

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670151

研究課題名(和文) RNAアプタマーによる腫瘍マーカー検出法の開発

研究課題名(英文) Development of the tumor marker detection method by RNA aptamer

## 研究代表者

藤原 俊伸 (FUJIWARA, Toshinobu)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：80362804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は細胞表面に発現しているスフィンゴシン1-リン酸受容体(S1PR)と結合し、生理活性を発揮する。S1PRはこれまでに5つのサブタイプが同定され、それぞれ組織特異的に発現している。そして、近年S1PRがガンの悪性化に深く関わるようになってきており、腫瘍マーカーとしての位置づけも重要となってきた。そこで、S1PRの各サブタイプと特異的に結合できる人工リガンドを「RNA」という高分子マテリアルを利用し、創製することを試みた。しかしながら、S1PR表面提示細胞の構築には成功し、whole Cell SELEXを試みたが、優位なRNAアプタマーは得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine 1-phosphate (S1P) is combined with a sphingosine 1-phosphate receptor (S1PR) emerging in the cell surface and shows bioactivity. Five subtypes of S1PR have been identified so far, and these are tissue-specific. Recently, it has been revealed that S1PR affected the malignant transformation of cancer deeply, and the positioning as the tumor marker became important. Therefore I used high polymer material called "RNA" with the artificial ligand which could be specifically combined with each subtype of S1PR and tried that it produced wounds. However, I succeeded in the construction of the S1PR surface presentation cell and tried whole Cell SELEX, but dominant RNA aptamer was not provided.

研究分野：RNA生化学

キーワード：RNAアプタマー

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は生体膜構成成分スフィンゴ脂質の代謝産物であり、細胞表面に発現しているスフィンゴシン 1-リン酸受容体 (S1PR) と結合し、細胞遊走などの生理活性を発揮する。S1PR は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、これまでに 5 つのサブタイプが同定され、それぞれ組織特異的に発現している。そして、近年 S1PR がガンの悪性化に深く関わるようになってきており、腫瘍マーカーとしての位置づけも重要となってきた。現在、受容体を標的とする腫瘍イメージングは、RI 標識したリガンドおよびリガンドアナログを用いて行われている。また、抗腫瘍作用を有するリガンドの開発も盛んに行われている。しかしながら、従来の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面の受容体のみならず、正常細胞に発現している受容体とも交差反応するために、診断精度・治療上の安全性に問題が指摘されている。そのため、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。

そこで、S1PR の各サブタイプと特異的に結合できる人工リガンドを「RNA」という高分子材料を利用し、創製する。

## 2. 研究の目的

GPCR であるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1PR) は、血管系、免疫系においての重要性が注目されてきた。一方、S1PR がガンの浸潤、転移の制御や脳腫瘍の悪性化に関与することが明らかになってきている。腫瘍の診断には、その特定の受容体の高発現性に基づき、RI 標識したリガンドおよびそのアナログを用いた腫瘍イメージングが有効である。しかしながら、既存の治療・診断用物質は、標的となる腫瘍細胞表面の受容体のみならず、正常細胞に発現している受容体とも交差反応する。S1PR の場合 S1P に対してほぼ同様の親和性を有するサブタイプが 5 つ存在す

る。そのため、診断精度・治療上の安全性に問題が予想され、サブタイプ特異的作動薬および診断薬の開発が期待されている。申請者は、これまでに酵母を用いてヒト GPCR からリガンド刺激を検出・スクリーニング可能な系を開発してきた。そして、出芽酵母にヒトソマトスタチン受容体 (SSTR) を発現させ、酵母内在性 G 蛋白質を介してのアゴニスト活性を、GFP 蛍光を利用して nM オーダーのリガンドを検出可能な系の構築に成功している。この系では、SSTR の作動性を、フローサイトメーターを活用して簡便かつ定量的に評価できる。そこで、このスクリーニング系を S1PR に応用し、S1PR の各サブタイプと特異的に結合できる診断薬としての人工リガンドを RNA という高分子材料を利用し、創製する。

