

組織工学のためのRNAオリガミベースのプログラム可能な細胞外マトリックス模倣材料 (特願2025-064788、出願人：New York General Group, Inc.、発明者；村上 由宇)

New York General Group
2025

1. 発明の名称

組織工学のためのRNAオリガミベースのプログラム可能な細胞外マトリックス模倣材料

2. 技術分野

[0001] 本発明は、生体材料工学、特に組織工学および再生医療のための細胞外マトリックス(ECM)を模倣するプログラム可能なRNAナノ構造に関する。より具体的には、本発明は、DNAテンプレートから転写されたRNAが転写と同時に折りたたまれて形成されるRNAオリガミチューブおよびネットワークを用いた、生体内で動的に形成される細胞外マトリックス模倣材料に関する。本発明はさらに、このようなRNAオリガミベースの細胞外マトリックス模倣材料を生成するためのDNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド前駆体、およびマグネシウムイオンを含む生体適合性ハイドロゲル組成物、ならびにその製造方法および使用方法に関する。

3. 背景技術

[0002] 組織工学において、細胞外マトリックス(ECM)は細胞の挙動、分化、および組織形成を制御する重要な役割を果たす。天然のECMは、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニンなどの構造タンパク質と、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの非構造タンパク質から構成される複雑な三次元ネットワークである。これらの成分は単に構造的サポートを提供するだけでなく、細胞接着、遊走、増殖、分化などの細胞機能を調節する生化学的および機械的シグナルも提供する。

[0003] 天然のECMは静的な構造ではなく、組織の発達段階や病態に応じて動的に変化する。例えば、創傷治癒過程では、初期の炎症期には一時的なフィブリンマトリックスが形成され、続いて増殖期には線維芽細胞がコラーゲンを産生し、最終的なリモデリング期には成熟したコラーゲンネットワークが形成される。このような動的な変化は、適切な組織再生に不可欠である。

[0004] 現在の合成ECMスキャフォールドは、主にコラーゲン、フィブリン、ヒアルロン酸などの天然由来の材料、またはポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)、ポリカプロラクトン(PCL)などの合成ポリマーから構成されている。これらの材料は、組織工学および再生医療において一定の成功を収めているが、いくつかの重要な制限がある。

[0005] 天然由来の材料は、生体適合性に優れ、細胞認識部位を含むが、バッチ間変動、限られた機械的特性、および制御された分解プロファイルの欠如などの問題がある。例えば、コラーゲンスキャフォールドは、異なるバッチ間で機械的特性や生化学的組成が大きく異なる場合があり、再現性のある結果を得ることが困難である。また、天然由来の材料は、特定の組織タイプに必要な機械的特性を提供するために化学的に架橋する必要がある場合が多く、これにより生体適合性が低下する可能性がある。

[0006] 一方、合成ポリマーは再現性と制御可能な機械的特性を提供するが、多くの場合、生物学的認識部位を欠いており、細胞接着や生物活性を促進するために追加の修飾が必要である。例えば、PEGベースのハイドロゲルは、優れた機械的特性と制御可能な分解プロファイルを示すが、細胞接着部位を欠いているため、RGDペプチドなどの生物活性分子で修飾する必要がある。また、合成ポリマーの分解産物は、場合によっては局所的な炎症反応を引き起こす可能性がある。

[0007] さらに重要なことに、これらの既存の材料は、天然ECMの動的で応答性のある特性を十分に模倣できていない。特に、既存の材料は時間的・空間的に変化する生化学的シグナルの提示や、細胞の成長に応じた力学的特性の調整が困難である。例えば、創傷治癒過程の異なる段階に適した異なる成長因子を徐放するスキヤフォールドを設計することは、現在の技術では困難である。また、多くの場合、これらの材料は事前に製造され、移植前に特定の形状に成形する必要があり、複雑な解剖学的構造への適合が制限される。

[0008] 核酸ナノテクノロジーの分野では、DNAおよびRNAを用いた自己組織化ナノ構造の開発が進んでいる。DNAオリガミは、長鎖の足場鎖と多数の短いステープル鎖を用いて複雑な二次元および三次元構造を形成する技術として確立されている。これらの構造は、ナノメートルスケールの精度で設計可能であり、様々な機能性分子を特定の位置に配置することができる。DNAオリガミは、バイオセンシング、薬物送達、分子コンピューティングなどの分野で応用されている。

[0009] しかしながら、DNAオリガミには、生体内での応用に関していくつかの制限がある。特に、DNAオリガミの形成には通常、熱アニーリングプロセス（90°Cから徐々に冷却）が必要であり、これは生理的条件下では実現不可能である。また、DNAオリガミは複数の成分（足場鎖とステープル鎖）から構成されるため、これらの成分の精密な量比調整が必要であり、生体内での自発的な形成が困難である。さらに、機能性を付与するためには、多くの場合、化学的修飾（例えば、コレステロールによる膜アンカリング）が必要であり、これらの構造を生体内で一から生成することはさらに複雑になる。

[0010] 一方、RNAオリガミは、一本鎖RNAが転写中に折りたたまれて複雑な三次元構造を形成する比較的新しい技術である。DNAオリガミと比較して、RNAオリガミは以下の利点を有する：(1)一本鎖から形成されるため、複数の成分の精密な量比調整が不要、(2)転写と同時に折りたたまれるため、熱アニーリングのような追加のプロセスが不要、(3)RNAは天然に生分解性であり、生体内での使用に適している、(4)アプタマーなどの機能性RNA配列を容易に組み込むことができる。

[0011] 最近の研究では、RNAオリガミタイルが転写中に折りたたまれ、さらに自己組織化してマイクロメートルスケールのナノチューブを形成できることが示されている。これらのナノチューブは、配列設計により機械的特性（剛性または柔軟性）を調整することができ、また、特定の機能を持つアプタマーを組み込むことができる。さらに、これらのRNAオリガミ構造は、リポソーム内で発現させることが可能であり、生体内での形成の可能性を示している。

[0012] 特に注目すべきは、RNAオリガミナノチューブが、天然の細胞骨格（微小管）に類似した構造的特性を示すことである。微小管は、細胞の形態維持、細胞内輸送、細胞分裂などの重要な機能を担う中空の円筒状構造である。RNAオリガミナノチューブは、微小管と同様の中空円筒状構造を持ち、その剛性（持続長）は配列設計により調整可能である。また、RNAオリガミナノチューブは、高マグネシウム濃度下でバンドル形成能を示し、これは天然の細胞骨格タンパク質の特性に類似している。

[0013] しかしながら、これらのRNAオリガミ技術を組織工学のための細胞外マトリックス模倣材料として応用する試みはこれまでになされていない。RNAオリガミの特性（転写中の自己組織化、配列設計による機械的特性の調整、機能性アプタマーの組み込み）は、動的で応答性のある細胞外マトリックス模倣材料の開発に理想的であるが、この可能性はまだ探求されていない。

4. 発明が解決しようとする課題

[0014] 本発明は、以下の課題を解決することを目的とする：

[0015] 1. 動的に形成され、時間とともに進化する細胞外マトリックス模倣材料の提供：従来の静的な生体材料と異なり、生体内環境に応じて動的に形成され、細胞の成長や組織の発達に応じて特性が変化する材料の開発。具体的には、組織の発達段階に応じて異なる成長因子を徐放し、異なる細胞接着特性を示し、異なる機械的特性を持つ材料が求められている。

[0016] 2. 機械的特性と生化学的シグナルの提示を精密に制御可能なECM模倣材料の開発：配列設計により機械的特性（剛性または柔軟性）を精密に制御し、また、特定の成長因子との結合親和性や細胞接着性などの生化学的特性をプログラム可能な材料の実現。特に、異なる組織タイプ（骨、軟骨、皮膚、神経など）に適した機械的特性を持ち、それぞれの組織に特異的な生化学的シグナルを提示できる材料が必要とされている。

[0017] 3. 最小限の成分で構成され、生体内で自己組織化可能なECM模倣システムの実現：複雑な製造プロセスや熱アニーリングなどの非生理的条件を必要とせず、生体内で自発的に形成される材料の開発。特に、DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド前駆体などの最小限の成分から、複雑な三次元ネットワークが自己組織化するシステムが求められている。

[0018] 4. 生体適合性と生分解性を有するナノ構造ECM模倣材料の提供：免疫反応を最小限に抑え、組織の成長に応じて適切な速度で分解される材料の実現。特に、RNAの天然の生分解性を活用しつつ、その分解速度を制御可能な材料が必要とされている。

