

ゲノム由来オリゴDNAによる 細胞分化制御

Regulating cell differentiation by genome-derived oligodeoxynucleotides

高谷 智英
Tomohide Takaya

信州大学大学院 総合医理工学研究科(准教授)
Graduate School of Medicine, Science and Technology, Shinshu University (Associate Professor)

KEYWORD ▶

核酸医薬品

アプタマー

細胞分化

はじめに

01

細菌やミトコンドリアのゲノムに由来するオリゴDNA (oligodeoxynucleotide: ODN) は、Toll様受容体 (Toll-like receptor: TLR) のリガンドとして自然免疫系を調節することが知られる。しかし、近年一部のゲノム由来ODNが、非免疫細胞の分化にも影響することが明らかになってきた。筆者は、乳酸菌ゲノムを起源とするODNライブラリから、筋・骨組織の前駆細胞に作用する配列を同定し、筋萎縮や骨粗鬆症に有効な核酸医薬品のシーズとして研究を進めている。本稿では、これらODNの背景や作用機序、そして応用展開について紹介する。

核酸医薬品とゲノム由来ODN

02

核酸医薬品は、数十塩基のオリゴ核酸を基本骨格とし、タンパク質へと翻訳されず、標的に直接作用する薬物である。分子量1万前後の核酸医薬品は、低分子化合物のように合成可能なことに加え、抗体医薬品や細胞医薬品と同等以上の特異性や効果を発揮する、次世代の創薬モダリティである。抗原抗体反応に依拠する抗体医薬品とは異なり、核酸医薬品の作用原理は多様で、シード配列のプラットフォームは目的に応じて選択される。

核酸医薬品の中で最も実用化が進んでいるのは、アンチセンス核酸やsiRNA (small interfering RNA) など、標的遺伝子と配列依存的に結合し、その発現を調節するタイプである。これまでに、デュシェンヌ型筋ジストロフィーやトランスサイレチン型アミロイドポリニューロパチーを対象とするアンチセンス核酸が米国で承認されている。核酸標的型の核酸医薬品は、1993年に線虫で発見され、2001年以降に報告が急増したmiRNA (microRNA) やRNA干渉が着想の一つにある。これらのシードは標的遺伝子と相同・相補的な配列であり、その開発の歴史は、多細胞生物では線虫で初めて整備されたゲノムデータベースの発展と軌を一

にする。

これとは別に、病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) としてオリゴ核酸を用い、免疫応答を調節する核酸医薬品がある。元来、細菌やウイルスのゲノムには非メチル化CpG配列が偏在しており、宿主のTLR9はこれを非自己の侵襲と認識して自然免疫系を活性化する¹⁾。この性質を利用し、非メチル化CpGモチーフを有するODN (CpG-ODN) はワクチンアジュバンド (免疫賦活剤) として利用することができ²⁾、米国では2017年にB型肝炎ワクチンのアジュバンドとして承認されている。他にも、TLR3/7/9がテロメア様の核酸パターンを感知し、免疫系を制御することが知られる。このため、CpG-ODNやテロメアODNのように、TLRリガンドとして自然免疫系に作用するPAMPs型ODNは、感染症、アレルギー、自己免疫疾患などに有用な核酸医薬品となり得る。その由来から、PAMPs型ODNのシード配列は、細菌、ウイルス、ミトコンドリアなどのゲノム配列から探索される。

また、立体構造依存的に標的分子と結合するアプタマー (核酸抗体) も、核酸医薬品への展開が期待される。アプタマーは、折り畳まれて熱力学的に安定な高次構造を形成するオリゴ核酸で、抗体のように標的と特異的に結合し、多くは阻害剤として働く。一般的にアプタマーは、細胞膜ないし細胞外タンパク質を標的に設定し、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法で作製される³⁾。これは、ランダム配列の核酸ライブラリから、標的結合配列の選抜とPCRによる濃縮を反復してアプタマーを得る、リバーススクリーニングの手法である。タンパク質である抗体と比べ、核酸アプタマーは免疫原性が低く、有機合成が可能で保存性にも優れる。しかし、実用化されたのは2004年に米国で承認された抗VEGFアプタマーのみで、臨床応用では抗体医薬品に及んでいない。

