

# 核酸集合技術と それを利用した創薬研究

Nucleic acid assembly technology and drug discovery research

岡本 晃充

Akimitsu Okamoto

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻(教授)

Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo (Professor)

森廣 邦彦

Kunihiko Morihiko

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻(助教)

Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo (Research Associate)

KEYWORD ▶

核酸集合体

核酸医薬

非天然塩基対

はじめに

01

幼少時に「スイミー」という絵本に親しんだ方も多いのではないだろうか。オランダ出身の絵本作家レオ・レオニによるもので、日本では国語の教科書に採用されていることも多い。このお話の中では、仲間を失ったスイミーという名の小さな黒い魚の周囲に同じように小さい赤い魚がたくさん集合することで、はるかに大きな強い魚に立ち向かうことができるようになる。1匹1匹の魚は小さく無力であるが、集合して見かけの大きさが増すことでこれまでにない力を発揮するという戦略である。このスイミーの戦略は我々の専門である生物有機化学分野でも有効であろうと妄想することができる。すなわち、細胞内や生体内に極微量に存在する特定の標的分子(スイミー)の存在を大きく増幅できるような分子プローブ(他の小さな魚たち)を開発できれば、標的に対する選択的なイメージング技術や標的をマーカーとした副作用の少ない治療薬を実現することができる。たとえば、様々な分子が入り混じった複雑環境の細胞内で微量に存在する標的分子を探すのは困難であるが、細胞外から導入したプローブをその周りに集合させて見かけの大きさを大きくすれば容易に見つけることができるであろう。では、それを実現するためにはどのような技術が必要だろうか?本稿では筆者らが専門としている核酸(DNAやRNA)を材料とした場合について解説する。

な形・サイズの集合体を組み上げることができる。単純な二重鎖はもちろんのこと、三重鎖や四重鎖などより複雑な高次構造も構築可能であり、核酸科学者の創作意欲をかき立てている。これらの核酸集合技術はDNAオリガミ(DNAで創られたニコちゃんマークが有名)やDNAコンピュータなど、基礎から応用研究まで幅広く利用されている<sup>1)</sup>。最近では、生体内で作動するDNA型ナノロボットも作製可能になっており、医療分野への進出も目覚ましい。すなわち、核酸集合技術の利用目的は核酸で「何を創るか」から、創った核酸構造体で「何をするか」に遷りつつあると言える。また、特定のナノ構造体を構築できる核酸配列設計用のオンラインソフトウェアが公開されており、あらゆる分野の研究者が参入できる基盤が整えられ始めている(cadnanoなど)<sup>2)</sup>。以降では、特に細胞内で利用可能な核酸集合技術の代表例をいくつか詳細に解説したのち、我々が最近取り組んでいる抗がん核酸医薬としての応用研究について紹介したい。

## 2-1 Hybridization Chain Reaction (HCR)

2004年にカリフォルニア工科大学のPierceらによって開発されたhybridization chain reaction (HCR) は、短鎖の一本鎖核酸を開始剤として2種類のヘアピン型核酸分子が長鎖核酸二重鎖に変換される核酸集合技術である<sup>3)</sup>。すなわち、1分子の開始核酸を目印に多分子のヘアピン型核酸が直列に集合することで、開始核酸の存在シグナルを大幅に増幅することができる。この反応はまず開始核酸が一方のヘアピン型核酸と鎖置換反応を起こすことから始まる(図1)。HCRに用いられるヘアピン型核酸(HCRプローブ)は5'もしくは3'末端にtoeholdと呼ばれる一本鎖領域をもっており、配列選択的な鎖置換反応の足がかりとなる。続いて最初の鎖置換反応によってヘアピン構造が崩れることで新たな一本鎖領域が出現し、他方のヘアピン型核酸との鎖置換反応が可能となる。その後は2種類のヘアピン型核酸の連続した鎖置換反応が自発的に進行し、生成物としてニックの入った

核酸集合技術

02

核酸分子は水素結合を介してA:T(U)およびG:C塩基対を選択的に形成することでさまざまな高次構造体を構築できるため、核酸プローブの配列をうまく設計することで自発的にさまざま

