

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700552

研究課題名（和文） 生体内で使用可能な新規核酸型リガンドの創製

研究課題名（英文） Investigation of nucleic acid type ligand which can use in vivo

研究代表者

兵藤 守（HYODO MAMORU）

北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号：30548186

研究成果の概要（和文）：本申請研究では、初代培養腫瘍血管内皮細胞を標的として DNA アプタマーの単離を試み 12 回のセレクションとさらに正常血管内皮細胞および腫瘍実質細胞を用いてカウンターセレクションを行い、AraHH001 アプタマーを得ることができた。AraHH001 アプタマーは腫瘍血管内皮細胞に対して 44 nM の解離定数を示すこと、蛍光標識 AraHH001 は腫瘍血管内皮細胞において、エンドソームとの共局在を示すこと、AraHH001 は脈管形成を阻害することを明らかにした。さらに AraHH001 アプタマーが結合するタンパク質を探索し、それが Troponin T タンパク質であることが明らかになった。Troponin T はこれまで腫瘍血管内皮細胞に発現しているとは考えられておらず、AraHH001 アプタマーをの脂質コンジュゲートを合成し、それをリポソームに組み込んだ AraHH001 リポソームは通常のリポソームと比較して 3.5 倍強く腫瘍血管内皮細胞へ結合することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We have isolated the DNA aptamer named AraHH001 from 12 rounds of selection to tumor endothelial cells and counter selection with normal endothelial cells and tumor parenchymal cells. AraHH001 aptamer showed 44 nM dissociation constant to tumor endothelial cells and incorporated into tumor endothelial cells. AraHH001 aptamer binds to Troponin T protein on tumor endothelial cells and AraHH001 aptamer bound liposome showed 3.5 times higher uptake efficacy compared to normal liposome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオコンジュゲート材料

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍は細胞増殖が盛んで常に栄養や酸素を必要としている。そのためその周辺では新しく血管細胞を作って栄養を得ようとしており、その現象を血管新生と呼ぶ。血管新生より作られる細胞の中に腫瘍血管内皮細胞がある。この細胞は腫瘍と血管の間に存在し、腫瘍に酸素、栄養を送る機能をもつ細胞である。近年、この細胞を破壊することにより腫瘍への酸素、栄養の供給を止め、兵糧攻めにする、いわゆる**新生血管阻害療法**が注目を集めている。しかし、アバチン等の医薬に代表されるようにこれまで明確な成果を上げたものは無く、真に腫瘍血管内皮細胞を効率的に認識する分子の創製が求められていた。申請者はこのような状況下、腫瘍血管内皮細胞への効率的な DDS 創製のためのリガンド探索を試み、腫瘍血管内皮細胞へのアプタマーを探索した。

## 2. 研究の目的

申請者は腫瘍血管内皮細胞への効率的な DDS 創製のためのリガンド探索を試み、腫瘍血管内皮細胞へのアプタマーを探索した。アプタマーは 20-100 量体の一本鎖 DNA もしくは RNA で分子内の水素結合等により立体構造を形成し、それが特定の化合物とのみ強く選択的に結合する分子であり、これを当研究室で開発された多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) に導入することにより効率的な DDS 方法を提示する。

## 3. 研究の方法

申請者はアプタマーの標的として初代培養腫瘍血管内皮細胞を選択し、DNA ライブラリーを用いる **Cell-SELEX** を行った。SELEX 法とはランダムな配列を有する DNA を標的分子と結合させ、結合しない配列を除いた後、結合する DNA を回収し、PCR により増幅する。このサイクルを繰り返し標的分子に結合する配列のみを得る方法である。Cell-SELEX は細胞を標的とする方法で、これまで腫瘍血管内皮細胞で行われた例はない。さらに正常血管内皮細胞と腫瘍実質細胞を用いる Counter-SELEX を行い腫瘍血管内皮細胞のみに結合する DNA ライブラリーを得た。このライブラリーの DNA 配列をシーケンシングにより決定し、**AraHH001** と名付けた (図 1)。

