

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07012

研究課題名(和文)フットボール型核酸医薬輸送ナノ構造体(FiNADs)の構築

研究課題名(英文)Development of Football integrated Nucleic Acid Medicine Delivery system: FiNADs

研究代表者

山本 清義 (YAMAMOTO, Seigi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・特任助教

研究者番号：80783521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬の効率的な細胞内送達の方法を確立することは核酸医薬の実用化のために不可欠である。本研究では核酸医薬を搭載し、刺激に応答して核酸医薬を放出することが可能な新たな核酸ナノ構造体であるフットボール型核酸医薬輸送ナノ構造体(FiNADs)を設計し、その構築および機能評価を行なった。その結果、目標とするフットボール型構造体の完全な構築には至らなかったものの、その部分構造である五角形構造体の構築に成功した。またより簡便な構造体である光刺激応答型三角柱型構造体が高いヌクレアーゼ分解耐性と刺激に応じた核酸医薬放出が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The development of the efficient delivery system is essential for the practical use of nucleic acid medicine. In this study, we designed a novel stimuli-responsive nucleic acid nanostructure named Football integrated Nucleic Acid Medicine Delivery system (FiNADs) that can load nucleic acid medicine and release it by external stimuli. Consequently, we could successfully construct pentagonal structures that are the partial structure of the football structure, but could not obtain the complete structure. Also, we found that the stability of nucleic acid medicine against nuclease digestion could improve over 20 times and the release of nucleic acid medicine from nucleic acid nanostructure could be controlled by photo-responsive triangular prism-shaped nucleic acid nanostructure.

研究分野：核酸ナノテクノロジー

キーワード：核酸ナノテクノロジー 核酸化学 核酸医薬 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬は高い標的特異性や低い製造コストといったアドバンテージから、抗体医薬に次ぐ次世代医薬品として高い期待が寄せられ、様々な疾病を標的とした核酸医薬の開発研究が国内外で精力的に行われている。しかし医薬品として認可された核酸医薬はわずか3例しかない。この理由の一つとして、核酸医薬を構成するオリゴヌクレオチドが血中や細胞質中において不安定であるということがあげられる。たとえば核酸医薬の一つであるsiRNAは天然型のRNAのみから構成されている場合、ヌクレアーゼによって速やかに分解され、活性を失ってしまう。従って不安定な核酸医薬をヌクレアーゼによる分解から保護し、かつ目的の部位でのみ効率よく機能させる核酸医薬輸送技術を確認することは次世代医薬として期待される核酸医薬の実用化のために求められている。ところで核酸分子は遺伝情報を保存、伝達するだけでなく、近年の核酸化学の発達によりナノ構造体を構築する材料として利用できる事が報告されている。核酸ナノ構造体とは一般的には長い一本鎖DNAを適切に配列が設計された多数の短い一本鎖DNAと二重鎖形成させる事で100nm程度の大きさの任意の形状に形成される構造体である。また核酸ナノ構造体は核酸二重鎖が密に集合しているために分解されにくいという特徴を示す。さらに核酸分子は化学的に修飾が容易であることから核酸ナノ構造体にタンパク質結合配列や刺激に応答して構造変化するという部位を導入し、核酸ナノ構造体の機能化が試みられている。その一つに核酸ナノ構造体を薬剤のキャリアとして用いる試みがある。

2. 研究の目的

核酸医薬分子の効率的な細胞内送達と活性発現の時空間制御を目的とした核酸分子の自己組織化によって構築されるフットボール型核酸医薬輸送ナノ構造体である(Football integrated Nucleic Acid Medicine Delivery system; FiNADs)を考案した。DNAナノ構造体を用いたDDS研究の多くがDNAオリガミ法によって構築した核酸ナノ構造体へ薬剤(siRNAやDoxorubicin)を吸着あるいは結合させる方法であり、核酸ナノ構造体の構築に用いる核酸(一本鎖DNA(7249 nt)及び配列の異なる200以上の短鎖DNA(32 nt))は活性発現に寄与しないだけでなく、むしろオフターゲット効果や自然免疫応答の誘発などの副作用の原因となる可能性が極めて高い。それに対して本研究で開発するFiNADsはわずか12種類のオリゴヌクレオチドから構成されている上、そのうちの一つは核酸医薬分子(本研究ではアンチmiRNAオリゴヌクレオチド; AMO)そのものであることから副作用の低減が期待できる。また用いるオリゴヌクレオチドに外部刺激(本研究では光)をトリガーとして分解する工夫を凝らすことで、任意の場所とタイミングで核酸医薬分子を効率良く放出できる極めて