このように、オリゴ核酸の基礎研究と核酸医薬品の開発は、互いに関連しながら進展してきた。他方、この枠組みに収まらない、ユニークな機能を示す配列も報告されている。2002年には、細菌のmRNAの5'側非翻訳領域がアプタマーとして低分子と結合し、自身の構造を変化させることで転写や翻訳を制御するリボス

イチチの概念が提唱された⁴⁾。また、CpG-ODNの非免疫的な作用として、2009年にはCpG-1826がTLR9依存的に破骨細胞の分化を抑制すること⁵⁾、2010年にはCpG-2006がTLR9非依存的に間葉系幹細胞の骨分化を阻害することが示された⁶⁾。2011年には、ミトコンドリアゲノム由来の非CpG-ODNが骨芽細胞の分化を促進することが報告された⁷⁾。これらの成果は、ゲノム由来配列がアプタマーとなり得ること、細胞の分化に影響し得ることを示唆する。筆者は、幹細胞に作用するゲノム由来ODNを探索することで、ODNによる新しい細胞制御技術を開発できないかと考えた。加齢や疾患に伴い、成体幹細胞や前駆細胞の機能は低下し、組織の恒常性維持に支障が生じる。幹細胞の活性化は、抗加齢や疾患治療にとって重要な課題である。ODNによる細胞制御が可能になれば、超高齢社会のニーズに応える核酸医薬品の創出につながると期待される。

筋形成ODNの同定

03

人体最大の組織である骨格筋は、運動に加え、熱生産、エネルギー貯蔵、糖代謝でも主要な役割を担う。筋力や筋量の減少は、運動機能の低下を招くだけでなく、心不全、がん、糖尿病などによる死亡の危険因子でもある。骨格筋は、多核の巨大細胞である筋線維が集合した組織である。筋形成の初期には、筋線維と基底膜の間に存在する筋幹細胞(衛星細胞)が活性化し、筋前駆細胞(筋芽細胞)となる。筋芽細胞は増殖後、収縮性の筋細胞へと分化して筋組織を構築する。しかし、加齢や疾患によって筋芽細胞の分化能は減退し、これが筋萎縮の一因と考えられている。過去に報告された筋分化促進剤は、特異性の低いヒストン脱アセチル化酵素阻害剤や、血中半減期が1時間未満のトリテルペン酸など、臨床応用にはいくつかの課題があった。そのため、抗体医薬品と比肩する特異性を達成でき、化学修飾により体内安定性や細胞毒性を調節できる、核酸ベースの筋萎縮治療薬の需要は大きい。

筆者らは、ヒト腸内に存在し、乳製品にも用いられる乳酸菌 *Lactocaseibacillus rhamnosus* GGのゲノム配列に由来する18塩基のODNライブラリから、筋分化を促進する配列を探索した。筋芽細胞にODNを投与して培養し、骨格筋マーカーであるミオシン陽性細胞の割合を指標にスクリーニングした。その結果、テロメア反復配列(TTA GGG TGA GGG)を有するODN群(iSN01~iSN07)が筋分化を誘導することがわかり(図1a)、これらを筋形成ODN(myogenetic oligodeoxynucleotide: myoDN)と呼称した⁸⁾。このうち、最も活性の高いiSN04(AGA TTA GGG TGA GGG TGA)の作用機序を解析した。

まず、iSN04が核酸を標的とするかを検討した。iSN04は、ヒト、マウス、ニワトリの筋芽細胞に作用したことから(図1b)^{8, 9)}、アンチセンス核酸様に働いたら、各動物種の相同遺伝子座にiSN04類似配列が存在するはずである。しかし、ゲノムデータベースではそのような座位を確認できなかった。また、アンチセンス核酸

