

博士論文

**Molecular Glues for Nucleic Acids
in Biomedical Applications**

(核酸の生医学応用のための分子糊の設計)

木幡 愛

Molecular Glues for Nucleic Acids in Biomedical Applications

(核酸の生医学応用のための分子糊の設計)

相田研究室 37-197132 木幡 愛

【1】緒言

核酸は遺伝情報の媒体という生物学的な重要性に加え、遺伝子治療薬として実用化が期待されている。標的分子へ配列特異的に結合しその活性を制御するため、適切に塩基配列を設計することにより核酸は副作用のリスクが軽減された強力な医薬となりうる。さらに化学合成可能であるため、標的分子と高い親和性を示す核酸を多量なライブラリーの中から効率的に見出すことによって、様々な疾患の診断・治療法へと展開することが可能となる。このような長所を持ちながらも、未修飾の核酸は物理化学的・生物学的安定性に乏しいため、さらなる核酸医薬の発展に向け、これまでに核酸の表面化学修飾が広く試みられてきた。核酸の末端やリン酸骨格に直接化学修飾を施す手法は、修飾部位が核酸の機能発現に干渉する恐れがある。また、核酸表面の負電荷に着目し、カチオン性ポリマーとの静電相互作用を介して表面修飾を行う手法も一般的であるが、ポリマーとの複合化が無作為に起こるため、修飾密度の低下や核酸間の架橋による凝集・沈殿などの問題が生じる。

当研究グループでは、生体高分子表面に非共有結合的に接着する『分子糊』を開発してきた^[1]。分子糊はグアニジニウムイオン (Gu^+) を多数有しており、タンパク質や核酸などの生体高分子表面に存在するオキシアニオンと多価的に塩橋を形成することで強力な接着を実現する (Figure 1a)。一方、紫外光照射によって励起され、近傍のタンパク質と共有結合を形成することのできるベンゾフェノン (BP) ユニットを分子糊に組み込むことで、分子糊の Gu^+ による仮留め状態を不可逆的な本留め状態へと変換することにも成功している (Figure 1b) ^[2]。

本研究では、分子糊を基盤とした核酸表面の化学修飾技術を開発し、核酸の生医学的機能性を高めることを目的とした。ここでは特に、(1) siRNA および (2) DNA アプタマーの機能化に焦点を置いた。本研究は以下の項目から構成される。

- (1) siRNA を鋳型とした分子糊の重合によって表面へのタンパク質導入を可能にし、そのタンパク質の性質を利用した組織深部への siRNA 輸送に成功した。
- (2) DNA アプタマー/標的タンパク質複合体を架橋する光反応性分子糊を開発し、光によって DNA アプタマーの阻害効果を強め、細胞機能を制御することに成功した。

【2】組織深部への siRNA 送達を実現するタンパク質被覆ナノカプセル^[3]

siRNA は、RNA 干渉により配列特異的に遺伝子発現を抑制できるため、低副作用な癌治療薬として期待されている。癌は血管から平均 $50 \mu\text{m}$ の組織にまで拡大しており^[3]、根治には siRNA をそのような深組織へと送達する必要がある。しかし、siRNA は血中での安定性に乏しく、また組織深部への浸透

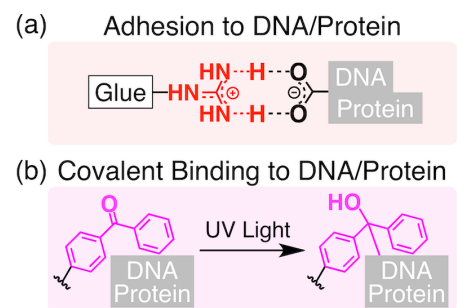


Figure 1. (a) A salt-bridge between guanidinium ion (Gu^+) of molecular glue and an oxyanion on DNA or proteins. (b) A photoreactive benzophenone (BP) unit forms a covalent bond with biomolecules located in the close vicinity.

