

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460146

研究課題名(和文) アプタマー-siRNAを用いたエイズ治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of the anti-AIDS drug using aptamer-siRNA

研究代表者

椛島 力 (KABASHIMA, Tsutomu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：20274673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：HIVプロテアーゼを標的としたsiRNAと、HIVの感染に必須なCD4を認識するDNAアプタマーを連結させた新規核酸分子(DNA aptamer-siRNA: DAS)を開発した。DASの抗HIV効果を調べたところ、DASはCD4+T細胞へ選択的に取り込まれ、HIVプロテアーゼの発現を抑制した。さらに、DASは血清中で比較的安定に存在できた。これらの結果は、DASのHIV治療薬としての可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Novel nucleic acid molecule that combined DNA aptamer and siRNA (DNA aptamer-siRNA: DAS) was developed. DNA aptamer of DAS recognizes the CD4, which is essential for HIV infection, and siRNA of DAS represses the expression of HIV protease. Anti-HIV effects of DAS were examined. DAS was selectively taken into CD4+ T cell, and reduced the expression of HIV protease. Furthermore, DAS was relatively stable in serum. These results indicated that the possibility as the anti-HIV drug of DAS.

研究分野：薬学

キーワード：エイズ HIV アプタマー siRNA プロテアーゼ CD4 変異 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

エイズ (AIDS: acquired immuno deficiency syndrome) は、HIV (human immunodeficiency virus) によって発症するウイルス感染症で、免疫不全を起こし、日和見感染や悪性腫瘍などを発症してくる症候群である。エイズは、結核、マラリアとともに三大感染症に数えられており、感染者数は世界中で 3000-4000 万人と推定されている。また、日本でも新規 HIV 感染者数は、ピーク時からわずかに減少しているものの、ほぼ横ばい状態であり社会的な問題となっている。

HIV は、ウイルス粒子内に 2 本の RNA とプロテアーゼ、逆転写酵素、インテグラーゼなどのウイルス酵素群を含んでおり、これらの酵素は HIV の増殖に必須である。そのため HIV 感染症治療薬として、これら酵素の立体構造や反応機構を基に、基質アナログや酵素阻害剤が開発され、臨床現場で使用されている。2008 年にはインテグラーゼ阻害剤が新たに認可され、現在、HIV 感染症の治療には、これらウイルス酵素阻害剤を複数組み合わせた多剤併用療法が行なわれている。この多剤併用療法によって、エイズの発症は劇的に減少した。しかし、HIV 感染を完治するまでには至っておらず、そのため、HIV 感染では治療薬の使用歴が一般的に長く、さらに、HIV は突然変異を起こしやすいため、薬剤耐性ウイルスの出現や副作用などが臨床問題となっており、別の観点からの治療薬開発が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究は、エイズ治療に貢献することを目的に、エイズの原因である HIV のウイルス酵素を標的として、アプタマー-siRNA を用いた新規抗 HIV 薬を開発するものである。

アプタマーは、特異的に標的分子と結合する能力を持った一本鎖 RNA または DNA であり、標的分子としては、タンパク質複合体のような高分子から金属イオンのような低分子まで、様々な物質を対象とする。これまで、様々なアプタマーの医薬品への応用が試みられており、実際に、血管内皮細胞増殖因子アプタマー (Macugen) が、加齢黄斑変性症治療薬として臨床適応されている。また、RNA 干渉によって特定の遺伝子の発現を抑制できる siRNA は、遺伝子配列の情報のみから設計が可能、化学合成が容易、特異的に遺伝子の発現を抑制するため副作用が低い、などの特徴を有しており、医薬品への応用が期待されている。

そこで本研究では、アプタマーと siRNA を連結した核酸分子 (アプタマー-siRNA) を設計し、これをエイズ治療薬としての適応を試みた。現在、核酸分子の医薬品への応用が試みられているが、標的細胞 (または組織) への輸送方法や生体内での安定性が課題となっている。本研究では、アプタマーによる標的細胞への輸送、血清中での安定性評価を行

い、アプタマー-siRNA のエイズ治療薬としての可能性を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) HIV プロテアーゼの発現を抑制するアプタマー-siRNA の設計