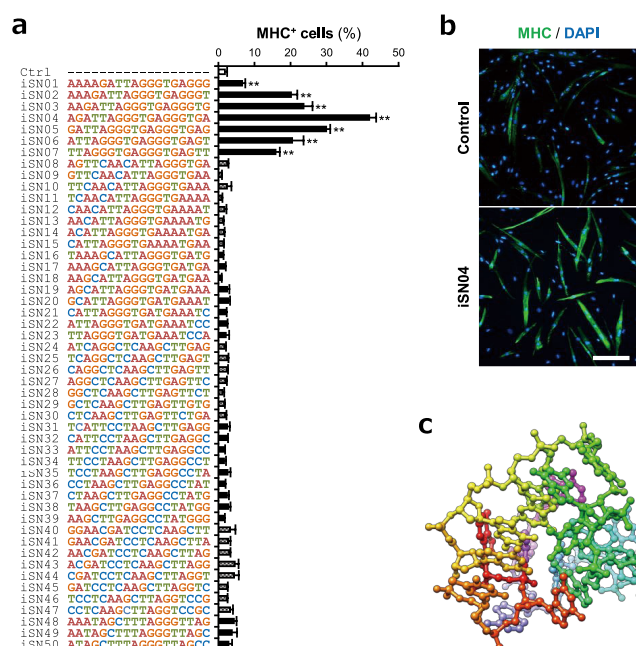


図1 myoDNの同定(文献8を改変)
(a) 10 $\mu\text{mol/L}$ の乳酸菌ゲノム由来ODNを48時間投与したマウス初代培養筋芽細胞ミオシン重鎖(myosin heavy chain:MHC)陽性率。 $** p < 0.01$ 。(b) 10 $\mu\text{mol/L}$ のiSN04を48時間投与したヒト初代培養筋芽細胞のMHC免疫染色像。スケールバー:200 μm 。(c) TTP-McMDで計算した310 K水分子中のiSN04の最安定構造(信州大学・梅澤公二先生)。

は直鎖化による活性向上が見込まれるが、一部のmyoDNは熱変性で失活した。つまり、iSN04は核酸標的型のODNではなく、構造依存的に機能すると考えられる。

次に、iSN04の免疫原性を検証した。テロメア配列を含むODNは、TLR3/7/9を介して免疫応答を抑制し得るが¹⁰⁾、iSN04を投与した筋芽細胞では、TLR下流の遺伝子群の発現に変動はなかった。また、既知のTLRリガンドODNは筋分化に影響せず、iSN04の活性も阻害しなかった。iSN04の筋分化促進活性はTLR非依存的であると結論される。

以上の結果から、iSN04がアプタマーである蓋然性が高まった。単純軌跡とマルチカノニカル分子動力学法(TTP-McMD)により、310 Kの水分子中で熱力学的に安定なiSN04の構造を計算すると、半径約1 nmの球状構造が示された(図1c)。特に、テロメア反復配列後半の3連グアニンは互いに近接し、構造の中心を占める。実験的にも、このグアニン中核を1塩基ずつ削除するごとにiSN04の活性が低下した。ゲノムDNAでは、テロメア様の配列がグアニン四重鎖と呼ばれる高次構造を形成し、テロメア結合タンパク質や転写因子複合体と相互作用する¹¹⁾。iSN04も、テロメア反復配列中のグアニンを介してタンパク質と結合すると推測された。iSN04で培養細胞の可溶性画分を沈降すると、結合タンパク質としてヌクレオリンが単離された。ヌクレオリンは真核生物でユビキタスに発現する多機能タンパク質で、N末端の被リン酸化領域、中央のRNA結合ドメイン、C末端のタンパク質結合領域からなる。ヌクレオリンは、核、細胞質、細胞膜などに移動・局在し、遺伝子の転写や翻訳、細胞の増殖や分化、炎症や細胞死などに関与するが¹²⁾、筋分化での役割は不明であった。