はそのサイズや表面電荷から非常に困難である。これまでに深組織への siRNA 送達を志向した様々な輸送体が開発されてきたが、深さ 50 μm 以上の組織に siRNA を輸送できるものは報告されておらず^[4]、大きな課題であった。

一般に、微小な輸送体は組織への拡散・浸透に優れる。当研究グループでは、siRNA を鋳型として Gu^+ を有するモノマーを重合させることで、10 nm 程度の最も小さな siRNA 内包ナノカプセルを得ることに成功している^[5]。そこで本研究では、このナノカプセルに「経細胞輸送 (トランスサイトーシス)」能を持つトランスフェリン (Tf) を修飾することで、効率的に siRNA を深組織へと送達できるのではないかと考えた (Figure 2)。

はじめに、表面にアジド基が多数導入された siRNA 内包ナノカプセル ($\text{AzNC} \supset \text{siRNA}$) を調製した。側鎖にアジド基 (Az)、主鎖に Gu^+ 基を 4 つ有する線形モノマー AzGu (Figure 3a) をメタノール溶液中で siRNA と混合し、ヨウ素を添加することにより末端トリチル基の脱保護および siRNA を鋳型とした酸化重合が同時に進行する (Figure 3d,e)。さらに、Tf の接着・固定化の足場とするため、 $\text{AzNC} \supset \text{siRNA}$ 表面へ分子糊 (Figure 3b) と BP (Figure 3c) ユニットをアジド-アルキン銅 (I) 触媒クリック反応によって

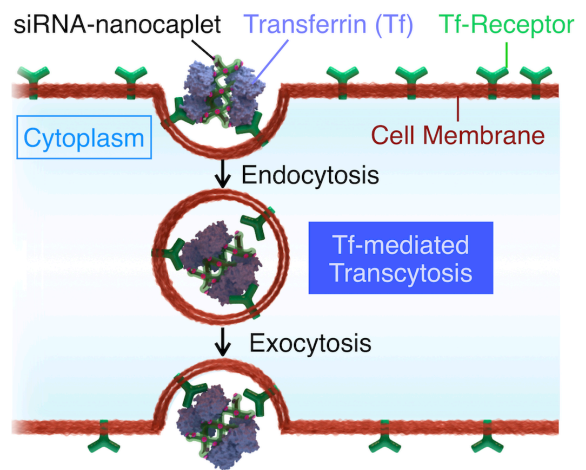


Figure 2. Schematic illustration of siRNA delivery into deep tissues with transferrin (Tf)-appended siRNA nanocaplets. The nanocaplets migrate into deep tissues via Tf-mediated transcytosis.

