

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14097

研究課題名(和文)核酸ナノ構造体の細胞内移行機構の解明を目的とした構造体D-NANsの創製研究

研究課題名(英文)The development of D-NANs for elucidation of intracellular translocation mechanism of nucleic acid nanostructures

研究代表者

山本 清義 (Seigi, Yamamoto)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ がん遺伝創薬研究室・研究員

研究者番号：80783521

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)：ナノサイズの粒子を用いた薬物を標的とする部位へ選択的に送達する手法(DDS)の確立は、薬物の効果の増強や副作用の低減が期待できるため、様々なDDSの開発研究が精力的に行われている。そこで本研究ではDNAナノ構造体に着目し、任意の直径を持つ球状構造を構築可能な dendrimer-like 核酸ナノ構造体(Dendrimer-like Nucleic Acid Nanostructure: D-NANs)の創成を検討した。その結果、第2世代D-NANsの構築を確認することに成功した。また作成した構造体を原子間力顕微鏡で行うため、DNA折り紙技術を用いた観察を試み、その構造体の作成、観察に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

目標とする部位に薬物を効率よく送達することで薬の効果的な利用と副作用の低減の両立を図るため、様々なキャリアを用いて薬の送達を行う技術がドラッグデリバリー(DDS)である。本研究では核酸ナノ構造体がどのように細胞へ取り込まれるのかを解明するため、新たな構造体D-NANsの創成を試みた。その結果三角柱型の核酸ナノ構造体TP-Aを用いて移行経路が蛍光顕微鏡によって明らかにし、第2世代までのD-NANs創成に成功した。この研究はDDSのキャリアとして期待される核酸ナノ構造体の細胞内動態を明らかにすることを試みるものであり、次世代の創薬に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：The establishment of a method (DDS) for selectively delivering a drug to a target site using nano-sized particles can be expected to enhance the effect of the drug and reduce the side effects. Therefore, in this research, we focused on DNA nanostructures and examined the creation of Dendrimer-like Nucleic Acid Nanostructures (D-NANs) that can construct spherical structures with arbitrary diameters. As a result, we succeeded in confirming the construction of the second generation D-NANs. In addition, since the created structure is to be observed with an atomic force microscope, observation using DNA origami technology was tried, and the structure was successfully created and observed.

研究分野：DNAナノテクノロジー

キーワード：DNAナノテクノロジー ドラッグデリバリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノサイズの粒子に薬物を内包、または吸着させることで薬物を標的とする部位へ選択的に送達するドラッグデリバリーシステム(DDS)は、薬物の効果の増強や副作用の低減が期待できる。そのため様々な材料からなるナノ粒子を利用した DDS 手法の開発研究が国内外で精力的に行われている。ナノ粒子を用いた DDS においてナノ粒子の形状及び粒径は細胞内への移行のメカニズムおよび速度を決定することから、DDS に適した粒子のパラメータの特定が必要とされている。すなわち DDS に最適な粒子の形状及び粒径を明らかにし、そうしたナノ粒子を効率的に作成する手法の確立は効果的な DDS の実現に不可欠である。

ところで近年、DNA や RNA のような核酸分子から構築される核酸ナノ構造体が DDS 担体として注目されている。核酸ナノ構造体は核酸の配列依存的な二重鎖形成を利用して構築され、DDS 担体として理想的な高い生体適合性と低い細胞毒性を示すだけでなく、容易に均一な粒径分布を持った構造体を作成できるという優れた特徴を有している。申請者は修飾核酸医薬分子の細胞内送達効率の向上と活性発現の時空間制御を目的として、光刺激応答型の三角柱型核酸ナノ構造体(TPx)を構築している。すでに TPx を用いた核酸医薬分子の細胞内への送達及び紫外線照射をトリガーとした核酸医薬分子の構造体からの放出に成功している(図1)。この TPx の様な核酸ナノ構造体はトランスフェクション試薬を用いなくてもエンドサイトーシスによって細胞内へ移行すると考えられている。しかしそのメカニズムの詳細についてはほとんど明らかになっていない。以上のような研究背景の下、申請者は 1)どのような粒径のナノ粒子が効率よく細胞内へ送達されるのか、また 2)その際、どのような経路によって送達されるのかという学術的な「問い」を投げかけ、その答えを導きだすために均一な表面構造を持ちながら粒径を自在に制御可能な dendrimer-like 核酸ナノ構造体(Dendrimer-like Nucleic Acid Nanostructure: D-NANs)を創製し、これらを明らかにすることを計画した。

