

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16871

研究課題名（和文）核酸会合体によるセラノスティクスへの応用

研究課題名（英文）Application of nucleic acid aggregates to theranostics

研究代表者

栗原 亮介（Kurihara, Ryohsuke）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：20713233

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、疎水性（油に溶けやすい）である蛍光色素と、親水性（水に溶けやすい）である核酸を結合させた両親媒性（水と油の両方に溶ける）核酸で形成させた核酸会合体を用いて、腫瘍部のイメージングと治療を同時におこなう新規材料の作製を試みた。一般的に疎水性蛍光色素は血液に溶けづらくまた化学修飾されていない核酸もそのままでは血中での安定性が乏しく細胞内へ導入させることが難しい。しかし、両親媒性核酸として会合体を形成させることで、これらの問題点を改善することができると期待される。その結果、両親媒性核酸が会合体を形成し細胞内へ入り、核酸が細胞内で機能することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セラノスティクスは、診断と治療を同時に行うことで、病気の早期発見と即時治療を可能にし、患者の負担を軽減しながら治療効果を向上させる。本研究では、蛍光色素でイメージングし、核酸医薬で治療を行うセラノスティクス材料の開発を試みた。保護されていない核酸医薬は血中で不安定であり、また細胞内への導入が難しい。しかし、蛍光色素と核酸からなる両親媒性核酸で会合体を形成させることでこの問題点を改善し、セラノスティクス材料としての可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop novel materials that simultaneously enable tumor imaging and treatment by using amphiphilic nucleic acid aggregates formed from hydrophobic fluorescent dyes and hydrophilic nucleic acids. Typically, hydrophobic fluorescent dyes do not dissolve well in blood, and unmodified nucleic acids lack stability in the bloodstream, making cellular delivery challenging. However, we expected to overcome these issues by forming aggregates of amphiphilic nucleic acids. Our results confirmed that the amphiphilic nucleic acids successfully formed aggregates, entered cells, and the nucleic acids functioned effectively within the cells.

研究分野：ナノ材料科学 / 生体医工学 / 生体材料学

キーワード：核酸会合体

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで癌治療方法は、主に三大療法（外科療法・放射線療法・化学療法）が用いられてきた。しかし外科的切除による臓器等の喪失、放射線や抗がん剤による副作用など患者の負担が問題となっている。そこでこれらの負担を軽減すべく様々な治療方法が試みられている。近年、がんの新規治療法として光線力学療法や光熱療法が注目されている。光線力学療法とは光照射により光感受性物質から活性酸素種を発生させがん細胞に傷害を与える方法であり、光熱療法とは光照射により光感受性物質から熱を発生させがん細胞に傷害を与える方法である。これらの方法は低侵襲な療法であり、正常細胞への障害は小さく、臓器の温存や副作用の低減が期待される。光線力学療法で使用されているフォトリンやレザフィリンは、照射光の波長が 410 - 630nm であるため生体透過性が低く体の表面部位や体内の管腔表面部位に利用が限定される。また、腫瘍部位への選択性が低いこと、化合物に由来する光過敏症などが問題となっている。一方、造影剤や肝機能検査薬などとして既に医薬品として使用されているインドシアニングリーン (ICG) は、生体透過性が良い 800 nm 付近の光照射によって活性酸素種（一重項酸素）と熱を発生させることができる。つまり、体表面よりも深部にある腫瘍部位に光照射することができ、また光線力学療法と光熱療法を同時に行うことが可能となる。しかし、ICG は腫瘍部位への選択性や体内での安定性が乏しいため、現在これらの課題を克服すべく様々な研究が行われている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光線力学療法・光熱療法を効率的に行うと同時にイメージングを行うことができる新規材料の開発である。具体的には、ICG 等の問題点である体内での安定性および腫瘍選択性を改善し、さらに、がん細胞の耐熱性を低下させる核酸医薬 (siRNA) 等を ICG 等に組み込むことで光線力学療法・光熱療法を効率的に行う。またこの方法は、用途に応じて核酸配列を自由に変更でき、水に溶かすだけで会合体を形成するためとても容易に利用できる。我々のグループはこれまで疎水性の化合物(薬剤)に親水性である DNA 鎖を修飾することで両親媒性 DNA を合成し、DNA 会合体を形成させることで効率よく細胞内へ薬剤等を送達し、その有用性を示してきた。通常、DNA 等の核酸は体内において核酸分解酵素による急速な生分解性を受けるため不安定である。また核酸単体では細胞内への取り込みは低い。しかし、これまでの研究より、会合体を形成させることで細胞内へ取り込まれ易くなることを示してきた。しかしこれまでは、この核酸部位は細胞への取り込み促進および体内での安定化のために使用されてきた。そこでこの核酸部位に核酸医薬としての機能を付与することで、疎水性薬剤だけでなく核酸医薬も同時に送達することが可能になると考えられる。核酸医薬とは低分子医薬が持つ容易な製造性と抗体医薬が持つ選択性を併せ持った薬剤であり、これまで治療不可能と考えられてきた病気に対する新たな治療薬として期待されている。本研究の目的の 1 つである光熱療法を効率的に行うための有用な核酸医薬の一つに、がん細胞の耐熱性に関与する遺伝子発現を阻害することで、細胞の耐熱性を低下させる siRNA がある。しかし siRNA も ICG 等と同様に、単体では腫瘍部位への選択性や体内での安定性が乏しいといった問題がある。しかしこれらの問題も会合体を形成させることで改善することが可能となる。またこの会合体は中心部が疎水的であるため、抗がん剤を内包させることも可能である。

