

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820404

研究課題名(和文) 温度応答性DNAアプタマーを利用する新規薬剤放出システムの開発

研究課題名(英文) Development of a novel drug delivery system using temperature-responsive DNA aptamer

研究代表者

古川 和寛 (FURUKAWA, Kazuhiro)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：00644999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規薬剤放出分子としてDNAに着目し、DNAアプタマーを用いるDDS開発を目指して検討を行った。さらに天然型DNAを用いる代わりに4'-チオDNAを用いることで生体内安定性を強化することとした。4'-チオDNAの酵素合成条件の最適化およびSELEX法による4'-チオDNAアプタマー取得に関する基礎的検討を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aim at a development of novel drug delivery system using DNA. I used 4'-thio DNA instead of natural DNA to increase the biological stability. I carried out an optimization of enzymatic synthesis of 4'-thio DNA and fundamental study of SELEX to obtain 4'-thio DNA aptamer.

研究分野：生物機能・バイオプロセス

キーワード：SELEX 4'-チオDNA DDS

1. 研究開始当初の背景

セントラルドグマの提唱以来長らく、DNA は「遺伝情報の保存」の担い手として注目されてきた。ところが近年、DNA アプタマーやデオキシリボザイムに代表される、遺伝情報の保存以外の様々な機能が発見され、注目を集めている (*Chem. Rev.*, 107, 3715, 2007)。アプタマーには、低分子化合物・タンパク質から細胞に至るまで、様々なリガンドと特異的に結合するものが存在し、SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 法と呼ばれる分子進化工学的手法によって得られる。

一方、体内の薬剤分布を定量的かつ空間的にコントロールするドラッグデリバリーシステム (DDS) は、副作用を抑え薬効を高める優れた投薬システムとして大きな注目を集めている。DDS を最適化する場合、(1) 患部への薬剤の特異的な送達、(2) 生体での薬剤放出の空間的制御、(3) 用いる材料の生体適合性を重視する必要がある。これまでに、上記を満たす分子設計として、高分子ポリマー・リン脂質・ペプチドなどを原料とするキャリアが開発されているが、薬剤の徐放性や生体適合性などの点で課題は多く、依然として改良の余地がある。

本研究では、DDS の全く新しい素材としての DNA に着目した。その理由として、(1) リガンド (薬剤) との強い親和力 (数 nM 程度の解離定数) (2) 元来体内に存在する分子であることに由来する生体適合性の高さが挙げられる。また、報告者らはごく最近になり、4'位酸素原子を硫黄原子に置換した修飾型核酸である 4'-チオ DNA の合成に成功した (図 1)。4'-チオ DNA は、細胞内 DNA 分解酵素に対する抵抗性が天然型よりも高い、天然型 DNA と比較して、免疫応答を誘起する可能性が少ない、条件を最適化することで PCR による増幅が可能であるといった非常に興味深い性質が観察されている (*Kojima and Furukawa et al., ACS Synth. Biol.*, 2013, 2, 529)。

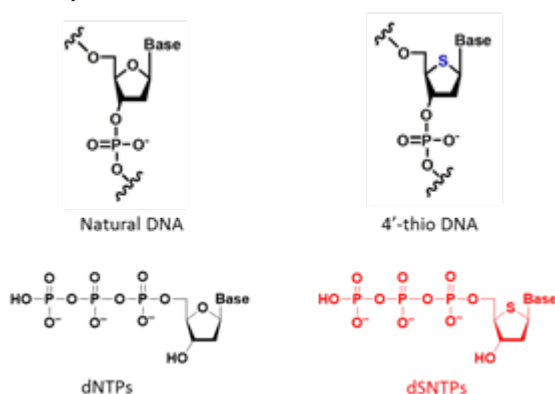


図 1 天然型 DNA と 4'-チオ DNA の構造および基質となるトリリン酸体の構造

2. 研究の目的

当初研究計画では、天然型 DNA を用いた抗がん剤 doxorubicin 結合性アプタマーの獲得を目指したが、4'-チオ DNA を用いることで自然免疫応答誘導を回避することが可能であり、またヌクレアーゼ抵抗性を獲得することで生体内安定性も劇的に向上させることが可能であると考えた。そこで本研究では 4'-チオ DNA を基質とした SELEX を行い、doxorubicin に対する 4'-チオ DNA アプタマーの獲得を目的として検討を行った。

3. 研究の方法

本研究課題の目標を達成するために、(1) 4'-チオ DNA の基質である dSNTPs (2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの三リン酸体) の酵素合成における取り込み条件の検討、(2) SELEX 法による 4'-チオ DNA アプタマーの獲得検討を行った。

4. 研究成果

SELEX 法では、近年では化学修飾三リン酸体の導入による、さらなる機能強化の試みが盛んに行われているが (*e.g., Nat. Chem.*, 4, 183, 2012)。一方で PCR での DNA ポリメラーゼによる三リン酸体の取り込み効率の低下が課題となっている。前述の通り、dSNTPs については、条件を最適化することにより PCR による増幅が可能であるが、複数の異なる配列を持つ DNA ライブラリーに対し、単一の条件で増幅を行うことは非常に困難であった (data not shown)。

