

■受領No.1384

DNA ナノテクノロジーを駆使した マイクロ RNA 応答型デコイ核酸医薬の創製



代表研究者

森廣 邦彦

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 助教

1. 研究目的

核酸医薬はこれまで標的化困難とされてきた生体分子をターゲットにできることから大きな注目を集めており、2010年代に入ってから複数のアンチセンス医薬やRNA干渉 (RNAi) 医薬が各国で承認されるなど、その開発競争が世界中で過熱化している。これら上市された核酸医薬品の多くはmRNAを標的としており、その翻訳やスプライシング過程を制御することで薬効を示す。一方で、細胞内の核酸結合タンパク質を標的とした核酸創薬研究も精力的に進められている。中でもデコイ核酸は転写因子を捕捉する「おとり」として機能し、病変細胞で異常に働いている遺伝子の発現を調節することで治療効果を発揮する。転写因子は従来の低分子医薬では標的化が困難な“undruggable”なタンパク質とされており、デコイ核酸は新しい創薬モデルティとして大きく期待されている。デコイ核酸医薬の長所として、①機能メカニズムが配列依存的であるため分子設計が容易 ②標的特異性が高い ③創薬標的が豊富(例えばヒトには1000種類以上の転写因子が存在すると推測されている)といった点が考えられる。このように様々な利点を有しているデコイ核酸であるが、これまでに「おとり」メカニズムを基にした核酸医薬は上市に至っていない。本研究ではDNAナノテクノロジーを駆使し、病変細胞で特異的に発現しているマイクロRNA (miRNA) に応答して薬効を発揮するデコイ核酸の開発を目的とする。

2. 研究内容

2.1 DNA プローブの配列および構造の最適化

多くのがん細胞で過剰発現しているmiR-21をトリガーとしたHCRに用いるヘアピン型DNAプローブセット (HP1とHP2) を3種設計・合成した。配列の設計に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を利用した。これらの配列はHCRの進行に最も大きな影響を与える一本鎖領域 (toeholdと呼ばれる) の長さを種々変更している。また、ヌクレアーゼに対する抵抗性を高めるため、toehold部分をホスホロチオエート化 (リン酸ジエステル結合の酸素原子の1つを硫黄原子に置換) している。

まず、各プローブセットのHCRの進行効率をゲル電気泳動によって評価した (図1)。その結果、HP1のtoeholdが8塩基長の場合に最も選択的なHCRの進行が確認された。すなわち、miRNAを加えていない場合や、標的ではないmiR-122を加えた場合はHCRが進行せず、標的のmiR-21を加えた場合のみHCR生成物が観察された。今後の実験では全て、toeholdが8塩基長のHP1を用いることとする。また核酸分子を医療応用する場合、体内ヌクレアーゼによる分解が問題となる場合が多い。そこでHP1およびHP2を各種ヌクレアーゼを含むFBSとともに一定時間インキュベートし、酵素分解の様子をゲル電気泳動によって解析した。その結果、それぞれのプローブが少なくとも8時間は安定に存在し得ることが分かった。

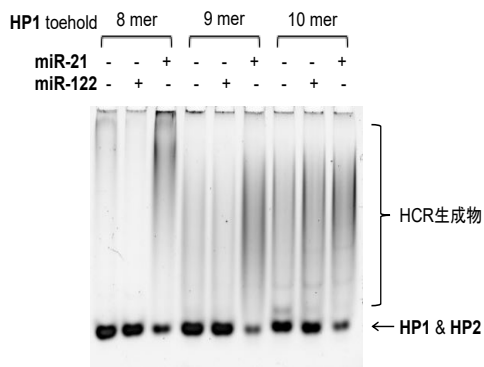


図 1 ポリアクリルアミドゲル電気泳動による HCR の評価

2.2 非培養細胞系における HCR 産物と転写因子 NF- κ B の結合評価

本研究では、HCRによって生成する長鎖DNA二重鎖中に転写因子NF- κ B結合配列が生じるようにプローブの配列を設計している。そこで、HCR産物とNF- κ Bとの結合をゲル電気泳動によって評価した(図2)。実験の結果、HCR生成物にNF- κ Bを加えた場合のみNF- κ BとHCR産物との複合体に対応するバンドが確認できたことから、設計通りHCRの生成物である長鎖DNA二重鎖がNF- κ B捕捉能を有していることが明らかとなった。今後、コントロール実験としてNF- κ B結合配列をもたない長鎖DNA二重鎖を用いた実験等を行い、選択性等について詳細に検討していく予定である。