免疫染色の結果、筋芽細胞のヌクレオリンの大部分は核内に

存在し、特に核小体に局在することがわかった。iSN04がヌクレオリンと結合するには、細胞膜を通過する必要がある。一般的にODNは、キャリアなしで細胞内に移行する(gymnosis)。ODNは二本鎖DNAより分子量が小さく、RNAより疎水性が高いため、比較的効率良くエンドサイトーシスで取り込まれる。エンドソームから細胞質に移行したODNの一部は、シャペロンやRNA結合タンパク質によって、さらに核内に運ばれる¹³⁾。蛍光標識したiSN04を筋芽細胞に投与すると、2時間以内に細胞内での蓄積が観察され、iSN04は核内のヌクレオリンとも相互作用し得ることが示された。がん細胞のヌクレオリンは、p53 mRNAの5'側非翻訳領域に結合し、p53タンパク質への翻訳を阻害する。また、筋芽細胞のp53タンパク質は、筋原性転写因子MyoDと協働して筋分化を誘導する。これらの知見から、iSN04は筋芽細胞のヌクレオリンと結合し、p53 mRNAをヌクレオリンから解放してp53シグナルを活性化すると考えられた。実験的にも、iSN04を投与した筋芽細胞では、p53 mRNA量とは独立にp53タンパク質量が増加し、p53下流の遺伝子群の発現が誘導された。

本研究から、乳酸菌のゲノム配列に由来する18塩基のiSN04は、高次構造を形成して筋芽細胞に取り込まれ、ヌクレオリンと結合してその機能を阻害し、p53シグナルを増強して筋分化を促

進ることがわかった(図2)。iSN04は、ゲノム由来ODNがアプタマーとして働き、細胞分化を制御することを示した世界初の例である⁸⁾。

iSN04の応用展開

04

筋分化を誘導するiSN04は、加齢に伴う筋力や筋量の減少(サルコペニア)の予防や、各種疾患が合併する筋萎縮の治療に有用な核酸医薬品シーズとして期待される。1型および2型糖尿病では、酸化ストレス、慢性炎症、細胞外マトリクスの異常、遺伝子発現の攪乱などにより筋分化能が低下し、これを一因に骨格筋が萎縮する。糖尿病患者の筋芽細胞を用いた実験では、iSN04が糖尿病で増悪する筋分化を回復することが示された(図3a)¹⁴⁾。また、進行性がん患者の約8割が、筋消耗を主徴とする悪液質(カヘキシー)を合併する。機序の一端として、がん細胞が分泌する悪性因子が筋芽細胞の炎症やアポトーシスを誘導し、筋分化を阻害することが指摘されている。筆者らの実験でも、がん分泌物を含む培養上清は筋芽細胞の分化を著明に悪化させたが、iSN04を投与すると、がん細胞培養上清中でも正常な筋分化が

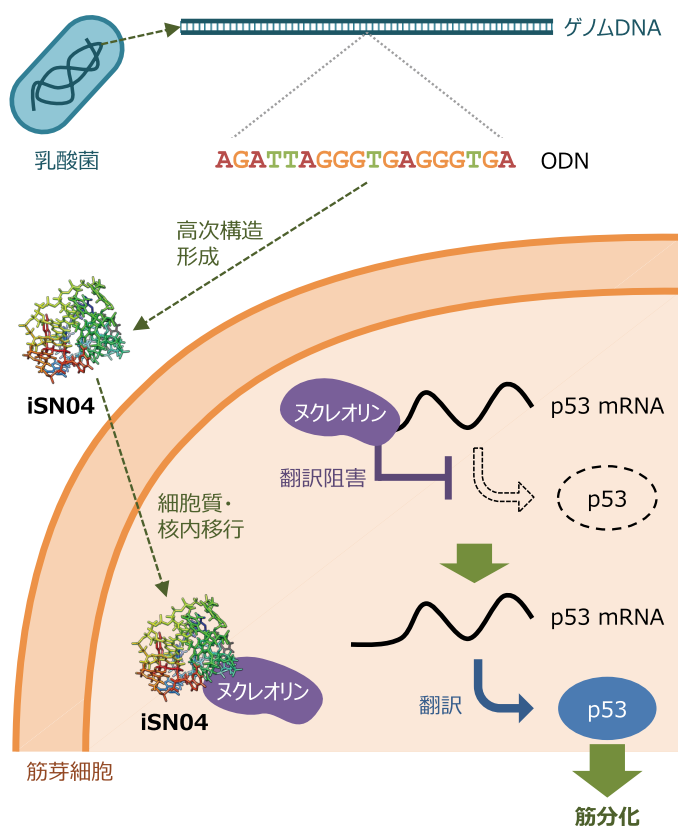


図2 iSN04の作用機序

乳酸菌ゲノム配列に由来するiSN04は、テロメア反復配列後半の3連グアニンを中心に高次構造を形成し、筋芽細胞内のヌクレオリンと結合する。結果、p53 mRNAがヌクレオリンから解放されてp53シグナル経路が活性化し、筋分化が促進される。

