

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12690

研究課題名（和文）核酸医薬密生型キャリアフリーDDSを活用したナノ粒子点眼薬の開発

研究課題名（英文）Precise Design and Evaluation of Nucleic Acid-Covered Nanostructures with Self-Immolation Reaction Responding to External Stimuli for Development of Nano-Ophthalmic Drugs

研究代表者

秋山 好嗣 (Yoshitsugu, Akiyama)

東京理科大学・教養教育研究院葛飾キャンパス教養部・准教授

研究者番号：40640842

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）：本研究課題は、安全かつ高い薬効を示すナノ眼科製剤の開発を目指し、核酸医薬密生型ナノ構造体（NCN）の構造設計と機能評価を目的としている。我々は、まず、自己崩壊性ポリ（カルバメート）誘導体を内核としたNCNを作製した。次に、外部刺激として還元剤を加えるとナノ構造体の自己崩壊が進行することを動的散乱測定により実証した。また、内核を金ナノ粒子としたNCNの表層部に糖突出構造を導入すると、コロイド分散性が著しく向上する知見を得た。この新奇現象により、がん関連酵素の目視アッセイ法の構築に成功した。本成果は、眼科治療薬向け核酸医薬デリバリーおよび眼科腫瘍の診断を可能にする基盤技術として期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにした核酸密生型ナノ構造体からの特異環境下における核酸医薬リリースは、核酸医薬を外殻、低分子医薬オリゴマーを内核としたキャリアフリーナノDDS製剤の開発を可能にする。特筆すべきは、本研究はコンビネーション化学療法向けに、キャリア自身の毒性および薬剤耐性という根本的な問題の解決につながる精密な構造設計に基づいている。したがって、本研究課題の遂行上で得た知見は、眼腫瘍点眼薬に求められる治療薬の眼内移行性の向上や循環血流への移行阻害による全身性の副作用の克服にとどまらない。これまでに眼科製剤として利用が制限された抗がん剤の適用を可能としたナノ医療への幅広い貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop reduction-responsive DNA-based nanostructures with a core of self-immolative poly(carbamate) (PC) derivative for highly efficient nano-ophthalmic drugs. We first prepared nucleic acid-covered nanostructures containing a disulfide-terminated PC derivative core. Dynamic light scattering measurements showed that treatment with a reducing agent induced self-immolation reaction of PC derivatives in the nanostructures. We also found that the nanostructures exhibit high colloidal dispersibility when sugar protrusion structures are introduced into the outermost nucleic acid layer on the gold nanoparticle surface. Using this phenomenon, the colorimetric enzymatic activity of tumor biomarkers was successfully demonstrated. This technology can allow to create an attractive nanotechnology for highly efficient delivery of nucleic acid drugs and diagnosis of ophthalmic tumors.

研究分野：有機機能材料工学

キーワード：コンビネーション化学療法 核酸密生層 ナノ点眼薬 自己崩壊性高分子 眼科製剤

1. 研究開始当初の背景

生命現象をつかさどる DNA は、高度な分子認識能を有し、かつ環境負荷が低い有機化合物であることから、魅力的な“機能素材”とみなすことができる。とりわけ、金ナノ粒子表面層部に一本鎖 (ss) DNA を高密度に修飾したナノ構造体は、均一溶液系の DNA にはない特異物性を発現することから、高機能性の DNA マテリアルとしてバイオ関連分野において注目されている[1]。その物性は多彩かつユニークで、一例として、非架橋的な凝集現象が挙げられる[2]。非架橋凝集は粒子表面層部で形成した二重鎖 (ds) DNA が完全相補の場合、高イオン強度条件下において自発的な粒子の凝集が観察される。このとき、金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴シフトに伴う明確な色変化が観察される。興味深いことに、末端がわずかに一塩基だけ異なるミスマッチ[2]あるいは突出構造[3]を形成させた場合、粒子は凝集せず分散状態を保持する。この一塩基の違いが色変化を与えるという新奇現象は、これまでにヒト由来サンプルを用いた一塩基多型の目視診断[4]および可逆的な粒子間の距離変化を誘起できる糸ビーズ状ナノ構造体の作製に応用されている[5]。最近、われわれは DNA 切断を薬効メカニズムにもつ抗がん剤の目視探索へ展開できる新たな構造設計に着手した。すなわち、DNA 損傷剤 (ここではブレオマイシン) が誘起する DNA 切断部位を粒子上の dsDNA に導入することである。これにより、DNA 損傷剤の活性評価法として汎用される放射性元素 (^{32}P) 標識化 DNA を用いたゲル電気泳動や高速液体クロマトグラフによる分離技術、あるいは蛍光共鳴エネルギー移動に基づく蛍光検出の代替技術として簡便・迅速な目視スクリーニングが可能となった[6]。また、ナノプラットフォーム上で形成した DNA 密生層は、血中での安定性と酵素分解に対して耐性をもつことから核酸運搬体 (キャリア) としても魅力的なナノマテリアルを提供している[7]。一方、効率的な核酸デリバリーの実現には血中での安定性、内核材料の安全性、さらには細胞内で核酸を高効率に放出できる精密制御が求められる。これら課題が克服できれば臨床応用が可能になる。

