

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15408

研究課題名（和文）DNAナノテクノロジーを利用したがん選択的化学療法の実現

研究課題名（英文）Cancer-selective chemotherapy using DNA nanotechnology

研究代表者

森廣 邦彦（Morihiro, Kunihiko）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・助教

研究者番号：70713890

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）：本研究ではがん選択的な化学療法を開発するべく、DNAナノテクノロジーの1種であるハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）と、代表的な生体直交型反応であるStaudinger還元を組み合わせたシステムを構築した。このシステムは特定のmiRNAのインプットによって蛍光分子などの様々な低分子化合物を放出することが可能であり、がん選択的な化学療法に非常に有用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では従来のがん化学療法の最大の欠点の1つである副作用に着目し、それを最大限抑制することが可能な分子システムの開発を行った。研究の結果、がん細胞の目印の1つであるマイクロRNA（miRNA）に反応して選択的に低分子化合物を放出して活性化するDNAシステムの構築に成功した。本成果は健康な細胞への毒性を大きく減弱させた、安心安全ながん化学療法に発展していくと期待される。

研究成果の概要（英文）：We constructed a system combining hybridization chain reaction (HCR), a kind of DNA nanotechnology, and the Staudinger reduction, a typical bioorthogonal reaction, in order to develop cancer-selective chemotherapy. The system is capable of releasing a variety of small compounds such as fluorescent molecules upon input of specific miRNAs, and has been shown to be very useful for cancer-selective chemotherapy.

研究分野：核酸化学

キーワード：DNAナノテクノロジー 核酸化学 生体直交型反応 Staudinger還元 マイクロRNA 抗がん剤 化学療法 HCR

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

低分子薬剤による従来型のがん化学療法は副作用の問題を避けることができず、患者への身体的/精神的負担が治療継続や QOL 向上の大きな妨げとなっている。この問題を解決するべく、特定の刺激が加わるまで薬剤を不活性化しておく「プロドラッグ化」の手法が古くから研究されてきた。薬剤の活性をオンにするトリガーとしては様々な刺激が考えられるが、光はその時空間分解能の高さから広く用いられている。しかし、光を利用する手法は培養細胞系では非常に有用であるものの、迅速さが求められる医療現場において病変部位にのみ正確に光刺激を加えることは困難であり、さらに光自身の毒性や組織透過性などの因子を考慮しなければならない。もし、光などの外部刺激に頼らず、細胞内の分子環境の差異によって薬剤の活性に差を生み出すことができれば、安心・安全ながん化学療法への発展が期待できる。

本研究では、がん選択的な化学療法の開発を目指し、がん細胞内で特異的に発現しているマイクロ RNA (miRNA) に応答して低分子薬剤を放出する DNA ナノデバイスの開発を行う。細胞内に存在する miRNA は極微量であるため、その高感度センシングに DNA ナノテクノロジーの 1 種であるハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR) を応用する。HCR と生体直交型の化学反応である Staudinger 還元とを組み合わせることで、雑多な細胞内環境下においても選択的な薬剤の活性化を可能にする。本技術は、副作用の小さい安全・安心ながん化学療法や miRNA 発現パターンに応じたテーラーメイド医療への発展が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞内の微量 miRNA に応答して抗がん分子を活性化する安心・安全な化学療法の開発に挑戦する。その鍵技術として DNA ナノテクノロジーの 1 種である HCR を駆使し、選択的な miRNA 応答とともに効率的な薬効の増幅を可能にする。具体的には、標的 miRNA がヘアピン DNA1 (HP1) 末端の一本鎖部分を足がかりとして鎖置換反応を起こすことから HCR が始まる (図 1; step 1)。

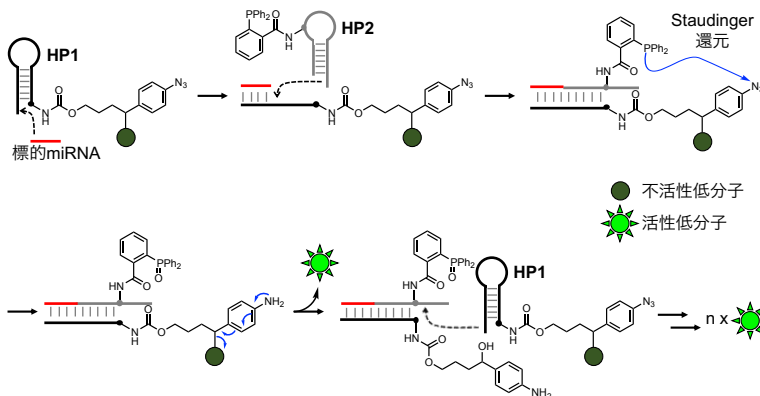


図 1. HCR による miRNA 応答型低分子化合物多重放出

これにより HP1 のヘアピン構造は不安定化し、続いて生じた一本鎖部分を足がかりに HP2 との鎖置換反応が起こる (step 2)。HP1 のアジド基と HP2 のホスフィンとは二重鎖形成により接近し、濃縮効果により Staudinger 還元が選択的に進行してアミンとホスフィンオキシドを与える (step 3)。最後にアミンの電子供与性によりリンカーが自発的に分解し、カルバマート基によって不活性化されていた分子が放出される (step 4)。step 2 から step 4 を繰り返すことで、1 分子の miRNA に対して低分子化合物の多重放出と活性化が可能となる (step 5)。

