

## 学位論文要旨

氏名 加賀城 真理

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

---

### 学位論文要旨

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。既存血管からの新しい血管の構築である血管新生は、血管内皮細胞が VEGF 等の外部からの刺激を受容する事で誘導され、Notch シグナルによって抑制される。血管新生は多様な疾患に関与しており、特に腫瘍の増殖と転移、加齢黄斑変性においては過剰な血管新生が病態の成因の一つである。現在までに VEGF シグナルを阻害する医薬品が臨床応用され、一定の治療効果を得ている一方で、高血圧等の有害事象や長期投与による薬剤耐性が問題視されており、VEGF や VEGFR 以外を標的とした新しい血管新生阻害剤の開発が急務である。

本研究において我々は、VEGF シグナル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なった。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、Apt-1~Apt-15 と命名した。抽出したこれら 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) の血管新生能に対する薬効を評価した。その結果、Apt-1、3、4、5 及び 6 の 5 種類の ssDNA アプタマーが、コントロール群と比較し血管新生を 30~50% 抑制した。HUVEC では、これらのアプタマー処理後も *IFN $\beta$* 、*IL-8* の mRNA 発現上昇は認められず、細胞内の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、細胞外またはエンドソーム内の核酸を感知する TLR 経路の活性

氏名 加賀城 真理

化は起きていないことを確認した。また、これら 5 種類の 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かったが、Apt-3 は CBF1 の標的遺伝子である *Hey2* の mRNA 量を有意に上昇させた。さらに、HUVEC で内在的に発現する CBF1 と biotin 化 Apt-3 の pull-down 解析により、両者の結合を確認した。CBF1 と Apt-3 の結合解離定数を Surface Plasmon Resonance (SPR) を用いて直接的に解析した結果、Kd 値は約 39 nM であった。最後に、CBF1 分子における Apt-3 の結合部位を同定するため、コムギ無細胞系タンパク合成系を用いて CBF1 の全長、各種ドメイン欠損体及び各種ドメインを作成し、ALPHA Screen を行った。その結果、Apt-3 は CBF1 の LAG1 domain の 158 から 178 アミノ酸領域 (SKRIKVISKPSKKKQSLKNAD) に結合していることを見出した。

以上の結果より我々は、CBF1 に結合してそ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 を単離する事に成功した。

尚、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。

キーワード (3~5)	血管新生阻害剤 DNAアプタマー CBF1 Notch signal
-------------	---