

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870594

研究課題名(和文) DNAナノチューブの遺伝子導入剤および抗がん剤キャリアーとしての応用

研究課題名(英文) DNA nanotube applications for gene and drug delivery

研究代表者

秋山 元英 (Akiyama, Motofusa)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：90467697

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)：鋳型内交互積層法により、DNAとポリエチレンイミンを階層成分とするナノチューブの合成に成功した。DNAナノチューブには、抗がん剤ドキソルビシン(Dox)を効率高く導入することが可能であった。Doxを導入したDNAナノチューブは細胞内に取り込まれ、Dox溶液よりも高い抗がん活性を示した。さらに、GFP発現ベクタープラスミドDNAとPEIからなるナノチューブを細胞導入したところ、細胞内において明確なGFPの蛍光が観察された。以上の結果より、DNAナノチューブは薬物キャリアーや遺伝子導入剤として応用可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Nanotubes (NTs) composed of DNA and polyethyleneimine were synthesized by alternating layer-by-layer assembly method using nanoporous polycarbonate membrane as a template. Doxorubicin (Dox), a DNA intercalating anticancer drug, can be loaded into the DNA layers of the NTs with high density. Dox-loaded DNA NTs were incorporated into the cancer cells and clearly showed anticancer activity. This activity was drug dose-dependent and slightly higher than that of Dox solution. Moreover, DNA NTs, prepared by using a plasmid DNA vector, successfully delivered the GFP (green fluorescent protein) gene into mammalian cells.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：ナノチューブ ドラッグキャリアー 遺伝子導入 交互積層 DNA構造体

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)有機ナノチューブ

近年、中空シリンドラー構造を持つ有機ナノチューブは、ナノリアクター、ドラッグキャリアー、分子捕捉剤といった様々な応用が期待される有望なナノ材料として注目を集めている。産総研の亀田らは、糖脂質やその誘導体の自己集積能を制御することでナノチューブを合成している<sup>1)</sup>。また、C. R. Martinらは、鋳型に30塩基の1本鎖DNAを交互にハイブリダイゼーションしていくことでDNAナノチューブが合成できることを報告しているが、この手法で用いるDNAの鎖長は短く、配列の自由度もないため、望みの長さや配列を持つDNAを内包させるのは困難であった<sup>2)</sup>。また、合成DNAを用いるためコストが高く、ナノ材料としての応用が難しいという問題もあった。一方、中央大学の小松らは鋳型内交互積層法による蛋白質ナノチューブの合成法を開発し、その階層成分を変えることで酵素活性やウイルス捕捉能など、様々な機能を付与することに成功している<sup>3-5)</sup>。

### (2)抗がん剤キャリアーとしてのDNA

抗がん剤には、染色体DNAに結合することで薬効を発揮するものが存在しており、DNAをこの様な抗がん剤のキャリアーとして応用する研究が盛んに行われている。Y. Huangらは、アプタマーによりがん細胞指向性を付与した金ナノ粒子にDNA-ドキシソルビシン(Dox)の複合体を結合した、がん細胞特異的な抗がん剤キャリアーを創製している<sup>6)</sup>。また、B. Dingらは、3次元構造体DNA折り紙がDoxのキャリアーとして機能し、がん細胞に対して抗がん作用を発揮することを報告している<sup>7)</sup>。これらの研究において、キャリアーDNAに結合したDoxは、がん細胞に取り込まれた後に放出され、高い抗がん作用を示すことが既に明らかにされている。

## 2. 研究の目的

蛋白質ナノチューブは、構成成分の静電的相互作用を駆動力にした鋳型内交互積層法により合成している。DNAは強い負電荷を有することから、同手法を用いることで同様にDNAナノチューブを合成できるのではないかと考えた。実際、サケ精液由来のDNAを用いることで、鋳型内交互積層法によりDNAナノチューブを得ることができた。申請者が合成したDNAナノチューブは、DNAとポリカチオンとの静電相互作用により積層していることから、DNA配列や長さに制限はなく、遺伝子発現ベクターなどを用いることができる。さらには、各層に異なるDNAを積層させることも可能である。また、DNAナノチューブのポリカチオンには、遺伝子や薬剤の細胞導入に利用されているポリエチレンジアミン(PEI)を使用しており、効率的な細胞導入が期待される。すなわち、細胞に取り込まれやすいポリカチオンを最外層に配置し、複数のDNA層を含むナノチュ