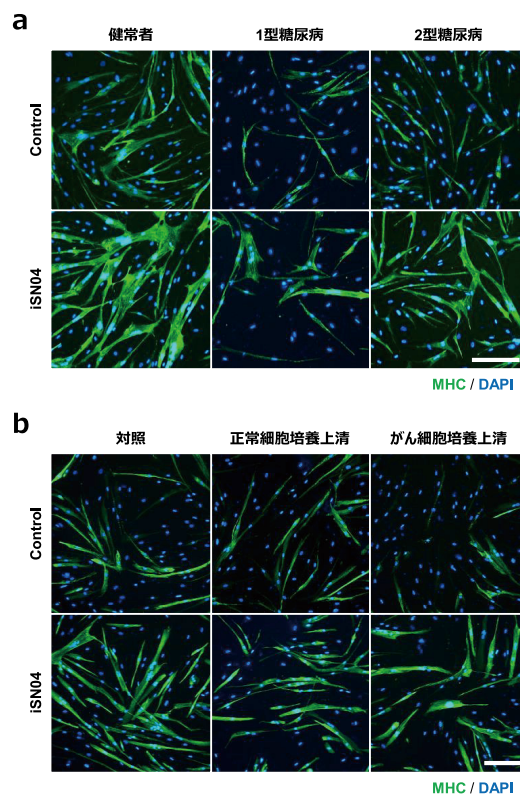


図3 iSN04による筋分化能の改善(文献14, 15を改変)

(a) 健康者と比べ、1型および2型糖尿病患者の筋芽細胞ではMHC陽性率が低い(上段)、10-30 $\mu\text{mol/L}$ のiSN04を48時間投与すると改善される(下段)。(b) 大腸がん細胞の培養上清で培養したヒト筋芽細胞のMHC陽性率は低い(上段)、30 $\mu\text{mol/L}$ のiSN04を投与すると改善される(下段)。スケールバー:200 μm 。

観察される(図3b)¹⁵。これら糖尿病・がんモデルでは、筋芽細胞は慢性的な炎症状態にあるが、iSN04は抗炎症作用を示すこともわかってきた。iSN04の標的であるヌクレオリンは、GSK-3 β のリン酸化を介して β カテニンの分解を制御する¹⁶。iSN04がヌクレオリンを阻害すると、炎症刺激による β カテニンの細胞内蓄積が減少し、 β カテニンと複合体を形成する転写因子NF- κ Bの核内移行が制限され、炎症応答が低減する¹⁷。糖尿病やがんを含め、筋萎縮を合併する疾患の多くが慢性炎症を伴うことから、筋分化促進と抗炎症というiSN04の二重作用は、臨床的にも有用性が高い。

ヌクレオリンは全細胞に発現するタンパク質であり、iSN04は様々な細胞で効果を発揮する。筋細胞が腫瘍化した横紋筋肉腫は、筋分化能が潜在化した細胞だが、iSN04で分化誘導することで増殖を抑制できる。筆者らの実験では、iSN04が、3次元培養した横紋筋肉腫細胞の腫瘍塊形成を阻害した(図4)¹⁸。元来、ヌクレオリンはがん治療の標的として知られ、iSN04にも抗腫瘍作用が想定されたが、特に、筋分化誘導が可能な横紋筋肉腫には著効が期待される。