3. 研究の方法

(1) 標的 miRNA として多くのがん細胞で発現している miR-21 を選択し¹、HP1 と HP2 の配列を設計する。DNA 自動合成機により化学合成したプローブのリン酸緩衝溶液に 0.01~1 当量の miR-21 を加え、37 °C 下で一定時間静置後にゲル電気泳動によって HCR の進行効率を評価する。また、選択性を担保するべく他の miRNA (miR122 など) をインプットとして加え、HCR への影響を調べる。バックグラウンド反応が大きい場合は配列を種々変更し、各プローブの最適化を行う。

(2) アジド/ホスフィン修飾 DNA プローブを化学合成する。Staudinger 還元によって放出される低分子化合物としては、簡便な評価が可能な蛍光分子 7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) 及び実際の化学療法に使用されている抗がん分子ゲムシタビン (GEM) を用いる。これらの化合物は分子内のアミノ基をカルバマートに変換することで不活性化されることが知られており^{2,3}、放出による機能のターンオンが可能である。HP2 に修飾するホスフィンとしては Staudinger 還元において優れた速度論を示すことが報告されている 2DPBM を採用する⁴。HP1 及び HP2 の修飾は、適切な位置にアミノ基を持つ DNA と各種 NHS-エステルとのコンジュゲート化によって行う。また、天然の DNA は細胞内ヌクレアーゼにより分解されてしまう恐れがあるため、各ヘアピン末端に化学修飾を施すことで酵素耐性能の向上を計る⁵。

(3) miRNA に応答した低分子化合物の多重放出を、まずは非細胞系で検討する。蛍光分子 AMC を搭載した HP1 と 2DPBM-HP2 のリン酸緩衝溶液に、0.01~1 当量の miR-21 を加え、蛍光プレートリーダーによって反応時間に伴う AMC の蛍光強度の増加を測定する。HP1 と同濃度の AMC 溶液をポジティブコントロールとして用い、各濃度の miR-21 に対する AMC の放出効率を評価することで本システムの感度を評価する。また、他の miRNA (miR-122 など) に対する反応性も精査し、miR-21 に選択的に応答して AMC が放出されていることを確認する。

(4) 最後に、ヒト生細胞内での miRNA 応答型 GEM 多重放出と選択的がん治療効果を評価する。miR-21 発現レベルの上昇が知られている HeLa 細胞⁶ にトランスフェクション試薬を用いて GEM 搭載型 HP1 と 2DPBM-HP2 を導入し、一定時間培養後に細胞増殖抑制試験により抗がん効果を評価する。同濃度の GEM をポジティブコントロールとして比較する。さらに miR-21 がほとんど発現していないことが分かっている HEK293 細胞⁷ でも同様の実験を行い、miR-21 に応答した GEM 放出を確認することで高選択的ながん化学療法の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) HCR プローブの配列設計と合成

オンラインソフトウェア NUPACK を用いて HCR プローブの配列を設計した。具体的には miR-21 が存在しない状況では安定なヘアピン構造を形成し、miR-21 存在下では HCR が進行する配列を求めた。その結果、3 種類のプローブセットを見出した (図 2)。これらの DNA は DNA 自動合成機によって合成した後に液体高速クロマトグラフィー (HPLC) による精製を実施し、MALDI-TOF MS によって同定した。

HP1(8): TCAACATCAGTCTGATAAGCTATCCAAAGATAGCTTATCAGACT
HP2(8): TAGCTTATCAGACTGATGTTGAAGTCTGATAAGCTATCTTTGGA
HP1(9): TCAACATCAGTCTGATAAGCTATCCAAAGAATAGCTTATCAGAC
HP2(9): TAGCTTATCAGACTGATGTTGAGTCTGATAAGCTATTCTTTGGA
HP1(10): TCAACATCAGTCTGATAAGCTATCCAAAGAATTAGCTTATCAGA
HP2(10): TAGCTTATCAGACTGATGTTGATCTGATAAGCTAATTCTTTGGA