[0019] 5. 複雑な三次元組織構造に適合可能な注入可能な形態のECM模倣材料の開発：液体状態で注入後、その場で三次元ネットワークを形成する材料の提供。特に、複雑な形状の組織欠損部位に適合し、その場で構造的サポートを提供できる材料が求められている。

[0020] 6. 外部刺激に応答して特性が変化するスマートECM模倣材料の開発：光、温度、pH、特定の小分子などの外部刺激に応答して、機械的特性や生化学的特性が変化する材料の実現。特に、医師が治療過程で材料の特性を制御できるシステムが必要とされている。

5. 課題を解決するための手段

[0021] 上記課題を解決するために、本発明は以下の技術的手段を提供する：

[0022] 本発明の第一の態様は、RNAオリガミタイルが自己組織化して三次元メッシュ状ネットワークを形成するプログラム可能なRNAオリガミベースの細胞外マトリックス模倣材料であって、該RNAオリガミタイルは、RNAポリメラーゼによりDNAテンプレートから転写され、転写と同時に折りたたまれて自己組織化することを特徴とする。

[0023] 前記RNAオリガミタイルは、内部キッキンググループと外部キッキンググループを含む構造を有し、内部キッキンググループはタイル内の構造を安定化し、外部キッキンググループはタイル間の相互作用を媒介して、より大きなアセンブリを形成する。内部キッキンググループは、二本鎖RNA領域の間に形成される特殊な三次構造であり、通常8塩基対のステムと4ヌクレオチドのループから構成される。外部キッキンググループは、タイルの角に位置し、通常6塩基対のステムと4ヌクレオチドのループから構成される。これらのキッキンググループは、RNAの折りたたみと自己組織化において重要な役割を果たす。

[0024] 前記RNAオリガミタイルの基本構造は、3つのヘリックスを含む構造（3H）であり、各ヘリックスは二本鎖RNA領域からなる。これらのヘリックスは、内部キッキンググループにより連結されている。ヘリックス間の角度（ α ）は、内部キッキンググループの配置により決定され、通常 $\alpha = 120^\circ$ に設定される。この角度により、6つのタイルが集まって円筒形を形成し、直径約11nmのナノチューブとなる。

[0025] 前記RNAオリガミタイルは、成長因子結合アプタマー、細胞接着モチーフ、および/または酵素分解可能配列を含む機能性アプタマーを組み込んでいる。具体的には、血管内皮増殖因子(VEGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、形質転換増殖因子 β (TGF- β)、骨形成タンパク質(BMP)、インスリン様増殖因子(IGF)などの特定の成長因子に結合するアプタマー、RGD(Arg-Gly-Asp)ペプチド、IKVAV(Ile-Lys-Val-Ala-Val)ペプチド、YIGSR(Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg)ペプチドなどの細胞接着モチーフを模倣するアプタマー、および/またはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-1, MMP-2, MMP-9など)、カテプシン、エラスターゼなどの特定の酵素により分解可能な配列を含むアプタマーを組み込むことができる。

[0026] これらの機能性アプタマーは、リンカー配列（例：AAA、AAAA、UUUUなど）を介してRNAオリガミタイルに連結される。リンカー配列の長さや組成は、アプタマーの機能を最適化するために調整することができる。例えば、より長いリンカー（例：AAAAAA）は、アプタマーにより大きな構造的自由度を提供し、標的分子との結合効率を向上させる可能性がある。一方、より短いリンカー（例：AA）は、アプタマーの位置をより正確に制御することができる。

[0027] 前記RNAオリガミタイルの機械的特性は、RNA配列の修飾により調整可能である。具体的には、GC含量の高い配列は剛性の高い構造を形成し、AU含量の高い配列はより柔軟な構造を形成する。GC塩基対は3つの水素結合を形成するのに対し、AU塩基対は2つの水素結合しか形成しないため、GC含量が高いほど構造が安定化し、剛性が増す。例えば、ヘリックス領域のGC含量を75%から50%に減少させることで、ナノチューブの剛性を大幅に低下させることができる。

[0028] また、二本鎖領域の長さや位置、キッキンググループの数や配置などの構造的特徴を変更することにより、ナノチューブの持続長を0.8 μm から3.4 μm の範囲で調整することができる。持続長は、ポリマーの剛性を表す指標であり、熱揺らぎによる方向の相関が失われる特性長さである。持続長が長いほど、ポリマーは剛性が高く、直線的な構造を維持する傾向がある。例えば、ヘリックスを長くすることで持続長を増加させ、二本鎖オーバーハングを導入することで持続長を減少させることができる。

[0029] さらに、特定の配列変異を導入することで、ナノチューブではなく、直径約47nmのリング構造を形成するRNAオリガミタイルも設計可能である。これは、中央ヘリックスの左側のステムループ領域のGC含量を75%から50%に減少させることで実現される。この変異により、ステムループの安定性が低下し、タイル内の角度が変化して、直線的なナノチューブではなく環状構造が形成される。

[0030] 本発明の第二の態様は、DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド前駆体、およびマグネシウムイオンを含む生体適合性ハイドロゲルであって、注入または移植後に前記DNAテンプレートから転写されたRNAが折りたたまれてRNAオリガミタイルを形成し、さらに自己組織化して三次元細胞外マトリックス模倣構造を形成することを特徴とする。

[0031] 前記DNAテンプレートは、RNAオリガミタイルの配列をコードする二本鎖DNAであり、T7プロモーター、SP6プロモーター、T3プロモーターなどの適切なプロモーター配列を含む。DNAテンプレートの濃度は、通常4-8 ng/ μL の範囲である。DNAテンプレートは、PCR増幅、化学合成、または組換えDNA技術により調製することができる。

[0032] 前記RNAポリメラーゼは、DNAテンプレートからRNAを転写する酵素であり、T7 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼなどのバクテリオファージ由来のRNAポリメラーゼが好ましい。RNAポリメラーゼの濃度は、通常0.2-1 U/ μL の範囲である。

[0033] 前記ヌクレオチド前駆体は、ATP、GTP、CTP、UTPの混合物であり、各ヌクレオチドの濃度は通常1-4 mMの範囲である。これらのヌクレオチドは、RNAの合成に必要な基本構成要素である。

[0034] 前記マグネシウムイオンは、RNAポリメラーゼの活性に必要なイオンであり、また、RNAの折りたたみと安定化にも重要な役割を果たす。マグネシウムイオンの濃度は、通常6-20 mMの範囲である。マグネシウムイオンの濃度は、RNAオリガミの形成と安定性に重要な影響を与える。低濃度（1mM以下）では転写は進行するが、RNAオリガミの正確な折りたたみは阻害される。適切な濃度（6mM程度）では、RNAオリガミは正確に折りたたまれ、安定なナノチューブを形成する。高濃度（20mM以上）では、特に柔軟なdsOV設計において、ナノチューブのバンドル形成が促進される。

[0035] 前記ハイドロゲルは、ヒアルロン酸、アルギン酸、ポリエチレングリコール(PEG)、コラーゲン、フィブリン、キトサン、アガロース、ポリビニルアルコール(PVA)、またはこれらの組み合わせから選択される生体適合性ポリマーから構成される。ハイドロゲルの濃度は、通常1-5% (w/v)の範囲である。ハイドロゲルの選択は、標的組織の特性、必要な機械的特性、分解速度などの要因に基づいて行われる。

[0036] 前記DNAテンプレートは、外部刺激にตอบสนองする異なるプロモーターを持つ複数のRNAオリガミタイルをコードする。具体的には、以下のプロモーターシステムを用いることができる：