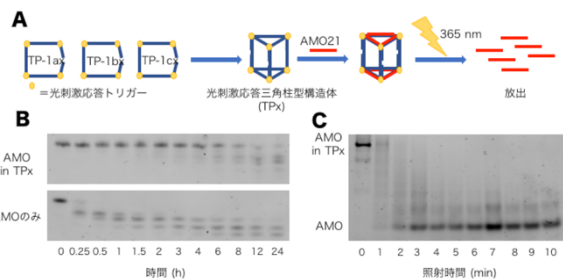


図1 (A)TPx のコンセプト、(B)TPx による酵素分解耐性の向上、(C)UV 照射による AMO 放出

2. 研究の目的

本研究は新たに開発する dendrimer-like 核酸ナノ構造体 (Dendrimer-like Nucleic Acid Nanostructure: D-NANs) の創製とそれを用いた核酸ナノ構造体の粒径と細胞内への送達効率の相関ならびに移行経路の解明を目的とするものである。この D-NANs は図 2 B に示すように dendrimer の構築手法を用いることで、均一な表面構造を持ちながらその粒径を 10 nm のオーダーで自在に制御可能な核酸ナノ構造体である。これまでの研究から、核酸ナノ構造体の細胞内への移行はエンドサイトーシスによるものである可能性がいくつかの研究グループによって示されている。エンドサイトーシスは取り込む物質の大きさや関係するタンパク質により 1)ファゴサイトーシス(数 μm)、2)マクロピノサイトーシス($\sim 1 \mu\text{m}$)、3)クラスリン依存性エンドサイトーシス(100~150 nm)、4)カベオリン依存性エンドサイトーシス(50~80 nm)の 4 種類に大きく分類され、粒子の粒径に応じて異なる経路によって細胞内へ移行していると言われている。しかし上述の研究は単一の

構造体、もしくは全く異なる構造を持つ数種類の構造体の細胞内送達について報告しているものであり、核酸ナノ構造体の粒径と細胞内送達効率との相関ならびに詳細な移行経路を明らかにした例は皆無である。一方、本研究で創製する D-NANs は、デンドリマー様の構造体を持つ核酸ナノ構造体であり、自在にその粒径を制御可能であることから、D-NANs は核酸ナノ構造体の大きさと細胞内への送達効率ならびに移行経路の相関を総合的に解明することが可能な斬新なシステムであると考えている。またこの D-NANs は、核とする Core Unit の形状を変化させることで球状だけでなく棒状や円板状など様々な形状を持った構造体の構築も可能だと考えられ、形状による移行経路の変化をも明らかにすることができると考えている。したがって、D-NANs は核酸ナノ構造体を利用した医薬輸送技術の核心部分である細胞内移行メカニズムを明らかにするものであり、本研究の成果が DDS 研究の分野に与えるインパクトは大きく、さらには DDS 製剤の創薬手法の一つとして医療への貢献が期待できる。

