

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630432

研究課題名(和文)細胞環境応答性アプタマー(PARCEL)を用いる新規薬剤放出システムの構築

研究課題名(英文)Development of DDS system based on the intracellular environment responsive aptamers

## 研究代表者

南川 典昭(MINAKAWA, Noriaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：40209820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内酸化還元環境に応答するDNAアプタマー～PARCEL(Practical Aptamer Responding to CELLular Environment)～を用いる薬剤放出システムの開発を目的とした。これを実現するために、2'-デオキシ-4'-セレノチミジンの三リン酸体(SeTTP)を合成した。得られた三リン酸体を用いて、PCRを検討した。その結果、KOD dash DNAポリメラーゼを用い、DMSO添加の条件下、PCRが効率よく進行することを見出した。これによりPARCELを獲得可能な条件を見出すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this work, we aimed to develop a novel DDS system based on the intracellular environment responsive aptamers, called PARCEL (Practical Aptamer Responding to CELLular Environment). In order to complete this project, we prepared 2'-deoxy-4'-selenothymidine 5'-triphosphate (SeTTP). Using the resulting SeTTP, PCR was investigated. As a result, PCR went well when KOD dash DNA polymerase was used in the presence of DMSO. Accordingly, we confirmed the conditions to obtain the desired PARCEL.

研究分野：核酸化学

キーワード：アプタマー 薬剤放出システム ヌクレオシド 細胞環境応答

1. 研究開始当初の背景

薬剤の活性発現の時空間制御は活性の増強や副作用の軽減に必要不可欠であり、様々な薬剤送達技術 (DDS) が報告されている。しかし、薬剤の徐放性やキャリアの生体適合性などの点で課題は多く、依然として改良の余地がある。

2. 研究の目的

DDS キャリアの全く新しい素材として、DNA アプタマー (低分子化合物・タンパク質などのリガンドと特異的に結合する DNA) に着目した。DNA アプタマーは、リガンド (薬剤) との強いアフィニティを示すことから薬剤を保持する素材として適している。また、生体適合性も高いことから、DDS キャリアとしての潜在能力は非常に高い。しかし、保持した薬剤を必要に応じて放出させるシステムの構築が必要である。そこで新規 1,2-ジチアンヌクレオシドを考案した。この 1,2-ジチアンヌクレオシドは、酸化還元環境に応じてジスルフィド型とジチオール型の構造をとると予想される。一般的にがん細胞は通常細胞と比べて酸化環境にあると考えられている。従って、これをアプタマー内に導入することにより、細胞内環境に応じたアプタマーの構造変化を誘起し、それに伴う薬剤放出の時空間制御が可能になると考えた。

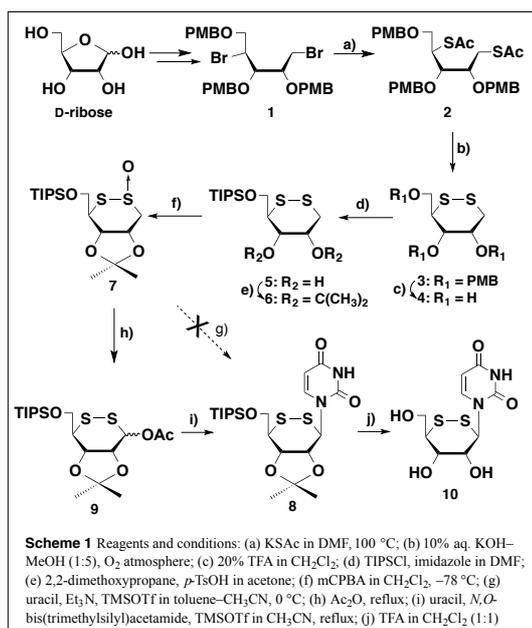
3. 研究の方法

本研究課題を達成するために、1) DNA ポリメラーゼの基質となる 4-デオキシ-1,2-ジチアンヌクレオシドの三リン酸体を合成し、その三リン酸体をオリゴマー中に取り込む酵素のスクリーニング、2) 還元環境でドキシソルピシン (DOX) を保持し、酸化環境では DOX を放出するアプタマー (PARCEL; Practical Aptamer Responding to Cellular Environment) を、*in vitro* selection 法で獲得、3) PARCEL の酸化還元環境に応じた DOX 放出を *in cellulo* および *in vivo* で検討、を順次行ない、PARCEL の獲得を目指す。