## 3. 研究の方法

ヒト・スフィンゴシン 1-リン酸受容体を標的としたアプタマーの創製

まず S1PR に対する結合性を基盤に RNA アプタマーをスクリーニングする。酵母表層提示系をスクリーニング系として用いたアプタマー作成では、RNA が非特異的に酵母に大量に結合する可能性がある。そこで、接着性の培養細胞を用いることでこの問題を回避する。具体的には CHO-K1 細胞にレンチウイルス発現系を用いて S1PR の各サブタイプを恒常的に発現する stable cell line を構築し、この細胞を用いた Cell-base SELEX を実施する。申請者はこれまでに同システムを用いて SSTR、TGF- $\beta$  type III 受容体の細胞表面へ恒常的に発現させる系を構築しており速やかに構築可能である。そして、得られた RNA アプタマーを、(1) で構築する系に導入し、RNA アプタマーによる各サブタイプの作動を GFP 蛍光を指標にフローサイトメーターで分別する。診断薬としては強い結合性のみを有し、作動性を持たない RNA アプタマーが最適である。そこで、強い特異的結合性のみを有

する RNA アプタマーを作動性を有さない RNA プールより結合性のみを基盤に創製する。

#### 4. 研究成果

1) ヒト S1PR 発現 stable cell line の構築  
S1PR を発現していない CHO-K1 細胞にレンチウイルス発現系を用いて S1PR の各サブタイプを恒常的に発現する stable cell line を構築した。

2) ヒト S1PR を標的とする RNA アプタマーの取得

ヒト S1PR を標的とする RNA アプタマーを、SELEX 法で創製するために必要な組換えタンパク質の作成に取りかかった。具体的には S1PR のうち、細胞表面に出ているペプチド部分について各 S1PR のサブタイプについて大腸菌を用いた組換えタンパク質としての調製を試みた。しかしながら、調製したヒト S1PR 由来ペプチドが非常に不安定であり、SELEX 作業中に随時分解していくことが確認された。従って、whole cell SELEX 法の事前段階として必須である組み換えタンパク質を用いた SELEX 法が実施できなかった。そこで、1) で作成した細胞を用い、whole cell SELEX 法を実施した。

しかしながら、研究期間内にヒト S1PR を特異的に認識する RNA の取得には至らなかった。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件) **全て査読有り**

1. Fukao, A., Aoyama, T. and Fujiwara, T :  
The molecular mechanism of translational control via the communication between the microRNA pathway and RNA-binding proteins. *RNA Biology* 12 922-926. (2015) DOI: 10.1080/15476286.2015.1073436.
2. Lupberger J., Casanova C., Fischer B., Weiss A., Fofana I., Fontaine N., Fujiwara T., Renaud M., Kopp A., Schuster C., Brino L., Baumert

TF., Thoma C. : PI4K-beta and MKNK1 are regulators of hepatitis C virus IRES-dependent translation.

*Sci Rep.* 5 13344. (2015) DOI:

10.1038/srep13344.

3. Mino T, Fukao A, Vandenbon A, Ori D, Uehata T, Tartey S, Akira S, Suzuki Y, Vinuesa CG, Standley DM, Fujiwara T and Takeuchi O. : Regnase-1 and Roquin regulate common inflammation-related mRNAs in translation-dependent and independent manners.

*Cell* 161:1058-1073 (2015) DOI:

10.1016/j.cell.2015.04.029.

4. Fukao A, Mishima Y, Takizawa N, Oka S, Imataka H, Pelletier J, Sonenberg N, Thoma C and Fujiwara T. : microRNAs trigger dissociation of eIF4AI and II from target mRNAs in humans. *Molecular Cell* 56, 79-89 (2014) doi:

10.1016/j.molcel.2014.09.005.

5. Maesaki R, Satoh R, Taoka M, Kanaba T, Asano T, Fujita C, Fujiwara T, Ito Y, Isobe T, Hakoshima T, Maenaka K, Mishima M. : Efficient and cost effective production of active-form human PKB using silkworm larvae. *Sci Rep* 4, 6016 (2014) doi: 10.1038/srep06016.