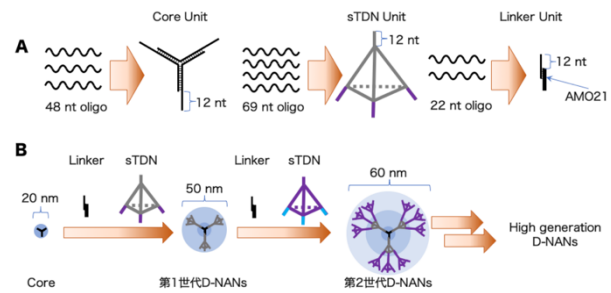


図2 A) D-NANs の各ユニットのデザイン、
B) D-NANs の構築スキーム

3. 研究の方法

本研究において構築する デンドリマー型医薬輸送核酸ナノ構造体(D-NANs)(図2)は樹状有機高分子であるデンドリマーと同様、コア部分(Core Unit)と側鎖部分(sTDN Unit)、そしてそれらをつなぐリンカー(Linker Unit)から構築される。それぞれのユニットについて説明する。Core Unit は 48 nt 長のオリゴヌクレオチド 3 本から形成される Y 字型の構造体であり、他のユニットとの接合のため末端部分に 12 nt 長のオーバーハングを持つ。また sTDN Unit は 69 nt 長の 4 本のオリゴヌクレオチドから形成される三角錐型の構造体で、こちらも各頂点に 12 nt 長のオーバーハングを持つ。Linker Unit は 22 nt 長のオリゴヌクレオチドから形成され、両端は 12 nt 長のオーバーハングとなっている(図 1A)。これら Core Unit、sTDN Unit そして Linker Unit は Core Unit のオーバーハングが Linker Unit の一方のオーバーハングと、また Linker Unit のもう一方のオーバーハングが sTDN のオーバーハングのうちの 1 本と二重鎖を形成するように設計されている。これにより Core Unit (直径約 20 nm)に対して 3 当量の Linker Unit と sTDN を加えると、Core Unit を中心に Linker Unit を介してその周囲に 3 つの sTDN が配置し第 1 世代 D-NANs(直径約 50 nm) が構築できる(図 2B、第 1 世代 D-NANs)。また sTDN の残り 3 本のオーバーハングは第二世代の Linker Unit と二重鎖形成するように設計しており、第 1 世代 D-NANs に 9 当量の Linker Unit と sTDN を加えることで第 2 世代 D-NANs(直径約 60 nm)を構築することができる(図 2B、第 2 世代 D-NANs)。繰り返しこのステップを行うことで様々な粒径を持った D-NANs を作成できる。また Core Unit の腕の長さを変化させることにより、D-NANs の粒径をさらに細かく制御することも可能である

(1) 蛍光ラベルした TPx を用いた核酸ナノ構造体の細胞内移行評価

以前に作成した構造体 TPx を用いて核酸ナノ構造体が細胞内へ移行することを検証した。共焦点蛍光顕微鏡を用いた評価を行うため、蛍光ラベルしたオリゴを用いて TPx(TP-A)を作成した。(図3)一般に核酸ナノ構造体は



図3 蛍光ラベル化 TPx(TP-A)の構築スキーム

エンドサイトーシスによって細胞内へ移行すると考えられていることからリソソームと共染色することで TPx の細胞内局在とともに細胞内移行経路を評価した。

(2) 各種 D-NANs の構築及びポリアクリルアミドゲル電気泳動による構造体評価

設計した dendritic 型の核酸構造体の構築を検証した。一般的に dendritic は側鎖同士に立体障害が生じるため、効率よく構造体を構築するためにはコアと側鎖部分をつなぐリンカー部分の長さの適切な設計及び構築手順の検討が必要である。そのためまず D-NANs を構築する条件の最適化が必要である。通常核酸ナノ構造体の構築は全てのオリゴヌクレオチドを混合し、一気に構造体を組み上げるのが理想であるが、それが困難な場合はいくつかのステップに分けて構築する方法についての検討を行った。バッファの組成、アニーリング温度条件、さらに構造体を構築する順序について最適な条件を決定した後、より高世代の D-NANs の構築を試みた。設計では Core Unit の直径は約 20 nm、第一世代の D-NANs は約 50 nm、第二世代は約 60 nm であり、これらの構築した構造体の評価はポリアクリルアミド電気泳動より評価した。