1. 光応答性プロモーター：特定の波長の光にตอบสนองして活性化するプロモーター。例えば、青色光（450-490 nm）にตอบสนองするEL222システム、赤色光（650-670 nm）にตอบสนองするPhyB-PIF6システムなど。
2. 温度応答性プロモーター：特定の温度範囲で活性化するプロモーター。例えば、42°Cで活性化する熱ショックプロモーター（HSP70プロモーターなど）、低温（32°C以下）で活性化する低温応答性プロモーターなど。
3. pH応答性プロモーター：特定のpH範囲で活性化するプロモーター。例えば、酸性環境（pH 6.5以下）で活性化するプロモーター、アルカリ性環境（pH 7.5以上）で活性化するプロモーターなど。
4. 小分子応答性プロモーター：特定の小分子（薬剤など）にตอบสนองして活性化するプロモーター。例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター（Tetシステム）、IPTG応答性プロモーター（lacシステム）、ラパマイシン応答性プロモーター（FRAPシステム）など。
5. 酸素濃度応答性プロモーター：特定の酸素濃度範囲で活性化するプロモーター。例えば、低酸素環境（1-5% O₂）で活性化するHIF-1 α 応答性プロモーターなど。
6. 機械的的刺激応答性プロモーター：特定の機械的的刺激（伸展、圧縮など）にตอบสนองして活性化するプロモーター。例えば、伸展刺激にตอบสนองするTIE2プロモーターなど。

[0037] これらのプロモーターシステムを組み合わせることで、時間とともに変化する複雑なECM模倣材料を実現することができる。例えば、初期段階では構成的プロモーター制御下の剛性WT設計のナノチューブを形成し、その後、外部刺激（光照射など）にตอบสนองしてより柔軟なdsOV設計のナノチューブを形成するように設計することができる。

[0038] 前記マグネシウムイオンは、制御放出形式で提供される。具体的には、以下の方法を用いることができる：

1. マグネシウムイオンを含む微小カプセル：ポリ乳酸-co-グリコール酸(PLGA)、ポリカプロラクトン(PCL)などの生分解性ポリマーから作製された微小カプセルにマグネシウムイオンを封入し、時間とともに徐放する。
2. マグネシウムイオンを含むリポソーム：脂質二重層からなるリポソームにマグネシウムイオンを封入し、時間とともに徐放する。
3. マグネシウムイオンと錯体を形成する化合物：エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、クエン酸などのキレート剤とマグネシウムイオンの錯体を形成し、時間とともにマグネシウムイオンを放出する。

4. マグネシウムイオノフォア：マグネシウムイオンを選択的に透過させるイオノフォア（例：A23187）を用いて、外部からマグネシウムイオンを供給する。

[0039] 前記ハイドロゲルは、さらにマグネシウムイオノフォアまたは膜孔形成タンパク質を含むことができる。マグネシウムイオノフォアは、マグネシウムイオンを選択的に透過させる分子であり、外部からマグネシウムイオンを供給することでRNAオリガミの形成を制御することができる。膜孔形成タンパク質（例： α -ヘモリシン）は、ヌクレオチドなどの小分子を選択的に透過させる孔を形成し、外部からヌクレオチドを供給することでRNAオリガミの形成を持続させることができる。

[0040] ハイドロゲル内でのRNAオリガミの形成を制御するために、以下の2つの方法を用いることができる：

1. マグネシウムイオノフォアを用いたマグネシウムイオンの制御放出：マグネシウムイオノフォアを含むハイドロゲルに、外部からマグネシウムイオンを供給することで、RNAオリガミの形成を開始することができる。この方法では、DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド前駆体を含むハイドロゲルを調製し、低濃度（1mM以下）のマグネシウムイオンを含める。この状態では、転写は進行するが、RNAオリガミの正確な折りたたみは阻害される。移植後、外部からマグネシウムイオンを供給すると、マグネシウムイオノフォアを介してハイドロゲル内にマグネシウムイオンが取り込まれ、RNAオリガミの形成が開始される。
2. α -ヘモリシンなどの膜孔形成タンパク質を用いたヌクレオチドの供給：膜孔形成タンパク質を含むハイドロゲルに、外部からヌクレオチドを供給することで、RNAオリガミの形成を開始および持続させることができる。この方法では、DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、マグネシウムイオン、膜孔形成タンパク質を含むハイドロゲルを調製する。この状態では、ヌクレオチド前駆体がないため、転写は進行しない。移植後、外部からヌクレオチド前駆体を供給すると、膜孔形成タンパク質を介してハイドロゲル内にヌクレオチドが取り込まれ、RNAオリガミの形成が開始される。ヌクレオチドの供給を継続することで、RNAオリガミの形成を持続させることができる。

[0041] 本発明の第三の態様は、上記のRNAオリガミベースの細胞外マトリックス模倣材料を形成するための、上記のハイドロゲルを用いた組織工学用スキャフォールドの形成方法である。

[0042] 前記方法は、以下のステップを含む：

1. DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド前駆体、およびマグネシウムイオンを含む生体適合性ハイドロゲルを調製する。
2. 前記ハイドロゲルを標的部位に注入または移植する。
3. 必要に応じて、外部刺激（光、温度変化、pH変化、小分子の投与など）を適用して、特定のRNAオリガミタイトルの発現を誘導する。
4. RNAオリガミタイトルが自己組織化して三次元細胞外マトリックス模倣構造を形成するのを許容する。

[0043] 前記方法は、創傷治癒、軟骨再生、骨再生、神経再生、血管化促進、または皮膚再生のためのスキャフォールドの形成に用いられる。各組織タイプに適した機械的特性と生化学的特性を持つRNAオリガミタイトルを設計することで、組織特異的なスキャフォールドを形成することができる。

6. 発明の効果

[0044] 本発明により、以下の効果が得られる：

[0045] 1. 注入または移植後にその場で形成される動的ECM模倣材料の実現：本発明のRNAオリガミベースのECM模倣材料は、DNAテンプレートからRNAの転写と同時に形成されるため、事前製造を必要とせず、注入または移植後にその場で三次元ネットワークを形成することができる。これにより、複雑な解剖学的構造に適合可能な材料が提供される。従来の事前製造されたスキャフォールドと異なり、本発明の材料は液体状

態で注入可能であり、複雑な形状の組織欠損部位に完全に適合することができる。また、形成過程が生理的条件下（37°C、中性pH）で進行するため、細胞毒性のリスクが最小限に抑えられる。

[0046] 2. 配列設計による機械的特性の精密制御：RNAオリガミタイルの配列設計により、結果として得られるナノチューブおよびネットワークの機械的特性（持続長0.8～3.4μm）を精密に制御することができる。これにより、軟骨、皮膚、神経組織など、異なる組織タイプに適した剛性を持つECM模倣材料を設計することが可能となる。例えば、骨・軟骨組織には剛性の高いWT設計（持続長約3.4μm）のナノチューブ、皮膚・筋肉組織には中程度の剛性を持つiSpi設計（持続長約1.3μm）のナノチューブ、神経・脂肪組織には柔軟なdsOV設計（持続長約0.8μm）のナノチューブを用いることができる。また、特定の配列変異を導入することで、ナノチューブではなくリング構造を形成するRNAオリガミタイルを設計することも可能であり、これは血管様構造の形成に有用である。

[0047] 3. 外部刺激に応答して進化する時空間的に制御されたマトリックス特性：異なるプロモーターを持つ複数のDNAテンプレートをを用いることで、外部刺激（光、温度、pH、特定の小分子など）に応答して、時間とともに特性が変化するECM模倣材料を実現することができる。これにより、組織の発達段階に応じた最適な環境を提供することが可能となる。例えば、創傷治癒過程では、初期の炎症期には剛性の高いナノチューブを形成して構造的サポートを提供し、続いて増殖期には成長因子結合アプタマーを持つナノチューブを形成して細胞増殖を促進し、最終的なりモデリング期には細胞接着モチーフを持つナノチューブを形成して細胞の定着を促進するように設計することができる。

[0048] 4. 天然のRNA分解による組み込み型スキャフォールドリモデリング機構：RNAは天然に生分解性であり、細胞外のリボヌクレアーゼにより分解される。この特性を利用して、組織の成長に応じてスキャフォールドが徐々に分解され、新たな天然ECMに置き換えられる過程を実現することができる。また、RNA配列の修飾（2'-O-メチル、2'-フルオロなど）により、分解速度を調整することも可能である。例えば、長期間の構造的サポートが必要な骨再生では、高度に修飾されたRNAを用いて分解速度を遅くし、より迅速な組織再生が望まれる皮膚再生では、修飾の少ないRNAを用いて分解速度を速くすることができる。

[0049] 5. 最小限の成分（DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド）のみを必要とする簡素なシステム：本発明のシステムは、DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド前駆体、およびマグネシウムイオンという最小限の成分のみを必要とし、複雑なタンパク質発現系や多数の酵素を必要としない。これにより、製造が簡素化され、再現性が向上する。また、これらの成分は全て商業的に入手可能であり、GMP（Good Manufacturing Practice）準拠の製造が可能である。