3. 研究の方法

疎水部に蛍光色素 (BODIPY、ICG) を持ち親水部に核酸 (DNA、RNA) を持つ両親媒性核酸を準備した。BODIPY 標識両親媒性核酸は購入し ICG 誘導体は合成した。つぎに、会合体の安定度を知るために重要な指標の一つである会合体を形成する際の濃度 (CAC) を評価した。つぎに、薬剤の腫瘍への集積効果を知るうえで重要な指標である粒径および表面電位を評価した。つぎに、両親媒性核酸の細胞内への導入を評価し、最後に細胞内に導入された核酸が機能するか評価した。

4. 研究成果

BODIPY 標識両親媒性核酸は購入し、ICG 誘導体は合成・精製した後、核磁気共鳴装置 (NMR) および質量分析装置 (MS) で確認した。つぎに、会合体を形成する際の濃度 (CAC) を評価した。BODIPY 標識両親媒性核酸は DNA 二重鎖が 25mer のとき 430 nM となり、RNA 二重鎖が 21mer のとき 790 nM となった。またその時の粒径は、両親媒性 DNA 二重鎖 (25mer) の場合およそ 138 nm、両親媒性 RNA 二重鎖 (21mer) の場合およそ 140 nm となった。また表面電位はそれぞれおよそ -39 mV、-35 mV となった。つぎに、ヒト肺がん細胞株 (A549) を用いた BODIPY 標識両親媒性核酸の細胞内導入の評価を共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。その結果、細胞内へ導入されていることが確認された。また、細胞内での両親媒性核酸の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価したところ、主にリソソームに局在しており、一部は細胞質でも観察された。このように細

胞内へ両親媒性核酸が導入されたことが確認されたので、最後に細胞内で導入された核酸が機能するかルシフェラーゼ発現ヒト線維肉腫細胞株 (HT1080-Luc) を用いて評価した。両親媒性核酸は、ルシフェラーゼ発現を抑制する配列を持つ BODIPY 標識 siRNA を用いた。その結果、BODIPY 標識していない siRNA はほとんど抑制効果を示さなかったが、会合体を形成した両親媒性核酸は 80% 以上の抑制効果を示した。一方、ICG を用いた両親媒性核酸は、当方の移籍に伴う研究環境の変更、また移籍後における研究棟改修工事による度重なる引越し等により評価の途中である。以上のことより、蛍光色素と核酸からなる両親媒性核酸は、セラノスティクス材料としての可能性が示唆され、今後は現在進行中の ICG を用いた両親媒性核酸の機能評価を進めていく。

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 Asahi Wataru, Kurihara Ryohsuke, Takeyama Kotaro, Umehara Yui, Kimura Yu, Kondo Teruyuki, Tanabe Kazuhito	4. 巻 2
2. 論文標題 Aggregate Formation of BODIPY-Tethered Oligonucleotides That Led to Efficient Intracellular Penetration and Gene Regulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 4456 ~ 4463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsabm.9b00631	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
研究協力者	田邊 一仁 (Tanabe Kazuhito)		
研究協力者	朝日 航 (Asahi Wataru)		
研究協力者	和田 健司 (Wada Kenji)		

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