

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：32601
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20H02863
研究課題名（和文）低酸素セラノスティクスを実現する創薬研究

研究課題名（英文）Drug Design for Hypoxic Theranostics

研究代表者

田邊 一仁（Tanabe, Kazuhito）

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：40346086

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：固形腫瘍内には低酸素状態の細胞（低酸素細胞）が発生し、放射線治療に抵抗性を示すこと、またがんの悪性化の原因となることが知られる。本研究では、次世代の低酸素治療薬・診断薬となり得る人工核酸を開発し、低酸素細胞のセラノスティクスを実現し得る分子設計を進めた。具体的には、低酸素条件下でのX線照射によって官能基が変換され、機能を発現する人工核酸、および官能基修飾により低酸素細胞に選択的な蓄積能を示す人工核酸を合成した。いずれも良好な性能を示し、低酸素条件下で駆動することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では低酸素セラノスティクスを実現しうる人工核酸型分子システムを開発した。具体的には2種類のシステムの開発に成功し、いずれも低酸素条件下で駆動した。核酸は遺伝子の担い手であるが、化学修飾を加えることによって多機能性を示す。すなわち、薬剤を導入したり、蛍光色素やMRI活性な元素を導入することによって治療薬・診断薬になり得る。全て申請者のオリジナルな技術を用いて作成する本システムは、低酸素細胞の診断と治療に確実な進歩をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Hypoxic cells generate within solid tumors and are known to be resistant to radiotherapy and to cause malignant of cancer. In this study, we developed artificial nucleic acids that could be the next generation of hypoxia therapeutics and diagnostics, and advanced molecular design that could realize theranostics for hypoxic cells. We synthesized artificial nucleic acids whose functional groups are converted by X-ray irradiation under hypoxic conditions and express their original functions. We also prepared artificial nucleic acids that show selective accumulation ability in hypoxic cells by functional group modification. Both nucleic acids showed good performance and were found to be driven under hypoxic conditions.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：低酸素細胞 人工核酸 放射線照射 還元酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍内には低酸素領域が存在し、細胞生存や増殖に大きな役割を果たすとともに、放射線治療に抵抗性を示すこと、またがんの悪性化の原因となることが知られている。この病的細胞の診断とそれに続く治療のため、国内外で診断薬、治療薬の開発が続けられている。しかし近年、申請者を含むいくつかの研究グループから腫瘍内低酸素細胞の酸素濃度は一定ではなく、時間経過とともに変化していることが示された。すなわち、腫瘍内のある部位が低酸素細胞であると診断できても、すぐに治療が開始できず、投薬まで時間を要すれば、その診断部位は既に「低酸素細胞」ではないことがあり、薬剤の効果は薄れる。すなわち、低酸素細胞の治療には、診断と治療の間隔を短くし、できれば同時に行う必要性が指摘されている。

本研究では、低酸素環境にある腫瘍細胞を標的としたセラノスティクス（低酸素セラノスティクス）を実現する分子システムを確立することを目的とした。

「セラノスティクス (Theranostics)」は、治療 (Therapeutics) と診断 (Diagnostics) を組み合わせた新しい医療技術である。診断薬が治療薬も兼ねる技術であり、「分子イメージング技術」で“病気の診断”を行うとともに、同じ分子によって治療用の薬剤を患部に送り込み、病巣だけを狙った“病気の治療”ができるようにする。この方法を低酸素領域の診断と治療に応用すると、診断と治療を同時に行うことが可能となり、これまでよりも圧倒的な早期に治療を始め得る。加えて診断と治療を同時並行で進めることで、患者の負担も大きく軽減できることから、低酸素腫瘍細胞の理想的ながん診断・治療法となる。本研究では、低酸素環境を標的とするセラノスティクスを「低酸素セラノスティクス」と定義し、これを実現する分子システムを構築することを目指した。具体的には、MRI あるいは発光で低酸素細胞を可視化しながら、人工核酸を活用した遺伝子発現抑制(核酸医薬)によって、低酸素細胞を高選択的に治療する分子システムを構築し、低酸素セラノスティクスを実現することとした。

2. 研究の目的

これまで低酸素を標的とする研究は数多く進められているものの、「診断薬」「治療薬」というカテゴリーに分かれて開発がすすめられてきた。しかし、最近、腫瘍組織内の酸素濃度は時間変化とともに変わることが示され、診断と治療が異なる時間に実施されると、診断結果を治療に反映しづらいことがわかってきた。すなわち、診断薬で低酸素領域と判断された部位は治療薬を投与する頃には既に酸素濃度が変わっており、効果がない。そこで、この低酸素細胞の診断と治療の乖離を解決し、克服することを目的に本研究の計画を進めた。