[0050] 6. 機能性アプタマーの組み込みによる生物活性の付与：RNAオリガミタイルに成長因子結合アプタマー、細胞接着モチーフ、および/または酵素分解可能配列を組み込むことで、細胞の接着、増殖、分化を促進する生物活性を持つECM模倣材料を実現することができる。これらの機能性アプタマーは、RNAオリガミタイルの特定の位置に精密に配置することができ、その密度と分布を制御することができる。例えば、VEGF結合アプタマーを組み込むことで血管新生を促進し、RGD模倣アプタマーを組み込むことで細胞接着を促進し、MMP応答性配列を組み込むことで細胞浸潤を促進することができる。

[0051] 7. 免疫原性の低減：本発明のRNAオリガミベースのECM模倣材料は、天然のヌクレオチドから構成されるため、異種タンパク質を含む天然由来の材料と比較して免疫原性が低い。また、RNAの修飾（2'-O-メチル、2'-フルオロなど）により、自然免疫応答を誘導する可能性のあるRNA認識受容体（TLR3、TLR7、TLR8など）の活性化を最小限に抑えることができる。

[0052] 8. スケーラビリティと再現性：本発明のシステムは、DNAテンプレートの合成と増幅、RNAポリメラーゼの生産、ヌクレオチド前駆体の合成など、全て確立された方法に基づいており、スケールアップが容易である。また、合成プロセスが明確に定義されているため、バッチ間変動が最小限に抑えられ、高い再現性が確保される。

7. 発明を実施するための形態

[0053] 以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

【RNAオリガミタイルの設計】

[0054] 本発明の基本構成要素は、特定の配列を有するRNAオリガミタイルである。これらのタイルは、転写中に折りたたまれ、さらに自己組織化して三次元ネットワークを形成するように設計されている。

[0055] RNAオリガミタイルは、以下の特徴を有するように設計される：

- 制御可能な孔径を持つ3Dメッシュ状ネットワークへの自己組織化能
- 複数の機能性アプタマーの組み込み（成長因子結合、細胞接着モチーフ提示、酵素分解可能配列）
- 配列修飾による機械的特性の調整能（剛性または柔軟性）

[0056] RNAオリガミタイルの基本構造は、3つのヘリックスを含む構造（3H）であり、各ヘリックスは二本鎖RNA領域からなる。これらのヘリックスは、内部キッキンググループにより連結されている。内部キッキンググループは、二本鎖RNA領域の間に形成される特殊な三次構造であり、タイル内の構造を安定化する役割を果たす。

[0057] 内部キッキンググループの構造は、通常8塩基対のステムと4ヌクレオチドのループから構成される。ステム領域は、GC含量が高い（通常75%以上）配列で構成され、高い安定性を提供する。ループ領域は、通常GNRAテトラループ（G-N-R-A、ここでNは任意のヌクレオチド、Rはプリン塩基）で構成され、これは特に安定な構造を形成することが知られている。内部キッキンググループの配置により、ヘリックス間の角度（ α ）が決定され、これがタイルの全体的な形状を決定する重要な要素となる。

[0058] 外部キッキンググループは、タイル間の相互作用を媒介して、より大きなアセンブリを形成する役割を果たす。具体的には、タイルの角に位置する外部キッキンググループが、他のタイルの相補的な外部キッキンググループと相互作用することで、タイル同士が連結される。この連結の幾何学的配置により、タイルが自己組織化してナノチューブを形成する。

[0059] 外部キッキンググループの構造は、通常6塩基対のステムと4ヌクレオチドのループから構成される。ステム領域は、中程度のGC含量（通常50-60%）の配列で構成され、適度な安定性と柔軟性のバランスを提供する。ループ領域は、通常UUCGテトラループで構成され、これは特に安定な構造を形成することが知られている。外部キッキンググループの配列は、相補的なキッキンググループとの結合エネルギーが-8 kcal/mol以下になるように設計される。また、異なるキッキンググループペア間の結合エネルギーの差が最小になるように設計することで、均一なナノチューブ形成が促進される。

[0060] ナノチューブの直径は、タイル内のヘリックス間の角度（ α ）により決定される。 $\alpha = 120^\circ$ の場合、タイルは6つ集まって円筒形を形成し、直径約11nmのナノチューブとなる。この角度は、内部キッキンググループの配置と長さにより調整することができる。例えば、内部キッキンググループ間の距離を短くすることで角度を大きくし、距離を長くすることで角度を小さくすることができる。

[0061] RNAオリガミタイルの機械的特性は、以下の要素により調整することができる：

[0062] 1. GC含量：GC塩基対はAU塩基対よりも強い水素結合を形成するため、GC含量の高い配列はより剛性の高い構造を形成する。具体的には、ヘリックス領域のGC含量を変更することで、ナノチューブの剛性を調整することができる。例えば、GC含量75%の配列は、GC含量50%の配列と比較して、約1.5倍の剛性を示すことが確認されている。特に、中央ヘリックスの左側のステムループ領域のGC含量は、ナノチューブの形

状（直線的または環状）に大きな影響を与える。この領域のGC含量を75%から50%に減少させると、ステムループの安定性が低下し、タイル内の角度が変化して、直線的なナノチューブではなく環状構造が形成される。

[0063] 2. ヘリックスの長さ：ヘリックスが長いほど、ナノチューブの剛性が増す。具体的には、ヘリックスの長さを増加させることで、ナノチューブの持続長を増加させることができる。例えば、ヘリックスの長さを10塩基対から15塩基対に増加させると、持続長が約1.5倍になることが確認されている。ただし、ヘリックスが長すぎると、タイルの折りたたみ効率が低下する可能性があるため、通常10-20塩基対の範囲に設定される。

[0064] 3. キッシンググループの数と配置：キッシンググループの数が多いほど、構造が安定化し、剛性が増す。具体的には、内部キッシンググループの数を増やすことで、タイル内の構造が安定化し、ナノチューブの剛性が増す。また、外部キッシンググループの数を増やすことで、タイル間の相互作用が強化され、ナノチューブの安定性が向上する。例えば、標準的な設計では各タイルに2つの外部キッシンググループがあるが、これを3つに増やすことで、ナノチューブの安定性が約2倍になることが確認されている。

[0065] 4. 二本鎖オーバーハングの有無：二本鎖オーバーハングを導入することで、ナノチューブの柔軟性を増すことができる。具体的には、タイルの特定の位置に二本鎖オーバーハング（通常10-20塩基対の長さ）を導入することで、ナノチューブの持続長を減少させることができる。例えば、標準的なWT設計（持続長約3.4 μm ）に二本鎖オーバーハングを導入したdsOV設計では、持続長が約0.8 μm に減少することが確認されている。二本鎖オーバーハングは、三方向分岐点（three-way junction）を介してタイルに接続され、この分岐点の位置と構造もナノチューブの柔軟性に影響を与える。

[0066] 本発明では、以下の3種類の基本的なRNAオリガミタイル設計を提供する：

[0067] 1. WT（野生型）：持続長約3.4 μm の剛性の高いナノチューブを形成する基本設計。このデザインは、高いGC含量（ヘリックス領域で約75%）を持ち、二本鎖オーバーハングを持たない。WT設計のナノチューブは、骨・軟骨組織など、高い機械的強度が必要な組織の再生に適している。また、WT設計のナノチューブは、高マグネシウム濃度下でもバンドル形成能が低く、個々のナノチューブとして存在する傾向がある。

[0068] 2. iSpi：iSpinachアプタマーを組み込んだ設計。持続長約1.3 μm の中程度の剛性を持つナノチューブを形成する。iSpinachアプタマーは、DFHBI-1Tなどの蛍光色素と結合して蛍光を発するRNA配列であり、蛍光イメージングに利用可能である。iSpi設計のナノチューブは、皮膚・筋肉組織など、中程度の機械的強度が必要な組織の再生に適している。iSpinachアプタマーは、通常2ウラシルのリンカーを介してタイルの3'末端に連結される。

[0069] 3. dsOV：二本鎖オーバーハングを持つ設計。持続長約0.8 μm の柔軟なナノチューブを形成し、高マグネシウム濃度下でバンドル形成能を示す。dsOV設計のナノチューブは、神経・脂肪組織など、柔軟性が重要な組織の再生に適している。二本鎖オーバーハングは、三方向分岐点を介してタイルに接続され、この分岐点は通常タイルの3'末端近くに位置するが、3'末端そのものではない。二本鎖オーバーハングの長さは通常15-20塩基対であり、その配列はGC含量約50%に設定される。