6. Mikami S, Kanaba T, Takizawa N, Kobayashi A, Maesaki R, Fujiwara T, Ito Y, and Mishima M. : Structural insights into the recruitment of SMRT by the co-repressor SHARP under phosphorylative regulation.

*Structure* 7, 35-46 (2014) doi:

10.1016/j.str.2013.10.007.

7. Ishii J, Oda A, Togawa S, Fukao A, Fujiwara T, Ogino C, Kondo A. : Microbial fluorescence sensing for

- human neurotensin receptor type 1 using  $G\alpha$ -engineered yeast cells. *Anal Biochem.* 446, 37-43 (2014) doi: 10.1016/j.ab.2013.10.016.
8. Takizawa N, Fujiwara T, Yamasaki M, Saito A, Fukao A, Nomoto A, Mizumoto K.: The essential role for the RNA triphosphatase Cet1p in nuclear import of the mRNA capping enzyme Cet1p-Ceg1p complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 8, e78000. (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0078000.
- [学会発表] (計 11 件)
1. 藤原俊伸 : in vitro翻訳系を用いた新規創薬ターゲット同定法  
BMB2015 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会  
2015年12月1日～4日 神戸国際会議場(神戸)
  2. Yuka Yamada, Manabu Yamasaki, Naoki Takizawa, Akira Fukao and Toshinobu Fujiwara : High affinity RNA for capping enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*  
11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society  
2015年10月11日～14日 ライデン(オランダ)
  3. Fujiwara, T. : The RNA binding protein HuD can attenuate the miRISC-mediated translation repression  
Joint Australia and Japan RNA Meeting  
2014年11月2日～5日 シドニー (オーストラリア)
  4. Yano Y., Fukao A., Fujiwara T. : Effect of eIF4B phosphorylation by active Akt1 recruited into cap binding complex by HuD on translation.
- Joint Australia and Japan RNA Meeting  
2014年11月2日～5日 シドニー (オーストラリア)
5. Fujiwara T. : microRNAs trigger dissociation of eIF4As from target mRNAs  
Cold Spring Harbor Laboratory Translational Control 2014年9月2日～7日 Cold Spring Harbor Laboratory (アメリカ)
  6. 矢野雄暉、深尾亜喜良、藤原俊伸 : 活性型Akt1によるeIF4Bのリン酸化を介したRNA結合タンパク質HuDのcap依存的翻訳の促進  
第16回日本RNA学会 2014年7月23日～25日 ウィンク愛知 (名古屋)
  7. 山田由佳、藤原俊伸 : In vitro selection of RNA aptamer to SSTRs  
第8回「長野ミーティング:生物資源の有効利用を目指して」2014年3月2日～4日 ラフォーレ白馬 (長野)
  8. 藤原俊伸 : High-throughput screening approach combining siRNA reverse-transfection and reporter mRNA transfection  
第8回「長野ミーティング:生物資源の有効利用を目指して」2014年3月2日～4日 ラフォーレ白馬 (長野)
  9. Satoh, R., Fukao, A., Nomoto, A. and Fujiwara, T. : The RNA-binding protein HuD regulates cap-dependent translation by binding to the mRNA nuclear export receptor TAP/NXF1  
第36回日本分子生物学会 2013年12月3日～6日 神戸国際会議場 (神戸)
  10. Yano Y., Fukao A., Fujiwara T. : HuD accelerates cap-dependent translation through eIF4B phosphorylation by active Akt1

第36回日本分子生物学会 2013年12月3日

～6日 神戸国際会議場 (神戸)

11. Fukao, A., Sonenberg, N., Thoma, T. and  
Fujiwara, T. : The mechanism of  
translational control which targets a  
translation initiation complex  
2013 RiboClub Annual Meeting 2013年9  
月23日～25日 ケベック (カナダ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.phar.kindai.ac.jp/biochemist  
ry/](http://www.phar.kindai.ac.jp/biochemist<br/>ry/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 俊伸 (FUJIWARA, Toshinobu)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号 : 80362804

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

上野 義仁 (UENO, Yoshihito)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号 : 20250467