2. 研究の目的

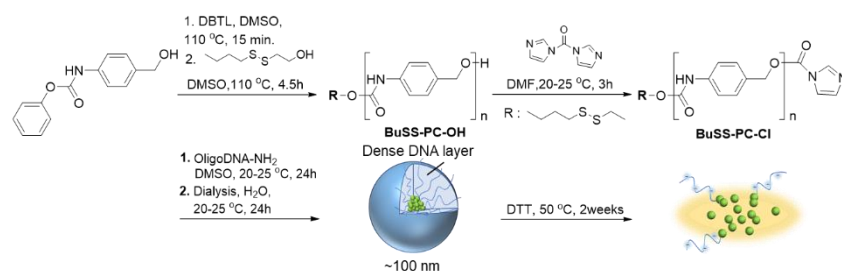
薬効メカニズムの異なる薬物の同時投与は、コンビネーション治療として知られ、それぞれの単独投与と比べ高い治療効果および薬剤耐性の克服が期待されている。このコンビネーション治療では、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の利用が血中滞留性や腫瘍集積性といった観点において重要な役割を担っている。これまでに、脂質、高分子化合物あるいは金属ナノ粒子などがキャリアとして利用されてきたが、キャリア自身の生分解性や生体適合性が十分でない場合、その毒性が臨床応用の大きな妨げとなっている。そこで、本研究課題は安全かつ高い薬効を示すナノ眼科剤の開発を目指し、自己崩壊機能を搭載した核酸医薬密生型ナノ構造体 (NCN) の構造設計と機能評価、さらには内核を金ナノ粒子とした目視バイオ分析法の構築を目的とした。

3. 研究の方法

本研究改題の遂行にあたり、(1) 内核をポリカルバメート (PC) 誘導体とした DNA 密生型ナノ構造体の作製とその機能評価、(2) 金ナノ粒子を内核としたナノ構造体の作製とバイオアッセイ法の構築について検討した。

(1) 内核を PC 誘導体とした DNA 密生型ナノ構造体の作製とその機能評価: 既報[8]に従って、ジスルフィド誘導体 (BuSS 基) とカルボニルイミダゾール (CI 基) を各末端に有する PC 誘導体 (BuSS-PC-CI) は、片末端を BuSS 基とした PC 誘導体 (BuSS-PC-OH) の縮合重合とその後の末端水酸基の CI 化反応により合成した。次に、BuSS-PC-CI と担体固定化 oligoDNA との固相反応および自己組織化によりナノ構造体を作製した。最後に、ナノ構造体の水溶液に還元剤のジチオトレイトール (DTT) を加え、自己崩壊反応を行った。

(2) 金ナノ粒子を内核としたナノ構造体の作製とバイオアッセイ法の構築: プロピルアミン (C3) で末端修飾した ssDNA (ssDNA-C3) にガラクトース誘導体を結合した ssDNA-C3-Gal を合成した (Scheme 1)。続いて、既報に従って調製した AuNP-ssDNA[3] と混和し、二重鎖形成により AuNP-dsDNA-Gal を作製した。次に、このナノ粒子分散液に β -Gal または β -グルクロニダーゼ (β -Glu) (最終濃度: 0.37 pmol/L) を加えて 15 分静置した。最後に、NaCl (最終濃度: 0.5 mol/L) を添加し、30 分後のナノ粒子の分散性を表面プラズモン共鳴に基づく色調変化で評価した。



Scheme 1. Preparation of self-assembled nanostructures composed of a dense DNA shell surrounding a reduction-responsive PC derivative core.