3. 研究の方法

本研究の最終目標は、ヒトの腫瘍組織内低酸素細胞で低酸素セラノスティクスを実現する分子システムを創出することである。その目的に至るためには、基礎段階として①候補化合物となる人工核酸の合成 ②化学的手法による機能評価 ③細胞レベルでの評価 ④マウス等を用いた評価、続いて前臨床研究として ⑤大型動物を用いた実験 を経て、⑥ヒトでの試験 というステップを経る必要がある。本研究では、このうち基礎段階①～④までの基礎的な研究を行うこととした。

4. 研究成果

1 アルキル基修飾人工オリゴヌクレオチドの合成と低酸素選択的な機能発現

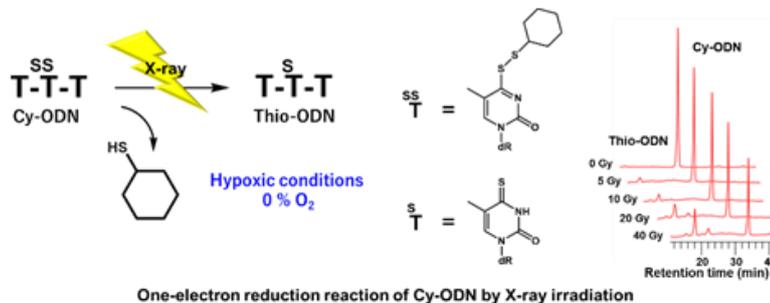
人工核酸は細胞内、組織で様々な機能を示す機能性材料として注目され、DNA の糖-リン酸部や塩基部への化学修飾に多くの関心が集まっている。DNA を化学修飾する主たる方法として、ホスホロアミダイト法が用いられてきた。しかし、この手法は、反応系において酸性・塩基性条件や酸化反応を要するために導入分子に制限が生じることが欠点であり、新たな DNA 修飾法が求められていた。そこで、本研究では、ジスルフィド架橋を用いた DNA オリゴマーへのポストモディフィケーションシステムを構築することを試みた。本テーマでは、チオチミジン修飾塩基を活用したポストモディフィケーションシステムを構築するとともに、低酸素条件下での X 線照射で機能制御する人工核酸開発へ応用することとした。

ポストモディフィケーション法による DNA オリゴマーの官能基修飾は次のように行った。①予めチオチミジンを含む DNA オリゴマーを合成しておく。②機能分子を有するフタルイミド誘導体との縮合反応によって DNA オリゴマー上にジスルフィド結合を介して機能部を導入する。以上の2段階を経て、まず、塩基部にアルキル基を備えた DNA オリゴマーを合成した。シクロヘキシル基をもつフタルイミド誘導体とチオチミジン含有 DNA を混合したところ、速やかに反応が進行し、修飾 DNA オリゴマー Cy-ODN が得られた。

当研究室ではこれまでに、低酸素条件下 X 線照射によってジスルフィド結合が還元・開裂することを報告してきた。この特長を利用し、本研究では Cy-ODN を X 線をトリガーとして二重鎖形成を制御可能な人工核酸として応用することを目指した。X 線照射による二重鎖形成制御システムは以下のメカニズムによって構築される。①Cy-ODN はアルキル基が導入されているため、相補鎖とのハイブリダイゼーションは抑制される。②X 線照射により、ジスルフィド結合が開裂する

と、通常のハイブリダイゼーション能が回復する。

合成したシクロヘキシル基修飾 DNA オリゴマー（3 量体: Cy-ODN³）を用いて X 線応答性の評価を行った。DNA オリゴマーの水溶液に低酸素条件下で X 線を照射すると、ジスルフィド結合が開裂し、チオチミジン含有 DNA (Thio-ODN³) が生成した。G 値を算出すると、144 nmol/J であった。また、有酸素条件下では反応効率が著しく低下したことから、本反応には水和電子が関わっていることが示唆された。次にシクロヘキシル基を長鎖 DNA に導入し同様の実験を行った結果、3 量体の DNA オリゴマー同様、低酸素条件下で選択的にジスルフィド結合開裂反応が進行し、無置換チオチミジンを含む 16 量体の DNA が生成した。G 値を算出すると低酸素条件下で 21.5 nmol/J であり、3 量体の G 値と比較すると、約 7 倍低下することが分かった。これは本反応に関わる水和電子の付着反応に際し、水和電子のマイナスチャージと DNA のリン酸基上のマイナスチャージが静電反発を引き起こすためだと考えられる。