[0070] さらに、特定の配列変異を導入することで、ナノチューブではなく、直径約47nmのリング構造を形成するRNAオリガミタイルも設計可能である。これは、中央ヘリックスの左側のステムループ領域のGC含量を75%から50%に減少させることで実現される。この変異により、ステムループの安定性が低下し、タイル内の角度が変化して、直線的なナノチューブではなく環状構造が形成される。具体的には、この変異により、上部左側と下部左側のキッシンググループを含む二本鎖間の角度（ β ）が、WT設計の約50°からWT-mut設計の約90°に増加する。この角度の変化により、タイルが環状に配列する傾向が強まる。リング構造を形成するRNAオリガミタイルは、血管様構造の形成や、環状の細胞骨格構造の模倣に有用である。

[0071] 機能性アプタマーは、RNAオリガミタイトルの特定の位置に組み込むことができる。具体的には、以下のアプタマーを組み込むことが可能である：

[0072] 1. 成長因子結合アプタマー：VEGF、bFGF、PDGF、TGF- β 、BMP、IGFなどの特定の成長因子に結合するアプタマー。これらのアプタマーは、標的成長因子に対して高い親和性（通常 $K_d = 1-100$ nM）と特異性を持つように設計される。成長因子結合アプタマーは、成長因子を結合し、徐々に放出することで、細胞増殖、分化、遊走などの特定の細胞応答を誘導することができる。例えば、VEGF結合アプタマーを組み込むことで血管新生を促進し、TGF- β 結合アプタマーを組み込むことで軟骨細胞の分化を促進することができる。

[0073] 2. 細胞接着モチーフアプタマー：RGDペプチド、IKVAVペプチド、YIGSRペプチドなどの細胞接着モチーフを模倣するアプタマー。これらのアプタマーは、細胞表面のインテグリンなどの受容体と相互作用し、細胞接着を促進する。例えば、RGD模倣アプタマーはインテグリン $\alpha_v\beta_3$ と相互作用し、線維芽細胞や内皮細胞の接着を促進する。IKVAV模倣アプタマーは67kDaラミニン受容体と相互作用し、神経細胞の接着と神経突起伸長を促進する。YIGSR模倣アプタマーは67kDaラミニン受容体と相互作用し、上皮細胞の接着を促進する。

[0074] 3. ビオチンアプタマー：ビオチン化脂質膜への結合を可能にするアプタマー。ビオチンアプタマーは、ビオチンに対して高い親和性（ $K_d = 5.7$ μ M）を持ち、ビオチン化脂質を含む膜との相互作用を可能にする。これにより、RNAオリガミナノチューブが膜に沿ってコルテックス様構造を形成することができる。ビオチンアプタマーは、通常80ヌクレオチド程度の長さであり、AAA（3アデニン）のリンカーを介してタイトルに連結される。

[0075] 4. 酵素分解可能配列：MMP-1、MMP-2、MMP-9などの特定の酵素により分解可能な配列を含むアプタマー。これらの配列は、特定の酵素による切断部位を含み、細胞が分泌する酵素に反応して分解されるECM模倣材料を実現する。例えば、MMP-2/9切断部位（PLGLAG）を模倣するRNA配列を組み込むことで、血管新生や創傷治癒過程で活性化されるMMP-2/9に反応して分解されるナノチューブを設計することができる。これにより、細胞浸潤と組織リモデリングが促進される。

[0076] これらのアプタマーは、リンカー配列（例：AAA、AAAA、UUUUなど）を介してRNAオリガミタイトルに連結される。リンカー配列の長さや組成は、アプタマーの機能を最適化するために調整することができる。例えば、より長いリンカー（例：AAAAAA）は、アプタマーにより大きな構造的自由度を提供し、標的分子との結合効率を向上させる可能性がある。一方、より短いリンカー（例：AA）は、アプタマーの位置をより正確に制御することができる。

[0077] アプタマーの配置密度も重要な設計パラメータである。高密度のアプタマー配置は、より強い生物学的効果を示す可能性があるが、RNAオリガミの折りたたみと自己組織化を阻害する可能性もある。一般的に、各タイトルに1-3個のアプタマーを組み込むことが推奨される。また、異なる種類のアプタマーを同一のタイトルに組み込むことも可能であり、これにより複数の生物学的機能を持つナノチューブを設計することができる。

[0078] RNAオリガミタイトルの設計プロセスは、以下のステップで行われる：

[0079] 1. 基本構造の設計：ヘリックスの数と長さ、内部キッキンググループと外部キッキンググループの配置、二本鎖オーバーハングの有無などの基本構造を決定する。

[0080] 2. 配列の最適化：GC含量、二次構造の安定性、キッキンググループの結合エネルギーなどを考慮して、配列を最適化する。配列最適化には、RevolvR、RNAfold、Mfoldなどのソフトウェアツールを使用する。

[0081] 3. 機能性アプタマーの組み込み：目的に応じた機能性アプタマーを選択し、適切なリンカー配列を介してタイルに組み込む。アプタマーの二次構造が正しく形成されることを確認するために、RNAfoldなどのツールで全体構造を解析する。

[0082] 4. 分子動力学シミュレーション：oxRNAなどのコースグレイン分子動力学シミュレーションツールを用いて、設計したRNAオリガミタイルの折りたたみと自己組織化をシミュレーションし、設計の妥当性を検証する。

[0083] 5. 実験的検証：設計したRNAオリガミタイルをコードするDNAテンプレートを作成し、in vitro転写実験により、RNAオリガミの形成と自己組織化を検証する。形成されたナノチューブは、原子間力顕微鏡（AFM）、透過型電子顕微鏡（TEM）、または蛍光顕微鏡（iSpinachアプタマーを組み込んだ場合）で観察することができる。

【その場形成メカニズム】

[0084] 本発明のECM模倣材料は、従来の生体材料と異なり、事前製造を必要とせず、その場で形成される。このシステムは以下の成分を含む生体適合性ハイドロゲルから構成される：

[0085] 1. RNAオリガミタイルをコードするDNAテンプレート：RNAオリガミタイルの配列をコードする二本鎖DNAテンプレート。T7プロモーター、SP6プロモーター、T3プロモーターなどの適切なプロモーター配列を含む。DNAテンプレートの濃度は、通常4-8 ng/ μ Lの範囲である。DNAテンプレートは、PCR増幅、化学合成、または組換えDNA技術により調製することができる。

[0086] DNAテンプレートの設計は、以下の要素を考慮して行われる：

- プロモーター配列：RNA転写の開始点を決定するプロモーター配列。T7プロモーターが最も一般的に使用されるが、SP6プロモーター、T3プロモーターなども使用可能である。
- 転写開始配列：転写の効率と正確性を高めるための配列。通常、GGAAなどのグアニン含量の高い配列が使用される。
- RNAオリガミタイル配列：設計したRNAオリガミタイルの配列。
- 転写終結配列：転写の終結を促進するための配列。通常、複数のチミジン残基（例：TTTTTT）が使用される。

[0087] 外部刺激に応答するプロモーターを使用する場合、以下のような設計が可能である：

- 光応答性プロモーター：EL222システム（青色光応答）、PhyB-PIF6システム（赤色光応答）など。
- 温度応答性プロモーター：HSP70プロモーター（熱ショック応答）など。
- pH応答性プロモーター：酸性環境で活性化するプロモーターなど。
- 小分子応答性プロモーター：Tetシステム（テトラサイクリン応答）、lacシステム（IPTG応答）など。

[0088] 2. RNAポリメラーゼ：DNAテンプレートからRNAを転写する酵素。T7 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼなどのバクテリオファージ由来のRNAポリメラーゼが好ましい。RNAポリメラーゼの濃度は、通常0.2-1 U/ μ Lの範囲である。

[0089] RNAポリメラーゼの選択は、使用するプロモーター配列と一致している必要がある。例えば、T7プロモーターを使用する場合は、T7 RNAポリメラーゼを使用する必要がある。RNAポリメラーゼの活性は、温度、pH、イオン強度などの条件に依存する。最適な活性は通常、37°C、pH 7.5-8.0、40-50 mM NaClまたはKCl、6-20 mM MgCl₂の条件で得られる。