HIV は、T 細胞表面の CD4 に結合し、細胞内に侵入することで感染が成立する。そこで、CD4 を認識する DNA アプタマーに HIV プロテアーゼを標的とした siRNA を連結した DNA アプタマー-siRNA を作製した。このとき、siRNA による標的タンパク質の発現抑制効果は、siRNA の配列によって、大きく異なることが知られていたため、4 種類の siRNA を設計した。

### (2) アプタマー-siRNA の細胞内輸送および安定性の評価

アプタマー-siRNA の細胞内輸送は、フルオレセインで標識したアプタマー-siRNA を培地中に添加し、細胞培養を行い、細胞内に取り込まれたアプタマー-siRNA を蛍光顕微鏡やフルオロメーターによって測定することで評価した。また、同様に、細胞内に取り込まれたアプタマー-siRNA を、電気泳動や HPLC によって分離検出し、その安定性を調べた。さらに、生体内での安定性を調べるために、血清中にアプタマー-siRNA を加え、経時的な分解の程度を電気泳動によって確認した。

### (3) アプタマー-siRNA による HIV プロテアーゼの発現抑制効果の評価

作製したアプタマー-siRNA の HIV プロテアーゼの発現抑制効果は、RT-PCR による mRNA の測定に加え、抗体による免疫検出や活性測定を行い、タンパク質レベルでの発現抑制効果を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) DAS の CD4<sup>+</sup>細胞に選択的な細胞内輸送と血清中での安定性

CD4 を認識する DNA アプタマーに HIV プロテアーゼを標的とした siRNA を連結した DNA アプタマー-siRNA (DAS) を作製した。DAS が細胞膜上の CD4 に結合し、選択的に CD4 を発現している細胞に取り込まれるか調べた。蛍光標識した DAS を CD4<sup>+</sup> T 細胞または CD4<sup>-</sup> T 細胞の培地中に加え、24 時間後の様子を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、CD4<sup>+</sup> T 細胞でのみ蛍光が観察できた (図 1)。この結果は、アプタマーを使用することによって、標的細胞へ選択的に siRNA を輸送できることを示しており、副作用の少ない医薬品の開発が期待できる。

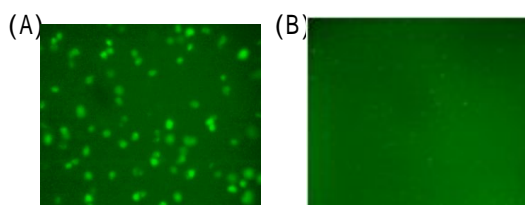


図1 蛍光標識した DAS の CD4<sup>+</sup> T 細胞への選択的な輸送  
A: CD4<sup>+</sup> T 細胞、B: CD4<sup>-</sup> T 細胞

次に、DAS の血清中での安定性を調べた。比較として、既報のアプタマーが RNA である RAS (RNA aptamer-siRNA) の安定性も同時に調べた (図 2)。

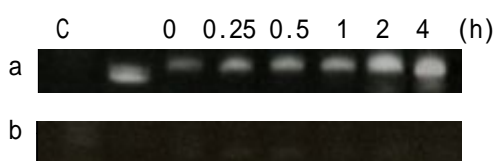


図2 DAS および RAS の血清中での安定性  
a: DAS、b: RAS、C: 未処理

DAS および RAS を血清中で 37°C 加温し、経時的にサンプリングしたのち、電気泳動によって安定性を調べた。その結果、DAS は血清中において約 1 時間は安定に存在していた。一方、RAS は血清と混合後、速やかに分解された。この結果は、アプタマーを DNA に変更することで、血中での安定性が劇的に向上することを示している。

