

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08235

研究課題名(和文) 心筋細胞内への特異的薬物送達システムの開発と心疾患治療への応用

研究課題名(英文) Development of cardiomyocyte-specific intracellular drug-delivery system for therapy of cardiac diseases

研究代表者

本田 健 (HONDA, Takeshi)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30457311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、心疾患治療の鍵となる蛋白質が心筋細胞内に多く見出されているが、それらを標的とする薬物では、心筋細胞内に薬物を送達する手段が必要となる。我々は、その薬物送達ツールとして、心筋特異的に細胞内へ侵入する核酸アプタマーを作製した。さらに、心筋細胞内で機能する薬物を、このアプタマーに搭載して細胞内部へ送達することにより、その薬効を発揮させることに成功し、心臓を標的とした新たな薬物送達法を示すに至った。

研究成果の概要(英文)：Several intracellular proteins of cardiomyocytes have been found as attractive drug targets for cardiac diseases. Drugs targeting to such proteins require penetration into cardiomyocytes to exert their efficacy. In order to develop the heart-specific intracellular drug delivery system, we prepared the nucleic acid-based aptamer possessing an ability to penetrate into the cardiomyocyte specifically. Then, to investigate the intracellular drug-delivery potential of the obtained aptamer, we conjugated the aptamers to a drug targeting an intracellular protein regulating the contraction of cardiomyocyte. The drug-conjugated aptamers improved the contraction activity, indicating the utility of the novel heart-targeted intracellular drug delivery method.

研究分野：薬理学

キーワード：核酸アプタマー 心筋細胞 細胞内導入 薬物送達

1. 研究開始当初の背景

本邦において、心疾患は生活習慣病や高齢化を背景に年々増加している。種々の心疾患の終末像は心不全であるが、その根本的な治療薬の開発は未だ途上である。しかしながら、その発症機構、特に心筋細胞内における分子病態の解明では、近年目覚ましい進展が見られる。燐酸化酵素などを介した細胞内シグナル伝達系、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプなど一連の Ca^{2+} 動態調節因子、筋フィラメントや細胞骨格の構成蛋白質など、それらの機能異常と病態との関係が明らかになり、これらを標的とした新たな心疾患治療薬の開発が期待されている。一方で、標的が細胞内にあるため、薬物を如何にして心筋特異的に膜を通過させて細胞内導入するかが大きな課題となっている。同様の問題は核酸医薬開発においても見られ、これまでに脂質リポソーム、ナノ粒子、細胞膜透過性ペプチドなどの細胞内導入法が開発されてきたが、いずれも無差別に細胞内へ入るため、組織特異性が低い。従って、心筋のみのシグナル伝達系を制御することが出来ず、他組織で有害作用を引き起こす要因ともなる。遺伝子治療分野では、遺伝子の送達にウイルスが利用され、特に心臓ではアデノ随伴ウイルスが有望視されているが [Methods Mol. Biol. 2008; 437, p51]、抗原性や炎症、ヒト遺伝子への組込みなど安全面での課題が多く残る。そこで我々は、心筋特異的に細胞内へ侵入する分子ツールを創出し、新たな心不全治療薬の開発に利用することを考えた。そのツールとして、核酸アプタマーを採用した。一本鎖の核酸は配列に依存して多様な立体構造をとる。例えば 40mer のランダム配列では、 10^{24} もの多様性が生じ、その中には標的に結合する“アプタマー”が存在する。細胞表面には、ある因子の結合刺激で細胞内部へエンドサイトーシスする生体分子(多くは蛋白質)が多様に存在し、細胞種に特異的な発現を示すものもある。そこで心筋特異的に細胞表面に存在する未知の取込み蛋白質に作用して心筋細胞内に侵入するアプタマーを創出することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、心筋特異的な薬物送達ツール(心筋特異的透過アプタマー)を開発し、細胞内導入の必要な治療薬を搭載した透過アプタマーの有効性を検証すると共に、アプタマーの心筋細胞内への侵入メカニズムを分子レベルで解明する。この様な新たな心筋特異的な薬物送達ツールの開発は、虚血性心疾患、心不全、不整脈など様々な心疾患に対する新たな治療手段を提供し、医学的・社会的に大きな貢献が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 心筋特異的透過アプタマーの作製