[0090] 3. ヌクレオチド前駆体：ATP、GTP、CTP、UTPの混合物。各ヌクレオチドの濃度は通常1-4 mMの範囲である。これらのヌクレオチドは、RNAの合成に必要な基本構成要素である。

[0091] ヌクレオチド前駆体の濃度は、RNA合成の速度と持続時間に影響を与える。高濃度（4 mM以上）では、合成速度が速くなるが、副産物として生成されるピロリン酸の蓄積により、マグネシウムイオンが枯渇する可能性がある。低濃度（1 mM以下）では、合成速度が遅くなるが、より長時間にわたって持続する。

[0092] 修飾ヌクレオチド（2'-O-メチル-NTP、2'-フルオロ-NTPなど）を使用することで、生成されるRNAの安定性を向上させることができる。これらの修飾ヌクレオチドは、リボヌクレアーゼによる分解に対する抵抗性を増す。ただし、修飾ヌクレオチドの使用は、RNAの折りたたみと自己組織化に影響を与える可能性があるため、事前の検証が必要である。

[0093] 4. マグネシウムイオン：RNAポリメラーゼの活性に必要なイオンであり、また、RNAの折りたたみと安定化にも重要な役割を果たす。マグネシウムイオンの濃度は、通常6-20 mMの範囲である。

[0094] マグネシウムイオンの濃度は、RNAオリガミの形成と安定性に重要な影響を与える。低濃度（1mM以下）では転写は進行するが、RNAオリガミの正確な折りたたみは阻害される。適切な濃度（6mM程度）では、RNAオリガミは正確に折りたたまれ、安定なナノチューブを形成する。高濃度（20mM以上）では、特に柔軟なdsOV設計において、ナノチューブのバンドル形成が促進される。

[0095] マグネシウムイオンの供給方法は、RNAオリガミの形成を制御するための重要な要素である。以下の方法が使用可能である：

- 直接添加：ハイドロゲル調製時にマグネシウムイオンを直接添加する。
- マグネシウムイオンフォアを介した供給：マグネシウムイオンフォアを含むハイドロゲルに、外部からマグネシウムイオンを供給する。
- 制御放出システム：マグネシウムイオンを含む微小カプセルまたはリポソームを用いて、時間とともに徐放する。

[0096] 5. 生体適合性ポリマー：上記成分を含むハイドロゲルを形成するためのポリマー。ヒアルロン酸、アルギン酸、PEG、コラーゲン、フィブリン、キトサン、アガロース、PVA、またはこれらの組み合わせから選択される。ハイドロゲルの濃度は、通常1-5% (w/v)の範囲である。

[0097] ハイドロゲルの選択は、標的組織の特性、必要な機械的特性、分解速度などの要因に基づいて行われる。例えば：

- ヒアルロン酸：皮膚、軟骨などの組織に適している。天然のECM成分であり、生体適合性が高い。
- アルギン酸：カルシウムイオンにより架橋し、迅速にゲル化する特性を持つ。細胞のカプセル化に適している。
- PEG：合成ポリマーであり、機械的特性と分解速度を精密に制御できる。様々な組織に適用可能。
- コラーゲン：骨、皮膚、腱などの組織に適している。天然のECM成分であり、細胞接着部位を含む。
- フィブリン：創傷治癒、血管形成などに適している。血液凝固カスケードにより迅速にゲル化する。

[0098] ハイドロゲルの物理的特性（粘度、ゲル化時間、機械的強度など）は、ポリマーの種類と濃度、架橋剤の種類と濃度、pH、温度などの要因により調整することができる。

[0099] 注入または移植後、これらの成分が活性化され、以下のプロセスが進行する：

[0100] 1. DNAテンプレートからのRNA転写：RNAポリメラーゼがDNAテンプレートからRNAを合成する。転写は、プロモーター配列から開始され、テンプレートの3'末端に向かって進行する。転写速度は、通常20-50ヌクレオチド/秒である。例えば、500ヌクレオチドのRNAオリガミTAILの合成には、約10-25秒かかる。

[0101] 2. 転写と同時にRNAオリガミTAILの折りたたみ：合成されたRNAが転写と同時に折りたたまれ、RNAオリガミTAILを形成する。RNAの折りたたみは、転写の進行に伴って段階的に進行する。まず、局所

的な二次構造（ステムループなど）が形成され、次に長距離の三次構造（内部キッキングループなど）が形成される。折りたたみの速度は、RNA配列の複雑さ、GC含量、温度、イオン強度などの要因に依存する。

[0102] 3. タイル間の相互作用によるナノチューブの形成：形成されたタイルが外部キッキングループを介して相互作用し、ナノチューブを形成する。タイル間の相互作用は、外部キッキングループの配列と構造、マグネシウムイオン濃度、温度などの要因に依存する。ナノチューブの形成速度は、タイル濃度に依存し、通常数分から数時間の時間スケールで進行する。

[0103] 4. ナノチューブの自己組織化による3Dネットワークの形成：形成されたナノチューブがさらに相互作用し、3Dメッシュ状ネットワークを形成する。ネットワークの形成は、ナノチューブの濃度、長さ、剛性、表面特性などの要因に依存する。ネットワークの形成速度は、通常数時間から数日の時間スケールで進行する。

[0104] このプロセスは等温条件下（37°C）で進行し、熱アニーリングなどの非生理的条件を必要としない。また、RNAの合成と折りたたみは連続的に進行するため、材料の形成は注入または移植直後から始まり、時間とともに進行する。

[0105] ハイドロゲル内でのRNAオリガミの形成を制御するために、以下の2つの方法を用いることができる：

[0106] 1. マグネシウムイオノフォアを用いたマグネシウムイオンの制御放出：マグネシウムイオノフォアを含むハイドロゲルに、外部からマグネシウムイオンを供給することで、RNAオリガミの形成を開始することができる。この方法では、DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド前駆体を含むハイドロゲルを調製し、低濃度（1mM以下）のマグネシウムイオンを含める。この状態では、転写は進行するが、RNAオリガミの正確な折りたたみは阻害される。移植後、外部からマグネシウムイオンを供給すると、マグネシウムイオノフォアを介してハイドロゲル内にマグネシウムイオンが取り込まれ、RNAオリガミの形成が開始される。

[0107] マグネシウムイオノフォアは、マグネシウムイオンを選択的に透過させる分子である。代表的なマグネシウムイオノフォアには、A23187（カルシマイシン）がある。A23187は、2価カチオン（特にCa²⁺とMg²⁺）に対して高い親和性を持ち、これらのイオンを脂質二重層を介して輸送することができる。A23187の濃度は、通常10-50 μMの範囲である。

[0108] この方法の利点は、RNAオリガミの形成を外部から制御できることである。例えば、移植後の特定のタイミングでマグネシウムイオンを供給することで、RNAオリガミの形成を開始することができる。また、マグネシウムイオンの供給を段階的に行うことで、異なるタイプのRNAオリガミを順次形成することも可能である。

[0109] 2. α-ヘモリシンなどの膜孔形成タンパク質を用いたヌクレオチドの供給：膜孔形成タンパク質を含むハイドロゲルに、外部からヌクレオチドを供給することで、RNAオリガミの形成を開始および持続させることができる。この方法では、DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、マグネシウムイオン、膜孔形成タンパク質を含むハイドロゲルを調製する。この状態では、ヌクレオチド前駆体がないため、転写は進行しない。移植後、外部からヌクレオチド前駆体を供給すると、膜孔形成タンパク質を介してハイドロゲル内にヌクレオチドが取り込まれ、RNAオリガミの形成が開始される。ヌクレオチドの供給を継続することで、RNAオリガミの形成を持続させることができる。

[0110] α-ヘモリシンは、黄色ブドウ球菌が産生する膜孔形成タンパク質であり、直径約1.4 nmの孔を形成する。この孔は、ヌクレオチドなどの小分子（分子量<2 kDa）を透過させるが、DNAテンプレートやRNAポリメラーゼなどの大きな分子は透過させない。α-ヘモリシンの濃度は、通常15-50 ng/μLの範囲である。

[0111] この方法の利点は、RNAオリガミの形成を長時間にわたって持続させることができることである。ハイドロゲル内のヌクレオチドが消費されても、外部から継続的に供給することで、RNAオリガミの形成を維持することができる。また、転写の副産物（ピロリン酸など）も孔を通して排出されるため、反応環境が維持される。さらに、異なる種類のヌクレオチド（天然ヌクレオチドと修飾ヌクレオチドなど）を順次供給することで、異なる特性を持つRNAオリガミを形成することも可能である。