長鎖核酸二重鎖が生じる。この反応は酵素や試薬を必要とせず等温で進むことから、生細胞内や生物個体内での核酸シグナル増幅に適していると考えられる。実際、Pierceらの研究グループはゼブラフィッシュ個体内で複数のmRNAイメージングを達成している<sup>4)</sup>。彼らは4種類の異なるmRNAに対するHCRプローブを用意し、4種類の異なる蛍光色素によって体内で染め分けることに成功した。従来の手法と比較して蛍光強度がおおよそ200倍に増加したことから、HCRの核酸シグナル増幅法としての有用性が窺える。また、最近ではpH変化<sup>5)</sup>や光照射<sup>6)</sup>によって駆動するHCRも開発されており、様々な外部刺激を利用することで時空間的に制御された条件下で核酸シグナルを増幅することも可能になっている。

HCRプローブの配列設計にはいくつかの指針が提示されている。まず大前提として、開始核酸非存在下ではそれぞれのHCRプローブは熱力学的に安定に存在し、それぞれが干渉してはならない(バックグランド反応の抑制)。一方で、開始核酸が存在すると速やかに、かつ、配列選択的に反応が進行する必要がある。Yungらのグループはこれらを満たすHCRプローブの条件として、①toehold領域のGC含量が30-40%以下である、②toehold領域の長さが12ヌクレオチド長以下である、③ステムの長さがtoehold領域の長さより長い、④ステムとtoeholdの長さが同等の場合、ステムのGC含量は60%以上であることを挙げている<sup>7)</sup>。実際、これらの条件を満たすHCRプローブはPierceらのオリジナルのものに比べて優れた反応性を示すことが分かっている。最近ではコンピュータ支援設計(CAD)によるHCRプローブの配列探索も報告されており、目的に合った反応性を容易に実現できる基盤が整いつつあると言える<sup>8)</sup>。一方で、上記の配列設計指針はあくまで細胞外での反応性に基づくものであり、生きた細胞内で機能するHCRプローブの探索には経験則を含めさらなる工夫が必要である。

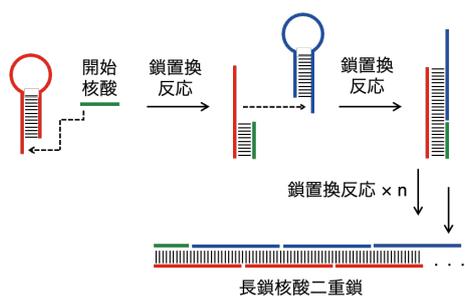


図1 HCR による長鎖核酸二重鎖の非酵素的な構築。開始核酸を反応のトリガーとして、2種類のヘアピン型核酸の鎖置換反応がカスケード的に進行する。

## 2-2 Catalytic Hairpin Assembly (CHA)

生きた細胞内で利用可能な他の核酸集合技術として、catalytic hairpin assembly (CHA) が挙げられる<sup>9)</sup>。この技術も2008年にPierceらのグループによって開発されたものであり、彼らの高い創造性には驚かされるばかりである。CHAもHCRと同様に短鎖一本鎖の開始核酸と2種類のヘアピン型核酸分子(CHAプローブ)を用いる。CHAでは開始核酸は反応の触

媒として働き、生成物として短鎖の二重鎖DNAを与える。最初に開始核酸が一方のヘアピン型核酸のtoehold領域を配列選択的に認識し、鎖置換反応によってステム構造を解離させる段階はHCRと同じであるが、その後他方のヘアピン型核酸が標的核酸を追い出すように鎖置換反応を進行させる。これにより、開始核酸が再生するとともに生成物として短鎖の二重鎖核酸が構築できる。追い出された開始核酸は再度CHAプローブと反応し、触媒的に機能することで効率的に生成物が産生する。CHAも微量核酸のシグナル増幅に適しており、Tanらの研究グループは生細胞内のmRNA蛍光イメージングに成功している<sup>10)</sup>。この報告によると、従来型の核酸検出蛍光プローブと比較してCHAプローブはより微量のmRNAを検出可能であり、病気の診断などに用いる技術としてより優れているとされている。