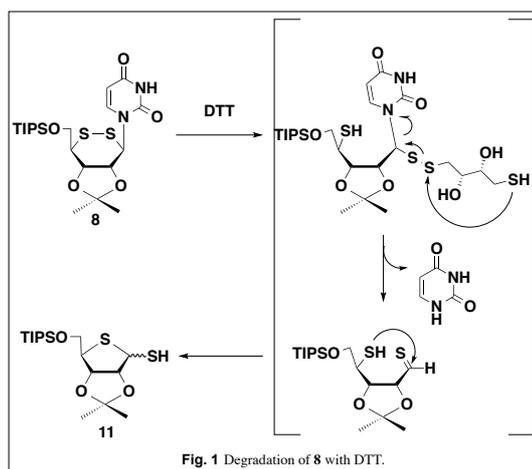
4. 研究成果

(1) 4-デオキシ-1,2-ジチアンヌクレオシド三リン酸体の合成: まず細胞環境応答性の核酸素子として 4-デオキシ-1,2-ジチアンヌクレオシドを合成した (Scheme 1)。D-リボースを出発原料として既知の方法に従ってジブromo体 **1** を合成した。これをチオ酢酸カリウムと反応させ化合物 **2** へと導いた。化合物 **2** を酸素雰囲気下でアルカリ処理したところ、アセチル基の除去を介して 1,2-ジチアン体 **3** が得られた。水酸基の保護基を適切に変更したのち (化合物 **6**)、mCPBA で酸化したところ、1位の硫黄原子のみが酸化された化合物 **7** が得られた。この化合物 **7** を用いてウラシル塩基存在下、Pummerer 反応を行なったが望みとするカップリング体 **8** を得ることができなかった。そこで **7** を無水酢酸中で加熱し、アセトキシ体 **9** へと変換したのち、Vorbruggen 反応の条件に付したところ **8** を 37% の収率で得ることができた。最

後に酸性条件下保護基を除去し、目的とした化合物 **10** の合成を達成した。



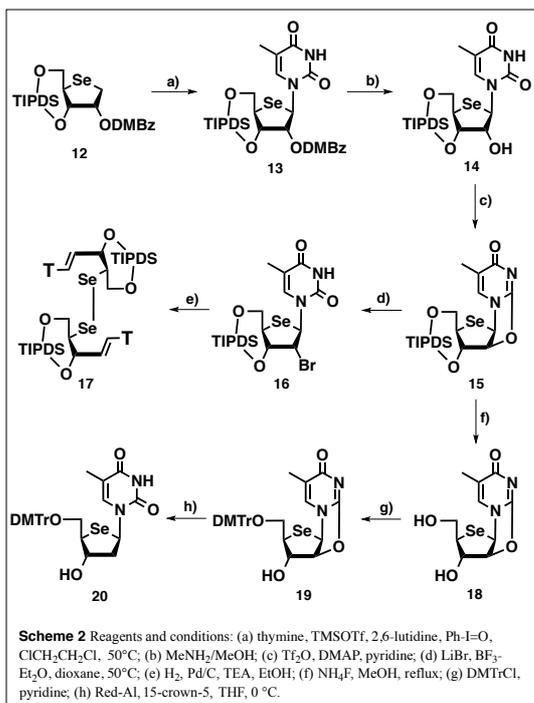
得られた化合物 **10** を続いて三リン酸体に導く検討を行なった。しかし望みとする化合物を得ることができなかった。その原因として **10** のジスルフィド結合が反応条件下開裂することが要因と考えられた。そこで保護体 **8** をジチオスレート (DTT) と反応させジスルフィド結合が開裂すると引き続いてどのような反応が起こるかを検証した。その結果、ジスルフィド結合の開裂に伴ってウラシル塩基の脱離が速やかに進行し、チオ糖 **11** が生成することが明らかとなった (Fig. 1)。



(2) 新たな細胞環境応答型核酸素子としての 4'-セレンチミジン三リン酸体の合成: セレン原子は周期表において酸素、硫黄原子と同族元素である。すでに我々は、ヌクレオシド糖部 4' 位を硫黄原子に置き換えた 4'-チオ核酸類が天然型核酸と高い生物学的等価性を示すことを明らかにしている。従って、同族元素である 4'-セレン核酸にも同様な効果が期待される。また容易に酸化-還元されることから、細