4. 研究成果

(1) 蛍光ラベルした TPx を用いた核酸ナノ構造体の細胞内移行評価

核酸ナノ構造体 TPx の蛍光ラベル化は TPx を構成するオリゴ DNA のうち AMO21 と同一配列を持つ上辺と下辺に結合するオリゴ DNA の 5' 末端に FITC を導入したものを合成することによって行い、このオリゴ DNA を用いて TPx(TP-A) 構造体を作成した。

TP-A を HeLa 細胞の培地へ添加し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて細胞内での局在について検証を行った。その結果図 4-A に示すようにリソ

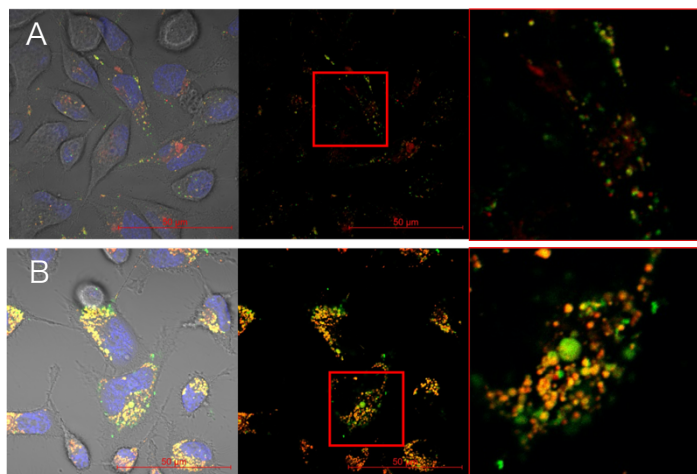


図4 A) TP-A の共焦点蛍光顕微鏡イメージ B) クロロキン(100mM)存在下 (緑: TP-A、赤: リソソーム)

ームとの共局在が観察されたことから、TP-A がエンドサイトーシスによって細胞内へ移行し、リソソームにトラップされていることが示された。ここで TP-A の細胞質への脱出を促進するため、リソソーム脱出を促進するクロロキン存在下観察を行ったところ、図 4-B に示すようにリソソームと共局在していない TP-A が観察された。すなわちクロロキンによって TP-A のリソソームからの脱出が促進されたことが示された。これらの結果より核酸ナノ構造体はクロロキンのようなリソソーム脱出促進剤の共存在下、細胞室内へ効果的に移行することが示された。

(2) 各種 D-NANs の構築及びポリアクリルアミドゲル電気泳動による構造体評価

まず D-NANs を構成するそれぞれのユニットについて設計通りに構築が可能であるかアガロースゲル電気泳動によって検証を行った。D-NANs のコアユニット、リンカーユニットはそれぞれ

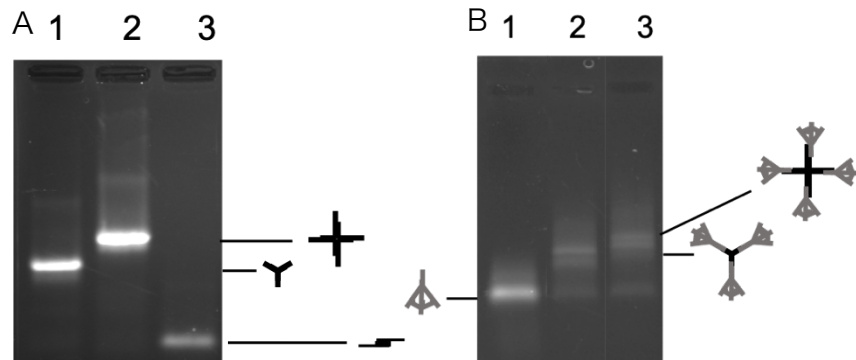


図5 A) D-NANs の各ユニット (1 : 三腕型 Core Unit、2 : 四腕型 Core Unit、3 : linker unit) B) 第一世代 D-NANs (1 : sTDN ユニット、2 : 三腕型 D-NANs、3 : 四腕型 D-NANs)