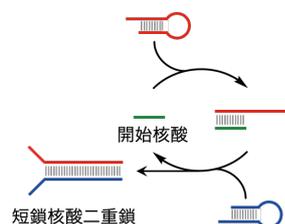


図2 CHAによる2種類のヘアピン型核酸を原料とした短鎖二重鎖の構築。開始核酸は再生されるため反応の触媒として働く。

CHAの弱点としては反応速度が遅いことが指摘されている。特に細胞内などの複雑な環境ではCHAプローブがランダムに拡散して反応が進行するため、分子間の相互作用は速度論的に不利である。また、単純なヘアピン型のDNAではヌクレアーゼ分解による反応効率の低下も無視することができない。これらを克服するため、YangらのグループはDNAでできた正四面体の頂点に2種類の異なるヘアピン型DNAを結合し、CHAが分子内で進行するシステムを開発した<sup>11)</sup>。このシステムを用いることでCHAプローブの局所濃度が増加し、従来の分子間CHAと比較すると15倍以上反応速度が上昇することが明らかになっている。さらに、正四面体DNA構造を基盤骨格とすることでヌクレアーゼ耐性も大幅に改善され、細胞内で長時間機能性を発揮することも可能になった。通常、CHAプローブを細胞内に導入する際にはカチオン性のトランスフェクション試薬が用いられることが多いが、その毒性やプロトコルの煩雑さが問題となることが多い。興味深いことに、正四面体構造のDNAはトランスフェクション試薬なしに細胞内に効率よく侵入することができるため、細胞導入の面でも従来法と比較して優れた細胞内核酸集合技術であると言える。

核酸集合技術を利用した  
抗がん核酸医薬開発

03

核酸医薬とはDNAやRNA、それらの類縁体から構成されたオリゴヌクレオチドであり、基本的には化学合成によって原薬が供

給される。2023年3月現在までに16品目の核酸医薬品が日米欧で承認されており、その数は今後も増え続けると予想される<sup>12)</sup>。創薬標的の枯渇から従来の低分子医薬開発が苦戦を強いられている一方で、核酸医薬の標的範囲はmRNAからpre-mRNA、ノンコーディングRNAと生物学の発展とともに拡大を続けており、これまでは治療が困難であった疾患に対する画期的な医薬品の創出につながることが期待されている。しかし、これまでにがんを治療標的とした核酸医薬は承認されておらず、新たな作用機序に基づく創薬技術の開発が求められている。がんは長年日本人の死因の第一位であり、その有効な核酸医薬の開発は喫緊の課題であると言える。

従来、がんに対する治療は外科手術、放射線治療、そして化学療法が主であったが、免疫チェックポイント阻害剤の開発以降、免疫療法が第四の治療法として定着しつつある。しかし、その奏効率は30-50%と高くなく、新しいメカニズムに基づくがん免疫医薬の開発が強く求められている。細胞外から侵入してきたDNAやRNAなどの核酸分子はウイルスと同様さまざまなセンサー分子によって認識されることで免疫を惹起するため、昔から免疫医薬の素材として研究が進められてきた。2017年に米国で承認されたB型肝炎予防薬であるHEPLISAV-BにはCpG配列を含むDNA(通称CpGオリゴ)が添加されており、免疫補助剤(アジュバント)として予防効果を高めている。しかし、CpGオリゴ自体が薬効本体として実用化された例はなく、あくまで補助的な役割に甘んじているのが現状である。また、長鎖のRNA二重鎖であるpoly(I:C)は細胞内のRNAセンサーに強く認識され、強力な抗がん作用を示すことからがん免疫医薬の素材として期待されたが、腫瘍選択性の乏しさから全身免疫毒性を回避することができず、単剤での臨床応用に至っていない<sup>13)</sup>。これらの状況を踏まえると、長鎖の核酸二重鎖をがん細胞内だけで構築することができれば、選択的に免疫を惹起してがん細胞だけを死に追いやるこ