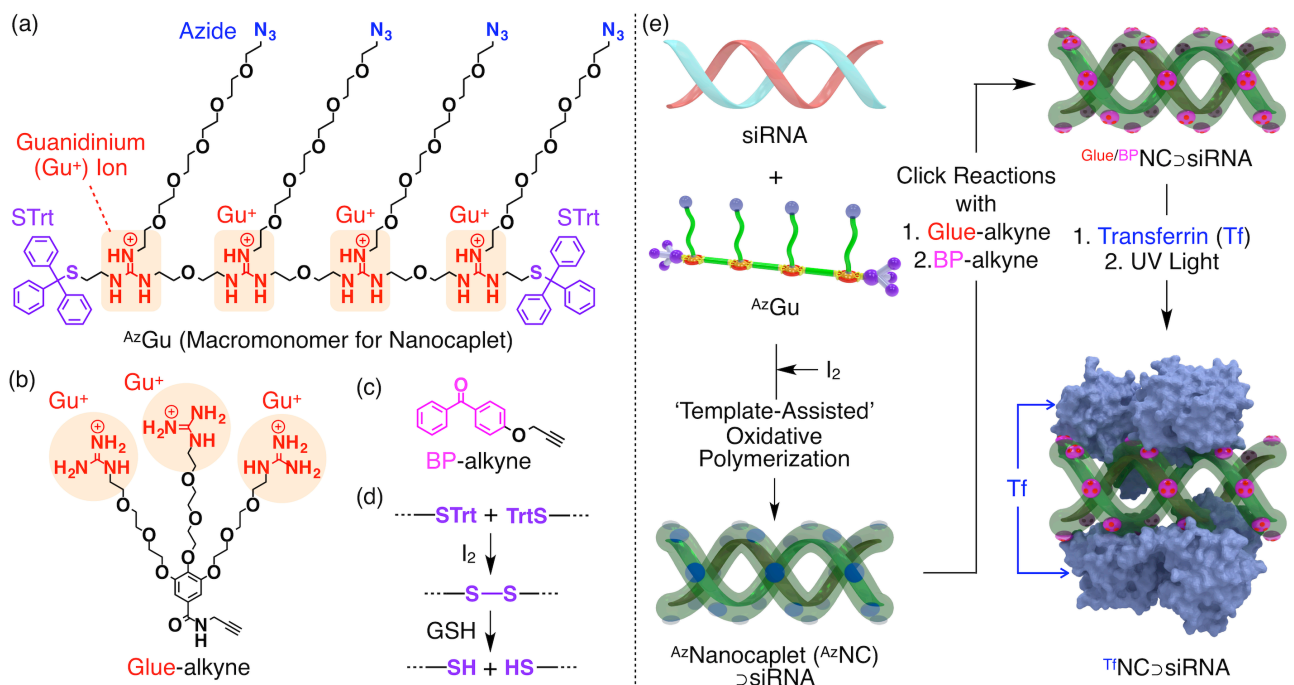


Figure 3. Molecular structures of (a) AzGu , an azide (N_3)-appended telechelic macromonomer for nanocaplet, (b) Glue-alkyne, and (c) BP-alkyne. (d) Iodine-mediated disulfide bond formation and its reductive cleavage by glutathione (GSH). (e) Synthesis of an siRNA-containing nanocaplet appended with transferrin (Tf) units ($\text{TfNC} \supset \text{siRNA}$).

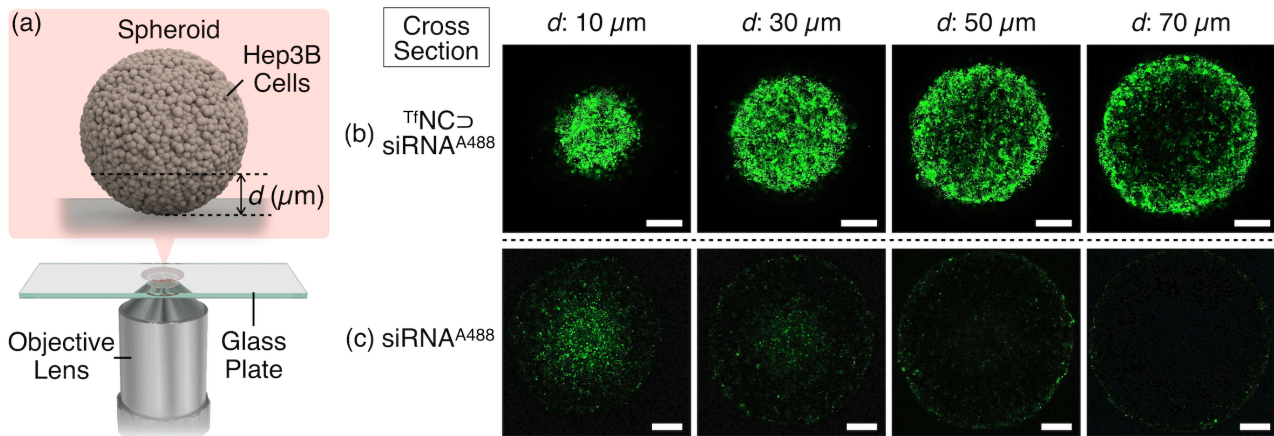


Figure 4. Schematic illustration of the experimental setup for obtaining cross-sectional confocal laser scanning microscope (CLSM) images of a Hep3B spheroid. (b,c) Cross-sectional CLSM ($\lambda_{\text{ext}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{obs}} = 510\text{--}590 \text{ nm}$) images of Hep3B spheroids at depths of 10, 30, 50, 70 μm from the surface after a 3-day incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ in MEM (10% FBS) in the presence of (b) TfNC \supset siRNA^{A488} ([siRNA^{A488}] = 100 nM) and (c) siRNA^{A488} (100 nM). Scale bars = 100 μm .

