ssDNA)アプタマーの開発を行った。Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)法を用いて、CBF1 に結合する ssDNA アプタマーの *in vitro* selection を実施した結果、解離定数 (Kd)が 30-300 nM の CBF1 結合 ssDNA アプタマーを 15 種類同定した (Apt-1~Apt-15 と命名)。抽出した 15 種類の ssDNA アプタマーを用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVECs) の血管新生能を評価した。その結果、5 種類 (Apt-1, 3, 4, 5, 6) のアプタマーが、コントロールと比較し血管新生を 30~50%程度抑制した。これらの ssDNA アプタマー

を HUVEC に処理しても, *IFN β* , *IL-8* の mRNA 発現は上昇しておらず, 核酸を感知しインターフェロン産生を促す cyclic GMP-AMP synthase/STING 経路や細胞外やエンドソーム内の核酸を認識する TLR 経路は活性化されていないことを確認した。血管新生阻害活性を有する 5 種類の CBF1 結合 ssDNA アプタマーは, CBF1 のタンパク質や mRNA の発現量を変化させないものの, 1 種類の CBF1 結合 ssDNA アプタマー (Apt-3) は CBF1 の下流で発現が誘導される *HEY2* の mRNA 量を有意に上昇させた。また, HUVEC 由来の CBF1 と biotin 化した Apt-3 は pull-down 解析により結合していることが分かった。CBF1 と Apt-3 の直接的な結合力を, Surface Plasmon Resonance (SPR) を用いて解析した結果, K_d 値は約 39 nM であった。最後に, Apt-3 の CBF1 結合部位を同定するため, コムギ無細胞系タンパク合成を用いて CBF1 タンパク質 (全長、ドメイン欠損体、各種ドメイン) を作成し, ALPHA Screen を用いて結合部位を探索した。その結果, CBF1 の LAG1 domain と Apt-3 は結合しており, さらに LAG1 ドメインの 158 から 178 アミノ酸 (SKRIKVISKPSKKKQSLKNAD) と Apt-3 が結合している事が分かった。

以上の結果より我々は, CBF1 に結合して CBF1 の機能を亢進させる事で血管新生を阻害する ssDNA アプタマーとして Apt-3 を導出する事に成功した。今後, より効率的な細胞内及び, 組織送達法の開発と共に, 個体レベルでの Apt-3 の血管新生阻害活性の評価を通して, Apt-3 の血管新生阻害剤としての開発が期待される。

本研究に係る遺伝子組換え実験は, 愛媛大学大学院医学系研究科等遺伝子組換え実験安全委員会によって承認されている。

なお, この学位論文の内容は, 以下の原著論文に既に公表済である。

主論文 : Tezuka-Kagajo M, Maekawa M, Ogawa A, Hatta Y, Ishii E, Eguchi M, Higashiyama S: Development of Human CBF1-Targeting Single-Stranded DNA Aptamers with Antiangiogenic Activity *In Vitro*. *Nucleic Acid Therapeutics* 30:365-378, 2020 DOI: 10.1089 /nat.2020.0875