斬新なシステムを構築でき、核酸医薬の実用化に貢献する

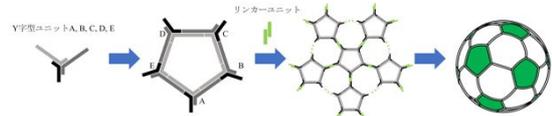


Figure 1. フットボール型ナノ構造体のデザイン

3. 研究の方法

(1) FiNADsの構築検討

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)での移動度の変化より、FiNADsのような複雑な構造体が実際に構築可能かどうかの検証を行った。具体的にはFiNADsは60個のY字型ユニット(五種類のユニットA,B,C,D,Eが1セットとなり五角形の部分を形成)とそれらを繋ぐ30個のリンカーユニットによって構築される複雑な構造体であり、構造体を構成するそれぞれのユニットが実際に構築可能かどうか、また設計通りにユニット同士が結合可能かを検証した。

(2) 簡便な構造を持つDNAナノ構造体を用いた核酸医薬送達

より簡便に構築可能な構造体を用いてFiNADsを構築する目的であるDNAナノ構造体を用いた核酸医薬の保護および、外部刺激による核酸医薬の発現制御の検討を行う。具体的には光刺激に応じてDNA鎖を切断することの可能なトリガーを導入した三角柱型構造体を構築し、これを用いて核酸医薬のヌクレアーゼ分解耐性の評価およびデュアルルシフェラーゼアッセイを用いた細胞内への核酸医薬送達の評価および紫外線照射による影響の検討を行った。

4. 研究成果

(1) フットボール型構造体の構築

まずフットボール型の構造体が実際に構築可能であるのか検証するため、まず全ての構造体配列をDNAで用意し、それらを用いて構造体の構築を行った。構造体が形成されているかどうかの確認のため Y字型ユニット、五角形構造体、フットボール型構造体の3つの段階に分けて構築を行った。

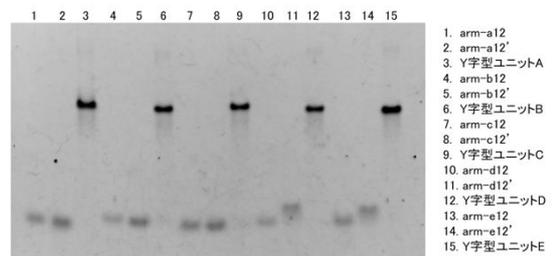


Figure 2. 相補鎖部位 12塩基対のオリゴヌクレオチドを用いたY字型ユニットの構築 その結果、全てのユニットにおいてアームオリゴヌクレオチドとAMOオリゴヌクレオチドを混合した時のみはっきりとしたバンド

がアームオリゴヌクレオチドのバンドより上方に現れたことが確認できる。すなわち設計したオリゴヌクレオチドを用いることで目的のY字型ユニットを形成することができた。5種類のY字型ユニットの構築を確認することができたので、続いてこれらのY字型ユニットを用いて五角形構造体の構築と確認を行った。

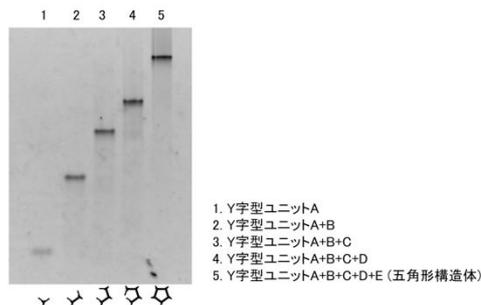


Figure 3. 五角形型構造体の構築

混合するユニットを増やすにつれ、バンドの移動度が減少し、また5種類のユニットを混合した場合でも、バンドがスミアにならずシャープなバンドとして観察されたことから、各Y字型ユニットが設計通り結合し、5種類のユニットを混ぜた場合も、鎖状ではなく環状に結合し目的の五角形構造体の構築ができたと考えられる。五角形の構築が確認できたため、次にフットボール型構造体の構築と確認を行った。フットボール型構造体の構築は先程の五角形構造体に必要なオリゴヌクレオチド(計11本)とリンカーオリゴヌクレオチド Linker-12を混合し、アニーリングする方法によって検討を行った。

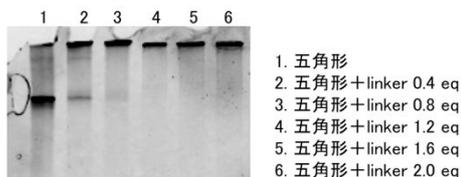


Figure 4. フットボール型構造体の構築

レーン2~6より、リンカーオリゴヌクレオチドの当量に関わらずウェルの部分で詰まってしまうバンドとして観察することができなかった。アニーリング条件の種々検討を行なったが、構造を構築することは出来なかった。Y字型ユニットが想定どおりにフットボール形状へと自己集合出来なかった理由として、Y字型ユニットはそれぞれの腕部分が二本鎖DNAからなっているためではないかと考えた。二本鎖DNAは水溶液中では自由に曲がるのが可能である。そのためY字型ユニットがそれぞれ異なる相補鎖によって結合する五角形構造体の構築には成功したが、それをリンカーで繋げる際にリンカー部分で回転したり、曲がったりしたため、想定どおりにフットボール状にまとまらず網目状の構造体となったものと考えられた。その問題を解決するため、新たな構造体としてY字型ユニットを三角錐型のユニットとした構造体を考案した。Y字型ユニットを三角錐