胞環境に応じて構造変化可能な核酸素子になり得ると期待した。

まずヌクレオシドユニットである 4'-セノチミジン誘導体 **20** の合成を検討した。第一のアプローチとして 2-デオキシ-4-セノ糖とチミン塩基とのカップリングを種々検討したが、得られる生成物は、 $\alpha$  体と  $\beta$  体の混合物である上、カップリング収率も極めて低かった。そこでリボ体を合成した後に 2' 位の水酸基をデオキシ化するアプローチを検討することにした (Scheme 2)。

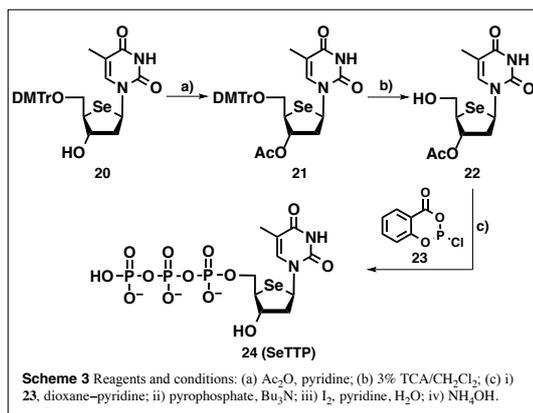


4-セノ糖 **12** を用いて、我々が開発した超原子価ヨウ素を用いてチミン塩基との Pummerer 反応を行なった。その結果、4'-セノリボチミジン体 **13** を収率 60% で  $\beta$  選択的に得ることができた。化合物 **13** の 2' 位保護基を除去した後、トリフルオロメタンスルホン酸無水物と処理することで 2,2'-アンヒドロ体 **15** へと導いた。続いて **15** をルイス酸存在化、臭化リチウムと処理し 2'-ブromo体 **16** を得た。この 2' 位臭素原子を還元できれば望みとする 4'-セノチミジン誘導体が合成できる。しかし、還元反応を種々検討したが、目的化合物は全く得られず、臭素原子の還元に伴って C-Se 結合が開裂、さらに二量化までもが進行した化合物 **17** が主生成物として得られる結果となった。

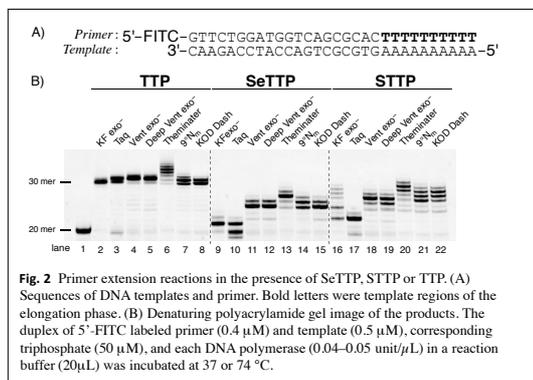
そこで 2,2'-アンヒドロ体からヒドリド還元反応を検討することにした。化合物 **17** の糖部保護基を除去し、**18** とした後、5' 位水酸基のみを DMTr 化し化合物 **19** を得た。この **19** に対して種々ヒドリド還元を試みたところ、Red-Al を還元剤として用いた場合にのみ望みとする 4'-セノチミジン誘導体 **20** を得ることに成功した。この方法は、核酸塩基とのカップリングにおいて立体異性体の生成を考慮する必要がなく、

還元剤をさらに精査できれば、2'-デオキシ-4'-セノヌクレオシド誘導体の優れた合成法になり得ると考えられる。

続いて、得られた **20** を 4'-セノチミジン三リン酸 (**24**; SeTTP) へと変換した (Scheme 3)。即ち、化合物 **20** の 3' 位水酸基をアセチル化し **21** とした後、5' 位 DMTr 基を除去し三リン酸化の基質 **22** とした。続いて **22** をサリチルホスホリルクロリド (**23**) と反応させた後、ピロリン酸のトリブチルアミン塩を作用させ、引き続いてヨウ素によるリン原子の酸化、アンモニア水による加水分解を経て SeTTP (**24**) を合成した。