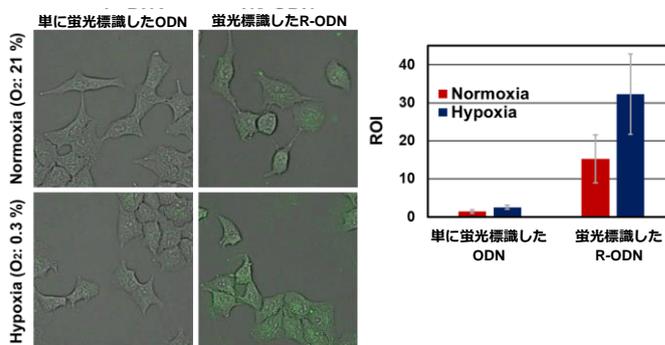


さらに、本システムによって二重鎖形成を制御可能か検証するため二重鎖形成の X 線制御実験を行った。22 量体の DNA オリゴマーにポストモディフィケーション法を用いてシクロヘキシル基を導入 (Cy-ODN22) し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって反応を評価した。その結果、低酸素条件下でのみ相補鎖とのハイブリダイゼーションが進行し、電気泳動すると、移動度の低いバンドが現れた。さらに、細胞内においても二重鎖形成の X 線制御実験を行った。Cy-ODN22 と相補的な配列をもち、かつ蛍光色素と消光剤で標識したヘアピン型 DNA オリゴマーを Cy-ODN22 そのものとともに低酸素細胞に投与した後に、X 線を照射し、共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、細胞から強い蛍光発光が確認できたことから、細胞内において X 線照射による低酸素選択的な二重鎖形成の制御が可能であることがわかった。

2 低酸素環境に選択的に集積する人工核酸の設計

両親媒性 DNA から成る会合体は、高い細胞膜透過性と生体内安定性を示す。両親媒性 DNA のもつこの特長と、ある種の還元酵素 (RE) が低酸素細胞内で活性化する事実を用いて、低酸素細胞に選択的に蓄積する人工核酸を開発した。具体的には、RE 応答性の官能基を導入したチミジン塩基 (d^RT) を合成し、さらにこの d^RT を組み込んだ R-ODN を作成した。R-ODN は以下のメカニズムで低酸素細胞に蓄積すると予想した。R-ODN から成る会合体が低酸素細胞内に取り込まれると RE により d^RT が活性化され、d^RT 上に導入した官能基が除去された無置換鎖が生成する。その結果、R-ODN は両親媒性を失い、会合体が不安定化する結果、低酸素細胞内に会合体が残留する。一方、会合体が有酸素細胞に取り込まれても、会合体は安定に形成し続けるため、しばらくすると細胞から排出される。

実際に、R-ODN を RE と混合し、疎水部の脱離反応が進行するかを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により追跡した。その結果、低酸素環境下で疎水部の脱離反応が効率よく進むことを確認した。また、A549 細胞を用いて、R-ODN の機能評価を行ったところ、R-ODN は会合体を形成し、A549 細胞に速やかに取り込まれることがわかった。細胞内の酸素濃度を変えたところ、R-ODN は低酸素細胞 (酸素濃度 0.3%) に選択的に蓄積した。以上より、R-ODN は低酸素細胞に選択的に蓄積する DNA として機能することがわかった。さらに、蛍光標識した R-ODN を A549 細胞に投与したところ、低酸素細胞で強く発光したことから、低酸素細胞を画像化できた。