図 2. 設計・合成した HCR プローブセットの配列

(2) HCR プローブの最適化

合成した各 HCR プローブの緩衝溶液に miR-21 を加え、一定時間反応後にポリアクリルアミドゲル電気泳動もしくはアガロースゲル電気泳動によって反応効率を評価した。その結果、miR-21 を加えていない場合は HCR が進行せず (バックグラウンド反応が少なく)、miR-21 を加えた場合に高効率で HCR が進行するプローブセットを見出すことができた。

(3) 化学修飾型 HCR プローブの合成

最適化した HCR プローブにアジド基およびホスフィンをコンジュゲート化した。アジド基修飾プローブには放出する低分子化合物として蛍光分子 7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC)、もしくは色素分子 Resorufin を搭載した。アミノ化した HCR プローブと各種 NHS-エステルを弱塩基性条件下で反応させることでコンジュゲート化を行った。化学修飾型 HCR プローブは HPLC で精製後、MALDI-TOF MS で同定した。

(4) miR-21 による低分子化合物の放出と活性化

HCR プローブに搭載した AMC および Resorufin が miR-21 によって放出、活性化されるか検討した。AMC の放出は蛍光プレートリーダーによって (図 3A)、Resorufin の放出は目視による溶液の色調変化によって評価した (図 3B)。どちらの場合も添加する miR-21 の量に従って蛍光強度の増大および溶液の色調変化が観察され、設計通り HCR に伴う Staudinger 還元の結果、搭載していた低分子化合物が放出、活性化されることが明らかとなった。一方で低分子化合物の放出効率および速度が不十分であることも分かった。

(5) プローブ修飾位置の最適化

miR-21 インพุットに対する低分子化合物放出の効率および速度を改善するために、HCR プローブ中の化学修飾を導入する位置について再検討を行った。その結果、プロトタイプよりも反応効率に優れた HCR プローブセットの取得に成功している。

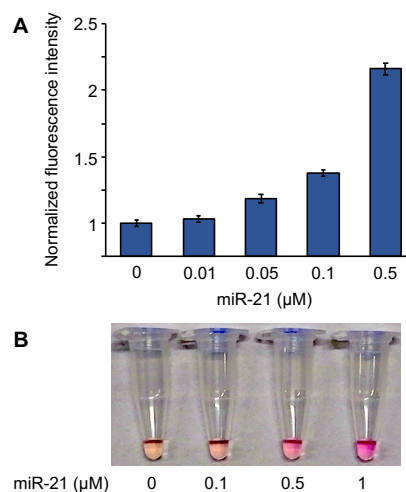


図 3. miR-21 による(A) AMC および (B) Resorufin の放出と活性化

(6) 抗がん分子を搭載した HCR プローブの合成

HCR プローブに搭載する抗がん低分子化合物は、当初予定していた Gemcitabine に加えて Camptothecin の誘導体である SN-38 も検討することとした。SN-38 については光延反応によってアジドリンカーに導入することに成功し、NHS-エステルの合成を完了した。今後は上記最適化した HCR プローブにコンジュゲートすることで、miR-21 に応答した抗がんシステムを構築する。

<参考文献>

- ① Chan *et al.*, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6029.
- ② Lo *et al.*, *Chem. Commun.* **2003**, *21*, 2728.
- ③ Weiss *et al.*, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5395.
- ④ Saneyoshi *et al.*, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 30.
- ⑤ Schmidt *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 287.
- ⑥ Feng and Tsao, *Biochem. Rep.* **2016**, *5*, 395.
- ⑦ Tian *et al.*, *PLoS One* **2012**, *7*, e29551.

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 Morihiro Kunihiko, Ishinabe Takuro, Takatsu Masako, Osumi Hiraki, Osawa Tsuyoshi, Okamoto Akimitsu	4. 巻 143
2. 論文標題 Floxuridine Oligomers Activated under Hypoxic Environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 3340 ~ 3347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.0c10732	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kunihiko Morihiro, Daisuke Fukui, Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 A Hybridization Chain Reaction (HCR)-Based MicroRNA Detection System
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井大介, 森廣邦彦, 岡本晃充
2. 発表標題 マイクロRNA応答型低分子多重放出システム
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森廣 邦彦, 石鍋 拓郎, 高津 正子, 岡本 晃充
2. 発表標題 低酸素環境下で活性化するFloxuridineオリゴマーの開発
3. 学会等名 第14回 バイオ関連化学シンポジウム 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森廣 邦彦, 劉 杉, 竹内 英美香, 岡本 晃充
2. 発表標題 金属イオン曝露による DNAトランスポゾンのメチル化蛍光解析
3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kunihiko Morihiko, Takuro Ishinabe, Masako Takatsu, Tsuyoshi Osawa, Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Hypoxia-Activated Floxuridine Oligomers via Bioreduction of Nitro and/or Azo Functionalities
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会(2021)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------