型の構造とすることであらかじめそれぞれの腕部分が向く方向を制御できる為、五角形型構造体となった後、よりフットボール型の構造を取りやすいと考えられた。

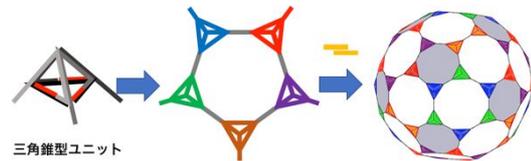


Figure 5. 三角錐型ユニットからなる構造体デザイン

まず同様にそれぞれの三角錐型ユニットが構築可能であるかどうかの検討を行った。次に三角錐型ユニットAの結果を示す。

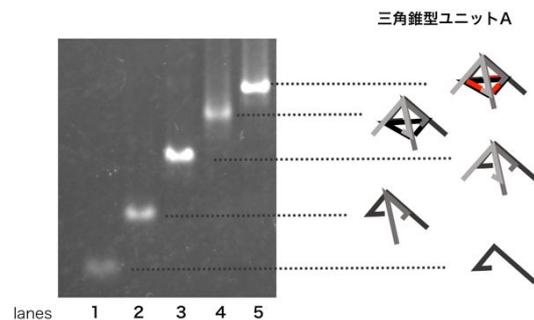


Figure 6. 三角錐型ユニットAの構築

ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果より構造体を構成するオリゴヌクレオチドを加えることによってバンドの移動度が減少したことがわかる。このことから三角錐型ユニットが構築可能であることが示された。また他のユニットも構築可能であるか検討した。その結果を下に示す。

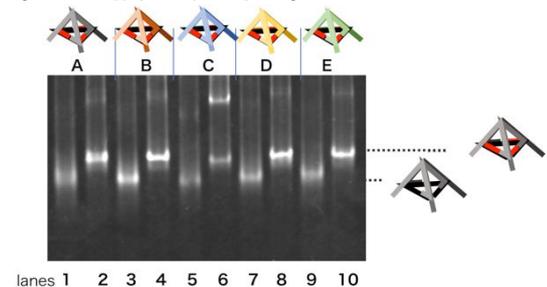


Figure 7. 三角錐型ユニットの構築

Figure 7よりすべての三角錐型構造体A~Eのバンドが同じ位置に観察できたことから設計通りの構造体が構築可能であることが示された。そこでこの三角錐型の構造体を用いて五角形型構造体の構築の検討を行った。その結果を下に示す。

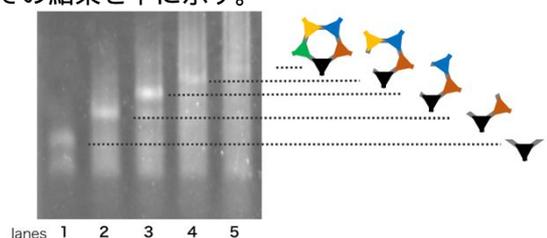


Figure 8. 五角形型構造体の構築

Figure 8に示されるように混合する三角錐型ユニットの数を増やすにつれ、バンドの移

動度の現象が観察された。しかし4以上のユニットを混合した場合、はっきりとしたバンドが観察できなかった。この結果より、三角錐型ユニットからなるフットボール型構造体構築は現在の設計では困難であることが明らかとなった。現在、よりフットボール形状を構築しやすい構造について設計を行っている。

(2) 光刺激応答性三角柱型核酸ナノ構造体を用いた核酸医薬送達

刺激応答トリガーを導入したより簡便な構造を持つ三角柱型核酸ナノ構造体を用いて刺激応答型核酸ナノ構造体による核酸医薬の放出制御が可能かどうかの検討を行なった。この三角柱型構造体は100merのオリゴ3本から構築される構造体であり、三角柱の上辺と下辺に6本の核酸医薬分子を搭載可能である。また刺激応答性を付与するため、三角柱型構造の角部分に相当する部分へ光刺激応答トリガーを導入した。

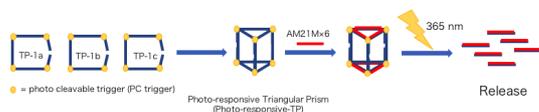


Figure 9. 光刺激応答型三角柱型核酸ナノ構造体のコンセプト

まず始めに光刺激応答トリガーを導入していないオリゴを用い、核酸ナノ構造体によるAMOの保護が行えるのかどうかを検討するため、裸のAM021とAM021を三角柱型構造体に組込んだものをヘビ毒ホスホジエステラーゼとともに37°Cでインキュベートし、時間毎のAMOの分解の様子をポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した。

