

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15294

研究課題名（和文）核酸ナノ構造体を基盤とした機能性抗体創出システムの開発とがん診断・治療への応用

研究課題名（英文）Innovative antibody engineering based on nucleic acid nanotechnology and its application to cancer diagnosis and therapy

研究代表者

毛利 浩太（Mohri, Kohta）

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：30723697

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん細胞指向性を有するDNAナノ構造体の開発を目的として、アプタマーを修飾した多足型DNAナノ構造体を構築し、立体構造化がアプタマーの機能に与える影響について検証した。アプタマー修飾DNAナノ構造体はがん細胞特異的に親和性を有しており、アプタマーの修飾数に依存して親和性が増大した。アプタマーの立体構造化が標的との親和性を向上する可能性が示され、多足型DNAナノ構造体を基盤としたがん細胞への抗がん剤送達システムの開発に有用な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、DNAナノテクノロジーにより構築可能なDNA構造体のがん治療への応用を目的としている。アプタマーを立体構造化したときの基礎的な情報を得られたことに加え、がん細胞との親和性を制御できる可能性が示された。DNA構造体は精密に設計・構築可能であるため、より効果的ながん治療法の開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：To develop cancer cell-targeting DNA nanostructures, we investigated the physiological characteristics of DNA aptamer-modified polypod-like structured nucleic acids (polypodna). The DNA aptamers modified on polypodna exhibited specific interactions with cancer cells that overexpressed target proteins, and the affinity increased with the number of aptamer modifications. These findings provide important information for the development of an anticancer agent delivery system targeting cancer cells through the construction of DNA nanostructures.

研究分野：DDS

キーワード：DNA nanotechnology

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸ナノテクノロジーは、核酸の二重鎖を形成する特性を巧みに利用することで、様々な形状のナノ構造体の設計・構築を可能にする。こうした DNA ナノ構造体は、アンチセンス ODN や siRNA、免疫刺激性 ODN などの機能性核酸を細胞内に送達するための有用なツールであることが報告されている。我々は、多足型構造を有する DNA 構造体 (polypod-like structured DNA) に CpG DNA を組み込むことで、その免疫刺激能を効率的に増強できることを見出してきた。さらに、多足型 DNA ナノ構造体を材料とする DNA デンドリマーや DNA ハイドロゲルの構築にも成功し、これらが強力な免疫刺激能を有することも明らかにしてきた。こうした知見は、核酸医薬の生理活性が核酸の一次構造や二次構造だけでなく、三次構造 (立体構造) にも影響される可能性を示すものである。

これまで我々は、多足型 DNA ナノ構造体が免疫細胞に効率的に取り込まれることから、免疫刺激性を有する CpG DNA などを中心に、多足型 DNA ナノ構造体の生体応用を進めてきた。そのため、標的分子に特異的に結合するアプタマーを多足型構造に構築したときに、その生理活性に及ぼす影響については全く解明されていないのが現状である。いくつかの DNA ナノ構造体はドキソルビシンなどの抗がん剤の有用なデリバリーツールであることが報告されている。そのため、がん細胞特異的に親和異性を有するアプタマーを多足型 DNA 構造体に組み込むことでその生理活性を増強することができれば、より効果的ながん治療法の開発に繋がることを期待できる。

2. 研究の目的

グアニンを豊富に含む ODN (guanine-rich ODN、GRO) は四重鎖構造を形成するために、がん細胞表面に過剰発現するヌクレオリンと特異的に結合する DNA アプタマーであることが知られており、AS1411 が最もよく研究されている (図 1)。本研究では、AS1411 と同様の配列を有する GRO29A をアプタマーとして選択し、これを多足型構造に構築することで、GRO29A のがん細胞特異的な親和異性およびがん細胞増殖抑制作用に与える影響について検証した。さらに、複数の多足型 GRO 構造体を設計・構築し、その生理活性を検証することで多足型構造の最適化も試みた。