4. 研究成果

(1) 内核を PC 誘導体とした DNA 密生型ナノ構造体の作製とその機能評価：ナノ構造体に還元応答機能を付与するために、BuSS-PC-CI を新規に設計し、その合成を試みた。¹H NMR 測定による構造解析から、BuSS-PC-OH の全てのピークについて帰属可能であった (Figure 1-(a))。また、末端ベンジル基由来のピーク (o) と BuSS 基由来のピーク (a) の積分強度比から算出した BuSS 基の導入率は 64%であった。次に、CI 化反応後、末端ベンジル基に由来するピーク (o) の化学シフト値の変化 (4.4→5.4 ppm) に加えて、新たに CI 基由来のピーク (q) を¹H NMR により検出した (Figure 1-(b))。BuSS 基と同様に CI 基の導入率は 78%と算出され、BuSS-PC-CI を合成することができた。

BuSS-PC-CI と oligoDNA (17 塩基) とのコンジュゲート化および透析法を用いた自己組織化によりナノ構造体の形成を試みた。DLS 測定を行ったところ、ナノ構造体の流体力学径は 110 nm を示した (Figure 2 a)。次に、得られたナノ構造体に DTT (20 mM) を加え、50°C で 2 週間静置した。流体力学径が 10 nm 程度の会合体を DLS 測定により観察した。また、同時に大きな凝集体 (~1,000 nm 付近) も含まれていることがわかった (Figure 2 b)。一方、DTT 処理を室温 (20-25°C) で行った場合、2 週間後の DLS のヒストグラムは自己組織化直後と同様な粒径 (Figure 2 a) を示した。以上より、新規設計により得たナノ構造体は 50°C に静置することで、PC 誘導体の部分的な自己崩壊反応の進行が示唆された。今後、細胞内還元環境下において、選択的な核酸デリバリーを可能とする基盤技術として期待できる。

(2) 金ナノ粒子を内核としたナノ構造体の作製とバイオアッセイ法の構築：C3 または C6 突出型 AuNP-dsDNA の分散・凝集特性の知見に基づいて設計した AuNP-dsDNA-Gal のコロイド分散性を目視評価した。 β -Glu を添加した溶液は、分散状態に由来する赤色を保持した (Figure 3 a)。一方、 β -Gal を添加した溶液は、凝集状態に由来する紫色に変化した (Figure 3 b)。これは、ナノ粒子表面部のガラクトース突出構造が β -Gal によって C3 突出構造になる加水分解反応が進行し、粒子のコロイド分散性が低下したためであると考えられる。以上より、AuNP-dsDNA-Gal によって β -Gal の酵素活性を目視で検出できることを明らかにした。今後、腫瘍マーカーの簡易分析技術としての展開が期待できる。

このように本研究で明らかにした核酸密生型ナノ構造体からの特異環境下における核酸医薬リリースは、核酸医薬を外殻、低分子医薬オリゴマーを内核としたキャリアフリーナノ DDS 製剤の開発を可能にする。特筆すべきは、本研究はコンビネーション化学療法向けに、キャリア自身の毒性および薬剤耐性という根本的な問題の解決につながる精密な構造設計に基づいている。したがって、本研究課題の遂行上で得た知見は、眼腫瘍点眼薬に求められる治療薬の眼内移行性の向上や循環血流への移行阻害による全身性の副作用の克服にとどまらない。これまでに眼科製剤として利用が制限された抗がん剤の適用を可能としたナノ治療・診断への幅広い貢献が期待できる。

【参考文献】

- [1] N. L. Rosi *et al.*, *Chem. Rev.*, **105**, 1547 (2005).
- [2] K. Sato *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8102 (2003).
- [3] Y. Akiyama *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **20**, 17420 (2014).
- [4] Y. Akiyama *et al.*, *ChemistryOpen*, **5**, 508 (2016).
- [5] Y. Akiyama *et al.*, *Small*, **11**, 3153 (2015).
- [6] Y. Akiyama *et al.*, *ChemBioChem*, **24**, e202200451 (2023).
- [7] C. A. Mirkin *et al.*, *ACS Nano*, **2023**, *17*, 16291.
- [8] S. Fukumoto *et al.*, *Anal. Sci.*, **37**, 781 (2021).

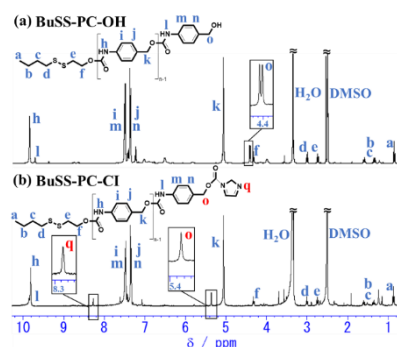


Figure 1. ¹H NMR spectra of (a) BuSS-PC-OH and (b) BuSS-PC-CI in DMSO-*d*₆ at 25°C.

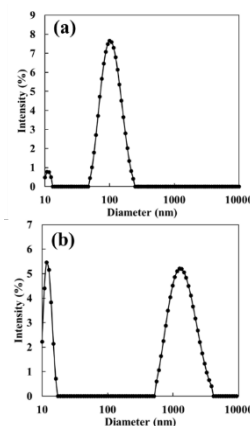


Figure 2. DLS size distribution of nanostructures (a) without DTT at 20-25°C and (b) with DTT at 50°C for 2 weeks.

