

2020 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

| | |
|-------|--|
| 研究課題 | 筋細胞に選択的かつ高親和性に結合する DNA アプタマーの創製 |
| キーワード | ①DNA アプタマー、②筋細胞選択的デリバリー、③筋疾患 |

研究者の所属・氏名等

| | | | |
|------------|---|-----|--------------------------|
| フリガナ 氏名 | ハマダ ケイスケ 濱田 圭佑 | 所属等 | 東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室 助教 |
| プロフィール | 2015 年 3 月東京薬科大学薬学部医療衛生薬学科卒業、2018 年 3 月東京薬科大学大学院薬学研究科薬学専攻博士課程修了（博士(薬学)）。その間、2016 年 4 月より日本学術振興会特別研究員（DC1）に採用され、2018 年 4 月より日本学術振興会特別研究員（PD）に資格変更。同年 7 月より東京薬科大学薬学部病態生化学教室助教（現職）。専門分野はペプチド化学、創薬化学、細胞生物学。所属学会は日本ペプチド学会、日本結合組織学会、日本薬学会、米国細胞生物学会。 | | |

1. 研究の概要

筋ジストロフィーをはじめとする各種遺伝性筋疾患に対する新規化学療法剤の創製ならびに遺伝子治療戦略の確立において、筋細胞への高選択的かつ高効率な薬物送達法の開発は、効力の増大や副作用発現回避の観点から大変重要な課題である。実際、筋ジストロフィーなどの難治性筋疾患治療や加齢に伴う筋力低下の改善を目的に、低・中分子化合物や核酸医薬（アンチセンス核酸、siRNA）を用いる薬物治療法が盛んに研究されているが、筋組織・筋細胞への薬剤送達効率の観点から未だ十分な治療効果が得られていない。

そこで本研究では、筋細胞に対する効率的な薬物送達を可能とする機能性分子を開発するべく、一本鎖 DNA である DNA アプタマーに着目し、ある筋細胞表面受容体（論文投稿準備中のため、分子の詳細に関しては割愛する）に対して選択的かつ高親和性に結合する新規分子の創出を試みた。SELEX と呼ばれる分子進化的手法を用い、目的の細胞表面受容体に対して高親和性に結合する分子のスクリーニングを行ったところ、4 種類の候補化合物を獲得することに成功した。現在これら分子の構造最適化および *in vivo* における集積性について検討している。

2. 研究の動機、目的

これまで私は筋ジストロフィー治療薬の開発を目指して、ナンセンス変異読み飛ばし活性を有するジペプチド様抗生物質ネガマイシンの構造活性相関研究を展開し、複数の医薬候補化合物を見出すなど、一貫して筋ジストロフィーをはじめとする難治性筋疾患の治療薬創製を目指した創薬研究に従事してきた。しかし、これまでに携わった化合物は筋細胞標的指向性を有しておらず、治療薬応用を目指す際には筋細胞（組織）選択性の付与が必要であると考えられた。そこで今回、筋細胞選択的な薬物送達が可能であり、かつ汎用性の高い新規機能性分子の創出に挑戦しようと考えた。

上記の問題点から私が着目したのが、近年注目を集めている機能性分子の一つである DNA アプタマーである。DNA アプタマーは、タンパク質などの標的分子に対して高い親和性を以って特異的に結合する一本鎖 DNA 断片である。DNA アプタマーは保存可能期間が長い、免疫原性が低い、安定性が高く、化学修飾も容易であるといった多くの利点を有していることから、筋組織選択的薬物送達を達成するために有用であると考えた。

3. 研究の結果

1. DNA アプタマーの取得

DNA アプタマーは、図 1 に示す Protein-SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) 法と呼ばれるスクリーニング法により取得した。すなわち、①ランダム配列を含む一本鎖 DNA (ssDNA) ライブラリーを、標的とするリコンビナントタンパク質を表面に担持させた磁気ビーズと結合させた後に②洗浄することで、標的に結合していない、もしくはアフィニティ