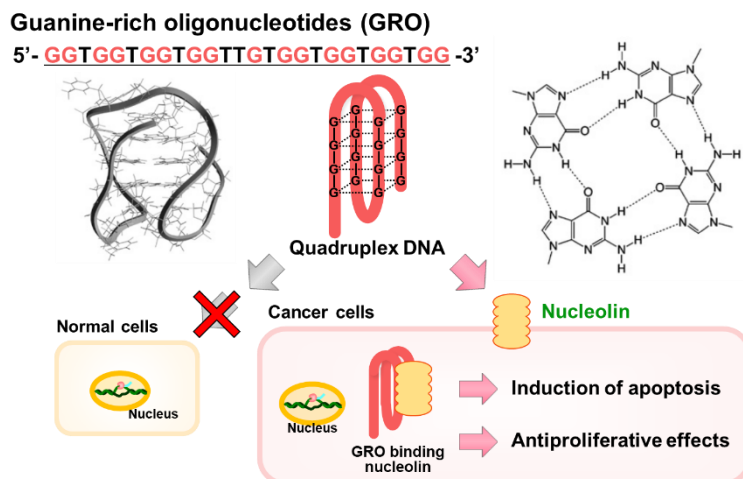


図 1. グアニンを豊富に含む ODN (GRO) の四重鎖構造とがん細胞表面に発現するヌクレオリンとの相互作用を含む生理活性を表わす。

3. 研究の方法

本研究では、3 本あるいは 6 本の足を有する DNA ナノ構造体 (tripodna あるいは hexapodna) の末端に GRO29A を結合した多足型 GRO 構造体を設計した (図 2)。対照として、GRO29A 単体に加えて、GRO29A を末端に結合した一本鎖や二本鎖 DNA も設計した。さらに、GRO29A のグアニンをシトシンに置換した CRO29A を末端に結合した多足型 CRO 構造体も設計した。これらの構造はポリアクリルアミド電気泳動法を用いて評価した。さらに、GRO29A の四重鎖構造は CD スペクトル法により解析した。血清中での安定性もポリアクリルアミド電気泳動法により評価した。多足型 GRO 構造体と細胞との相互作用は、フロサイトメトリー法および蛍光顕微鏡法を用いて評価した。多足型 GRO 構造体のがん細胞増殖抑制作用は、WST-1 アッセイにより評価した。

4. 研究成果

3 個の GRO29A を末端に結合した tripodna (Tri-G3)、1、3 個の GRO29A を末端に結合した hexapodna (Hexa-G1、Hexa-G3) は、ポリアクリルアミド電気泳動法において単一のバンドで確認されたことから、多足型 GRO ナノ構造体の構築に成功したと推察した。一方、6 個の GRO29A を末端に結合した hexapodna (Hexa-G6) のバンドはスメア状に確認された。一方、1、3、6 個の CRO29A を末端に結合した hexapodna (Hexa-C1、Hexa-C3、Hexa-C6) は単一のバンドで確認された。これらの結果から、四重鎖構造を有する GRO29A を多数修飾したことにより立体障害が生じ、Hexa-G6 は多足型構造を形成できなかつたと推察した。

GRO29A は四重鎖構造を形成するために、CD スペクトル法において特徴的な波形を示した。類似の波形は、Tri-G3、Hexa-G1、Hexa-G3、Hexa-G6 においても認められた。一方、多足型 CRO ナノ構造体は GRO29A に特徴的な波形を示さなかった。これらの結果から、多足型構造を形成したときにも、GRO29A は四重鎖構造を形成することを明らかにした。

血清中での GRO29A の安定性は、CRO29A に比べて高かった。Tri-G3、Hexa-G1、Hexa-G3、Hexa-G6 の安定性は、多足型 CRO ナノ構造体に比べて高かった。GRO は四重鎖構造を形成するために、一本鎖や二本鎖 DNA に比べて、酵素分解に対して安定であることが報告されている。GRO29A が CRO29A よりも血清中で安定であった結果は、これらの報告と合致する。さらに、GRO29A の修飾により多足型 DNA ナノ構造体の安定性が向上することも明らかとなった。

Alexa Fluor 488 標識した GRO29A、CRO29A、多足型 GRO 構造体、多足型 CRO 構造体を作製し、GRO29A の標的タンパク質であるヌクレオリンを過剰発現するヒト乳癌腫瘍由来細胞株 MCF-7 と、ヌクレオリンの発現が低いチャイニーズハムスター卵巣由来細胞株 CHO との相互作用について検証した。蛍光顕微鏡による観察において、Alexa Fluor 488 標識 GRO29A 及び Alexa Fluor 488 標識 Hexa-G3 が MCF-7 細胞と相互作用することを明らかにした。一方、Alexa Fluor 488 標識 CRO29A 及び Alexa Fluor 488 標識 Hexa-C3 の相互作用は観察されなかった。さらに、Alexa Fluor 488 標識 GRO29A 及び Alexa Fluor 488 標識 Hexa-G3 と CHO 細胞との相互作用も観察されなかった。これらの結果から、多足型 GRO 構造体は、修飾した GRO29A とがん細胞表面に発現するヌクレオリンとの結合を介して、がん細胞と特異的に相互作用することが示唆された。