とができると着想される。

筆者らは上述したHCRと呼ばれる核酸集合技術を利用することで、がん選択的な核酸免疫医薬が実現できると考えた<sup>14)</sup>。すなわち、特定の細胞で特徴的に発現している核酸分子をHCRのトリガーとして利用することができれば、標的細胞内でのみ長鎖核酸二重鎖を構築でき、自然免疫応答を活性化することで選択的な細胞死を導くことができるかもしれない。筆者らはまず、代表的ながん関連マイクロRNA(miRNA)であるmiR-21によって駆動するヘアピンDNAペアの設計と合成を行った。miRNAは20塩基長ほどの短い1本鎖RNAであり、さまざまながん細胞内で特定のmiRNAの発現が増加もしくは減少していることが報告されている。このヘアピンDNAペアをmiR-21が過剰発現しているHeLa細胞に導入し、細胞生存率を測定した結果、非常に強い細胞毒性を示すことが分かった(図3A)。これは強い免疫細胞毒性を示す長鎖DNA二重鎖であるpoly(dA:dT)と同程度、もしくはそれ以上の抗がん効果であった。ヘアピンDNAを片方のみ導入した場合では生存率に変化が見られなかったことから、当初の設計通りHCRによって細胞内でin situ構築された長鎖DNA二重鎖が強い細胞毒性を引き起こすことが明らかとなった。一方で、miR-21の発現量が低いHEK-293T細胞ではほとんど毒性を示さなかったため、ヘアピンDNAペアは細胞内miR-21環境を認識して細胞選択的な細胞死を誘導できることが明らかになった(図3B)。この選択的な細胞毒性が免疫惹起メカニズムによるものか確かめるため、免疫の活性化によって発現が増加するインターフェロンβ(INF-β)のmRNA量を測定した。ヘアピンDNAペアを導入したHeLa細胞ではINF-β mRNAの発現量が大きく上昇したのに対して、STINGをsiRNAでノックダウンした場合にはそれが一部低下したことから、細胞内の代表的なDNAセンサーであるcGAS-STING経路を介して自然免疫が活性化されていることが分かった(図3C)。

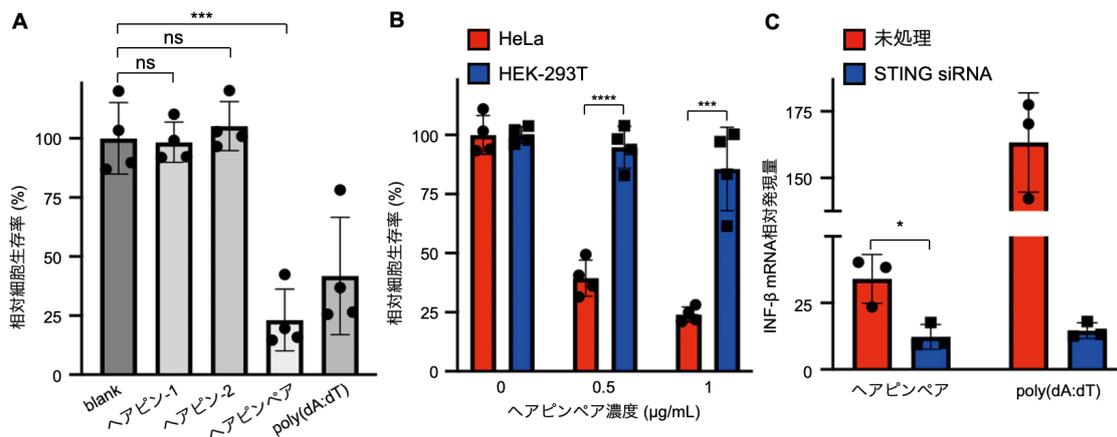


図3 培養細胞系におけるヘアピンDNAペアの薬効評価

(A) HeLa細胞に対するヘアピンDNAペアの毒性

(B) 細胞内 miR-21 量に依存した選択的な細胞毒性

(C) STING ノックダウンによる INF-β 発現量の現象

ns, not significant, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, and \*\*\*\*P < 0.0001 by unpaired Student's t-test.

参考文献14より引用し一部改変

Adapted with permission from Reference 14. Copyright 2023 American Chemical Society.

