



Development of bulk-scale intelligent hydrogels using oligo DNA for biomedical applications [全文の要約]

その他のタイトル	生体応用を目指したオリゴDNAを使ったバルクスケールのインテリジェントヒドロゲル材料の開発
著者	田中 静磨
発行年	2019-03-31
学位授与機関	関西大学
学位授与番号	34416甲第723号
URL	http://doi.org/10.32286/00018639

論題 : **Development of bulk-scale intelligent hydrogels using
oligo DNA for biomedical applications**

(生体応用を目指したオリゴ DNA を使ったバルクスケールの
インテリジェントヒドロゲル材料の開発)

生物の遺伝情報を担っている DNA は、化学的には二本の鎖が A-T, G-C の相補的な塩基対形成によって会合した生体高分子である。その複合体は直径 2 nm, 10.5 塩基の周期で一回転する非常に整った二重らせん構造をとっている。これらの性質は生物が遺伝情報をコピーしていくために不可欠なものであるが、視点を変えると、ボトムアップのナノテクノロジー¹⁾で利用するうえでも、実に適した特徴である。また、核酸はナノテクノロジー分野での利用だけに留まらず、ターゲット分子の検出などで利用されているアプタマー²⁾や、テロメラーゼ阻害剤などの核酸医薬³⁾としての研究・利用も数多く報告されている。さらに近年、DNA の配列特異的な認識能や DNA への化学修飾が容易な点を利用することによる、DNA ヒドロゲルを開発する研究が盛んに行われている⁴⁾。DNA ヒドロゲルは、組織再生用足場材料や細胞培養基材、DDS (Drug Delivery System) 用材料の様な医療材料や、マイクロ流路などのスイッチング剤としての利用が期待されている。しかしながら、DNA ヒドロゲルの実用化は、その合成法から容易では無い。

本論文では、上記の背景を基に、DNA の液相大量合成法を活用したインテリジェントヒドロゲル材料 (DNA 四重鎖ゲル) の開発およびその応用について報告する。本論文は、全六章構成であり、以下に各章の概要を記す。

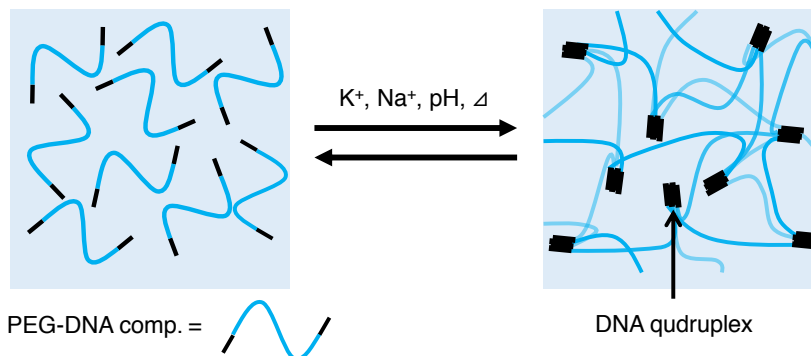


Fig. 1. Intelligent hydrogels utilizing DNA quadruplex formation between PEG-DNA conjugates.

緒論（第一章）では、DNA およびそれを用いたヒドロゲル等のマテリアルに関する現在までに行われている研究を俯瞰するとともに、その問題点および解決策を示し、本研究で開発目標とする DNA 材料について述べた。

第二章では、DNA を大量に合成可能な液相合成法⁵⁾を活用して、直鎖型もしくは4分岐型ポリエチレングリコール（PEG）の末端部にデオキシグアノシン（dG）を4塩基伸長されたマクロモノマー（直鎖型：L4.6k-dG4，分岐型：X10k-dG4）を合成し、これを用いたNa⁺もしくはK⁺に応答して瞬時にゲル化するグアニン四重鎖構造で架橋されたヒドロゲル材料（金属イオン応答型DNA四重鎖ゲル）の開発に成功に詳述した。この材料は、上記金属イオンを添加することで瞬時にゾル状態からゲル状態へと転移する。また、体液によってゾル・ゲル相転移をコントロールでき、生分解性、かつ自己修復可能であることを証明した^{6,7)}。