Alexa Fluor 488 標識した GRO29A、CRO29A、多足型 GRO 構造体、多足型 CRO 構造体とインキュベートした後の MCF-7 細胞の平均蛍光強度を測定した (図 3)。その結果、Alexa Fluor 488 標識 GRO29A は、Alexa Fluor 488 標識 CRO29A 及び Alexa Fluor 488 標識 Hexa-C3 に比べて、効率的に MCF-7 細胞と相互作用した。一方、Alexa Fluor 488 標識 Hexa-G3 と MCF-7 細胞との相互作用は、Alexa Fluor 488 標識 GRO29A との相互作用と比較して、顕著に増大した。さらに、Alexa Fluor 488 標識した多足型 GRO 構造体と MCF-7 細胞との相互作用は、GRO29A の修飾数に依存して増大した。これらの結果から、GRO29A を多足型構造に構築することで、ヌクレオリンを過剰発現するがん細胞との親和異性が増大し、GRO29A の修飾数によりがん細胞との親和性を制御できることが示唆された。

多足型 GRO 構造体によるがん細胞増殖抑制作用について検証した。GRO29A 及び多足型 GRO 構造体は効率的に MCF-7 細胞の増殖を抑制した。中でも、Hexa-G3 による細胞増殖抑制作用が最も高かった。一方、CRO29A 及び多足型 CRO 構造体による MCF-7 細胞の増殖抑制作用は認められなかった。さらに、GRO29A 及び Hexa-G3 による CHO 細胞の増殖抑制作用も確認されなかった。これらの結果から、多足型 GRO 構造体がヌクレオリンを発現するがん細胞特異的に細胞増殖抑制作用を発揮することが示唆された。

本研究では、GRO アプタマーである GRO29A を多足型構造に構築することで、がん細胞との特異的な親和異性及び細胞増殖作用を増強できることを見出した。本研究で構築した多足型 GRO 構造は、構造中の GRO29A の修飾数を制御することが可能であり、これがヌクレオリンを発現するがん細胞との特異的な親和異性を増強する要因であると考えられた。さらに、この効率的な親和異性が GRO29A の細胞増殖抑制作用を向上させると考えられた。多足型 GRO 構造体は、DNA デンドリマーや DNA ハイドロゲルの材料として使用することも可能であり、がん細胞への特異的な抗がん剤送達システムとしての利用も期待できる。以上、本研究では、がん細胞指向性を有する多足型 DNA ナノ構造体の開発に成功した。

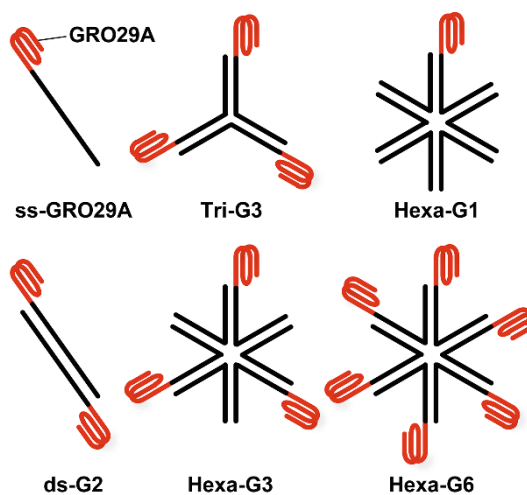


図 2. 多足型 GRO ナノ構造体の模式図。

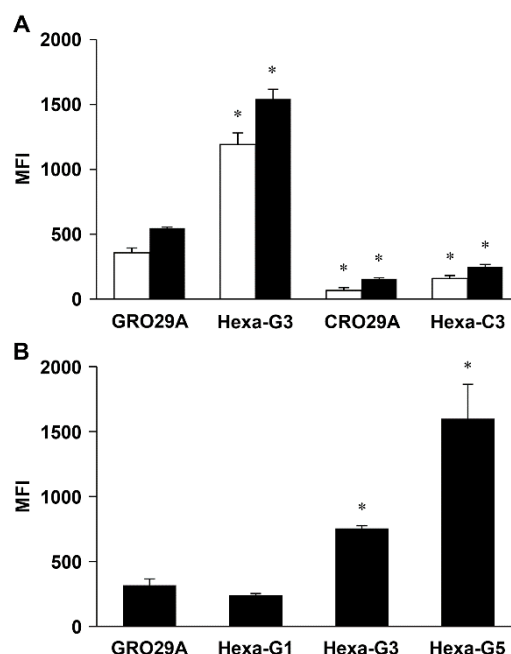


図 3. 多足型 GRO ナノ構造体とヌクレオリンを過剰発現した細胞との相互作用。蛍光標識を施した核酸 (白棒 : 0.5 μM, 黒棒 : 1.0 μM) をインキュベートした後の MCF 細胞の平均蛍光強度を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mohri Kohta, Hayashi Emi, Nishino Manato, Matsushita Nao, Tanishita Sohei, Nishikawa Makiya, Sakuma Shinji	4. 巻 29
2. 論文標題 Polypod-like structured guanine-rich oligonucleotide aptamer as a selective and cytotoxic nanostructured DNA to cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Drug Targeting	6. 最初と最後の頁 217 ~ 224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1061186X.2020.1830407	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------