導入した (Glue/BPNC \supset siRNA)。この Glue/BPNC \supset siRNA 溶液中へ Tf を添加し、紫外光 (310 nm, 10 min) を照射することにより、Gu⁺基を介してナノカプセル表面に非共有結合的に仮留めされていた Tf が BP の光化学反応によって共有結合的に固定化された (Figure 3e)。

動的光散乱 (DLS) 法およびクライオ透過型電子顕微鏡 (Cryo-TEM) 観察から、Tf 修飾 siRNA 内包ナノカプセル (TfNC \supset siRNA) は約 15 nm の粒径を持つ微小な球状物体であることが判明した。この TfNC \supset siRNA の細胞取り込み能を調べるため、蛍光色素 Alexa488 で標識した siRNA (siRNA^{A488}) を用いて Tf 修飾ナノカプセルを調製 (TfNC \supset siRNA^{A488}) し、MEM 培地中のヒト肝癌由来 Hep3B 細胞へ添加ののち、細胞を共焦点顕微鏡 (CLSM) で観察した。未修飾の siRNA や AzNC \supset siRNA と比較し、TfNC に内包された場合には多くの siRNA が細胞へ取り込まれていた。

そこで、我々は TfNC \supset siRNA の組織浸透能を調べるため、Hep3B 細胞を用いて 3 次元腫瘍組織モデル (スフェロイド) を作成した (Figure 4a)。siRNA サンプルを加えた MEM 培地 (10% FBS) 中で培養後、スフェロイド断面を共焦点顕微鏡によって観察した。深さ 70 μm の断面図において、中心部にも siRNA^{A488} 由来の発光が観察されたことから、TfNC \supset siRNA は、深さ \sim 70 μm まで siRNA を輸送したことが明らかとなった (Figure 4b)。一方で、未修飾 siRNA や Tf の代わりにウシ血清アルブミン (BSA) を用いて調製したナノカプセルは 10 μm ほどまでしか浸透しなかった (Figure 4c)。この結果は、Tf 由来のトランスサイトシス能によって TfNC \supset siRNA がスフェロイド深部まで輸送されたことを示唆している。さらに、TfNC \supset siRNA を用いて、顕著な細胞毒性を示すことなく標的遺伝子の発現を抑制することにも成功した。

[3] DNA アプタマーの阻害効果を増強する光反応性分子糊^[4]

DNA アプタマーは標的とするタンパク質へ高い特異性を持ち、他のリガンド分子との結合を阻害することによりタンパク質の機能発現を抑制する。その物理化学的な安定性や合成の簡便さ、目的とする

核酸分子の探索が容易であることから、抗体に変わる合成医薬として、様々な疾患の治療法として発展する可能性を秘めている。しかしながら、標的タンパク質に対する DNA アプタマーの結合力は不十分であることも多く、実用化への大きな課題となっている。これまでに DNA アプタマー/標的タンパク質複合体の固定化の戦略として、DNA 鎖への光架橋部位の導入が考えられてきたが、そのような化学修飾はアプタマーの立体構造を変えてしまう恐れがあるため、アプタマー本来の認識能を減じることにつながる¹⁶⁾。

本研究では、事前の化学修飾を行うことなく、DNA アプタマー/標的タンパク質間の相互作用を光架橋により増強する手法の開拓に取り組んだ。ここでは特に、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor, HGF) 受容体 c-Met へ特異的に結合することで知られている DNA アプタマー (SL1) ¹⁷⁾を用いて、SL1/c-Met 複合体を光によって安定化することを試みた。HGF が c-Met へ結合すると、癌細胞の遊走や増殖を誘導することが知られており¹⁸⁾、SL1 アプタマーの阻害効果を光によって増強する技術は、DNA アプタマーを用いた癌治療法のために重要である。