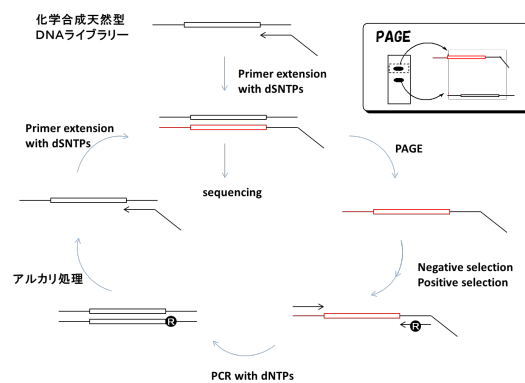


図 2 4'-チオ DNA アプタマーの SELEX の手順。赤線で示した部位が、4'-チオ DNA が取り込まれた箇所を示す。

そこで、図 2 に示した、primer extension による 4'-チオ DNA の取り込みを介した SELEX 法を考案した。すなわち、天然型の DNA ライブラリーに対し、primer extension による dSNTPs (4'-チオ DNA のトリリン酸体) の取り込みを行い、その後リガンドに対するアフィニティーセレクションを行う。選抜された 4'-チオ DNA を、天然型 dNTPs によって PCR を行うことにより、再度天然型の DNA ライ

ブラリーを作成する。この際、PCRのリバースプライマーにはRNAを挿入し、PCR後のアルカリ熱処理および変性ポリアクリルアミドゲルにより、不要な相補鎖DNAを除去する。このサイクルを繰り返すことにより、ライブラリーの多様性を失うことなくSELEXを行うことができると考えた。

まず、本SELEXの根幹をなす、ランダム配列をテンプレートとしdSNTPsを用いた場合のprimer extensionの条件を検討することとした。テンプレート濃度、サイクル数、アニーリング温度、伸長時間、各種添加剤(DMSO, betaine, Mn^{2+})濃度を变化させ、最も伸長効率が良い条件を見出した(20.5%)。100%の伸長効率が見られない原因としては、テンプレートがランダム配列の集合体であるために、配列によってはdSNTPsの取り込みが非常に困難になるためであると考えられた。

次に、実際にSELEXを行った。まず、50残基のランダム配列を持つ天然型DNAに対し、dSNTPsを用いたprimer extensionを行い、4'-チオDNAによって構成されるランダムライブラリーを構築した。この際、最適化した条件(ポリメラーゼにはKOD dashを用い、DMSO, betaine, Mn^{2+} 等を添加する)を用いることにより、4'-チオDNAを安定した収率で獲得することが可能であった。アフィニティーカラムとの非特異的に吸着する分子を除くためにネガティブセレクションを数回行ったのち、リガンドとのアフィニティーセレクション(ポジティブセレクション)を行った。4'-チオDNAは天然DNAに比べて極めて疎水性が高いことからアフィニティーカラムへ非特異的に吸着する分子が多く、リガンドに特異的に結合する分子を選別することが困難であった。そこで、セレクションに用いる全てのバッファー類に0.001%のSDSを共存させることにした。その結果、非特異的な吸着を抑えることが出来た。続いて、得られたリガンド結合性プールをPCRおよびprimer extensionによって増幅した。以上の過程を1サイクルとし、5サイクルのセレクションを行った結果を図3に示した。2サイクル目においては、ポストネガティブセレクション(アフィニティーセレクション後に再びネガティブセレクションを行う操作)を行ったために、一時的にリガンド結合性分子の割合が減少したが、その後サイクルを増すと再びその割合は上昇した。4ラウンド目以降は、アフィニティーセレクションをリガンドの有無に分けて行ったところ、リガンドが存在する場合には、非存在下に比べて2倍以上の分子が選別されており、セレクションが機能していることが分かった。5ラウンド目においては、リガンド濃度を1/10として淘汰圧をより高めたが、依然としてこの傾向が見られている。今後、さらにセレクションを進め、選別された個々の分子の解析を行う予定である。

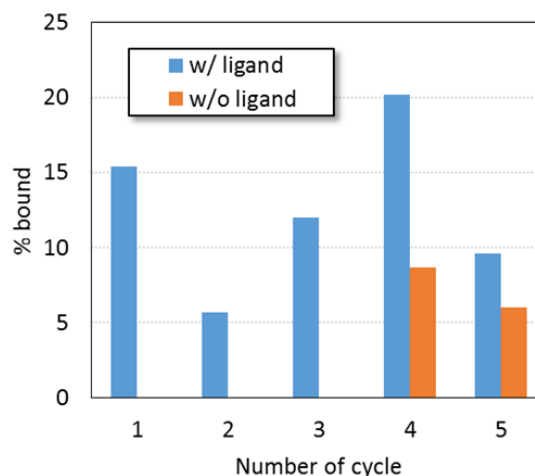


図3 4'-チオDNAアプタマーのSELEXにおける、各サイクルごとのリガンドの有無による結合性分子の割合の相違。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Kazuhiro Furukawa and Noriaki Minakawa: Allosteric control of a DNA-hydrolyzing deoxyribozyme with short oligonucleotides and its application in DNA logic gates: *Org. Biomol. Chem.*, 12, 3344-3348 (2014). DOI: 10.1039/C4OB00451E.(査読有)
2. Takamitsu Kojima, Kazuhiro Furukawa, Hideto Maruyama, Naonori Inoue, Noriko Tarashima, Akira Matsuda, Noriaki Minakawa: PCR Amplification of 4'-ThioDNA Using 2'-Deoxy-4'-thionucleoside 5'-Triphosphates. *ACS Synth. Biol.*, 2, 529-536 (2013). DOI: 10.1021/sb400074w. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

1. Kazuhiro Furukawa, Noriaki Minakawa, Allosteric control of DNA-hydrolyzing deoxyribozyme by short oligonucleotides, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Poster presentation), 2013.11/13-11/15, 神奈川大学(神奈川県横浜市)

〔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.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/>

mar/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

古川 和寛 (FURUKAWA, Kazuhiro)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・助教
研究者番号：00644999