医薬としてさらに実践的な評価を実施するため、担がんマウスモデルを用いて動物個体に対する抗腫瘍活性を調べた。マウスメラノーマB16細胞を移植したマウスに対してヘアピンDNAペアをDDS試薬 (AteloGene® Local Use; 株式会社高研) を用いて局所注射し、腫瘍のサイズを経時的に測定することで抗腫瘍効果を評価した (図4)。その結果、実験後のマウスの写真からも分かるようにPBS投与群では腫瘍が急激に増大したのに対し、ヘアピンDNAペア投与群ではその増大を顕著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投与した poly(dA:dT) と比べても強力な抗腫瘍効果であり、開発したヘアピンDNAペアの抗がん剤としての有用性を示すことができた。なお、体重減少などの顕著な全身性副作用は生じなかったことから、本医薬候補核酸は高い薬効と安全性を併せもつと期待される。最近、上記の技術を基にした核酸創薬ベンチャー「東京核酸合成株式会社」を設立した<sup>15)</sup>。得られた成果を論文にして終わりにするのではなく、社会実装を見据えて研究を展開していく環境を整えつつある。

通常、アデニンやグアニンなどのプリン塩基 (large) はアンチ型と呼ばれる配向をとり、ワトソン-クリック面でピリミジン塩基 (small) と塩基対を形成する。しかし、8-オキソグアニン (oxoG) と呼ばれる酸化損傷塩基では配向性がシン型を優先し、フーグスティーン面でアデニン塩基と large-large 塩基対を形成しうる (図5A)。この現象は遺伝子変異の原因となるため生物にとって望まれたものではないが、新たな非天然塩基対を設計するうえではおおいに役立つ。すなわち、人為的に塩基配向性をアンチ-シン型に制御することで、これまでになかった large-large 非天然塩基対の形成が期待できる。このコンセプトに基づき筆者らは新たに **An<sup>N</sup>:Sy<sup>N</sup>** 塩基対を開発した (図5B)<sup>16)</sup>。分子設計のポイントは、**Sy<sup>N</sup>** 塩基の8位にかさ高い硫黄原子を導入してシン型を安定化 (アンチ型を不安定化) した点と、水素供与基と水素受容基を天然核酸塩基と直交的に配置することで選択的な塩基対形成を可能にした点にある。実際に **An<sup>N</sup>:Sy<sup>N</sup>** 塩基対の安定性と選択性をDNA二重鎖の融解温度測定によって評価した結果、天然のA:T塩基対と同程度の熱的安定性およびミスマッチ認識能をもっていることが明らかとなった。

著者らはHCRの開始核酸とヘアピンDNAペア中に **An<sup>N</sup>** および **Sy<sup>N</sup>** 塩基を導入し、**An<sup>N</sup>:Sy<sup>N</sup>** 塩基対の形成を駆動力とした反応の進行に成功した。ゲル電気泳動で反応を分析した結果、**Sy<sup>N</sup>** 塩基を導入した開始核酸を系中に加えた場合のみHCRの進行が確認された。すなわち、非天然塩基対形成を利用することで、夾雑な環境下でも選択的に核酸集合体の構築を惹起できる可能性を示すことができた。このような新しい分子設計に基づく核酸集合技術の制御は、将来的にさらに高機能な核酸医薬の開発に貢献できると期待される。

天然核酸に直交的な核酸集合技術

04

HCRをはじめとする核酸集合技術を細胞内で利用する場合、標的以外の核酸分子との非特異的相互作用に由来する副反応や低い反応効率が問題となる場合がある。これらの問題を克服するためには、天然のA:TおよびG:C塩基対との相互作用を回避して直交的に作動する分子設計が必要となる。筆者らは独自に開発した非天然核酸塩基対である **An<sup>N</sup>:Sy<sup>N</sup>** 塩基対を搭載したHCRシステムを設計し、天然核酸と直交したHCRを開発したので最後に紹介したい。