はじめに、SL1/c-Met 複合体の光架橋ユニットとして、BP およびアジド基 (N₃) を有する光反応性分子糊 BPGlue-N₃ を合成し (Figure 5)、複合体の共有結合的な安定化について調査した。細胞膜タンパク質である c-Met は水溶液中での取り扱いが困難であるため、代わりに SL1 結合部位を含む c-Met 細胞外ドメインを融合した Fc タンパク質 (c-Met^{Fc}) を使用した。末端に放射性同位元素リン (³²P) を修飾した SL1^{32P} を調製し、SL1^{32P}/c-Met^{Fc} 複合体に BPGlue-N₃ を混合、光照射 (365 nm, 2 h) ののち、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行なった。泳動後のゲルからは、BPGlue-N₃/SL1^{32P}/c-Met^{Fc} の 3 物質混合溶液に光照射を施した場合に限り、SL1^{32P} と c-Met^{Fc} の共局在が確認された (Figure 6)。この結果は、BPGlue-N₃ が SL1^{32P}/c-Met^{Fc} 複合体を共有結合的に安定化したことを示している。また、蛍光色素 FAM を標識した SL1 (SL1^{FAM}) を用いた滴定実験により、BPGlue-N₃ は SL1^{FAM} へ強く接着することを確認した ($K_{\text{assoc}} = 3.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)。紫外光 (365 nm, 10 min) を照射すると BP は SL1 と共有結合を形成し、さらには、励起された BP からのエネルギー移動によってアジド基が非常に反応性の高いニトレンとなることが明らかとなった。この結果は、SL1^{32P}/c-Met^{Fc} 複合体に接着した BPGlue-N₃ のニトレン基が近傍に存在するタンパク質と反応していることを示唆している。

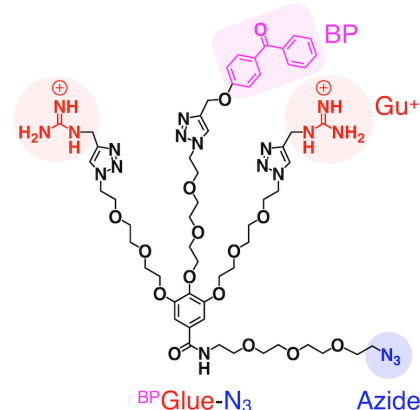


Figure 5. Molecular structure of photoreactive molecular glue BPGlue-N₃.

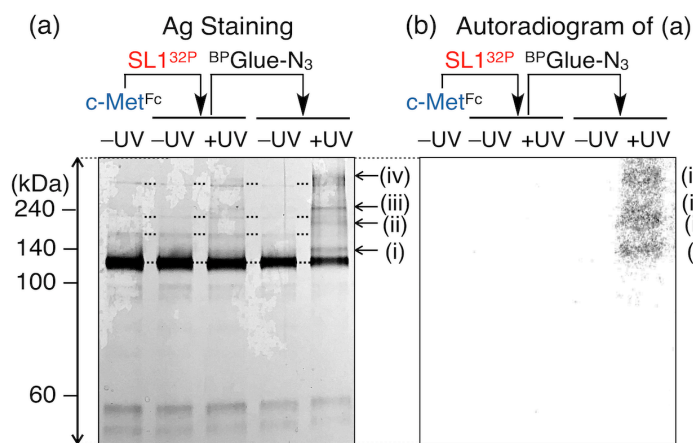


Figure 6. (a,b) SDS-PAGE profiles of c-Met^{Fc} (0.1 μM) without and with SL1^{32P} (0.1 μM) in the presence and absence of BPGlue-N₃ (2.5 μM), developed by (a) Ag staining and (b) autoradiography. The samples were electrophoresed before and after UV exposure (365 nm, 2 h).