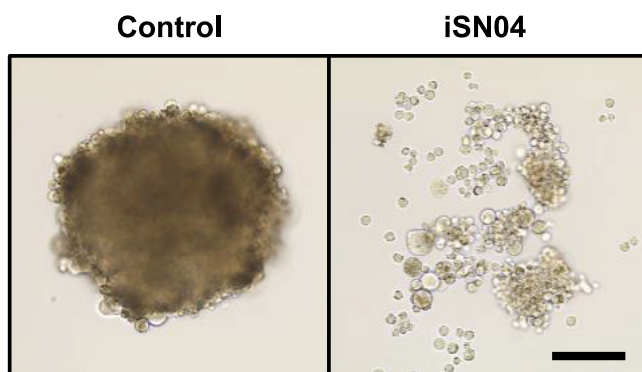


図4 iSN04による横紋筋肉腫の増殖抑制(文献18を改変)
10 μ mol/LのiSN04は、3次元培養した横紋筋肉腫細胞の腫瘍塊形成を阻害する。スケールバー:100 μ m。

また、ヌクレオリンは骨格筋と近縁の心筋や血管平滑筋、さらに脂肪の分化にも関与しており、iSN04によって、これらの細胞の分化や炎症が制御可能になりつつある(特許出願中)。心臓、血管、脂肪はメタボリックシンドロームを基盤とする循環器疾患の治療対象であり、核酸医薬品シーズとしてのiSN04の適用拡大が期待される。現在、iSN04の臨床応用を目指して動物試験を進めている。

同時に、多様な細胞に作用するiSN04を、標的細胞へ選択的に到達させるドラッグデリバリーシステムも必要である。18塩基(分子量5,957)のiSN04は、既知のアプタマー(平均長51塩基)より短く、化学修飾や脂質ナノ粒子による製剤化に有利である。この観点から、iSN04の構造データを元に設計した、iSN04と同等の活性を有する12塩基(分子量3,958)のODNも開発している(特許出願中)。配列の短縮は、合成コストの低減、分子の安定化、吸収率の向上とも関連し、核酸医薬品としての実用性にとって重要である。

骨形成ODNの同定

05

iSN04が提示する、ゲノム由来ODNによる細胞制御技術は、核酸医薬品の創薬モダリティとなるだろうか。先行研究では、ヒトミトコンドリア配列に由来する27塩基のMT01([ACC CCC TCT]₃)が、骨芽細胞や間葉系幹細胞の骨分化を促進し、ラット歯周病モデルにおける歯槽骨量の減少を改善している^{7, 19}。MT01はERK/MAPK経路を活性化し、骨形成に必須の転写因子Runx2のリン酸化を亢進するが、直接の標的は不明である。筆者らも、iSN04を同定した乳酸菌ODNライブラリを再利用し、MT01のように骨分化を誘導する骨形成ODN(osteogenetic oligodeoxynucleotide: osteoDN)の探索を試みた。骨芽細胞にODNを投与して培養し、骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼの活性を指標にスクリーニングした結果、CpGモチーフを含むiSN40(GGA ACG ATC CTC AAG CTT)が骨分化を促進することがわかった(図5a)²⁰。iSN40を長期投与した骨芽細胞は、細胞外基質が石灰化した骨細胞へと成熟する(図5b)。