以上のように、本研究では低酸素環境下で駆動する人工核酸の開発に成功した。人工核酸は容易に化学修飾が可能であることから、薬剤や蛍光色素等の情報発信分子を導入できる。また、疎水性官能基の導入により形成する会合体は、多様な機能分子を内包可能である。これら特徴を活用することによって、低酸素細胞に選択的な治療や診断およびセラノスティクスを実現し得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Misu, S.; Kurihara, R.; Kaimuma, R.; Sato, R.; Nishihara, T.; Tanabe, K. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Hybridizing Oligonucleotides with Hydrophobic Peptide Nucleic Acids Assists Their Cellular Uptake through Aggregate Formation. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 ChemBioChem. | 6. 最初と最後の頁 1140-1143 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900607 | 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 - |
| 1. 著者名 Kainuma, R.; Motohashi, Y.; Nishihara, T.; Kurihara, R.; Tanabe, K. | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 Modulation of cell membrane functionalization by aggregates of oligodeoxynucleotides containing alkyl chain-modified uridines. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Org. Biomol. Chem. | 6. 最初と最後の頁 5406-5413 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ob00943a | 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 - |
| 1. 著者名 Takemura, S.; Watanabe, H.; Nishihara, T.; Okamoto, A.; Tanabe, K. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Monitoring intracellular metal ion complexation with acetylene-tagged ligand by Raman spectroscopy. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 RSC Advances. | 6. 最初と最後の頁 36119-36123 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ra06329k | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Umehara Yui, Kimura Yu, Kleitz Freddy, Nishihara Tatsuya, Kondo Teruyuki, Tanabe Kazuhito | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Phosphonated mesoporous silica nanoparticles bearing ruthenium complexes used as molecular probes for tracking oxygen levels in cells and tissues | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 RSC Advances | 6. 最初と最後の頁 5865 ~ 5873 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0RA08771H | 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Makanai, H.; Nishihara, T.; Tanabe, K. | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Raman spectra of acetylene-tagged anthraquinone derivatives in various solvents | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Photomedicine and Photobiology | 6. 最初と最後の頁 17 ~ 19 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 - |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Itaya Ryota, Idei Wakana, Nakamura Takashi, Nishihara Tatsuya, Kurihara Ryohsuke, Okamoto Akimitsu, Tanabe Kazuhito | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Changes of C C Triple Bond Vibration that Disclosed Non-Canonical Cytosine Protonation in i-Motif-Forming Oligodeoxynucleotides | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 ACS Omega | 6. 最初と最後の頁 31595 ~ 31604 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c04074 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Makanai Hiroki, Nishihara Tatsuya, Tanabe Kazuhito | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Surface-Enhanced Raman Scattering Identification of Nucleic Acid Targets by Acetylene-Tagged Hoechst Molecule Binding with DNA-Tethered Gold Nanoparticles | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials | 6. 最初と最後の頁 2935 ~ 2942 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.2c00213 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Akisawa Kento, Makanai Hiroki, Nishihara Tatsuya, Tanabe Kazuhito | 4. 巻 92 |
| 2. 論文標題 Hypoxic X-irradiation as a trigger for reduction of metal ion and azide-alkyne cycloaddition on oligodeoxynucleotides | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Tetrahedron Letters | 6. 最初と最後の頁 153658 ~ 153658 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2022.153658 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Yokota Shohei, Motohashi Yuto, Nishihara Tatsuya, Tanabe Kazuhito | 4. 巻 58 |
| 2. 論文標題 pH-responsive aggregates consisted of oligodeoxynucleotides bearing nitrophenol group that deliver drugs into acidic cells | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 128519 ~ 128519 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2021.128519 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Motohashi Yuto, Nishihara Tatsuya, Tanabe Kazuhito | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 Preparation of a multifunctional photoactivated prodrug on a streptavidin scaffold bearing a DNA aptamer | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 128819 ~ 128819 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128819 | 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Makanai Hiroki, Nishihara Tatsuya, Tanabe Kazuhito | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 The pH-Dependent Raman Signal Enhancement of an Alkyne-tagged Hoechst Molecule that Binds with Oligodeoxynucleotides on Gold Nanoparticles | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 1135 ~ 1138 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.220435 | 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Watanabe Hikaru, Maehara Daigo, Nishihara Tatsuya, Tanabe Kazuhito | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Raman Signal Enhancement by DABCYL-Substitution on DNA Aptamer for Identification of Cellular ATP | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry | 6. 最初と最後の頁 2314 ~ 2319 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.2c00541 | 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6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 田邊一仁 |
| 2. 発表標題 ラマンスペクトルを活用した核酸構造解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 田邊一仁 |
| 2. 発表標題 腫瘍内低酸素環境の可視化に資する機能性ナノ粒子の設計 |
| 3. 学会等名 第63回日本放射線影響学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田邊一仁 |
| 2. 発表標題 高機能化ルテニウム錯体のりん光を活用した腫瘍内酸素濃度のリアルタイムイメージング |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 蒔苗宏紀、西原達哉、田邊一仁 |
| 2. 発表標題 SERS-Based detection of intracellular oligonucleotides by using acetylene-tagged Hoechst molecules |
| 3. 学会等名 International symposium on nucleic acids chemistry (ISNAC2021) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 本橋優人、西原達哉、田邊一仁 |
| 2. 発表標題 Photo-activated prodrug to show selective cell toxicity using the recognition of cell specific antigen |
| 3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 前原大悟、西原達哉、田邊一仁 |
| 2. 発表標題 Function of amphiphilic oligonucleotides bearing nitrobenzene units that were activated in hypoxic cells. |
| 3. 学会等名 International symposium on nucleic acids chemistry (ISNAC2022) |
| 4. 発表年 2022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 |
|-------------------|--|-----------------------------------|----|
| 研究 分 担 者 | 西原 達哉 (Nishihara Tatsuya) (00773201) | 青山学院大学・理工学部・助教 (32601) | |

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 |
|---------|---------|