本研究では、核酸アプタマーの素子として RNA 鎖および一本鎖 DNA を用いた。いずれも

ランダム領域は 40mer に設定し、PCR での増幅や転写反応を可能とする領域を付加した配列に設計した。ランダム化された核酸鎖ライブラリー(約 10^{15} 種)をラット心筋細胞に作用させ、洗浄および核酸分解酵素処理によって、細胞内部に侵入できなかった核酸鎖を淘汰した。細胞溶解液から細胞内部に侵入した核酸鎖を抽出し、PCR 法によって増幅させた。また、骨格筋系細胞などの心筋以外の細胞にも作用させ、それらには取り込まれない核酸鎖を選別した。この淘汰、抽出、増幅を繰り返すことで目的の機能を持つ核酸鎖を得る手法を試験管内分子進化法(SELEX)と呼ぶが、心筋細胞内に透過する分子の獲得というユニークな“心筋 SELEX 法”を開発し、心筋細胞へ特異的に取り込まれる(心筋透過型)核酸アプタマーを網羅的に探索した。

(2) アプタマーの特性解析

得られたアプタマーについて、心筋以外の細胞に対する侵入活性を調べて細胞特異性を確認した。また、核酸鎖の端を順次削った一連の欠損体を合成し、細胞内侵入活性を測定し、最小活性部位を同定した。また、ヒト血清に添加して分解の程度を解析した。さらに、エンドサイトーシス阻害薬の影響などを検討して、細胞内侵入経路の解析を行った。

(3) アプタマーに薬物等の積荷分子を結合させ、心筋特異的透過アプタマーが薬物送達ツールとして有用かを検証した。

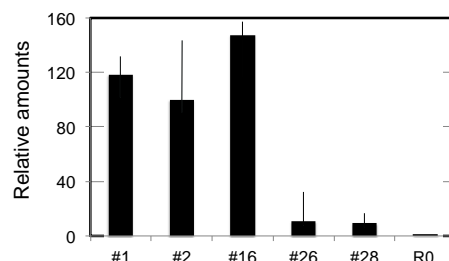
(4) モデル動物(マウス)を用いて生体投与における安定性や薬物動態解析を行い、薬物送達ツールとしての有用性を検証した。

(5) 心筋特異的透過アプタマーに光架橋基やビオチンを化学修飾し、アプタマーの作用相手を抽出、同定することによって、心筋細胞への侵入メカニズムを分子レベルで解析した。

4. 研究成果

(1) RNA アプタマー

まず RNA から構成されるアプタマーを作製した。RNA は天然構造では極めて不安定であるため、分解耐性を向上させるためホスホチオエート修飾アデニン塩基を最初のライブラリーの時点で組み込んでいる。心筋 SELEX にて得られたアプタマーをクローン化して配列を解析した(特許申請を控えるため配列情報は割愛した)。各々を合成して定量 PCR によって活性を比較し(図 1)、最終的にクローン #1, 2, 16 (いずれも EC_{50} 値は 100 nM 程度)について以降の解析を行った。



RNA clone; 1 μ M
Rat cardiomyocyte; 1 x 10^5 cells

図1.RNA クローンにおける細胞内侵入量比 SELEX 実施前 RNA 群 (R0) の検出量を“1”とした時の相対値を縦軸に示す。

次に NaN_3 および 2-deoxy-D-glucose を用いてエネルギー依存性のエンドサイトーシスを阻害した状態で細胞内侵入活性を比較したところ、#2, 16 は活性が阻害された。一方、#1 は阻害されず、エンドサイトーシスとは異なる機序で細胞内へ送達されていることが示唆された。しかしながら、詳細な機序は不明である。

次に、心筋以外の細胞に対する侵入活性を調べた。その結果いずれも心筋における活性が高く、心筋への特異性を持つことが示された(図2)。ただし、#16 については幼若な心筋細胞にも作用した。

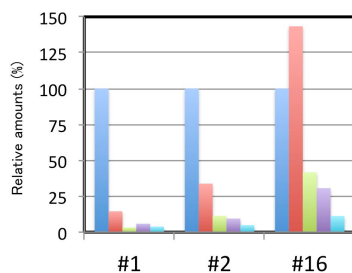


図2.各種細胞における細胞内侵入量比

左からラット成獣心筋、ラット新生児未成熟心筋、マウス筋芽細胞、マウス繊維芽細胞、マウス大腸癌細胞に対する RNA クローン #1,2,16 の細胞内侵入量比。(ラット成獣心筋 = 100%)