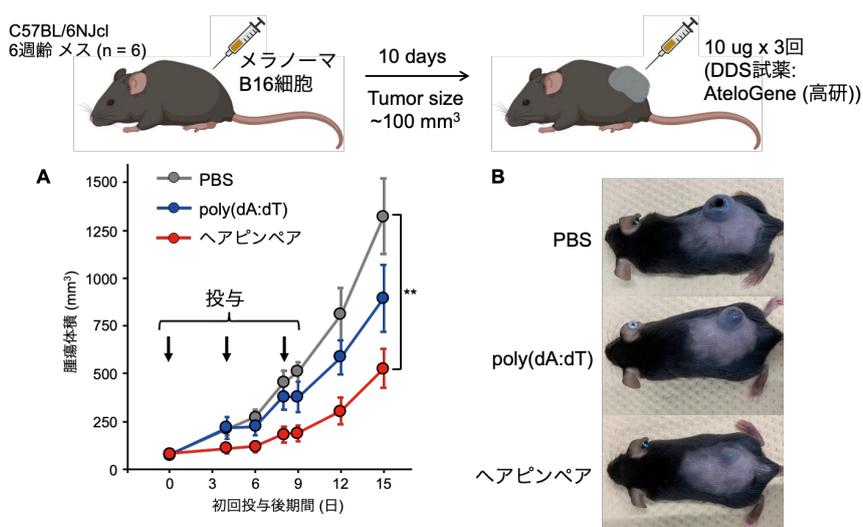


図4 担がんマウスモデルを用いたヘアピンDNAペアの薬効評価

(A) 腫瘍サイズの経時的な変化

(B) 初回投与 15 日後の代表的なマウスの写真

\*\*P < 0.01 by unpaired Student's t-test.

参考文献14より引用し一部改変

Adapted with permission from Reference 14. Copyright 2023 American Chemical Society.

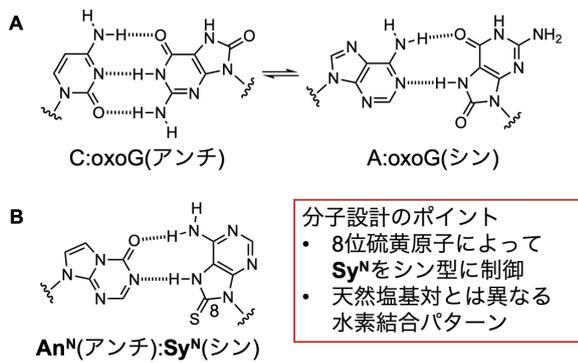


図5 アンチ-シン配向性をもつ非天然塩基対  $An^N:Sy^N$   
 (A) oxoGの塩基配向性および認識塩基の変化  
 (B) 非天然塩基対  $An^N:Sy^N$ の構造と分子設計のポイント

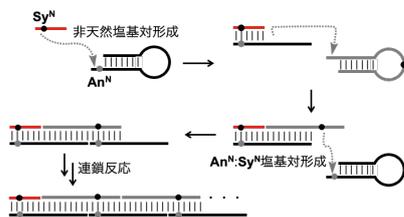


図6 非天然塩基対  $An^N:Sy^N$ 形成をHCRの駆動力とした核酸自己集合技術

## おわりに

# 05

本稿では、細胞内で利用可能な核酸集合技術の代表例と、それを応用した新しいタイプの抗がん核酸医薬の開発を中心に最近の我々の取り組みについて紹介した。本抗がん核酸医薬候補はがん細胞内選択的に自己集合することで免疫応答を活性化するヘアピンDNAペアを素材としており、副作用を軽減したがん治療につながる可能性を有している。独自に設計した2種のヘアピン型DNAは、それ自体は全く機能性を有していないが、miR-21というマーカー分子のもとに集合した場合にのみ強い抗がん活性を示す。まさに、小さな魚が集まって巨大な魚に対抗できるようになる「スイミー」と同じ戦略を核酸分子で実現したと言える。本技術は、異なるmiRNAの配列情報からヘアピン型DNAペアの配列を設計することで様々ながんに対応できるテーラーメイド医薬としての可能性も有しており、それぞれの患者さんに最適な治療薬を届けることができると考えている。また、現在のがん免疫療法の主役である免疫チェックポイント阻害剤との併用療法により、さらなる薬効の増強も期待される。ヘアピン型DNAは化学合成によって供給できるため種々の化学修飾を搭載することができ、その利点を活用することでがん以外の対象疾患の拡大も現在検討中である。本創薬技術をきっかけに、様々な核酸集合技術を利用した新たな核酸医薬開発が進むものと期待される。