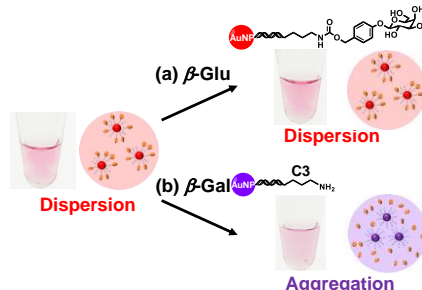


Figure 3 Colorimetric assay of β -Gal activity using AuNP-dsDNA-Gal.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yoshitsugu Akiyama, Kazunori Kimura, Syuuhei Komatsu, Tohru Takarada, Mizuo Maeda, Akihiko Kikuchi	4. 巻 24
2. 論文標題 A Simple Colorimetric Assay of Bleomycin-Mediated DNA Cleavage Utilizing Double-Stranded DNA-Modified Gold Nanoparticles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202200451
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202200451	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 Shione Fukumoto, Mami Kawade, Kazunori Kimura, Yoshitsugu Akiyama, Akihiko Kikuchi	4. 巻 37
2. 論文標題 Preparation of Spherical Nucleic Acid Nanoparticles Containing Self-Immolative Poly(carbamate) Core	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ANALYTICAL SCIENCES	6. 最初と最後の頁 781 - 784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20SCN06	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石山蓮, 高橋雄大, 福本汐音, 小松周平, 菊池明彦, 秋山好嗣
2. 発表標題 刺激応答機能を有する自己崩壊性ポリ（カルバメート）誘導体の末端活性化
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山好嗣
2. 発表標題 短鎖DNAで創り込むナノバイオ材料の精密分子設計
3. 学会等名 第17回ナノ・バイオメディカル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松 彩香, 秋山 好嗣, 上村 真生
2. 発表標題 分子ビーコン-金ナノ粒子モノコンジュゲートの作製と腫瘍マーカーの蛍光特性評価
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石山蓮, 福本汐音, 小松周平, 菊池明彦, 秋山好嗣
2. 発表標題 刺激崩壊性バイオコンジュゲートを可能にするポリ(カルバメート)誘導体の選択合成
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松 彩香, 秋山 好嗣, 上村 真生
2. 発表標題 分子ビーコンを1分子鎖固定した金ナノ粒子複合体の作製と腫瘍マーカーの蛍光検出
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ren Ishiyama, Syuuhei Komatsu, Akihiko Kikuchi, Yoshitsugu Akiyama
2. 発表標題 Rational design of environment-responsive spherical nucleic acids containing poly(carbamate) derivatives with self-immolation ability
3. 学会等名 5th G'Lowing Polymer Symposium in Kanto
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福森泰地, 高橋雄大, 石山蓮, 小松周平, 宝田徹, 前田瑞夫, 安藤格士, 菊池明彦, 秋山好嗣
2. 発表標題 鎖長の異なるアルキルアミンの突出構造を有する二重鎖DNA修飾金ナノ粒子の分散制御
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋雄大, 福本汐音, 秋山好嗣, 宝田徹, 前田瑞夫, 菊池明彦
2. 発表標題 -ガラクトシダーゼの目視活性評価を指向した糖修飾剤の合成と金ナノ粒子の界面設計
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山好嗣, 福本汐音, 岡島宏季, 川出茉実, 菊池明彦
2. 発表標題 自己崩壊性ポリ(カルバメート)誘導体を内核とした球状核酸の構造設計と特性評価
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshitsugu Akiyama, Shione Fukumoto, Hiroki Okajima, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Design of Spherical Nucleic Acid Nanoparticles Containing Self-immolative Poly(carbamate) Core
3. 学会等名 4th GLowing Polymer Symposium in KANTO, 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshitsugu Akiyama, Shione Fukumoto, Hiroki Okajima, Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Preparation of Spherical Nucleic Acid Nanoparticles Containing Self-immolative Poly(carbamate) Core for Carrier-free DDS
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 雄大 秋山 好嗣 宝田 徹 前田 瑞夫 菊池 明彦
2. 発表標題 カルボニルイミダゾール基を有するガラクトース誘導体の合成：DNA密生型金ナノ粒子による α -ガラクトシダーゼの目視活性評価への展開
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山好嗣 福本汐音 岡島宏季 菊池明彦
2. 発表標題 自己崩壊性ポリ(カルバメート)誘導体を内核とした DNA密生型ナノ粒子の作製
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 秋山好嗣, 菊池明彦, 他108名	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 580
3. 書名 新規モダリティ医薬品のための新しいDDS技術と製剤化	

〔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	菊池 明彦 (Kikuchi Akihiko) (40266820)	東京理科大学・先進工学部マテリアル創成工学科・教授 (32660)	

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