

として期待されている。癌は血管から平均 50 μm の組織にまで拡大しており、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、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。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。

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 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。さらに、Tf の接着・固定化の足場とするため、 $\text{AzNC}\supset\text{siRNA}$ 表面へ分子糊と BP 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導入した ($\text{Gluc/BPNC}\supset\text{siRNA}$)。この $\text{Gluc/BPNC}\supset\text{siRNA}$ 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。

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 ($\text{TfNC}\supset\text{siRNA}$) 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 $\text{TfNC}\supset\text{siRNA}$ 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 ($\text{siRNA}^{\text{A488}}$) を用いて Tf 修飾ナノカプセルを調製 ($\text{TfNC}\supset\text{siRNA}^{\text{A488}}$) 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 $\text{AzNC}\supset\text{siRNA}$ 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 $\text{TfNC}\supset\text{siRNA}$ 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。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 $\text{siRNA}^{\text{A488}}$ 由来の発光が観察されたことから、 $\text{TfNC}\supset\text{siRNA}$ は、深さ ~70 μm まで siRNA を輸送したことが明らかとなった。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。この結果は、Tf 由来のトランスサイトーシス能によって $\text{TfNC}\supset\text{siRNA}$ 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、 $\text{TfNC}\supset\text{siRNA}$ 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

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。

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) 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、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 (N_3) を有する光反応性分子糊 $^{BP}Glue-N_3$ を合成し、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 (^{32}P) を修飾した SL1^{32P} を調製し、SL1^{32P}/c-Met^{Fc} 複合体に $^{BP}Glue-N_3$ 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、 $^{BP}Glue-N_3$ /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。この結果は、 $^{BP}Glue-N_3$ 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、 $^{BP}Glue-N_3$ は SL1^{FAM} へ強く接着することを確認した ($K_{assoc} = 3.8 \times 10^7 M^{-1}$)。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 $^{BP}Glue-N_3$ 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。

これらの結果をもとに、 $^{BP}Glue-N_3$ 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。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。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。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。