## 参考文献

- N. C. Seeman, and H. F. Sleiman. DNA nanotechnology. Nat. Rev. Mater. 2017, 3, 17068.
- <https://cadnano.org/> (参照 2023-03-31)
- R. M. Dirks, and N. A. Pierce. Triggered amplification by hybridization chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101, 43, 15275-15278.
- H. M. T. Choi, V. A. Beck, and N. A. Pierce. Next-Generation in Situ Hybridization Chain Reaction: Higher Gain, Lower Cost, Greater Durability. ACS Nano. 2014, 8, 5, 4284-4294.
- A. Idili, A. Porchetta, A. Amodio, A. Vallée-Bélisle, and F. Ricci. Controlling Hybridization Chain Reactions with pH. Nano Lett. 2015, 15, 8, 5539-5544.
- H. Chu, J. Zhao, Y. Mi, Y. Zhao, and L. Li. Near-Infrared Light-Initiated Hybridization Chain Reaction for Spatially and Temporally Resolved Signal Amplification. Angew. Chem. Int. Ed. 2019, 58, 14877-14881.
- Y. S. Ang, and L.-Y. L. Yung. Rational design of hybridization chain reaction monomers for robust signal amplification. Chem. Commun. 2016, 52, 4219-4222.
- X. Liu, D. Mao, Y. Song, L. Zhu, A. N. Isak, C. Lu, G. Deng, F. Chen, F. Sun, Y. Yang, X. Zhu, and W. Tan. Computer-aided design of reversible hybridization chain reaction (CAD-HCR) enables multiplexed single-cell spatial proteomics imaging. Sci. Adv. 2022, 8, 2, eabk0133.
- P. Yin, H. M. T. Choi, C. R. Calvert, and N. A. Pierce. Programming biomolecular self-assembly pathways. Nature. 2008, 451, 318-322.
- C. Wu, S. Cansiz, L. Zhang, I.-T. Teng, L. Qiu, J. Li, Y. Liu, C. Zhou, R. Hu, T. Zhang, C. Cui, L. Cui, and W. Tan. A Nonenzymatic Hairpin DNA Cascade Reaction Provides High Signal Gain of mRNA Imaging inside Live Cells. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 15, 4900-4903.
- Z. Qing, J. Hu, J. Xu, Z. Zou, Y. Lei, T. Qing, and R. Yang. An intramolecular catalytic hairpin assembly on a DNA tetrahedron for mRNA imaging in living cells: improving reaction kinetics and signal stability. Chem. Sci. 2020, 11, 1985-1990.
- 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部ホームページ, <https://www.nihhs.go.jp/mtgt/index.html> (参照 2023-03-31)
- A. S. Levine, M. Sivolich, P. H. Wiernik, and H. B. Levy. Initial Clinical Trials in Cancer Patients of Polyribonucleosinic-Polyribocytidylic Acid Stabilized with Poly-L-lysine, in Carboxymethylcellulose [PoIy(ICLC)], a Highly Effective Interferon Inducer. Cancer Res. 1979, 39, 5, 1645-1650.
- K. Morihira, H. Osumi, S. Morita, T. Hattori, M. Baba, N. Harada, R. Ohashi, and A. Okamoto. Oncolytic Hairpin DNA Pair: Selective Cytotoxic Inducer through MicroRNA-Triggered DNA Self-Assembly. J. Am. Chem. Soc. 2023, 145, 1, 135-142.
- 東京核酸合成株式会社ホームページ, <https://www.tkg-na.com/> (参照 2023-03-31)
- K. Morihira, Y. Moriyama, Y. Nemoto, H. Osumi, and A. Okamoto. anti - syn Unnatural Base Pair Enables Alphabet-Expanded DNA Self-Assembly. J. Am. Chem. Soc. 2021, 143, 35, 14207-14217.