

# 機能性人工核酸による「低酸素セラノスティクス」の実現

青山学院大学理工学部化学・生命科学科

田邊 一仁

## 本研究の目的：

固形がんには低酸素状態の細胞（低酸素細胞）が発生する。2019年にノーベル賞が低酸素細胞研究に与えられ、低酸素細胞はがん特有の特徴として注目を浴び、機能解明が進められてきた。しかしその機能は複雑性に富み、この病的細胞が発生する仕組みの一部は明らかにされつつあるものの、現時点で分子レベルでの全容解明には至っていない。また、この細胞は既存のがん治療法に抵抗性を示し、かつ、がん悪性化の原因となることから、新たな診断法および治療法の創出が望まれてきた。

上記課題を受け、これまでに多数の低酸素細胞で駆動する機能性化合物（診断薬、治療薬）が開発されてきた。治療薬としてはtirapazamine、マイトマイシン等が、診断薬としてはF-MISO、Pimonidazoleに加えて、低酸素応答性蛍光色素やりん光性金属錯体（ルテニウム錯体、イリジウム錯体など）がその代表例である。これら既存薬剤はほぼ全てが分子量が比較的小さい低分子薬剤である。低分子創薬はコストパフォーマンスが良い一方、細胞透過性が高く、低酸素細胞以外の細胞にも容易に浸透し、副作用や目的外の発光など誤診断の問題も産んできた。事実、これら低分子薬剤には神経毒性等が指摘され、臨床試験が断念されたケースも多い。すなわち、低酸素細胞の理解・制御・診断・治療には、同細胞への高選択的なドラッグデリバリーに加えて、高選択的な分子認識能を備えた薬剤が不可欠であった。

我々は、これら課題を克服し得る分子システムとして、オリゴ核酸（比較的短鎖のDNAやRNAオリゴマーを指す）に着目した。オリゴ核酸は、中程度の分子量（分子量数千程度）を持ち、高い生体適合性と標的特異性をもつ。また、オリゴ核酸は、その中程度のサイズから、特定の分子と複数の相互作用点を持ち、分子を高選択的に識別し得る上、配列の設計だけで標的や機能を変更できるという多機能性を持つ。さらに、合成法や配列設計法も確立されており、容易である。実際にオリゴ核酸は、①核酸医薬品として細胞内の特定の遺伝子(mRNA)と結合し、遺伝子発現を抑制したり、②アプタマーとして特定の生体内低分子化合物と結合して、生命機能を発現・抑制したり、③制限酵素様の機能を持ち、特定のRNAの切断を実現してきた。すなわち、オリゴ核酸は合成が容易、配列設計するだけで多機能性能を示すという、非常に使いやすい素材である。そこで本研究では、低酸素細胞の「診断」と「治療」の両方を行うことが可能なセラノスティクス用分子システム（低酸素セラノスティクス）をオリゴ核酸を活用して開発することを目指した。しかし、現時点でのオリゴ核酸の大きな欠点は、細胞に取り込まれ難く、かつ細胞内で非常に核酸分解酵素に壊され、不安定な性質をもつということである。その結果、がん細胞内で駆動し得るオリゴ核酸型薬剤の開発は未だ発展途上である。そこでまず、我々は、低酸素細胞に選択的に蓄積可能な人工核酸の開発を試みた。

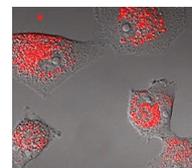
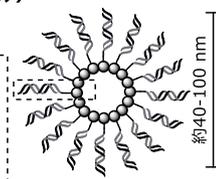
## 申請者が保有する基盤技術

我々の研究グループでは、これまでに遺伝子診断や遺伝子治療に資する機能性人工核酸の合成開発研究<sup>1</sup>を進めてきた。その過程で我々は、核酸に疎水基を導入して両親媒性を付与したところ、得られた両親媒性の