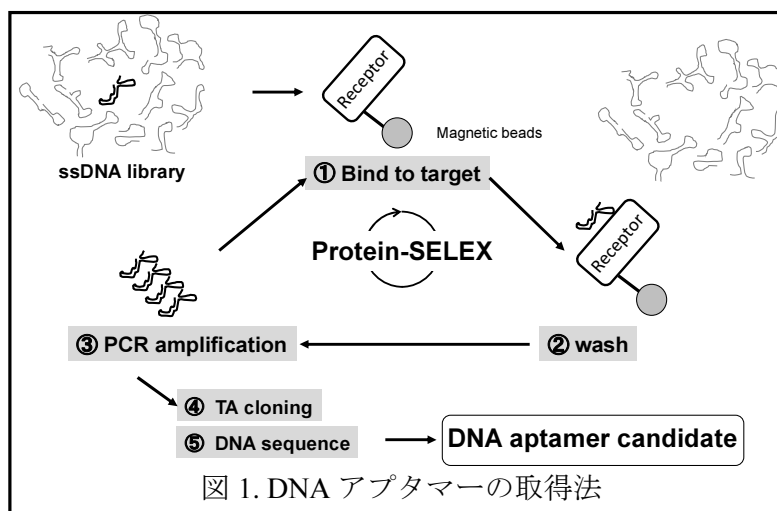


図 1. DNA アプタマーの取得法

の弱いものを除去する。③ssDNA を単離後、PCR にて複製し二本鎖 DNA を得た後、水素結合を乖離させることで再度 ssDNA へと変換する。この一連の流れを、条件を種々変更しながら繰り返すことで、標的とするリコンビナントタンパク質に対して高親和性に結合する分子を濃縮した。上記スクリーニングを計 8 回繰り返した後、④TA クローニングを経て、⑤DNA シーケンスを行うことで、目的とする受容体に対して高親和性に結合するアプタマー候補配列 (4 種類) を決定することに成功した。

2. 取得した DNA アプタマーの受容体結合能評価

Alexa488 および FITC を用いて、それぞれ候補配列の 5'末端を修飾した後、目的とする受容体を高発現する筋芽細胞 C2C12 に対する結合能評価を、フローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡を用いて行った。その結果、本アプタマーは筋細胞表面の標的受容体に対して、濃度依存的に結合することが明らかとなった。現在、本研究結果について学術雑誌への論文投稿準備中である。

4. 研究者としてのこれからの展望

本研究により、筋細胞表面の受容体に対して選択的かつ高親和性に結合する新規 DNA アプタマー分子の獲得に成功した。今後さらなる構造最適化研究を展開するとともに、医薬候補化合物との複合体形成および、*in vivo* 評価を含むさらなる詳細な結合能・標的指向性評価を行うことで、本分子を用いた筋細胞選択的な薬物送達法の有用性を証明したい。

私の夢は、筋ジストロフィーをはじめとする多くの難治性筋疾患の治療薬開発に携わり、一人でも多くの患者の命を救い、QOL を改善することである。これまでに多くの医薬候補化合物が開発されてはいるものの、臨床現場では未だに対症療法に頼らざるを得ない現状があり、その根本的治療法・治療薬の開発は喫緊の課題である。これからも研究者として、創薬研究を通じて微力ながらも社会に貢献できるよう精進していきたい。

5. 社会（寄付者）に対するメッセージ

今回、本研究を遂行するにあたり研究奨励金をご支援いただきました日本私立学校振興・共済事業団および関係者各位に心より感謝申し上げます。今回ご支援いただきました研究奨励金により、目的としておりました新規分子を見出すことが出来ました。挑戦的かつ先行研究が乏しいにも関わらず、本研究の可能性をご理解いただきご支援いただきまして、大変感謝しております。これからも本分子を基にした創薬研究に邁進していきたいと考えております。今後も継続的なご理解・ご支援を賜りますよう、何卒よろしく願いいたします。