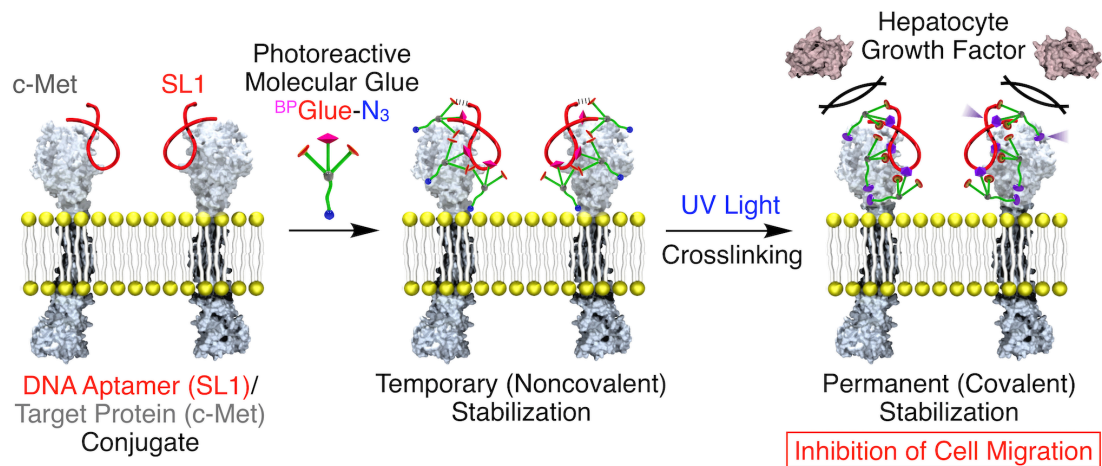


Figure 7. Schematic illustration of the temporary-to-permanent stabilization of DNA aptamer (SL1) onto the target protein (c-Met) via photoreactive molecular glue ^{BP}Glue-N₃. The covalently stabilized ^{BP}Glue-N₃/SL1 conjugate successfully inhibited the interaction of hepatocyte growth factor (HGF) with c-Met, resulting in the suppression of cell migration.

これらの結果をもとに、^{BP}Glue-N₃を用いた SL1/c-Met 複合体の光架橋に挑戦した。HGF は SL1 と競合して c-Met に結合し、c-Met の二量化、c-Met 細胞質ドメインのリン酸化を誘導し、さらには細胞遊走・増殖・転移を引き起こすことが知られている。細胞膜上での SL1/c-Met 複合体の安定化の有無を調べるため、HGF 添加後の細胞遊走を観察した。c-Met を発現していることで知られるヒト前立腺癌由来 DU145 細胞に HGF を添加すると細胞が活発に遊走した (Figure 8, black)。

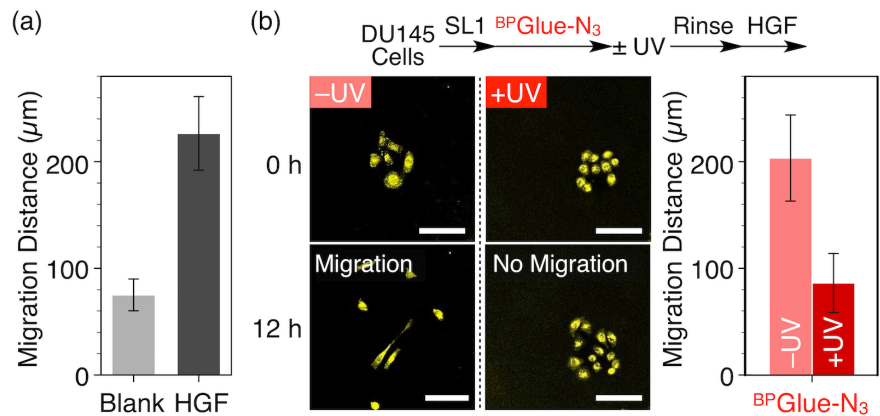


Figure 8. (a) Average cell migration distances of DU145 cells (n = 40) evaluated by CLSM. Cells were incubated in RPMI1640 (0.5% FBS) for 12 h at 37 °C without and with HGF (500 pM). (b) CLSM images ($\lambda_{\text{ext}} = 552 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{obs}} = 560\text{--}620 \text{ nm}$) of CellBrite Orange labeled cells subsequently supplied with SL1 (5 μM) and ^{BP}Glue-N₃ (100 μM) and exposed or not to UV light (365 nm, 4 min) prior to the incubation with HGF (500 pM). Scale bars = 100 μm . Their migration distances were evaluated by CLSM.