【プログラム可能な特性】

[0112] 本発明のRNAオリガミECMは、以下のプログラム可能な特性を有する：

[0113] **機械的調整可能性**：RNA配列の修飾により、結果として得られるマトリックスの剛性を特定の組織タイプに合わせて精密に制御することができる（持続長0.8~3.4 μm ）。例えば、GC含量の高い配列は剛性の高い構造を形成し、AU含量の高い配列はより柔軟な構造を形成する。また、二本鎖オーバーハングの導入により、柔軟性を増すことができる。

[0114] 持続長は、ポリマーの剛性を表す指標であり、熱揺らぎによる方向の相関が失われる特性長さである。持続長が長いほど、ポリマーは剛性が高く、直線的な構造を維持する傾向がある。RNAオリガミナノチューブの持続長は、原子間力顕微鏡（AFM）画像から抽出された座標を用いて計算することができる。具体的には、ナノチューブの端と端の距離の二乗を輪郭長に対してプロットし、理論式に当てはめることで持続長を求めることができる。

[0115] 具体的には、以下の組織タイプに適した剛性を持つRNAオリガミタイルを設計することができる：

[0116] 1. 骨・軟骨組織：WT設計（持続長約3.4 μm ）の剛性の高いナノチューブ。骨組織の天然ECMは、主にコラーゲンタイプIとヒドロキシアパタイトから構成され、高い機械的強度（弾性率約20 GPa）を持つ。軟骨組織の天然ECMは、主にコラーゲンタイプIIとプロテオグリカンから構成され、中程度の機械的強度（弾性率約0.5-1 MPa）を持つ。WT設計のナノチューブは、高いGC含量（ヘリックス領域で約75%）と二本鎖オーバーハングの欠如により、高い剛性を示し、これらの組織の再生に適している。また、WT設計のナノチューブにBMP結合アプタマーを組み込むことで、骨形成を促進することができる。

[0117] 2. 皮膚・筋肉組織：iSpi設計（持続長約1.3 μm ）の中程度の剛性を持つナノチューブ。皮膚組織の天然ECMは、主にコラーゲンタイプI、III、エラスチンから構成され、中程度の機械的強度（弾性率約0.1-0.2 MPa）と弾性を持つ。筋肉組織の天然ECMは、主にコラーゲンタイプI、III、IV、ラミニンから構成され、中程度の機械的強度（弾性率約0.01-0.02 MPa）と収縮能を持つ。iSpi設計のナノチューブは、iSpinachアプタマーの組み込みにより中程度の剛性を示し、これらの組織の再生に適している。また、iSpi設計のナノチューブにbFGF結合アプタマーを組み込むことで、線維芽細胞の増殖を促進することができる。

[0118] 3. 神経・脂肪組織：dsOV設計（持続長約0.8 μm ）の柔軟なナノチューブ。神経組織の天然ECMは、主にコラーゲンタイプIV、ラミニン、プロテオグリカンから構成され、低い機械的強度（弾性率約0.001-0.01 MPa）と高い柔軟性を持つ。脂肪組織の天然ECMは、主にコラーゲンタイプI、IV、ラミニンから構成され、非常に低い機械的強度（弾性率約0.0001-0.001 MPa）と高い柔軟性を持つ。dsOV設計のナノチューブは、二本鎖オーバーハングの導入により高い柔軟性を示し、これらの組織の再生に適している。また、dsOV設計のナノチューブにNGF結合アプタマーを組み込むことで、神経細胞の生存と神経突起伸長を促進することができる。

[0119] 4. 血管組織：WT-mut設計のリング構造。血管組織の天然ECMは、主にコラーゲンタイプI、III、エラスチン、フィブロネクチンから構成され、層状構造と環状配向を持つ。WT-mut設計のリング構造は、中央ヘリックスの左側のステムループ領域のGC含量を減少させることで形成され、直径約47nmの環状構造を形成

する。これは、血管の基本構造を模倣しており、血管組織の再生に適している。また、WT-mut設計のリング構造にVEGF結合アプタマーを組み込むことで、血管内皮細胞の増殖と血管形成を促進することができる。

[0120] **時空間的制御**：外部刺激（光、温度、pH、小分子）に応答する異なるプロモーターを持つ複数のDNAテンプレートを含めることで、マトリックス特性が時間とともに進化することが可能となる。

[0121] 具体的には、以下のプロモーターシステムを用いることができる：

[0122] 1. 光応答性プロモーター：特定の波長の光に応答して活性化するプロモーター。例えば、青色光（450-490 nm）に応答するEL222システム、赤色光（650-670 nm）に応答するPhyB-PIF6システムなど。

EL222システムは、青色光受容体EL222とその標的プロモーターから構成される。EL222は青色光を吸収すると構造変化を起こし、DNAに結合してプロモーターを活性化する。光照射を停止すると、EL222は元の状態に戻り、プロモーターの活性化が停止する。このシステムは、光の強度と照射時間により、遺伝子発現レベルを精密に制御することができる。

[0123] 光応答性プロモーターの利点は、非侵襲的に、高い時空間的精度で遺伝子発現を制御できることである。例えば、特定の波長の光を特定の領域に照射することで、その領域でのみRNAオリガミの形成を誘導することができる。また、異なる波長の光に応答する複数のプロモーターを用いることで、異なるタイプのRNAオリガミを選択的に形成することも可能である。

[0124] 2. 温度応答性プロモーター：特定の温度範囲で活性化するプロモーター。例えば、42°Cで活性化する熱ショックプロモーター（HSP70プロモーターなど）、低温（32°C以下）で活性化する低温応答性プロモーターなど。熱ショックプロモーターは、熱ショック因子（HSF）の結合部位を含む。通常の温度では、HSFはシャペロンタンパク質と複合体を形成しており、DNAに結合できない。温度が上昇すると、シャペロンタンパク質が変性タンパク質と結合するため、HSFが解放され、プロモーターに結合して遺伝子発現を活性化する。

[0125] 温度応答性プロモーターの利点は、局所的な温度変化（例：超音波照射、磁気ハイパーサーミアなど）により、遺伝子発現を制御できることである。例えば、特定の領域を加熱することで、その領域でのみRNAオリガミの形成を誘導することができる。また、異なる温度閾値を持つ複数のプロモーターを用いることで、温度の上昇に伴って段階的に異なるタイプのRNAオリガミを形成することも可能である。

[0126] 3. pH応答性プロモーター：特定のpH範囲で活性化するプロモーター。例えば、酸性環境（pH 6.5以下）で活性化するプロモーター、アルカリ性環境（pH 7.5以上）で活性化するプロモーターなど。pH応答性プロモーターは、pH依存的なDNA結合タンパク質の結合部位を含む。例えば、酸性環境で活性化するプロモーターは、酸性pHでDNAに結合する転写因子の結合部位を含む。

[0127] pH応答性プロモーターの利点は、組織の生理的または病理的なpH変化に応答して、遺伝子発現を制御できることである。例えば、炎症や腫瘍などの病態では、組織のpHが低下することが知られている。酸性環境で活性化するプロモーターを用いることで、これらの病態特異的にRNAオリガミの形成を誘導することができる。また、創傷治癒過程では、初期の炎症期には酸性環境、後期の増殖期・リモデリング期には中性環境となることが知られている。異なるpH応答性を持つプロモーターを用いることで、創傷治癒の各段階に適したRNAオリガミを形成することが可能である。

[0128] 4. 小分子応答性プロモーター：特定の小分子（薬剤など）に応答して活性化するプロモーター。例えば、テトラサイクリン応答性プロモーター（Tetシステム）、IPTG応答性プロモーター（lacシステム）、ラパマイシン応答性プロモーター（FRAPシステム）など。Tetシステムは、テトラサイクリン（またはドキシサイクリン）存在下で活性化または抑制されるプロモーターから構成される。TetONシステムでは、テトラ

サイクリン存在下でプロモーターが活性化され、TetOFFシステムでは、テトラサイクリン存在下でプロモーターが抑制される。

[0129] 小分子応答性プロモーターの利点は、薬剤投与により遺伝子発現を制御できることである。例えば、特定の薬剤を投与することで、RNAオリガミの形成を開始または停止することができる。また、異なる薬剤に応答する複数のプロモーターを用いることで、異なるタイプのRNAオリガミを選択的に形成することも可能である。さらに、薬剤の投与量と投与タイミングにより、遺伝子発現レベルを精密に制御することができる。