(3) SeTTP を用いた DNA ポリメラーゼのスクリーニング: 新規細胞環境応答型核酸素子である SeTTP (**24**) の合成が完了したので、続いてこの化学修飾三リン酸体を効率よく取り込む DNA ポリメラーゼのスクリーニングを行なった。Fig. 2A に示したように 5'-FITCラベルしたプライマー鎖 (20 mer) とテンプレート鎖 (30 mer) からなる二本鎖 DNA に対して SeTTP 存在下で鎖伸長反応を行ない、最も効率よく SeTTP を取り込む DNA ポリメラーゼを探索した。検討に用いた DNA ポリメラーゼは、A ファミリーに属する Taq ポリメラーゼならびに B ファミリーに属する Vent、Deep Vent、Therminator、9°Nm ならびに KOD Dash DNA ポリメラーゼで、比較対象として天然型の TTP ならびに 4'-チオチミジン三リン酸 (STTP) についても実験を行なった (Fig. 2B)。



その結果、TTP を用いた場合にはいずれの条件でも完全鎖長に対応するバンドが観察さ

れた。それに対して SeTTP の場合、A ファミリーに属する Taq ポリメラーゼでは全く鎖伸長が起こらなかった。それに対して B ファミリーに属する DNA ポリメラーゼでは鎖伸長が観察された。但し、ゲル電気泳動の結果からも明らかのように完全鎖長にまで伸長したバンドは観察されなかった。しかし SeTTP で得られた結果は、STTP の結果と遜色ないものであった。すでに我々は、STTP が天然型 TTP と同様に PCR の良い基質となり効率よく増幅産物を与えることを明らかにしている。従って、Fig. 2 に示したように連続して 10 残基の導入は困難であっても SeTTP 存在下でも PCR が進行するのではないかと考えた。

(4) SeTTP 存在下での PCR の検討: Fig. 2 の実験結果から、SeTTP は B ファミリーに属する DNA ポリメラーゼの良い基質になることが示された。そこで次に PCR による増幅が可能であるかを検討した。PCR による増幅では、SeTTP のプライマー鎖への取り込みだけでなく、SeTTP が取り込まれた DNA 鎖を鋳型として相補的な dATP が取り込まれる必要があり、酵素反応としての要求度は鎖伸長反応より遥かに高い。しかし PARCEL を獲得するためには、この PCR による増幅が必要不可欠である。

まずごく一般的な条件(伸長時間 30s, 40 cycles)を用いて PCR を行なった。PCR 効率の評価は 87 mer のテンプレート鎖と 2 本のプライマー鎖から得られる 104 bp の増幅産物量を定量することによって行なった。またこの場合も、比較として TTP と STTP についても検討した。

その結果、STTP の増幅効率は TTP のそれと比較して <40% となり、検討した DNA ポリメラーゼの中では KOD Dash DNA ポリメラーゼが最良の結果を与えた。一方、SeTTP 存在下ではいずれの条件でも PCR 産物はほとんど得られなかった (Fig. 3)。

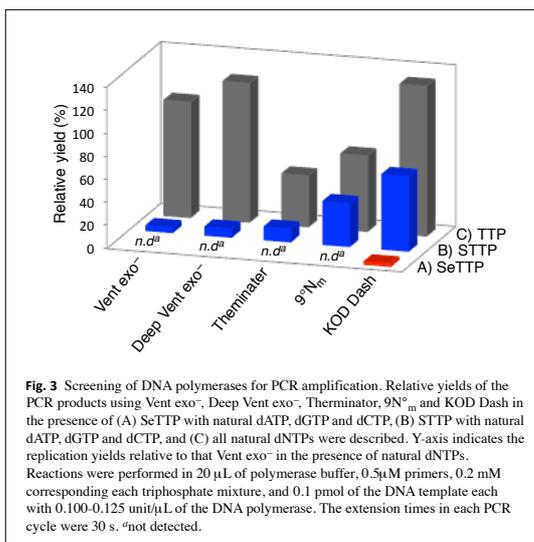


Fig. 3 Screening of DNA polymerases for PCR amplification. Relative yields of the PCR products using Vent exo<sup>-</sup>, Deep Vent exo<sup>-</sup>, Terminator, 9N<sup>+</sup>, and KOD Dash in the presence of (A) SeTTP with natural dATP, dGTP and dCTP, (B) STTP with natural dATP, dGTP and dCTP, and (C) all natural dNTPs were described. Y-axis indicates the replication yields relative to that Vent exo<sup>-</sup> in the presence of natural dNTPs. Reactions were performed in 20  $\mu$ L of polymerase buffer, 0.5  $\mu$ M primers, 0.2 mM corresponding each triphosphate mixture, and 0.1 pmol of the DNA template each with 0.100-0.125 unit/ $\mu$ L of the DNA polymerase. The extension times in each PCR cycle were 30 s. \*not detected.