## (2) DAS による HIV プロテアーゼの発現抑制効果

siRNA による標的タンパク質の発現抑制効果は、siRNA の配列によって、大きく異なることが知られている。そこで、配列の異なる 4 種類の siRNA を作製し、それぞれの HIV プロテアーゼに対する発現抑制効果を比較した。各 siRNA と HIV プロテアーゼ遺伝子を同時にトランスフェクションし、HIV プロテアーゼ mRNA 量を real-time PCR によって定量した。その結果、全ての siRNA で発現抑制効果がみられたが、その効果には差があることが分かった。この 4 種類のなかで、最も高い効果を示した siRNA239 を以降の実験に使用した。

siRNA239 と、CD4 を認識する DNA アプタマーを連結させた核酸分子を作製した。このとき、DNA アプタマーと siRNA239 の連結部分の長さを変えた 2 種類の分子 (DAS および DAS-3T) を作製した。DAS および DAS-3T の HIV プロテアーゼの発現抑制効果を、real-time PCR で調べたところ、両分子ともに発現抑制効果を示したが、DAS の方がより高い発現抑制効果を示した。この結果は、アプタマーや siRNA の配列に加えて、連結部分

も考慮することで、より治療効果の高い分子を開発できることを示している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Yin S, Kabashima T, Zhu Q, Shibata T, Kai M, Fluorescence assay of dihydroorotate dehydrogenase that may become a cancer biomarker, *Sci. Rep.*, 査読有、2017、7、40670. DOI: 10.1038/srep40670.

Yin S, Dragusha S, Ejupi V, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Sensitive and selective determination of orotic acid in biological specimens using a novel fluorogenic reaction, *J. Fluoresc.*, 査読有、2015、25、1005-1011. DOI: 10.1007/s10895-015-1584-3

Zhu Q, Yu Z, Kabashima T, Yin S, Dragusha S, El-Mahdy AF, Ejupi V, Shibata T, Kai M, Fluorometric assay for phenotypic differentiation of drug-resistant HIV mutants, *Sci. Rep.*, 査読有、2015、5、10323. DOI: 10.1038/srep10323.

Azam MG, Yamasuji M, Krawczyk T, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Chemiluminescence-imaging detection of DNA on a solid-phase membrane by using a peroxidase-labeled macromolecular probe, *Talanta*, 査読有、2015、139、138-142. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.03.005.

El-Mahdy AF, Ejupi V, Shibata T, Kabashima T, Lu J, Kai M, Facile preparation of streptavidin-coated sephadex beads and their application to chemiluminescence detection of a target DNA, *Microchimica Acta*, 査読有、2015、182、495-503. DOI: 10.1007/s00604-014-1348-9

Yasmin H, Rahman MS, Shibata T, Kabashima T, Kai M, Sensitive and selective determination of peptides, PG and PGP, using a novel fluorogenic reagent 4-chlorobenzene-1,2-diol, *Chemical Papers*, 査読有、2015、69、504-509. DOI: 10.1515/chempap-2015-0057.

El-Mahdy AF, Shibata T, Kabashima T, Zhu Q, Kai M, Delivery of siRNA using siRNA/cationic vector complexes encapsulated in dendrimer-like polymeric DNAs, *RSC Adv.*, 査読有、2015、5、32775-32785. DOI: 10.1007/s10895-015-1584-3.

Ejupi V, Dragusha S, Kabashima T, Zhu Q, El-Mahdy AF, Yin S, Shibata T, Kai M, Spectrofluorometric assays of human collagenase activity using native collagen and acetyl-peptide substrates, *Advances in Enzyme Research*, 査読有、2015、3、19-29. DOI: 10.4236/aer.2015.31003.

Yasmin H, Kabashima T, Rahman MS, Shibata T, Kai M, Amplified and selective

assay of collagens by enzymatic and fluorescent reactions, Sci. Rep., 査読有、2014、4、4950. DOI: 10.1038/srep04950.

Yasmin H, Rahman MS, Shibata T, Kabashima T, Kai M, A Novel Fluorometric Method for the Selective Determination of Pro-Gly and Pro-Gly-Pro, J. Pept. Res. Ther., 査読有、2014、20、441-446. DOI: 10.1007/s10989-014-9406-z.