要なオリゴを最終濃度が 5 μ M となるように、Tris-HCl(pH 7.5, 20 mM) MgCl₂ (10 mM) のバッファー中、混合し、95°C から毎分-0.5°C で 4°C まで冷却することで作成した。

図 5-A に示すように収率よく構成されることがわかった。また図 5-B、lane1 に示すように sTDN ユニットも同様の条件で収率よく作成できた。これらの作成したユニットを core3 ユニットに対して第一世代 linker, sTDN ユニートを 3 当量、Core4 ユニートの場合はそれぞれ 4 当量、8 当量混合し、60 °C から毎分-0.5 °C で

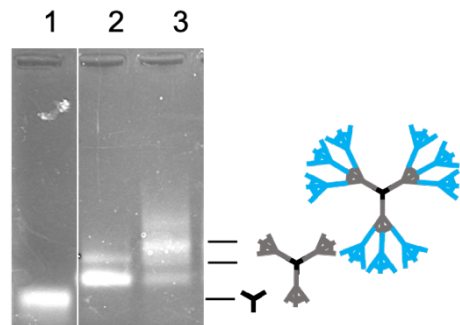


図6 第二世代 D-NANs 1 : 三腕型 Core Unit、2 : 三腕型第一世代 D-NANs、3 : 三腕型第二世代 D-NANs、)

5 °C まで冷却したところ図 5-B、lane2、3 に示すように、それぞれの第一世代 D-NANs が作成できた。第二世代 D-NANs も第一世代と同様に三腕型第一世代 D-NANs に対して第二世代 linker ユニート、第二世代 sTDN ユニートを 9 当量添加し、60 °C から毎分-0.5 °C で 5 °C まで冷却することによって図 6 に示すように第二世代三腕型 D-NANs が作成できた。

ゲル電気泳動により、第一世代、第二世代 D-NANs の構築が確認できたことから、実際にこれらの D-NANs が設計通りの大きさを持っているかどうか確かめることとした。原子間力顕微鏡を用いて直接 D-NANs の観察を試みたが、mica 表面との相互作用によって凝集が生じてしまい観察することができなかった。そのため DNA 折り紙構造体上に D-NANs を固定し、観察を試みた。(図 7)。

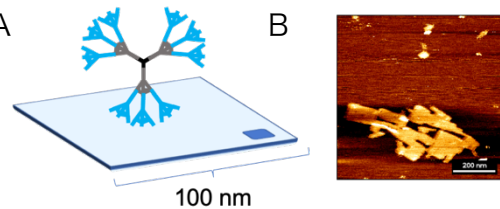


図7 A) DNA 折り紙構造体を用いた D-NANs 観察 concept、B) DNA 折り紙構造体 AFM 画像

現在この DNA 折り紙構造体を用いた D-NANs 構造体の評価と細胞を用いた移行評価を行っている。

本研究においては核酸ナノ構造体の細胞内移行メカニズムの解明を目的として様々な直径を調節可能な核酸ナノ構造体として新たに dendritic の手法を用いた D-NANs 設計し、その構築を行った。当初の設計通り第一世代、第二世代 D-NANs の構築に成功したものの、高次世代の D-NANs の構築は分子の高さの問題から、構築が困難であることが明らかとなった。またその作成した構造体の確認方法においても問題の残るものであったことから、現在それらの問題を解決すべく、検討を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本 清義
2. 発表標題 Development and Evaluation of Photoresponsive DNA Prism with Nucleic Acid Medicine
3. 学会等名 第45回国際核酸化学シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----