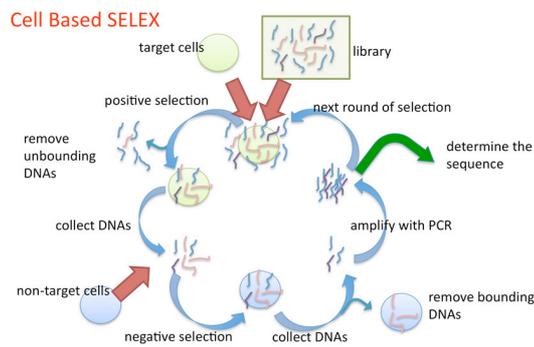


図 1. Cell-SELEX の概要

## 4. 研究成果

Cell-SELEX により得られた AraHH001 アプタマーの性質を検証し、AraHH001 アプタマーは腫瘍血管内皮細胞に対して 44 nM の解離定数を示すこと (図 2) を明らかにした。

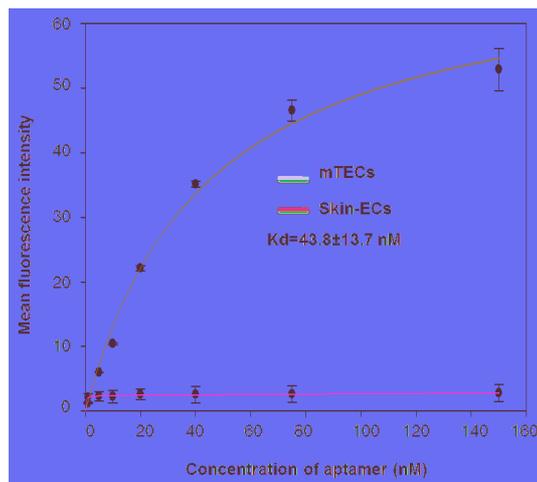


図 2. AraHH001 アプタマーの解離定数

また、蛍光標識 AraHH001 は腫瘍血管内皮細胞において、腫瘍血管内皮細胞へ効率的に取り込まれ、エンドソームとの共局在を示すこと、AraHH001 は脈管形成を阻害することを明らかにした (図 3)。

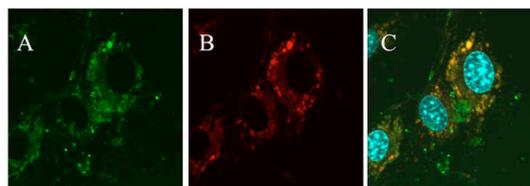


図 3. 共焦点レーザー走査型顕微鏡による AraHH001 アプタマーの取り込み評価 (A)

FITC tagged aptamer (B) Lysotracker Red  
(C) Merge + Hoechst33342

さらに AraHH001 アプタマーが結合するタンパク質を探索し、それが Troponin T タンパク質であることが明らかになった。Troponin T はこれまで腫瘍血管内皮細胞に発現しているとは考えられておらず、世界で初めての成果であると考えている(図4)。

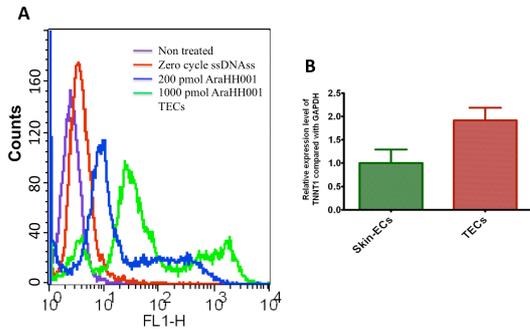


図4. (A) AraHH001 アプタマーの腫瘍血管内皮細胞への結合 (B) 腫瘍血管内皮細胞における Troponin T mRNA の発現評価

また、AraHH001 アプタマーの脂質コンジュゲートを合成し、それをリポソームに組み込んだ AraHH001 リポソームは通常のリポソームと比較して3.5倍強く腫瘍血管内皮細胞へ結合することが明らかになった(図5)。