〔学会発表〕(計 17 件)

島村亮裕、ウラシル特異的蛍光反応を用いた尿中ウラシルの HPLC 定量法、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24-27 日、東北大学(宮城県・仙台市)

大島澄佳、新規蛍光反応を用いた DNA 中のシトシン定量法の開発、第 32 回日本薬学会九州支部大会、2016 年 12 月 2-3 日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

柴田孝之、簡便かつ高選択的な新規アミノ酸呈色法、新アミノ酸分析研究会第 6 回学術講演会、2016 年 11 月 4 日、東京大学(東京都・文京区)

柴田孝之、PD 欠損症のスクリーニング検査を指向した尿中ウラシル濃度の蛍光定量法、日本分析化学会第 65 年会、2016 年 9 月 14-16 日、北海道大学(北海道・札幌市)

大島澄佳、新規蛍光反応による DNA 中のメチル化シトシン定量法の開発、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26-29 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

柴田孝之、ペプチドの新規蛍光検出反応および HPLC によるヒストン修飾部位の解析、新アミノ酸分析研究会第 5 回学術講演会、2015 年 12 月 7 日、東京大学(東京都・文京区)

安達杏奈、DNA アプタマーの HER2 発現細胞への導入、第 32 回日本薬学会九州支部大会、2015 年 11 月 28-29 日、九州保健福祉大学(宮崎県・延岡市)

陣内伸俊、プリオンタンパク質の加熱処理によるプロテアーゼ抵抗性への影響、第 32 回日本薬学会九州支部大会、2015 年 11 月 28-29 日、九州保健福祉大学(宮崎県・延岡市)

田上奈緒美、新規蛍光反応によるヒストン修飾解析法の開発、第 32 回日本薬学会九州支部大会、2015 年 11 月 28-29 日、九州保健福祉大学(宮崎県・延岡市)

Sheng Yin、Fluorometric assay of dihydroorotate dehydrogenase activity and orotic acid concentration in a cell lysate, 日本分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 9-11 日、九州大学(福岡県・福岡市)

Valon Ejupi、Collagenase activity and its stimulation in cultured cells by spectrofluorometric evaluation, 日本分析化学会第 64 年会、2015 年 9 月 9-11 日、九州大学(福岡県・福岡市)

安達杏奈、DNA アプタマー-siRNA による HIV

プロテアーゼの発現抑制効果、第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2015)、2015 年 8 月 21-23 日、長崎大学(長崎県・長崎市)

椛島力、3,4-DHPAA 蛍光反応の新規プロリダーゼ活性測定法への応用、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25-28 日、神戸サンボホール(兵庫県・神戸市)

川島歌織、ペプチドに特異的な蛍光反応を用いた HIV/HCV 識別法の開発、第 31 回日本薬学会九州支部大会、2014 年 12 月 6-7 日、第一薬科大学(福岡県・福岡市)

曾宮実和子、3,4-DHPAA を用いた新規プロリダーゼ活性測定法の開発、第 31 回日本薬学会九州支部大会、2014 年 12 月 6-7 日、第一薬科大学(福岡県・福岡市)

尹晟、Dihydroorotate dehydrogenase assay using a specific fluorescence reaction, 日本分析化学会第 63 年会、2014 年 9 月 17-19 日、広島大学(広島県・東広島市)

Valon Ejupi、Assay of collagenase activity in human cells using a novel fluorescence reaction, 日本分析化学会第 63 年会、2014 年 9 月 17-19 日、広島大学(広島県・東広島市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: アミノ酸およびペプチドの検出方法ならびに検出試薬

発明者: 甲斐雅亮、椛島力、柴田孝之

権利者: 長崎大学

種類: 特願

番号: 2016-14936

出願年月日: 2016 年 1 月 28 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/function/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椛島力(KABASHIMA, Tsutomu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号: 20274673

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

甲斐 雅亮(KAI, Masaaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・教授  
研究者番号：00160953

柴田 孝之（SHIBATA, Takayuki）  
長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・助教  
研究者番号：10448491

(4)研究協力者

島村 亮裕（SHIMAMURA, Ryosuke）

大島 澄佳（OOSHIMA, Sumika）

安達 杏奈（ADACHI, Anna）

陣内 伸俊（JINNOUCHI, Nobutoshi）

田上 奈緒美（TANOUE, Naomi）

川島 歌織（KAWASHIMA, Kaori）

曾宮 実和子（SOMIYA, Miwako）

尹 晟（YIN, Sheng）

Ejupi Valon（EJUPI, Valon）