これらのアプタマーの構造と活性の相関を調べたところ、欠損への耐性がなかったため、全長を用いて以降の解析を行った。

心筋小胞体膜蛋白質ホスホランパン (PLN) は心不全の心筋細胞内の Ca^{2+} 動態を改善させる理想的な薬物標的であることから、我々はこれまで、PLN に直接結合して心筋収縮・弛緩機能を著明に改善する核酸アプタマー (PLN アプタマー) を開発してきたが [J Mol Cell Cardiol, 20, 177-185, 2014, J. Pharmacol. Exp. Ther., 329, 57-63, 2009]、薬効の発現には心筋細胞内への導入が必須となる。そこで PLN アプタマーに、心筋特異的透過アプタマーを連結したハイブリッド体を合成した。両者共に RNA であることから、一本の RNA 鎖として合成した。通常、薬物とその運搬ベクターとのリンクは化学架橋などの煩雑な操作が必要であるが、この簡易なハイブリッド化は、合成上大きなメリットがある。このハイブリッドアプタマーをラット心筋細胞に作用させ、心筋収縮力が改善されるかを Ca^{2+} / 収縮リアルタイム測定システム (Myocyte IONOPTIX System) にて解析した。収縮機能の評価には収縮速度、弛緩時定数、 Ca^{2+} 変動速度を用いたが、いずれも同様の結果であったため、ここでは Ca^{2+} 変動速度のみを示す。陽性対照として、無差別に細胞内へ透過する活性を持つ

TAT ペプチドを用い、これを化学結合させた PLN アプタマーを作用させた。その結果、TAT-PLN アプタマーと同様に #1, 16 のハイブリッドアプタマーでは有意に心筋収縮機能が向上していた。この収縮力増加は、#1, 16 によって心筋細胞内へ送達された PLN アプタマーが薬効を発現した結果であると推測された。

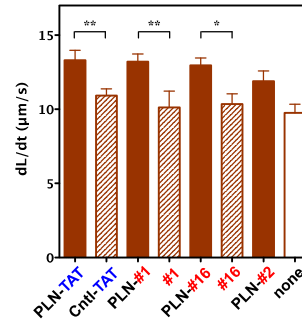


図3.心筋細胞内 Ca^{2+} 変動速度

各ハイブリッドアプタマーをラット単離心筋細胞に 5 μM で作用させた際の心筋収縮機能 (Ca^{2+} 変動速度) を示す。(PLN: ホスホランパンアプタマー、Ctrl: コントロールアプタマー、TAT: 細胞透過ペプチド、#1,2,16: 各心筋透過アプタマー)

#2 に関しては収縮機能の向上が見られず詳細は不明だが、ハイブリッド体にしたことで有害な相補鎖を形成するなど互いの立体構造が崩壊して失活した、あるいは #2 の送達経路ではホスホランパンアプタマーを適切に送達できなかった等の原因が考えられる。

次に、#1, 16 に関して、細胞内への導入を視覚化するため、蛍光色素を標識して蛍光顕微鏡にて観察した。しかしながら、心筋の持つ強い自家蛍光のためにシグナルが埋没し、細胞内導入を確認できていない。条件検討の結果、おそらく心筋に多く含まれる Lipofuscin の蛍光によるバックグラウンドであると思われ、その消失処理などさらなる条件検討を実施中である。

次に、将来的な *in vivo* 解析を見据えて血中での分解耐性を調べたところ、これらのアプタマーは血清中で十数分程度は保持されたが、生体投与で解析を行うには血中ヌクレアーゼに対する分解耐性に課題を残す結果となった。そこでヌクレアーゼ分解耐性を付与する修飾基 (ダングリングエンドなど) をアプタマー 3' 末端に結合するなどの対策を考えたが、これ以上の化学修飾 RNA アプタマーの合成は極めて高価になる。ここまでの RNA ベースの研究により、本研究戦略の妥当性は確認できたため、次に心筋特異的細胞内導入がどのような経路で行われるかを分子レベルで調べる研究にシフトした。その分子ツールとしての心筋特異的細胞内侵入アプタマーを得るため、天然構造でも比較的分解耐性のある、より安価な一本鎖 DNA アプタマーの作製に取り組んだ。

(2) 一本鎖 DNA アプタマー

RNA は DNA と比較してヌクレオチド構成因子に OH 基を一つ余分に持つことから、相互作用相手との結合接点が増え、RNA アプタマーは DNA に比べてより高親和性のものが得られやすい。しかしながら、極めて分解されやすく、分解耐性を向上させるための修飾は必須となる。そのため開発コストが非常に高くなり、生体投与など大量にアプタマーが必要となる解析ではハードルが高くなる。そこで、より安価な開発が可能な DNA アプタマーも同時並行で作製した。作製や機能解析の手法は基本的に RNA アプタマーと同じであるが、DNA 鎖の場合、放射性同位体 ³²P によるラベルが容易であるため、細胞内に取り込まれたアプタマーの放射活性を直接測定する系を構築し、より迅速で確実な解析を可能とした。スクリーニングの結果、高い活性を持つトップ 7 種のクローンを選別した(図 4)(特許申請を控えるため配列情報は割愛した)。いずれの DNA クローンもヒト血中において数時間は安定であることが判明した。また、DNA 鎖の両側から逐次削除した欠損体を用いて活性測定を行い、全長 100 塩基長のうち、いずれも約 60 塩基長まで構造最適化することができた。特に、#44 は 58 塩基長に最適化でき、相対活性も高かったため、以降の機能解析に用いた。

