

サブテーマ名：C 高速分子進化の医療応用
小テーマ名：C2 がん診断・治療に関連した機能分子の創出

フェーズ I<3-1-a>

[概要]

種々のがん細胞で転写因子 STAT3 が恒常的に活性化されており、これががん細胞の悪性化に関与している。我々は STAT3 の活性化によって hepatocyte growth factor (HGF) の産生が促進されることを明らかにした。HGF は血管新生促進作用やがん細胞に対する運動促進作用によって、がん細胞の転移を促進する。さらに、HGF は種々のがんの予後を診断できる血中腫瘍マーカーになると報告されている。そこで本研究のフェーズ I では、HGF に特異的に結合し、その生物活性を阻止する DNA アプタマーを創出した。フェーズ II では、このアプタマーを診断用アプタマーチップに応用するために、血中 HGF の定量システムを開発する。また、他の腫瘍マーカーやホルモン受容体に対する新規アプタマーを作製する。さらに、がんの悪性化に関与する遺伝子や腫瘍マーカーの探索を続行し、これらの分子に選択的に作用する化合物を高速分子進化の方法を駆使して作製する。

[フェーズ I の研究成果]：

HGF 結合 DNA アプタマーの創出

がんの転移を促進するサイトカイン HGF に特異的に結合し、HGF の生物活性を阻止する DNA アプタマーを創製した。ヘアピンループ型とグアニンカルテット型と構造が異なる 2 群のアプタマーが得られたが、どちらも HGF のヘパリン結合部位と同一の部位に結合した。HGF は膵臓がん細胞の分散や運動 (migration)、浸潤を促進するが、アプタマーの添加によってこれらの作用が阻止された。さらにアプタマーは HGF による血管新生促進作用を阻害した (図 1)。

[フェーズ II の研究成果]：

(1) DNA アプタマーによる HGF 定量法の開発

アプタマーの応用として HGF の定量法を検討した。HGF を特異的に検出するために、結合部位が異なるアプタマーの分離を試みたが、異なる部位に結合するアプタマーを分離できなかった。HGF 抗体で HGF を捕捉後、DNA アプタマーを結合させ、DNA を PCR 法で検出する方法を検討した。標準 HGF にアルブミン蛋白を加えた一定条件下では定量的に検出することができた。血清試料中の HGF を定量するために、がんセンターの倫理審査委員会の承認と患者さんの同意を得て、約 200 名の患者の血液を採取した。しかし、PCR 法では血清試料中の HGF を正確に定量することが困難であった。別の方法を検討した結果、アビジン固定プレートにビオチン標識 DNA アプタマーを結合させた後、試料 HGF を捕捉し、HGF 抗体を利用して HGF を検出する方法で、定量できる可能性があることがわかった。

(2) 腫瘍マーカー候補分子 nicotinamide *N*-methyltransferase (NNMT) の同定と解析

がんの悪性化に関係している転写因子 Stat3 の新規標的分子として NNMT を同定した。Hep-G2 細胞を IL-6 で刺激すると Stat3 が活性化され、NNMT mRNA が誘導される。Dominant negative Stat3 の導入によって、IL-6 による NNMT プロモーター活性の促進が阻止された。一方、hydroxytamoxifen (4HT) によって活性化される STAT3ER の導入によって、プロモーター活性が誘導された。種々のがんで Stat3 が活性化されていることから、これらの種々のがんで、NNMT が高発現していることが推察される。大腸がん組織と正常大腸組織を NNMT と活性型 Stat3 に対する抗体で免疫染色をした。86% のがんで NNMT が高発現し、Stat3 の活性化と強い相関性が認められた (図 2)。