人工核酸は水溶液中で会合体を形成することを見出した。この核酸から成る会合体は高い細胞膜透過性を示すとともに、がん細胞にエンドサイトーシス経路で速やかに取り込まれ、細胞内でも安定に存在した。また、このオリゴ核酸の塩基配列を設計し、この会合体を用いて細胞や腫瘍組織内で発現するルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制に成功した。一般に核酸のオリゴマーは細胞に単に投与しても細胞内に浸透しにくい。しかし、我々は、疎水性官能基の導入と会合体形成によって、速やかに細胞内に取り込まれること<sup>2</sup>を明らかにしてきた。本研究では、この両親媒性のオリゴ核酸と同核酸から成る会合体の特性を活用して、低酸素細胞に選択的に集積可能な人工核酸の開発に取り組んだ。

### (DNA会合体の細胞取り込み)

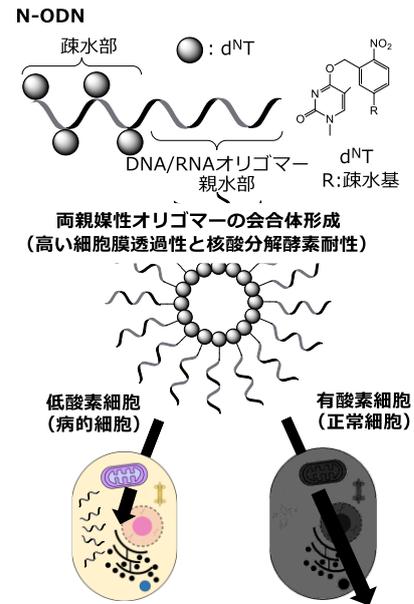
#### 会合体形成による核酸の細胞内取込



細胞に速やかに取り込まれる

## 低酸素細胞に蓄積する人工核酸のデザイン

低酸素細胞に選択的に集積する人工核酸を設計するにあたり、ニトロ基還元酵素 (NR) が低酸素細胞内で活性化されていることを活用することとした。我々は、NRの基質となる官能基をオリゴ核酸に組み込むことで、低酸素細胞の中でオリゴ核酸の機能を選択的に制御できると考えた。具体的には、ニトロベンジル基 (NB基) の還元・脱離反応を活用することとした。NB基を組みこんだチミジン塩基 (d<sup>NT</sup>) を備えたオリゴ核酸 (N-ODN) は以下のメカニズムで低酸素細胞に蓄積すると予想した。N-ODNから成る会合体が低酸素細胞内に取り込まれるとNRによりd<sup>NT</sup>が活性化され、アルキル鎖とニトロベンジル基が除去された無置換鎖が生成する。その結果、N-ODNsは両親媒性を失い、会合体が不安定化する結果、低酸素細胞内に会合体が残留する。一方、会合体が有酸素細胞に取り込まれても、会合体は安定に形成し続けるため、高い細胞膜透過性を維持する結果、しばらくすると細胞から排出される。最終的に、N-ODNから発生した無置換DNA鎖のみが低酸素細胞に残る。