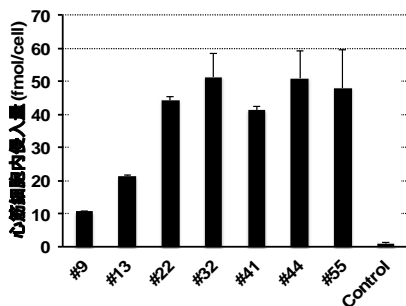


図 4. DNA クローンの心筋細胞内侵入量
DNA クローン (# 9,13,22,32,41,44,55) と活性を持たない陰性対照クローン (Control)

得られた最適化 DNA アプタマーについて、送達ツールとしての能力を評価した。ホスホランバンアプタマーは RNA 鎖であるため、心筋透過 RNA アプタマーとの連結は単に“ひとつながり”の RNA として合成することで成就したが、DNA アプタマーとの連結ではコストがかかる。そこで、Terminal transferase を用いて、DNA アプタマーの 3' 末端からデオキシアデニン (dATP) を 100 塩基長ほど伸長させ、ポリ dATP 鎖 (poly-dA) を“積荷”とした。また、伸長反応時において DIG-dUTP を dATP: DIG-dUTP = 10 : 1 の割合で添加し、poly-dA 鎖を DIG 化した。細胞内に透過した poly-dA 化アプタマーは、抗 DIG 抗体による cell-ELISA 法により検出した。その結果、100 塩基長程度の poly-dA 鎖を付加したアプタマーにおいても、心筋細胞内侵入活性を保持することを確認できた。

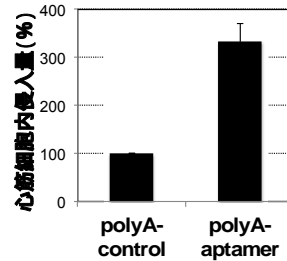


図 5. DNA クローンの心筋細胞内侵入量
ポリアデニル (polyA) 化した DNA クローン #44 と活性を持たない陰性対照クローン (Control)

次に、ビオチン-dUTP を用いて、DIG 化と同様の手法にてビオチン修飾 poly-dA 鎖を付加したアプタマーを作製し、先の cell-ELISA 法で測定したところ、DIG 化 poly-dA アプタマーと同程度の心筋細胞内侵入活性を確認できた。このビオチン化は、心筋侵入アプタマーの作用相手を抽出するための“トラップアプタマー”の作製を見越したのもでもあり、このビオチン化アプタマーの活性保持を踏まえて、トラップアプタマーの合成に進んだ。

図 6 に示すように、トラップアプタマーは、心筋侵入アプタマーの相互作用相手を光架橋により共有結合させ、さらにアビジン・ビオチン結合によりビーズにトラップして相互作用相手を抽出し、同定するためのツールである。先のビオチン修飾 poly-dA 鎖付加アプタマーの 5' 末端に光架橋基であるベンゾフェノンを経過的に結合させた。具体的には、まず 5' 末端にチオール基を導入したアプタマーについてビオチン修飾 poly-dA 鎖付加を施し、次いでマレイミド基を有するベンゾフェノンをマイケル付加反応によって 5' 末端チオール基に結合させた。ベンゾフェノンは紫外光の照射で近接する蛋白質に共有結合する性質を持った光架橋基である。

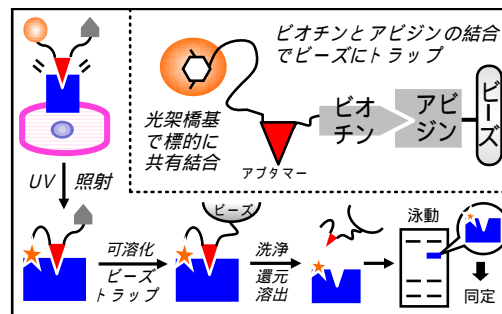


図 6. 心筋侵入 DNA アプタマーに光架橋基とビオチンを搭載したトラップアプタマーと、相互作用相手の同定法

さらに、この合成アプタマーが心筋侵入活性を持つことを、先の cell-ELISA 法にて確認した。次に、得られたトラップアプタマーを心筋細胞に作用させて紫外光を照射し、紫外光強度や照射時間などの検討を重ねた結果、25~35kDa にトラップアプタマーによってラ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本田 健 (HONDA, Takeshi)
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：3 0 4 5 7 3 1 1

(2)研究分担者

乾 誠 (INUI, Makoto)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：7 0 2 2 3 2 3 7

酒井 大樹 (SAKAI, Hiroki)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：4 0 4 6 4 3 6 7