そこで PCR の反応条件(伸長時間や添加剤)を検討した。その結果、1サイクルの反応

時間を 30 秒から 20 分に延長し、さらに 5% の DMSO を添加剤として用いた場合に PCR の増幅産物量が劇的に向上することが明らかとなった (Fig. 4)。これにより PARCEL を獲得するための PCR 条件を確立できた。

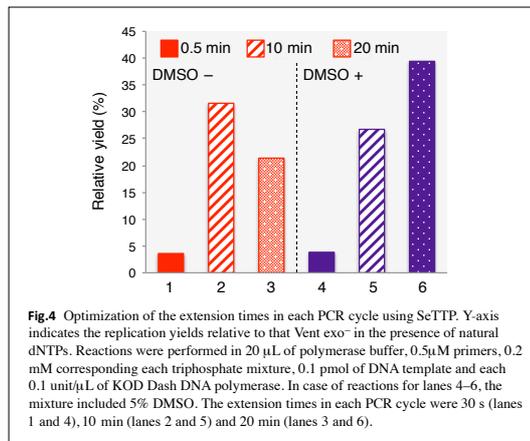


Fig. 4 Optimization of the extension times in each PCR cycle using SeTTP. Y-axis indicates the replication yields relative to that Vent exo<sup>-</sup> in the presence of natural dNTPs. Reactions were performed in 20  $\mu$ L of polymerase buffer, 0.5  $\mu$ M primers, 0.2 mM corresponding each triphosphate mixture, 0.1 pmol of DNA template and each 0.1 unit/ $\mu$ L of KOD Dash DNA polymerase. In case of reactions for lanes 4-6, the mixture included 5% DMSO. The extension times in each PCR cycle were 30 s (lanes 1 and 4), 10 min (lanes 2 and 5) and 20 min (lanes 3 and 6).

(5) おわりに:我々は、細胞環境に応答して薬剤を放出するシステムとして PARCEL を考案し、そのヌクレオシド素子として 4'-デオキシ-1,2-ジチアンヌクレオシドを設計した。ヌクレオシドユニットの合成は達成できたものの、それを三リン酸体へと誘導することはできなかった。そこで新たなヌクレオシド素子として 4'-セレノチミジン三リン酸 (SeTTP) を考案した。この三リン酸体は、B ファミリーに属する DNA ポリメラーゼの良い基質となり、鎖伸長反応において取り込まれるだけでなく、SeTTP 存在下 PCR による増幅も可能であることが明らかとなった。現在、ランダム配列を有するテンプレート鎖を調製し、これを用いて SeTTP 存在下で PCR を行なっている。今後、さらに調製した 4'-セレノ DNA ライブラリーを用いて SELEX を行ない DOX に対するアプタマーの獲得、続く細胞環境に応答した DOX の放出についての検討を行なっていきたい。

## 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 1 件)

① Noriko Tarashima, Tatsuya Sumitomo, Hidenori Ando, Kazuhiro Furukawa, Tatsuhiro Ishida, Noriaki Minakawa, Synthesis of DNA fragments containing 2'-deoxy-4'-selenonucleoside units using DNA polymerases: comparison of dNTPs with O, S and Se at the 4'-position in replication. *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13, 6949–6952. (査読有) (doi: 10.1039/c5ob00941c)

[学会発表] (計 1 件)

① Tadashi Miyazawa, Noriko Tarashima, Kazuhiro Furukawa, Noriaki Minakawa, Synthesis and properties of a novel 1,2-dithianenucleoside. 2014.11/5-11/7、第 41 回国際核酸化学シンポジウム、北九州国際

会議場、福岡県北九州市

[その他]

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/mar/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南川 典昭 (MINAKAWA Noriaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：40209820

### (2) 研究分担者

古川 和寛 (FURUKAWA Kazuhiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号：00644999