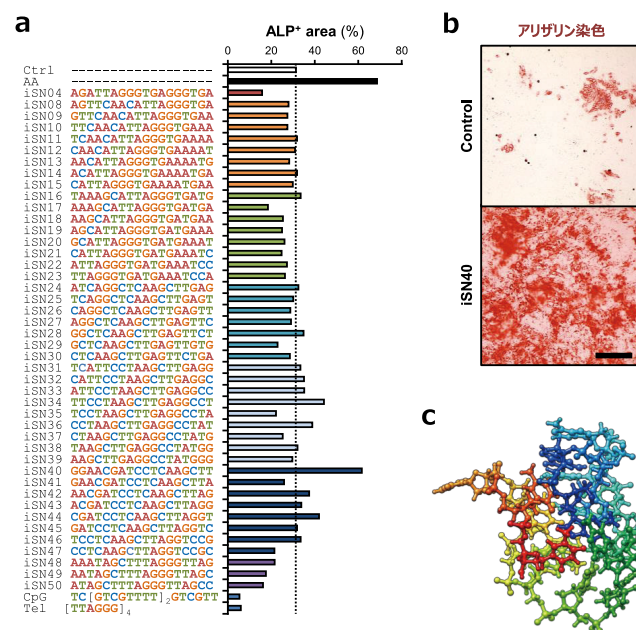


図5 iSN40の同定(文献20を改変)
(a) 10 μ mol/Lの乳酸菌ゲノム由来ODNを48時間投与したマウス骨芽細胞株MC3T3-E1のアルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase:ALP)陽性率。アスコルビン酸(ascorbic acid:AA)は骨分化誘導の陽性対照。(b) 10 μ mol/LのiSN40を12日間投与したMC3T3-E1のアリザリン染色像。スケールバー:200 μ m。(c) TTP-McMDで計算した310 K水分子中のiSN40の最安定構造(信州大学・梅澤公二先生)。

CpG配列を有するiSN40は、CpG-ODNとしてTLR9に受容され得る。しかし、CpGモチーフ(CG)をGCに置換した変異iSN40も骨分化を促進する一方、TLR9リガンドであるCpG-2006は骨分化に影響しない。さらに、本研究で用いた骨芽細胞株はTLR9を発現しないことから、iSN40による骨分化誘導はTLR9非依存

的であると結論される。分子シミュレーションでは、iSN40は半径約1 nmの球状構造を形成した(図5c)。iSN40と変異iSN40はともに、30分以内に骨芽細胞内に移行したため、iSN04同様、アプタマーとして機能すると考えられる。しかし、現時点で標的分子は不明である²⁰⁾。

骨は代謝が活発な組織で、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収の均衡によって恒常性が維持される。骨芽細胞の分化能の低下は、骨量や骨密度の減少、ひいては骨粗鬆症の原因となる。治療薬としてデノスマブ(抗RANKL抗体)やロモソズマブ(抗スクレロスチン抗体)が承認されているが、核酸医薬品は存在しない。興味深いことに、TLR9非依存的に骨分化を誘導するiSN40は、同時に、TLR9依存的に破骨細胞の形成を阻害することがわかってきた(投稿中)。骨形成を促進し、骨吸収を抑制するiSN40は、骨リモデリングのバランスを改善し、骨粗鬆症の治療に有効な創薬シーズとして期待される。

おわりに

06

わずか50種類の配列からなる乳酸菌ODNライブラリから、筋形成型のiSN04と、骨形成型のiSN40という、細胞分化を制御する2種類のODNが同定された。一連の成果は、ゲノム配列が核酸医薬品のシーズ開発に有用なプラットフォームであることを示唆する。ゲノムDNAやmRNAは、それら単体では機能しない。ゲノムDNAには、転写因子複合体、クロマチンタンパク質、核酸修飾酵素、開裂・複製・修復・切断に関する様々なタンパク質が結合する。RNAには、スプライシング、ポリアデニル化、輸送、翻訳に寄与する多彩なRNA結合タンパク質が働き、その数はヒト遺伝子の7.5%に達する。つまり、ゲノム配列は何らかのタンパク質と相互作用する確率が極めて高く、短くとも機能性に富むアプタマーの探索に好適といえる。筆者らは、ゲノム由来ODNライブラリを、標的分子を設定しないフォワードスクリーニングに供したが、これをSELEX法のスタートライブラリに応用することもできる。今後、ゲノム配列に着目したアプタマー研究が進展し、ユニークな核酸医薬品シーズがさらに登場することを願う。