また第三章では、前章とは別のDNA四重鎖構造であるi-motif構造を活用した弱酸性条件下（pH4.0-5.0）のみでゲル化するpH応答型DNA四重鎖ゲルの開発に成功について報告した。また、直鎖型PEGと分岐型PEGを用いた場合に、このゲルの諸物性に大きな変化が現れたことを論じた⁸⁾。

第四章では、DNA四重鎖ゲルの問題点の1つである維持期間の短さを解決する手法について記述した⁹⁾。具体的には、相互侵入網目（IPN）を局所的に導入することを試みた。この方法を活用すれば、物理架橋ゲルの利点を損なうことなく、ゲルの維持期間のみを向上できる。実際に、L4.6k-dG4を使用して調製したDNA四重鎖ゲルの局所的なIPN化を行った結果、生体条件におけるゲルの維持期間を約3倍向上させることに成功した。面白いことに、X10k-dG4を用いた場合は、ゲルの維持期間に大きな変化が現れなかった。

さらに第五章では、DNA四重鎖ゲルの細胞培養基材および薬物放出用材料としての応用について検討を行ったことについて記した。DNA四重鎖ゲル上で、L929繊維芽細胞の培養を行った結果、スフェロイドのような細胞集合体が観察され、細胞の増減はなかった。また、テロメラーゼ阻害剤の一種であるTMPyP4を内包したゲルの薬物放出挙動について調査を行った。15wt%のマクロモノマーを使用することで、初期バーストの無い緩やかな薬物リリースが観られた。さらに、HeLa細胞を用いた細胞毒性試験から、マクロモノマーに毒性は無く、TMPyP4とマクロモノマーの複合化によるTMPyP4の薬効阻害がないことが示された。

最後に第六章では、総括としてDNA四重鎖ゲルのゲル化および崩壊メカニズムについて述べ、将来の応用の可能性を展望した。

References

- (1) Rothemund, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- (2) Walter, J.-G.; Kokpinar, O.; Friehs, K.; Stahl, F.; Scheper, T.; Systematic Investigation of Optimal Aptamer Immobilization for Protein-Microarray Applications. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 7372–7378.
- (3) Damm, K.; Hemmann, U.; Garin, C. P.; Hael, N.; Kauffmann, I.; Priepke, H.; Niestroj, C.; Daiber, C.; Enenkel, B.; Guilliard, B.; Lauritsch, I.; Muller, E.; Pascolo, E.; Sauter, G.; Pantic, M.; Martens, U.; Wenz, C.; Lingner, J.; Kraut, N.; Rettig, W.; Schnapp, A. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J.* **2001**, *20*, 6958–6968.
- (4) Um, H. U.; Lee, J. B.; Park, N.; Kwon, S. Y.; Umbach, C. C.; Luo, D. Enzyme-catalyzed assembly of DNA hydrogel. *Nature Mater.* **2006**, *5*, 797.
- (5) Bonora, G. M.; Zaramella, S.; Veronese, F. M. Synthesis by High-Efficiency Liquid-Phase (HELP) Method of Oligonucleotides Conjugated with High-Molecular Weight Poly(ethylene glycol)s (PEGs). *Biol. Proced. Online* 1998, *1*, 59–69.
- (6) Tanaka, S.; Wakabayashi, K.; Fukushima, K.; Yukami, S.; Maezawa, R.; Takeda, Y.; Tatsumi, K.; Ohya, Y.; Kuzuya, A. Intelligent, Biodegradable, and Self-Healing Hydrogels Utilizing DNA Quadruplex. *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 2388–2392.
- (7) Kuzuya, A.; Tanaka, S.; Hydrogels Utilizing G-Quadruplexes. *MOJ Poly. Sci.* **2017**, *1*, 00033.
- (8) Tanaka, S.; Yukami, S.; Fukushima, K.; Ohya, Y.; Kuzuya, A. Bulk pH-Responsive DNA Quadruplex Hydrogels Prepared by Liquid-Phase, Large-Scale DNA Synthesis. *ACS Macro Lett.* **2018**, *7*, 295–299.
- (9) Tanaka, S.; Yukami, S.; Ohya, Y.; Kuzuya, A. Localizing-IPN Conversion of DNA Quadruplex Gel for Enhanced Gel-State Lifetime in Water. in preparation.

以上