ーブを用いれば、高濃度かつ高効率でDNA結合性抗がん剤や遺伝子DNAを細胞に作用させることが可能であると考えられる。

本研究は、DNAナノチューブを合成し、DNA結合性抗がん剤のキャリアーや遺伝子の細胞導入剤として応用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)鋳型内交互積層法による(PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub>ナノチューブの合成と形態観察

孔径400nmの多孔性ポリカーボネート(PC)膜に、PEI(Mw: >750,000, 20mg/mL)のリン酸緩衝(PB)溶液(pH 7.1, 10mM)10mLとサケ精液由来のDNA(500-1,000bp, 1.0mg/mL)のPB溶液(pH 7.1, 10mM)10mLを交互に通過させた。この操作を3回繰り返すことで、PC膜の内孔表面に(PEI/DNA)<sub>3</sub>交互積層膜を作製した。(PEI/DNA)<sub>3</sub>を積層したPC膜をDoxのPB溶液(250μM)に浸し、室温で1時間回転撹拌した。純水による洗浄後、PC膜の溶解および凍結乾燥することで(PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub>ナノチューブを合成した。ナノチューブの形態観察は、走査型電子顕微鏡(SEM)により行った。また、Dox導入量はDox溶液の紫外可視吸収スペクトルを測定し、480nmにおける吸収の減少率より算出した。

### (2)(PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub>ナノチューブの抗がん活性と細胞取り込み

$2.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の密度で播種し18時間培養したヒト子宮頸がん由来のHeLa細胞を、(PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub>ナノチューブ([Dox]=0.5-10μM)で24, 48時間処理した。その後、WST-8 assayにより細胞生存率を算出した。比較対照として同濃度のDox溶液および(PEI/DNA)<sub>3</sub>ナノチューブでも実験を行った。さらに、最内層にのみDNAを積層した(PEI/HSA)<sub>2</sub>PEI/DNA-Doxナノチューブでも同様に細胞を48時間処理した。

また、(PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub>ナノチューブ([Dox]=2.5μM)で24時間処理したHeLa細胞を、蛍光色素DiD(λ<sub>ex</sub>/λ<sub>em</sub>=648/670)で細胞膜を染色後、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)により観察した。

### (3)(PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub>ナノチューブからのDox放出

37°CでpHが5.5, 6.0, 7.4となるよう調整した20mMトリスマレイン酸緩衝溶液に、(PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub>ナノチューブをDox濃度が5.0μMとなるように分散し、37°Cで3時間静置した。遠心分離(16,000g, 20min)によりナノチューブを沈殿させ、上清の蛍光スペクトルを測定した。濃度既知のDox溶液を用いて検量線を作成し、590nmにおける蛍光強度よりナノチューブから解離したDoxの濃度を算出した。

### (4)Plasmid DNAを用いたナノチューブの合成と細胞導入

孔径 400 nm の PC 膜に PEI の PB 溶液 10 mL と、サケ精液由来の DNA の PB 溶液 10 mL を交互に 2 回ずつ通過させた。再度 PEI の PB 溶液を通過させた後、細胞膜局在型 GFP 発現ベクター-plasmid DNA (pAcGFP1-Mem; plasmid) の PB 溶液 (10 mM, pH 7.1) 10 mL を通過させ、PC 膜を溶解後に凍結乾燥することで (PEI/DNA)<sub>2</sub>PEI/plasmid ナノチューブ合成した。また、同様の手順で分子量 25,000 の PEI (PEI<sub>25k</sub>) の PB 溶液と、plasmid の PB 溶液を用いることで (PEI<sub>25k</sub>/plasmid)<sub>3</sub> ナノチューブを合成した。

HeLa 細胞を  $1.8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し 18 時間培養した後、ナノチューブ ( $1.1 \times 10^8$  本相当) で 2 日間処理した。PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde の PBS 溶液で細胞を固定し、CLSM を用いて観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 鋳型内交互積層法による (PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub> ナノチューブの合成と構造解析

ナノチューブの形態観察を SEM により行ったところ、長さは約 9 μm、外径は約 400 nm であり、鋳型に用いた PC 膜の厚さおよび孔径と一致した (図 1)。また、管壁厚は 59.1 nm であった。比較対照としてヒト血清アルブミン (HSA) を用いて合成した (PEI/HSA)<sub>4</sub> ナノチューブの管壁厚は 40.4 nm であった。これまでの蛋白質ナノチューブの結果から HSA 層は 8.0 nm と見積られるため、PEI 層の厚さは 2.1 nm、さらにこの値より算出した DNA 層の厚さは 17.6 nm となった。

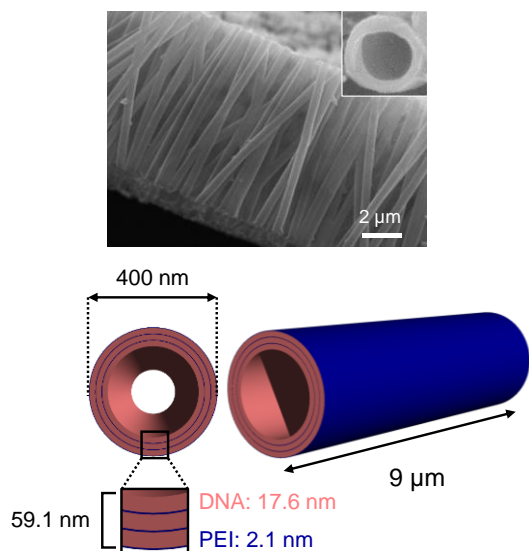


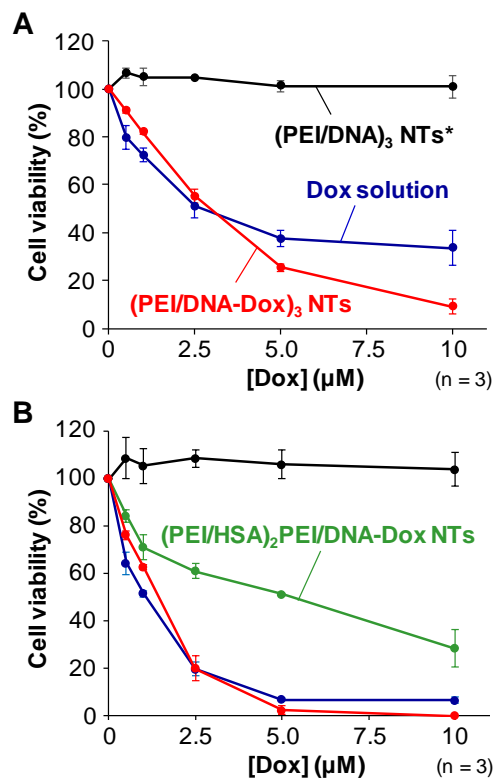
図 1. ナノチューブの SEM 像とその構造

(PEI/DNA)<sub>3</sub> 積層膜への Dox 導入量を算出した結果、PC 膜 1 枚当たり 216 nmol の Dox が結合することが明らかとなった。また、最内層以外の DNA を HSA に変えた (PEI/HSA)<sub>2</sub> PEI/DNA を作製し、同様に Dox 導入量を算出したところ、その値は約 1/3 に低下した。な

お、全ての DNA 層を HSA に変えた (PEI/HSA)<sub>3</sub> では、Dox は全く導入されなかった。DNA 層の層数依存的な導入量の変化が見られたことより、ナノチューブにおいて Dox は DNA と結合していることが確認された。また、水中に分散させたナノチューブ 1 本の体積内 Dox 濃度を算出した結果、約 580 mM と極めて高いことが明らかとなった。

##### (2) (PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub> ナノチューブの抗がん活性と細胞取り込み

*In vitro* において (PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub> ナノチューブは Dox 溶液に比べ高い抗がん活性を示した (図 2A)。一方、(PEI/DNA)<sub>3</sub> ナノチューブは細胞毒性を全く示さなかった。また、(PEI/HSA)<sub>2</sub>PEI/DNA-Dox ナノチューブで細胞を 48 時間処理したところ、その活性は (PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub> ナノチューブに比べ低下した (図 2B)。このことから、Dox 導入量が多いナノチューブほど高い抗がん活性を発揮することが明らかとなった。



\* Same number of NTs as (PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub>

図 2. (PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub> ナノチューブの抗がん活性

CLSM 観察を行った結果、ナノチューブおよび細胞の核において Dox の蛍光が観察された (図 3)。また、三次元解析より、(PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub> ナノチューブは細胞膜に包まれながら取り込まれていることが明らかとなった。ナノチューブはエンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれると考えられる。

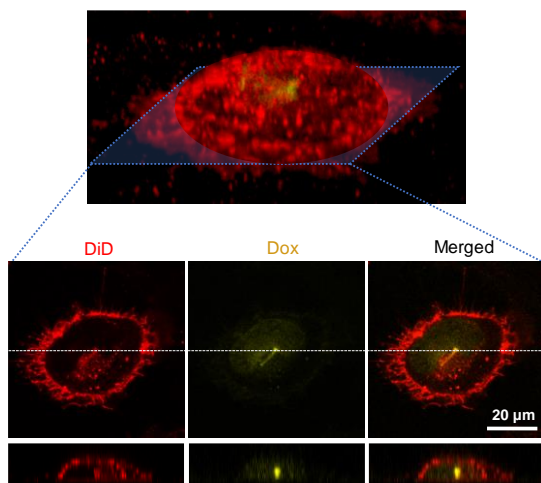


図 3. HeLa 細胞による (PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub> ナノチューブの取り込み

### (3) (PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub> ナノチューブからの Dox 放出

細胞が物質を取り込む過程であるエンドサイトーシスにおいて、取り込まれた物質はエンドソーム (pH 6.0–6.5) やリソソーム (<pH 5.5) という酸性環境下の細胞内小器官へと輸送される。そこで、これらの pH におけるナノチューブからの Dox の放出量を調べた結果、細胞外の pH 7.4 に比べ、pH 5.5 および 6.0 では Dox の放出が促進されることがわかった (図 4)。これらの結果より、ナノチューブは細胞内に取り込まれ、Dox を放出することで高い抗がん活性を発揮することが明らかとなった。

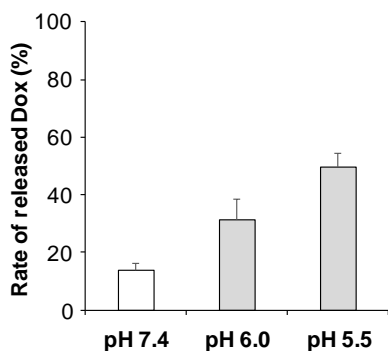


図 4. (PEI/DNA-Dox)<sub>3</sub> ナノチューブからの pH 依存的な Dox 放出

### (4) Plasmid DNA を用いたナノチューブの合成と細胞導入

最内層に plasmid DNA を積層した (PEI/DNA)<sub>2</sub>PEI/plasmid ナノチューブを合成し SEM により形態観察を行った。その結果、均一な中空シリンダー構造のナノチューブが観測された。得られたナノチューブの長さは 9 μm、外径は 402 nm であり、PC 膜の厚さおよび孔径と一致した。また管壁厚は、65.0 nm であった。この値は、(PEI/DNA)<sub>3</sub> ナノチューブの管壁厚 59.1 nm よりも高い値となっており、plasmid が最内層に積層されていることが示唆された。また、PEI 層の厚さが 2.1 nm、

DNA 層の厚さが 17.6 nm と見積もられることから、plasmid 層の厚さは 23.5 nm と算出された。

得られた (PEI/DNA)<sub>2</sub>PEI/plasmid ナノチューブを用いて HeLa 細胞への導入実験を行った。CLSM 観察において、(PEI/DNA)<sub>2</sub>PEI/plasmid ナノチューブが細胞に結合している様子が観察されたが、GFP の蛍光は検出されなかった (図 5A)。一方、PEI<sub>25k</sub> を用い合成した (PEI<sub>25k</sub>/plasmid)<sub>3</sub> ナノチューブで処理した細胞では、明確な GFP の蛍光が観察された (図 5B)。これらの結果から、(PEI<sub>25k</sub>/plasmid)<sub>3</sub> ナノチューブが遺伝子導入剤として機能することが明らかとなった。

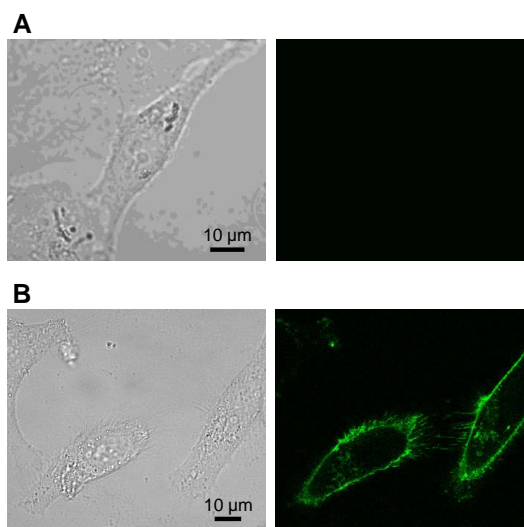


図 5. ナノチューブによる GFP 遺伝子の導入

### <引用文献>

- 1) K. Ishikawa, N. Kameta, M. Aoyagi, M. Asakawa, T. Shimizu, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 1677–1683.
- 2) S. Hou, J. Wang, C. R. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8586–8587.
- 3) X. Qu, G. Lu, E. Tsuchida, T. Komatsu, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10303–10308.
- 4) T. Komatsu, H. Terada, N. Kobayashi, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 1849–1854.
- 5) T. Komatsu, X. Qu, H. Ihara, M. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3246–3248.
- 6) Y. Luo, Y. Shiao, Y. Huang, *ACS Nano* **2011**, *5*, 7796–7804.
- 7) Q. Jiang, C. Song, J. Nangreave, X. Liu, L. Lin, D. Qiu, Z. Wang, G. Zou, X. Liang, H. Yan, and B. Ding, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13396–13403.

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① S. Kobayakawa, Y. Nakai, M. Akiyama, T. Komatsu, Self-propelled soft protein microtubes with a Pt nanoparticle interior-surface, *Chem. Eur. J.* **2017**,

23, 5044-5050. 査読有  
doi: 10.1002/chem.201605055

- ② S. Yuge, M. Akiyama, M. Ishi, H. Namkoong, K. Yagi, Y. Nakai, R. Adachi, T. Komatsu, Glycoprotein nanotube traps influenza virus, *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 95-97. 査読有  
doi: 10.1246/cl.160805

[学会発表] (計 12 件)

- ① 中井葉子、秋山元英、小松晃之、自走方向を制御できる蛋白質マイクロチューブの合成と大腸菌捕捉、第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016、2016 年 11 月 16 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)
- ② 安達諒、秋山元英、小松晃之、グルコースオキシダーゼマイクロチューブの酵素活性、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 8 日、もてなしドーム地下イベント広場(石川県・金沢市)
- ③ 山田知佳、秋山元英、小松晃之、DNA ナノチューブの薬物送達システムへの応用、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 8 日、もてなしドーム地下イベント広場(石川県・金沢市)
- ④ 秋山元英、山田知佳、小松晃之、鑄型内交互積層法による DNA ナノチューブの合成とその応用、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、2016 年 9 月 7 日、石川県立音楽堂(石川県・金沢市)
- ⑤ 中井葉子、小早川聡史、秋山元英、小松晃之、自走する蛋白質マイクロチューブの大腸菌捕捉能、第 65 回高分子学会年次大会、2016 年 5 月 26 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
- ⑥ M. Akiyama、T. Komatsu、Photodynamic activities of human serum albumin-metalloporphyrin complex, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015、2015 年 12 月 18 日、Honolulu (USA)
- ⑦ C. Yamada、M. Akiyama、T. Komatsu、Synthesis and anticancer activity of doxorubicin-loaded DNA nanotubes, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015、2015 年 12 月 18 日、Honolulu (USA)
- ⑧ 山田知佳、秋山元英、小松晃之、ドキシソルビシンを導入した DNA ナノチューブの合成と抗がん活性、第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015、2015 年 10 月 13 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
- ⑨ 秋山元英、服部周悟、小松晃之、ヒト血清アルブミン-金属ポルフィリン錯体の光増感能と抗がん活性、錯体化学会第 65 回討論会、2015 年 9 月 22 日、奈良女子大学(奈良県・奈良市)
- ⑩ M. Akiyama、C. Yamada、T. Komatsu、Preparation and Anticancer Activities of Doxorubicin-loaded DNA Nanotubes、

第 64 回高分子学会年次大会、2015 年 5 月 29 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

- ⑪ 山田知佳、秋山元英、小松晃之、ドキシソルビシンを導入した DNA ナノチューブの合成と抗がん活性、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 28 日、日本大学船橋キャンパス(千葉県・船橋市)
- ⑫ 秋山元英、小松晃之、鑄型内交互積層法による DNA ナノチューブの合成と細胞導入、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 9 月 12 日、岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 元英 (AKIYAMA, Motofusa)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：90467697