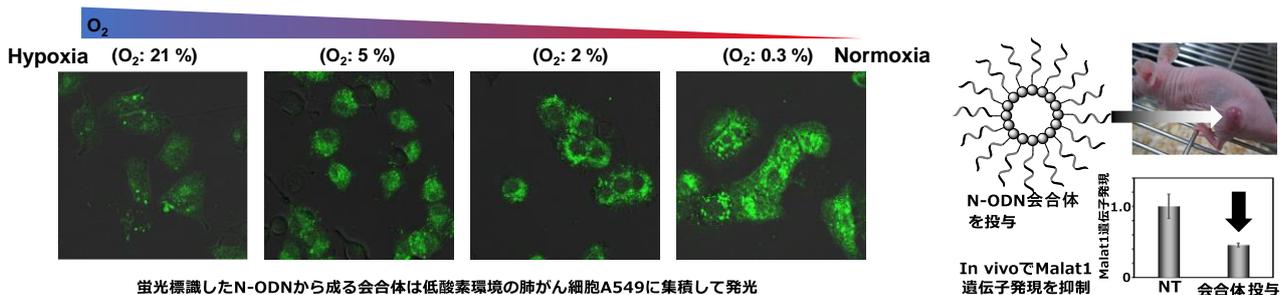


## 低酸素細胞に蓄積する人工核酸の機能 1 : 遺伝子制御

こうした分子設計の下、ホスホロアミダイト法を用いたDNA自動合成を使用してN-ODNを合成した。続いて、N-ODNをNRと混合し、疎水部の脱離反応が進行するかを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により追跡した。その結果、低酸素環境下で疎水部の脱離反応が効率よく進むことを確認した。また、ヒト肺がん細胞A549を用いて、N-ODNの機能評価を行った。まず、有酸素・低酸素条件下におけるN-ODNの細胞内取り込み評価を行った。細胞に蛍光標識したN-ODNから成る会合体を投与した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、低酸素細胞からN-ODNの蛍光発光が観察され、細胞内に取り込まれていることがわかった。N-ODN中のd<sup>NT</sup>の導入数を増やすと、取り込み量が増加し、d<sup>NT</sup>を5'末端に3塩基分導入した17塩基のN-ODN 17において低酸素細胞と有酸素細胞を比較すると、約2.6倍の強度を示す蛍光が観察された。このことから、N-ODNは低酸素細胞に選択的に集積し、発光することが確認された。すなわち、低酸素細胞を可視化し得るイメージングツールとしてN-ODNは駆動することがわかった。

次に、N-ODNのさらなる応用として、低酸素細胞での選択的な遺伝子発現抑制を検討した。マウス肝癌細胞Hep1-6に有酸素条件下あるいは低酸素条件下でN-ODN、もしくはN-ODNと化学修飾されたアンチセンス鎖の二重鎖を投与し、Malat1 mRNAの発現量を定量した。具体的には、N-ODNを細胞に投与して24時間後にRNAを抽出し、cDNAへと逆転写後、qPCRを用いてMalat1 mRNAを定量した。その結果、有酸素条件下ではMalat1の量は減少しなかったが、低酸素条件下ではMalat1の発現量が優位に減少したことがわかった。これらの結果は、N-ODNが低酸素細胞に選択的に集積し、核酸医薬品としての効果を発現できたことを示唆している。

さらに、担癌マウスを用いてN-ODNの遺伝子制御効果を調べた。Hep1-6細胞を皮下に移植したマウスを作成し、N-ODNとアンチセンスから成る二重鎖の会合体を腫瘍部位に局所注射した。続いて、腫瘍を取り出し、細胞内のMalat1 mRNA発現量を定量したところ、人工核酸投与群において、有意にMalat1の発現量が抑えられた。これらの結果は、N-ODNから成る会合体が腫瘍部の遺伝子を効率的に制御できたことを示している。すなわち、N-ODNは、低酸素セラノスティクスを実現し得る機能分子であることを示すことができた。現在、動物実験を継続して行っており、低酸素セラノスティクスの実現に向けてN-ODNを活用した研究を続けている。N-ODNの構造最適化、実験動物における機能評価と安全性評価を進め、薬剤としての機能を確立していきたいと考えている。



## 低酸素細胞に蓄積する人工核酸の機能 2 : 低酸素細胞の細胞膜への集積

細胞膜に短鎖の核酸を集積できれば、細胞膜上でアプタマー機能による低分子捕捉や特定タンパク質と

の結合など、さらなる機能拡張ができる。そこで次に、N-ODNをさらに活用して低酸素細胞の細胞膜に選択的に蓄積する核酸へと発展させることを試みた。当研究室で以前に開発したアルキル基含有ウリジン誘導体 ( $d^{alkyl}U$ ) を備えたDNA鎖(U-ODN)は細胞膜集積特性を示す<sup>3</sup>ことから、U-ODNとN-ODNを複合化した核酸会合体を作成すれば、低酸素細胞膜への人工核酸の集積が実現できるのではないかと期待した。