参考文献

1. A. M. Krieg. CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects. *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20, 709-760.
2. J. Vollmer, and A. M. Krieg. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61, 3, 195-204.
3. T. Wang, C. Chen, L. M. Larcher, R. A. Barrero, and R. N. Veedu. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnol. Adv.* 2019, 37, 28-50.
4. E. M. Aghdam, M. S. Hejazi, and A. Barzegar. Riboswitches: From living biosensors to novel targets of antibiotics. *Gene.* 2016, 592, 2, 244-259.
5. J. H. Chang, E. J. Chang, H. H. Kim, and S. K. Kim. Enhanced inhibitory effects of a novel CpG motif on osteoclast differentiation via TREM-2 down-regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, 389, 1, 28-33.
6. N. N. Nørgaard, T. Holien, S. Jönsson, H. Hella, T. Espevik, A. Sundan, and T. Standal. CpG-Oligodeoxynucleotide Inhibits Smad-Dependent Bone Morphogenetic Protein Signaling: Effects on Myeloma Cell Apoptosis and In Vitro Osteoblastogenesis. *J. Immunol.* 2010, 185, 6, 3131-3139.
7. Z. Feng, Y. Shen, L. Wang, L. Cheng, J. Wang, Q. Li, W. Shi, and X. Sun. An Oligodeoxynucleotide with Promising Modulation Activity for the Proliferation and Activation of Osteoblast. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 4, 2543-2555.
8. S. Shinji, K. Umezawa, Y. Nihashi, S. Nakamura, T. Shimosato, and T. Takaya. Identification of the Myogenetic Oligodeoxynucleotides (myoDNs) That Promote Differentiation of Skeletal Muscle Myoblasts by Targeting Nucleolin. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 8, 616706.
9. Y. Nihashi, S. Shinji, K. Umezawa, T. Shimosato, T. Ono, H. Kagami, and T. Takaya. Myogenetic oligodeoxynucleotide complexed with berberine promotes differentiation of chicken myoblasts. *Anim. Sci. J.* 2021, 92, 1, e13597.
10. F. J. Barrat, and R. L. Coffman. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Rev.* 2008, 223, 1, 271-283.
11. T. M. Ou, Y. J. Lu, J. H. Tan, Z. S. Huang, K. Y. Wong, and L. Q. Gu. G-Quadruplexes: Targets in Anticancer Drug Design. *ChemMedChem.* 2008, 3, 5, 690-713.
12. W. Jia, Z. Yao, J. Zhao, Q. Guan, and L. Gao. New Perspectives of Physiological and Pathological Functions of Nucleolin (NCL). *Life Sci.* 2017, 186, 1-10.
13. R.L. Juliano. Intracellular Trafficking and Endosomal Release of Oligonucleotides: What We Know and What We Do Not. *Nucleic Acid Ther.* 2018, 28, 3, 166-177.
14. S. Nakamura, S. Yonekura, T. Shimosato, and T. Takaya. Myogenetic Oligodeoxynucleotide (myoDN) Recovers the Differentiation of Skeletal Muscle Myoblasts Deteriorated by Diabetes Mellitus. *Front. Physiol.* 2021, 12, 679152.
15. Y. Nihashi, M. Yamamoto, T. Shimosato, and T. Takaya. Myogenetic Oligodeoxynucleotide Restores Differentiation and Reverses Inflammation of Myoblasts Aggravated by Cancer-Conditioned Medium. *Muscles.* 2022, 1, 2, 111-120.
16. S. Reister, C. Mahotka, N. van den Höfel, and E. Grinstein. Nucleolin promotes Wnt signaling in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia.* 2019, 33, 1052-1054.
17. Y. Yamamoto, M. Miyoshi, K. Morioka, T. Mitani, and T. Takaya. Anti-nucleolin aptamer, iSN04, inhibits the inflammatory responses in C2C12 myoblasts by modulating the β -catenin/NF- κ B signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2023, 664, 1-8.
18. N. Nohira, S. Shinji, S. Nakamura, Y. Nihashi, T. Shimosato, and T. Takaya. Myogenetic Oligodeoxynucleotides as Anti-Nucleolin Aptamers Inhibit the Growth of Embryonal Rhabdomyosarcoma Cells. *Biomedicines.* 2022, 10, 11, 2691.
19. Y. Shen, Z. Feng, C. Lin, X. Hou, X. Wang, J. Wang, Y. Yu, L. Wang, and X. Sun. An Oligodeoxynucleotide That Induces Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Osteoblasts in Vitro and Reduces Alveolar Bone Loss in Rats with Periodontitis. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 3, 2877-2892.
20. Y. Nihashi, M. Miyoshi, K. Umezawa, T. Shimosato, and T. Takaya. Identification of a Novel Osteogenic Oligodeoxynucleotide(osteoDN) That Promotes Osteoblast Differentiation in a TLR9-Independent Manner. *Nanomaterials.* 2022, 12, 10, 1680.