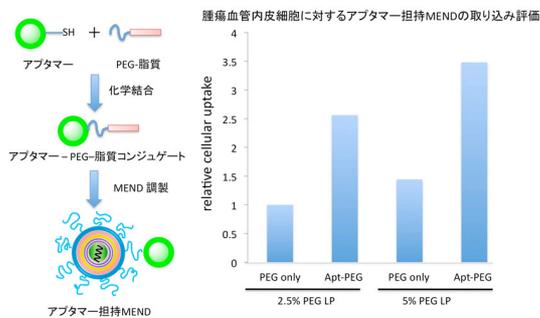


図5. AraHH001 標識リポソームの取り込み評価

今後、薬剤の搭載による抗腫瘍効果の検証や *in vivo* での抗腫瘍効果などの検討を予定している。

## 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)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Mst. Naznin Ara, Mamoru Hyodo, Noritaka Ohga, Kyoko Hida, Hideyoshi

Harashima Development of a novel DNA aptamer ligand targeting to primary cultured tumor endothelial cells by a cell-based SELEX method. *PLoS One* **2012**, 7, e50174. doi: 10.1371/journal.pone.0050174, 査読有

(2) Yusuke Sato, Hiroto Hatakeyama, Yu Sakurai, Mamoru Hyodo, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harashima A pH-sensitive cationic lipid facilitates the delivery of liposomal siRNA and gene silencing activity *in vitro* and *in vivo*. *J. Control. Release* **2012**, 163, 267-276. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.09.009, 査読有

(3) Md. Nazir Hossen, Kazuaki Kajimoto, Hidetaka Akita, Mamoru Hyodo and Hideyoshi Harashima Vascular-targeted nanotherapy for obesity: Unexpected passive targeting mechanism to obese fat for the enhancement of active drug delivery. *J. Control. Release* **2012**, 163, 101-110. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.09.002, 査読有

(4) Kazuhiko Furukawa, Hongzhou Gu, Narasimhan Sudarsan, Yoshihiro Hayakawa, Mamoru Hyodo and Ronald R. Breaker Identification of ligand Analogues that control c-di-GMP Riboswitches. *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 1436-1443. doi: 10.1021/cb300138n, 査読有

[学会発表] (計4件)

(1) Mamoru Hyodo, Mst. Naznin Ara, Yusuke Takaya and Hideyoshi Harashima Isolation of new DNA aptamers for pancreatic cancer cells. Abstract No. 121, IS3NA XX international roundtable, Centre Mont-Royal, Montreal, Canada, August 5-9, 2012.

(2) Yuri Tawaraya, Mamoru Hyodo, Yuma Yamada and Hideyoshi Harashima Investigation of RNA aptamers targeting mitochondria by mitochondria based SELEX. Abstract No. 149, IS3NA XX international roundtable, Centre Mont-Royal Montreal, Canada, August 5-9, 2012.

(3) 俵谷優里, 兵藤守, 山田勇磨, 原島秀吉, ミトコンドリア標的 RNA アプタマーの探索, 日本薬剤学会第27年会, 神戸国際会議場, 神戸, 2012年5月24-26日

(4) Mst Naznin Ara, Mamoru Hyodo, Noritaka Ohga, Kyoko Hida, Hideyoshi Harashima, Development of a new DNA aptamer against

primary cultured tumor endothelial cells by a cell-based SELEX method to discover a new drug delivery system, Abstract No. 3886, AACR annual meeting 2012, McCormick Place, Chicago, Illinois, USA, March 31-April 4, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：トロポニン T と結合する DNA、これを用いた腫瘍組織における血管新生および／または脈管形成抑制剤ならびにこれを用いた細胞内へ目的物質が取り込まれることを促進する剤

発明者：アラ ナズニン，兵藤守，畠山浩人，樋田京子，大賀則孝，原島秀吉

権利者：バイオメッドコア，アラ ナズニン，兵藤守，畠山浩人，樋田京子，大賀則孝，原島秀吉

種類：特願

番号：2012-124073

出願年月日：2012年6月21日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

兵藤 守 (HYODO MAMORU)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号：30548186

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし