

# 研究終了報告書

## 「タンデムリピート長鎖 DNA の細胞内化学構築」

研究期間：2019 年 10 月～2022 年 3 月

研究者：森廣 邦彦

### 1. 研究のねらい

2008 年のマイコプラズマゲノム全合成の報告以降、長鎖 DNA を合成しそれを細胞内で機能させる技術が急速に発展している。しかし、従来の長鎖 DNA 合成手法は数週間という合成期間の長さもさることながら、化学合成から PCR、大腸菌や酵母を用いた遺伝子工学的な合成と多様な技術や材料を必要とし、汎用性や応用性の低下を招きかねない。また、生物を利用する以上、安全面への配慮も常に必要である。もし長鎖 DNA を全て化学的に合成することができれば、現在の手法に必要な時間やコスト、技術的ハードル、安全性を大幅に改善することが可能となり、様々な研究分野での長鎖 DNA の活用が期待される。ところが、現在の DNA 化学合成に一般的に用いられるアミダイト法には、百塩基長以上の DNA 合成で収率が著しく低下してしまうという大きな問題があり、また例えば長鎖 DNA を化学合成できたとしてもそれを細胞に効率よく導入することは現在の技術では未だ困難である。

核酸ナノ技術は短い核酸断片の自己集合性を利用してナノ構造体を組み上げる有用な手法であり、様々な分野での応用が期待されている。本研究では、核酸ナノ技術の 1 種であるハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）を利用し、細胞内で効率よく長鎖 DNA を構築する化学的手法を確立する。HCR の生成物は特定の配列が反復するタンデムリピート配列であり、ゲノム上に散在して遺伝子の安定性や発現に影響を与えることが知られている。タンデムリピート DNA には機能未知な配列も多く残されており、それらの解明は今後の創薬研究においても重要である。また、反復する配列を設計することで、構築した長鎖 DNA を細胞機能の制御に応用できる可能性を秘めている。すなわち、DNA 結合タンパク質等の創薬標的分子を細胞内構築したタンデムリピート長鎖 DNA 上で多重捕捉することができれば、極めて効率の高い医薬品の開発につながることを期待される。

本研究では、HCR による短鎖 DNA の自発的集積を利用し、細胞内でタンデムリピート長鎖 DNA を化学構築する技術を開発する。さらに開発した技術を医療応用し、「核酸ナノ技術創薬」とも言うべき新しい創薬手法の確立を目標とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

まずは核酸高次構造の安定性予測に広く用いられているオンラインソフトウェア NUPACK を利用し、特定の miRNA に応答して長鎖 DNA 二重鎖を構築する HCR プローブの設計を行った。予測結果と実際にゲル電気泳動実験で得られた HCR 進行効率および選択性を配列設計にフィードバックし、精度良く優れたプローブを設計できる体制を整えた。

培養細胞系における評価では miRNA 発現量の差異によって細胞生存率が大きく変化し、がん細胞選択的な細胞死を誘導できることが明らかとなった。これまでは DNA プローブを用



いて実験を進めていたが、同様に RNA プローブによる HCR についても核酸ナノ医薬としての詳細な検討を実施した。

## (2) 詳細

### 1. miRNA をトリガーとする HCR プローブの設計と合成

NUPACK による構造安定性予測結果を基に、複数種類の HCR プローブセットを設計した。具体的には、様々ながん細胞で過剰発現している miRNA 非存在下では安定なヘアピン構造を保持し、miRNA が存在する場合のみ HCR を開始する配列を求めた。それぞれのプローブは HCR を速度論的に制御する toehold と呼ばれる末端一本鎖領域の長さが異なっており、様々な反応性を示すと考えられる。設計した各プローブセットは DNA 自動合成機によって化学合成し、それぞれのヘアピン末端の一本鎖部分はヌクレアーゼ耐性を付与するためホスホロチオエート化した。

### 2. miRNA 応答型 HCR の非培養細胞系評価

合成した HCR プローブの機能性をまずは非培養細胞系で評価した。それぞれのプローブセットに HCR のトリガーである miRNA を 0.1 当量加え、一定時間静置後にポリアクリルアミド電気泳動によって反応溶液を分析した。また、プローブのヌクレアーゼ耐性を評価するべく、FBS 中での安定性をゲル電気泳動によって分析した。その結果、24 時間後においても HCR プローブの残存が確認され、ホスホロチオエート修飾により適切なヌクレアーゼ抵抗性を獲得していることが分かった。

### 3. miRNA 応答型 HCR の培養細胞系評価

HCR プローブのそれぞれを FAM および Cy5 で蛍光標識し、HCR の進行に伴って FRET 効率が增加するシステムを構築した。標識したプローブを miRNA を過剰発現している細胞およびほとんど発現していない細胞にトランスフェクションした後、まずは共焦点顕微鏡による観察を行った。続いて、フローサイトメーターを用いることでそれぞれの細胞での FRET 効率を定量した。これらの実験から、設計した HCR プローブが細胞内 miRNA に応答し、長鎖 DNA 二重鎖を構築することが明らかになった。

### 4. miRNA 応答型 HCR による選択的細胞死の誘導

最適化した HCR プローブを miRNA 発現量が異なる様々なヒト細胞にトランスフェクションし、一定時間培養後に PlestoBlue (invitrogen) を用いて細胞生存試験を行なった。その結果、miRNA を多く発現している細胞では強い細胞死が誘導された一方で、発現していない細胞ではほとんど細胞死が誘導されなかった。

### 5. モデルマウスを用いた抗腫瘍活性評価

マウスメラノーマ B16 細胞を生着させたマウス (C57BL/6NJcl 系統) に HCR プローブ (これまでと異なり RNA プローブ) を 3 回に分けて腫瘍内に局所投与した。ネガティブコントロールである PBS 投与群と腫瘍サイズを比較したところ、HCR プローブ投与群ではその増大を有意に抑制することができた。これは、ポジティブコントロールとして用いた強力な免疫活性化核

酸である poly(I:C)と同程度もしくはそれ以上の抗腫瘍効果であり、今回開発した技術が優れた抗がん剤シーズであることが分かった。また、プローブ投与によるマウスの体重減少は見られず、本技術の安全性についても一定の結果を得ることができた。

## 6. 本研究から派生して得られたその他の成果

既存の核酸ナノ技術の欠点の1つに、生体直交性の低さがある。生体内には多種多様な核酸分子が存在しており、これらとのクロスリアクションを避けることはさらなる選択性の向上につながる。研究者は独自に非天然核酸塩基対を設計・合成して HCR に応用し、天然核酸と直交的に長鎖

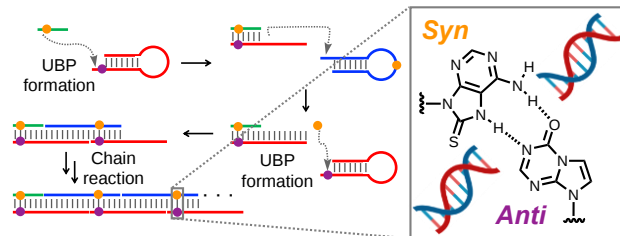


図 1. 独自に開発した非天然塩基対による生体直交型 HCR

DNA 二重鎖を構築する核酸ナノ技術の開発に成功した (図 1) [成果論文 1]。この非天然核酸塩基対は構造がシンプルで、かつ高い安定性・選択性をもつため、HCR 以外にも様々な反応に応用できると期待している。

本 ACT-X の研究テーマは短い核酸プローブから長い核酸二重鎖を構築し薬効を発揮させるものであるが、全く逆の戦略、すなわち短い核酸プローブをヌクレオチドまで分解することで抗腫瘍効果を得ることに挑戦した [成果論文 2]。具体的には、低酸素環境下で選択的かつ効率的に除去できる核酸塩基部の保護基を新たに開発し、それを代表的なヌクレオシド製剤である

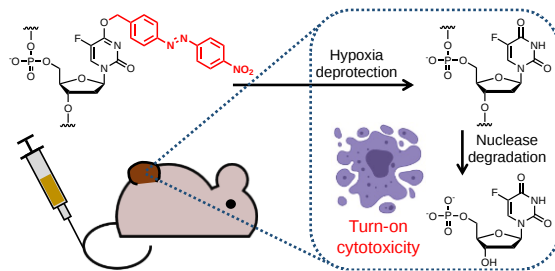


図 2. 低酸素環境下で活性化するオリゴヌクレオチド型プロドラッグ

Floxuridine のオリゴマーに複数搭載した (図 2)。このオリゴマー型プロドラッグは低酸素環境下で選択的にがん細胞増殖抑制効果を示し、モデルマウス系においても優れた抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。

## 3. 今後の展開

本研究では、ヘアピン型の核酸プローブを独自に設計することで、特定の miRNA を発現している細胞でのみ細胞死を誘導する技術を確認した。本技術は細胞選択性や薬効発現メカニズムの観点からも前例がないため、社会実装の観点から新しい創薬手法として製薬企業等に導出していきたいと考えている。今後数年間で競合技術 (例えば他の核酸医薬) に対する優位性の検証や詳細な薬物データ (作用機序、有効性、体内動態、安全性、製剤化) の取得、有望な対象がん種の特特定等を実施していく予定である。

## 4. 自己評価

研究目的の達成状況

本研究は、「長鎖 DNA の細胞内構築」と「核酸ナノ技術創薬分野の確立」を大きな目標として実施した。両目標に対して研究開始当初の予想以上の成果が得られ、今後の発展が楽しい研究に成長させることができたと自負している。「長鎖 DNA の細胞内構築」については、DNA のみならず RNA の長鎖二重鎖を自在に構築することが可能となり、本技術の応用範囲を広げることができた。「核酸ナノ技術創薬分野の確立」については、当初の想定メカニズムとは異なるものの、がん細胞選択的に細胞死を誘導できる技術を確認することができた。また、提案時の計画には含まれていなかったマウスを用いた薬効評価も実施し、より実践的に研究を進めることができたと評価している。

## 研究の進め方

本研究を進めていく中で、当初の想定とは異なる実験結果が得られることがいくつかあった。これを受けて、評価方法等を提案時の計画から一部変更することとした。結果的にはこの進め方が功を奏し、研究期間内に本研究の大きな目標を達成することができたと評価している。アウトプットとしても、研究期間内に権威ある化学系雑誌の 1 つである *Journal of the American Chemical Society* に筆頭著者として 2 報の論文を発表することができた。

## 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究成果により、今後新しいメカニズムに基づいた核酸創薬研究が可能になると期待している。特に現在までにがんを対象疾患とした核酸医薬は上市されていないため、非常に有望な新薬開発につながることを期待される。がんは長年日本人の死因の第一位であり、抗がん剤の市場規模は 14 兆円超とも予測されていることから、実用化された際の社会・経済効果も大きいと見られる。今後は上述の通り、製薬企業への導出等、社会実装化に向けた活動にも取り組みたい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. Kunihiko Morihiko, Yuya Moriyama, Yui Nemoto, Hiraki Osumi, Akimitsu Okamoto “anti-syn Unnatural Base Pair Enables Alphabet-Expanded DNA Self-Assembly” *Journal of the American Chemical Society* **2021**, *143*, 14207–14217.

非天然核酸塩基対は創薬や合成生物学研究の分野で重要な素材となりつつあり、その新しい設計指針の提案が常に求められている。本研究では核酸塩基の配向性に着目し、通常の anti-anti ではなく anti-syn 配向で形成する非天然塩基対を開発した。さらにこの新規非天然塩基対を HCR に応用し、天然の四文字型核酸とは直交的に働く DNA 高次構造体形成システムの構築に成功した。

2. Kunihiko Morihiko, Takuro Ishinabe, Masako Takatsu, Hiraki Osumi, Tsuyoshi Osawa, Akimitsu Okamoto “Floxuridine Oligomers Activated under Hypoxic Environment” *Journal of the American Chemical Society* **2021**, *143*, 3340–3347.

近年、非常に高い抗腫瘍効果をもつ核酸類縁体としてヌクレオシド製剤である Floxuridine



をオリゴマー化したミニ核酸医薬が注目されているが、副作用の問題を克服する必要がある。本研究ではがんの特徴的な微小環境である低酸素に応答して脱離する官能基を搭載した、腫瘍選択的ミニ核酸医薬プロドラッグを開発した。これらのプロドラッグが低酸素環境選択的に活性化できることを細胞およびマウスで実証した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件 (特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

**学会発表**

1. 「核酸ナノ技術を駆使したがん免疫療法」 FIBER 日本核酸化学会若手フォーラム, オンライン開催, 2021 年 8 月 6 日 (招待有)
2. 「核酸化学・核酸ナノ技術によるがん選択的化学療法」 大阪大学大学院薬学研究科 2021 年度生物有機化学特別講義, オンライン開催, 2021 年 6 月 25 日 (招待有)

**著作物**

3. 「細胞内ではたらく RNA を観るための化学」 **森廣邦彦**, 岡本晃充 *進化を続ける核酸化学* **2021**, 131-136 (化学同人)
4. 「核酸イメージング」 **森廣邦彦**, 岡本晃充 *核酸科学ハンドブック 2020*, 165-173. (講談社サイエンティフィク)

**プレスリリース**

5. 「低酸素環境で腫瘍細胞に効く「ミニ核酸医薬」を開発 — 従来の抗がん剤に代わると期待 —」 (東京大学)