一方、SL1 をあらかじめ添加しておいた DU145 細胞では、細胞遊走が抑制されたが、HGF 添加前に細胞の洗浄操作を行うと細胞遊走が再び引き起こされた。そこで我々は、SL1 が結合した DU145 細胞に ^{BP}Glue-N₃ を添加、紫外光 (365 nm, 4 min) 照射し、そして D-PBS による洗浄操作を施したのちに HGF を投与し、細胞遊走挙動を共焦点顕微鏡で観察した。紫外光を照射した場合、細胞はほとんど遊走せず、移動距離は HGF 非添加の場合と同程度であった (Figure 8b, red)。一方、紫外光を照射しなかった場合は HGF 添加時と同程度の遊走が見られた (Figure 8b, light red)。また、細胞表面に c-Met がより多く発現しているヒト肺癌由来 A549 細胞溶解液のウェスタンブロッティング解

析から、SL1 および ^{BP}Glue-N₃ を添加した細胞においては、紫外光照射時に c-Met のリン酸化が抑制されたことが明らかになった。これらの結果は、光照射によって ^{BP}Glue-N₃ が SL1 を c-Met 上へ固定化し、HGF/c-Met 相互作用を阻害したことを示している。

【4】 結言

本研究では、生体高分子表面に強く接着性を示す『分子糊』を基盤とし、生医学的応用を志向した核酸表面の化学修飾技術を開拓した。特に、生体高分子表面に対する分子糊の接着→BP による光固定を段階的に行うことで、BP による不可逆的な光架橋を制御する戦略を取った。本研究で開拓した核酸修飾技術は、いずれも分子糊および BP の普遍性に基づくものであるため、修飾タンパク質や DNA アプタマーの選択によって、癌治療に限らず多岐にわたる対象へと適用することができる。本研究のさらなる発展により、核酸の可能性が大きく拡張され、核酸/タンパク質相互作用の理解や新たな疾患治療法の開発が加速的に進むものと期待している。

【5】 発表論文

- [i] A. Kohata, P. K. Hashim, K. Okuro, T. Aida
“Transferrin-Appended Nanocaplet for siRNA Delivery into Deep Tissues”
J. Am. Chem. Soc. **2019**, *141*, 2862–2866.
- [ii] A. Kohata, R. Ueki, K. Okuro, P. K. Hashim, S. Sando, T. Aida
“Photoreactive Molecular Glue for Enhancing the Efficacy of DNA Aptamers by Temporary-to-Permanent Conjugation with Target Proteins”
J. Am. Chem. Soc. **2021**, *143*, 13937–13943.
- [iii] N. Uchida, A. Kohata, K. Okuro, M. A. Deriu, G. M. Pavan, M. Tomishige, T. Hikima, T. Aida
“Reconstitution of microtubule into GTP-responsive nanocapsule” *to be submitted*.

【6】 参考文献

- [1] R. Mogaki *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6480–6491.
- [2] N. Uchida *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4684–4687.
- [3] A. Nacev *et al.*, *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 2907–2923.
- [4] J. Wang *et al.*, *Int. J. Pharm.* **2016**, *510*, 394–405.
- [5] P. K. Hashim *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15608–15611.
- [6] J. Lee *et al.*, *Nucleic Acid Ther.* **2016**, *26*, 173–182.
- [7] R. Ueki *et al.*, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13131–13134.
- [8] P. M. Comoglio *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 637–645.