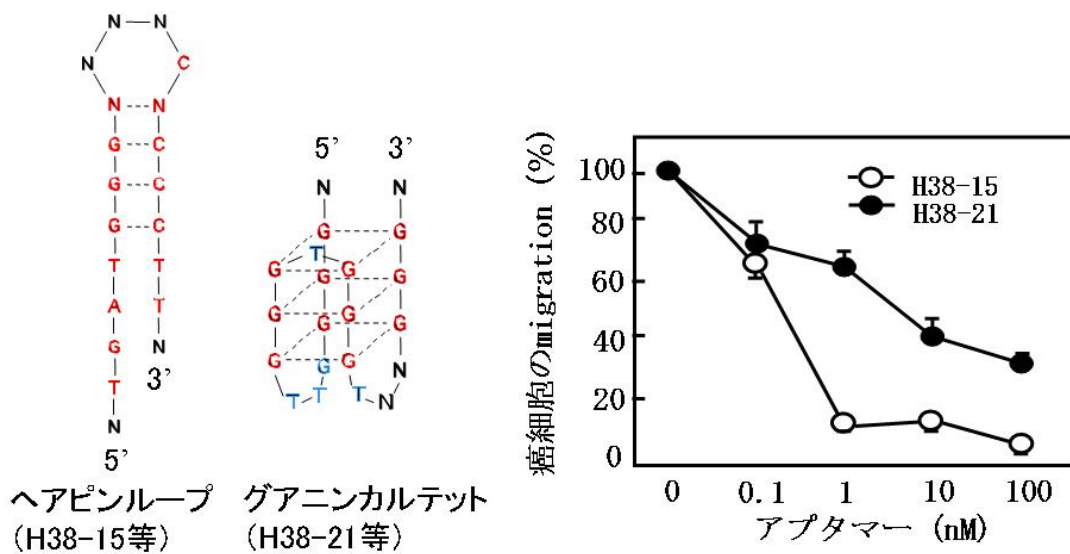
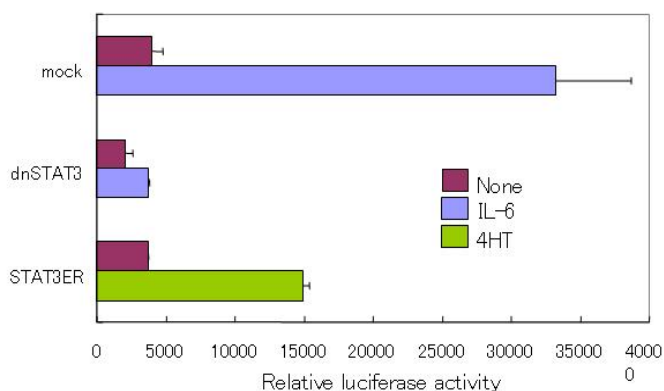


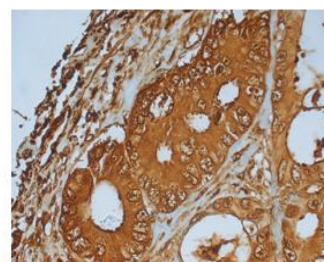
図1. HGF結合DNAアプタマーの創出

2種類のDNAアプタマーはHGFのヘパリン結合部位に特異的に結合し、HGF (100 pM)による膵臓癌細胞の運動能の亢進を抑制した。

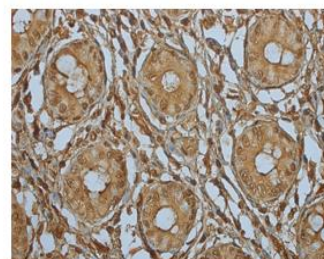
(A) NNMT プロモーター活性に対するdominant negative STAT3とconditionally active STAT3の効果 (Hep-G2細胞)



(B) NNMTの免疫染色



大腸癌組織



正常大腸組織

図2. STAT3の新規標的分子NNMTの同定(A)とがん細胞におけるNNMTの高発現(B)

NNMT が腫瘍マーカーとしてがんの診断に利用できる可能性があるので、微量の NNMT を定量できる ELISA 法を開発した。最初に、大腸菌で遺伝子組み換えタンパク質を作製し、このタンパク質に結合するアプタマーと抗体の作製を行った。アプタマーの作製はまだ成功していないが、ウサギで作製した抗体を利用することができた。肺癌は癌の部位別死亡の 1 位であり、早期発見が必要とされる。肺癌患者(120 症例)の血液中の NNMT を定量した。NNMT は早期の肺腺癌の 39%が陽性で、既存の腫瘍マーカー CEA の 12%より、高感度であった。

(3) グレリン (成長ホルモン分泌促進因子) 受容体に対する DNA アプタマーの作製

グレリン受容体を強制発現させた CHO 細胞と結合した DNA を濃縮し、受容体を発現していない CHO 細胞と結合した DNA は除去する、細胞 SELEX 法によってアプタマーを選別した。蛍光標識をしたアプタマー候補 DNA は受容体発現細胞の方に強く結合した。

[今後の展開] :

(1) DNA アプタマーによる血清 HGF 定量法の改良

DNA アプタマーと HGF との結合 (結合定数は nM オーダー) は強くて、10%ウシ血清によって阻害されない。しかし、ヒト血清中の HGF を定量する場合に、弱い結合能力の血清成分でも、濃度が高いために HGF の検出に影響することがあった。DNA と血清成分の非特異的結合をブロックする条件をさらに検討する必要がある。

(2) 血中 NNMT の臨床的意義の検討

肺癌関連患者の血清(120 症例)を定量した中間結果で、NNMT が腫瘍マーカーとして高感度であることが示唆された。今後、さらに多く肺癌患者と非癌患者の血清を解析し、感度と特異性を既存の腫瘍マーカー CEA と比較して、NNMT の有用性を評価する。

(3) グレリン受容体に対するペプチドアプタマーの創製

今後は、都市エリア産学官連携促進事業「タンパク質の高速分子育種を基盤技術とする先端バイオ産業の創出」のプロジェクトの一環として、グレリン受容体に対するペプチドアプタマーの創製を目指す。DNA アプタマーの作製のために開発したグレリン受容体発現細胞や、サブグループ A が開発した cDNA-display 法を利用する。