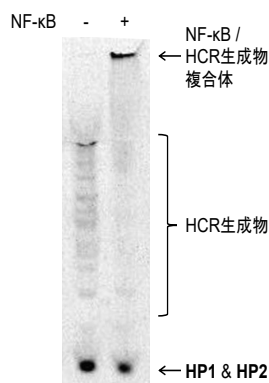


図 2 HCR 生成物による NF- κ B の捕捉

2.3 ヒト生細胞内における HCR の評価

培養細胞系でのHCRの評価を共焦点顕微鏡を用いて実施した。生細胞へのプローブの導入法としてまずはリポフェクション法を検討した。また、HCRの進行は蛍光分子間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によって評価することとした。すなわち、HP1をFluoresceinで、HP2をTAMRAで修飾することで、HCRが進行した場合にのみFRETが観察されるように各プローブを設計した。まず、miR-21を過剰発現していることが知られているヒト子宮頸がん細胞 (HeLa) にHP1とHP2をリポフェクションした結果、細胞内からFRETによる蛍光発光が観察された。この結果から、miR-21をトリガーとしたHCRが生きた細胞内でも進行することが分かった。一方、miR-21をほとんど発現していないことがわかっているヒト胎児腎細胞 (HEK293T) に同様にHP1とHP2をトランスフェクションした結果、HeLa細胞と比較してFRET効率の低下が見られ、HCRがmiR-21依存的に進行していることが示唆された。

続いて、マイクロインジェクション法によるプローブ導入を検討した。マイクロインジェクション法はリポフェクション法と比較して、各プローブの量と導入のタイミングを厳密に制御できるメリットがある。HP1とHP2を細胞内に導入後、同様に共焦点顕微鏡によって解析を行い、FluoresceinとTAMRAの蛍光強度の比を算出することでHCRの進行を経時的に追跡した (図3)。また、miR-21をほとんど発現していないHEK293Tについても同様に実験を行なった。解析の結果、HeLa細胞では時間経過に伴いTAMRA/Fluorescein比が上昇した一方、HEK293T細胞ではほとんど変化が見られなかった。本実験からも、HCRが細胞内のmiR-21濃度に依存して進行することが分かり、細胞選択的な疾病治療の可能性を見出すことができた。

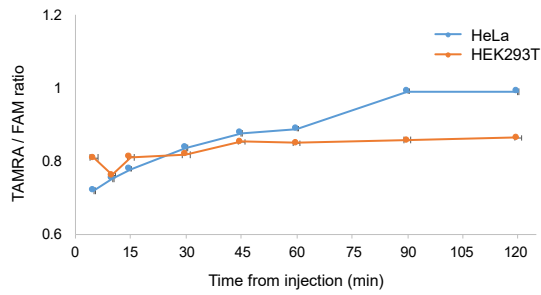


図 3 プローブを各細胞内にマイクロインジェクションした場合の TAMRA / Fluorescein 比の変化

3. 発表 (研究成果の発表)

- (1) Kunihiko Morihiko, Daisuke Fukui, Akimitsu Okamoto
A Hybridization Chain Reaction (HCR) Based MicroRNA Detection System
The 46th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry 2019 (口頭発表、東京、2019年10月)
- (2) 福井大介、森廣邦彦、岡本晃充
マイクロRNA応答型低分子多重放出システム
日本化学会第100春季年会2020 (口頭発表、千葉、2020年3月)