U-ODNから成る二重鎖とN-ODNから成る二重鎖を濃度比1:1で混合し、二重鎖濃度を20 mMに調製した。続いて、酸素濃度0.3%または21%の条件下においたA549細胞に投与したところ、酸素濃度0.3%の条件下の低酸素細胞に選択集積することがわかった。また、U-ODN上の修飾塩基の数を増やしたところ、低酸素細胞の細胞膜に集積する挙動が確認できた。

### 低酸素細胞に蓄積する人工核酸の機能3：低酸素細胞への機能分子の運搬

最後に、このN-ODNが細胞へ機能分子を送達する運搬材となり得るか検討した。上述のように、N-ODNは、低酸素細胞に集積しやすいため、低酸素細胞に選択的に機能分子を送達し得る。しかし、DNAに機能分子を直接修飾することは困難となることも多く、導入可能な機能分子には制限があることが指摘されていた。こうした背景の下、本サブテーマでは、DNA結合特性を持つHoechst分子を用いることで、機能分子を低酸素細胞へ効率的に送達する手法の開発に取り組んだ。Hoechst分子はアデニンとチミンに富んだDNA二重鎖と強力に結合する。そこで、クリック反応により機能分子を導入したHoechst誘導体を合成した後、二重鎖を形成したN-ODNの会合体と複合化することで、機能分子の低酸素細胞への送達手法を開発することとした。

機能分子のモデルとして蛍光色素であるフルオレセインを選択した。アジド化したフルオレセイン誘導体とアルキン部を備えたHoechst分子を銅触媒存在下で縮合し、フルオレセインを導入したHoechst誘導体 (Hoe-FAM) を合成した。得られたHoe-FAMとN-ODNを水溶液中で混合し、複合化を行った。得られたHoechst-DNAから成る会合体を酸素濃度0.3, 2, 5, 21%条件下でヒト肺がん細胞A549に投与し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、酸素濃度が減少するにつれてフルオレセイン由来の蛍光発光が増大する様子が細胞内から観察された。このことから、細胞内に取り込まれたHoechst-DNA複合体は酸素濃度に応じて細胞内に蓄積したことがわかった。すなわち、Hoechst分子に導入した機能分子を低酸素細胞に選択的に集積させることができた。

### まとめ

以上のように、本研究では、低酸素集積性を示す人工核酸としてニトロベンジル基を備えたオリゴ核酸N-ODNを開発した。このN-ODNは会合体を形成する結果、低酸素細胞に蓄積する一方、有酸素細胞では速やかに除去される。N-ODNを用いて、低酸素細胞内の遺伝子制御、低酸素細胞膜のオリゴ核酸による修飾、低酸素細胞への機能物質運搬を実現した。未だ細胞を用いた機能評価の段階ではあるが、これら結果は、N-ODNが低酸素細胞を標的としたセラノスティクス(低酸素セラノスティクス)を実現し得る機能を保有することを強く示唆するものである。今後、動物を用いた機能評価を続け、低酸素細胞の診断と治療を実現する機能性薬剤としてN-ODNの開発を続けていきたいと考えている。

### 参考文献

1. Chemical approaches for preparation of functionalized oligodeoxynucleotides and their applications to biomolecular analysis and drug design, Nishihara, T.; Tanabe, K. *Radiat. Biol. Res. Commun.* **2024**, *59*, 238.
2. Aggregate formation of BODIPY-tethered oligonucleotides that led to efficient intracellular penetration and gene regulation. Asahi, W.; Kurihara, R.; Takeyama, K.; Umehara, Y.; Kimura, Y.; Kondo, T.; Tanabe, K. *ACS Applied Bio Materials* **2019**, *2*, 4456.
3. Modulation of cell membrane functionalization by aggregates of oligodeoxynucleotides containing alkyl chain-modified uridines. Kainuma, R.; Motohashi, Y.; Nishihara, T.; Kurihara, R.; Tanabe, K. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 5406.