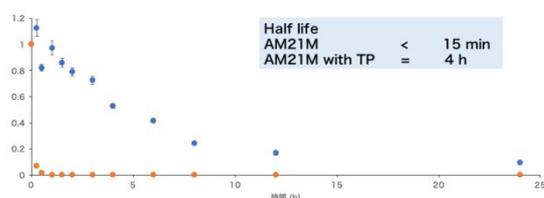
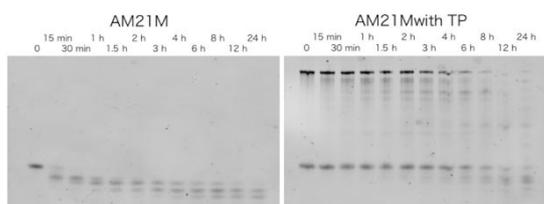
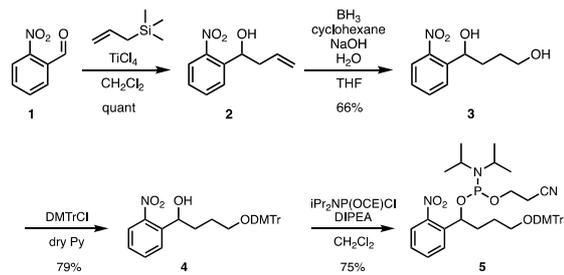


Figure 10. 三角柱型核酸ナノ構造体 (TP) による核酸医薬分子 (AM021) の保護

ゲル電気泳動の結果より、裸のAM021は15分以内にほぼ完全に分解してしまったのに対して、三角柱型ナノ構造体を用いることで、AM021は12時間以上も分解されていないことがわかる。すなわち、核酸ナノ構造体を用いることで煩雑なAMOの化学修飾を施さなくても、そのヌクレアーゼ分解に対する耐性を20倍以上に高められることが明らかとなった。

次にこの三角柱型核酸ナノ構造体へ光刺激応答性を付与するため光刺激に反応してDNA鎖を切断可能なトリガーの合成を次のスキームに従って行い、DNA合成機を用いて合成したトリガーを次の三角柱型核酸ナノ構造体を構成するオリゴヌクレオチドのXで示した部分へ導入した。



Scheme 1. 光刺激応答型トリガーの合成

SFx-a,

5' - tgcgtgagtatXtttagcttatcagactgatgtgatXttgcaagtgtgggcacgcacactXtttagcttatcagactgatgttgatXttcacaatctg-3'

SFx-b,

5' - cactggtcagtXtttagcttatcagactgatgtgatXtttactcagcgacagatttgtgtXtttagcttatcagactgatgttgatXttggtttgctga-3'

SFx-c,

5' - ccacacttgctXtttagcttatcagactgatgtgatXttctgaccagtgtcagcaaacctXtttagcttatcagactgatgttgatXttgtgtgctg-3'

合成した光刺激応答オリゴヌクレオチドを用いて、光刺激応答三角柱型核酸ナノ構造体を構築した。最後に365 nmの紫外線照射による構築した光刺激応答三角柱型核酸ナノ構造体からのAM021の放出が実際に可能かどうかを検討した。

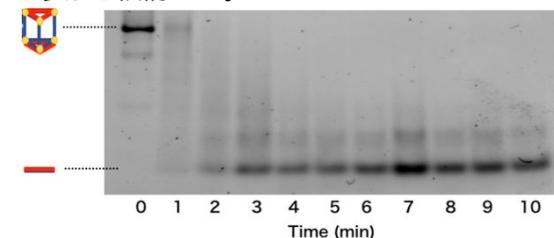


Figure 11. 紫外線照射による核酸医薬放出

Figure 11より紫外線照射による速やかな三角柱型構造体の崩壊とAM021の放出がみとれ、このことよりこの光刺激応答型トリガーは意図した通りに機能していることがわかった。現在、この光刺激応答三角柱型核酸ナノ構造体を用いて細胞内へのAM021の輸送および、光によるAM021の機能制御が可能かどうか検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

山本 清義, Development of nucleic acid medicine delivery system using photo responsive nucleic acid nanostructure、

日本化学会第98春季年会、2018年
山本 清義、Development of
Photoresponsive DNA Nanostructure
Integrated Nucleic Acid Medicine、第44
回国際核酸化学シンポジウム、口頭発表、
2017年
山本 清義、核酸医薬分子を組み込んだ
DNA ナノ構造体の構築とその性質、日本核酸
医薬学会第三回年会、ポスター発表、2017年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 清義 (YAMAMOTO, Seigi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究科 (薬学
系)・特任助教
研究者番号：80783521