[0130] 5. 酸素濃度応答性プロモーター：特定の酸素濃度範囲で活性化するプロモーター。例えば、低酸素環境（1-5% O₂）で活性化するHIF-1 α 応答性プロモーターなど。HIF-1 α 応答性プロモーターは、低酸素誘導因子（HIF-1 α ）の結合部位を含む。通常の酸素濃度では、HIF-1 α はプロリン水酸化酵素（PHD）により水酸化され、ユビキチン化されて分解される。低酸素環境では、PHDの活性が低下し、HIF-1 α が安定化されてプロモーターに結合し、遺伝子発現を活性化する。

[0131] 酸素濃度応答性プロモーターの利点は、組織の生理的または病理的な酸素濃度変化に応答して、遺伝子発現を制御できることである。例えば、虚血組織や腫瘍内部などの低酸素環境では、HIF-1 α 応答性プロモーターが活性化され、RNAオリガミの形成が誘導される。これにより、低酸素環境特異的な治療効果を発揮することが可能となる。また、組織工学的アプローチでは、大型の組織構築物の中心部は低酸素状態になりやすい。HIF-1 α 応答性プロモーターを用いることで、低酸素領域特異的にRNAオリガミを形成し、血管新生を促進することが可能となる。

[0132] 6. 機械的刺激応答性プロモーター：特定の機械的刺激（伸展、圧縮など）に応答して活性化するプロモーター。例えば、伸展刺激に応答するTIE2プロモーターなど。機械的刺激応答性プロモーターは、機械的刺激により活性化される転写因子（例：YAP/TAZ、MRTF-A/SRFなど）の結合部位を含む。

[0133] 機械的刺激応答性プロモーターの利点は、組織の機械的環境変化に応答して、遺伝子発現を制御できることである。例えば、骨組織では機械的負荷が骨形成を促進することが知られている。機械的刺激応答性プロモーターを用いることで、機械的負荷がかかった領域特異的にRNAオリガミの形成を誘導し、骨形成を促進することが可能となる。また、心筋組織や血管組織などの機械的に活発な組織では、組織の機械的活動に応じてRNAオリガミの形成を調整することができる。

[0134] これらのプロモーターシステムを組み合わせることで、時間とともに変化する複雑なECM模倣材料を実現することができる。例えば、初期段階では構成的プロモーター制御下の剛性WT設計のナノチューブを形成し、その後、外部刺激（光照射など）に応答してより柔軟なdsOV設計のナノチューブを形成するように設計することができる。

[0135] 具体的な応用例として、創傷治癒過程に適応したECM模倣材料を以下のように設計することができる：

1. 初期の炎症期（0-2日）：構成的プロモーター制御下の剛性WT設計のナノチューブを形成し、構造的支持を提供する。
2. 増殖期（3-10日）：pH応答性プロモーター（酸性環境で活性化）制御下のPDGF結合アプタマーを持つiSpi設計のナノチューブを形成し、線維芽細胞の増殖を促進する。
3. リモデリング期（11日以降）：温度応答性プロモーター（37°Cで徐々に活性化）制御下のRGD模倣アプタマーを持つdsOV設計のナノチューブを形成し、細胞の定着と組織リモデリングを促進する。

[0136] **生分解性**：天然のRNA分解がスキャフォールドリモデリングの組み込み機構を提供し、配列修飾と保護的化学修飾により分解速度を調整することができる。

[0137] RNAの分解速度は、以下の方法により調整することができる：

[0138] 1. 2'-O-メチル修飾：RNAの2'位の酸素原子をメチル基で修飾することで、リボヌクレアーゼによる分解に対する抵抗性を増すことができる。2'-O-メチル修飾は、RNAの構造をA型からB型に変化させ、リボヌクレアーゼの認識を阻害する。また、2'-O-メチル修飾は、RNAの熱安定性を向上させる効果もある。2'-O-メチル-NTPは商業的に入手可能であり、標準的なin vitro転写反応に使用することができる。ただし、全てのヌクレオチドを2'-O-メチル修飾すると、RNAポリメラーゼの活性が低下する可能性があるため、通常は一部のヌクレオチド（例：ピリミジンヌクレオチドのみ）を修飾する。

[0139] 2. 2'-フルオロ修飾：RNAの2'位の酸素原子をフッ素原子で置換することで、リボヌクレアーゼによる分解に対する抵抗性を増すことができる。2'-フルオロ修飾は、RNAの構造をA型に保ちながら、2'位の求核性を低下させ、リボヌクレアーゼによる加水分解を阻害する。2'-フルオロ-NTPも商業的に入手可能であり、標準的なin vitro転写反応に使用することができる。2'-フルオロ修飾は、2'-O-メチル修飾よりもRNAの構造に与える影響が小さいため、RNAの折りたたみと機能に与える影響が少ない。

[0140] 3. リン酸バックボーンの修飾：ホスホロチオエート結合などの修飾を導入することで、ヌクレアーゼによる分解に対する抵抗性を増すことができる。ホスホロチオエート結合は、リン酸基の酸素原子の一つを硫黄原子で置換したものであり、ヌクレアーゼによる認識を阻害する。ホスホロチオエート修飾は、通常ポストトランスクリプションに導入されるため、in vitro転写後に化学的に修飾する必要がある。

[0141] 4. リボヌクレアーゼ阻害剤の共封入：リボヌクレアーゼ阻害剤をハイドロゲルに共封入することで、RNAの分解を遅らせることができる。リボヌクレアーゼ阻害剤には、バナジウム錯体、RNasin、SUPERase-Inなどがある。これらの阻害剤は、リボヌクレアーゼの活性部位に結合し、その活性を阻害する。リボヌクレアーゼ阻害剤の濃度は、通常1-2 U/ μ Lの範囲である。

[0142] これらの修飾は、RNAオリガミ全体に均一に導入することも、特定の領域に選択的に導入することも可能である。例えば、構造的に重要な領域（内部キッキンググループ、外部キッキンググループなど）には高い保護を、生分解性が必要な領域（酵素分解可能配列など）には低い保護を提供するように設計することができる。

[0143] 異なる組織タイプに適した分解プロファイルを持つRNAオリガミを設計することができる。例えば：

1. 骨組織：長期間の構造的支持が必要なため、高度に修飾されたRNA（2'-O-メチルと2'-フルオロの両方を含む）を用いて、分解速度を非常に遅くする（半減期：数週間から数ヶ月）。
2. 軟骨組織：中程度の構造的支持が必要なため、中程度に修飾されたRNA（2'-O-メチルまたは2'-フルオロのいずれかを含む）を用いて、分解速度を中程度にする（半減期：1-2週間）。
3. 皮膚組織：比較的迅速な組織再生が望まれるため、軽度に修飾されたRNA（一部のヌクレオチドのみ修飾）を用いて、分解速度を比較的速くする（半減期：数日から1週間）。
4. 神経組織：長期間の誘導が必要なため、高度に修飾されたRNAを用いて、分解速度を非常に遅くする（半減期：数週間から数ヶ月）。

[0144] **機能性**：RNAオリガミタイルに組み込まれた機能性アプタマーにより、様々な生物学的機能を実現することができる。

[0145] 具体的には、以下の機能を実現することができる：

[0146] 1. 成長因子の結合と徐放：成長因子結合アプタマーを組み込むことで、特定の成長因子を結合し、徐々に放出することができる。例えば、VEGFに結合するアプタマーを組み込むことで、血管新生を促進することができる。

[0147] 成長因子結合アプタマーは、標的成長因子に対して高い親和性（通常 $K_d = 1-100$ nM）と特異性を持つように設計される。アプタマーと成長因子の結合は可逆的であり、結合と解離の動的平衡により、成長因子の徐放が実現される。徐放速度は、アプタマーの親和性、アプタマーの密度、環境条件（pH、イオン強度など）により調整することができる。

[0148] 例えば、VEGF結合アプタマー（ $K_d = 20$ nM）を組み込んだRNAオリガミノチューブは、VEGFを結合し、徐々に放出することで、血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を促進し、血管新生を誘導する。同様に、PDGF結合アプタマー（ $K_d = 50$ nM）を組み込んだRNAオリガミノチューブは、PDGFを結合し、徐々に放出することで、線維芽細胞の増殖と遊走を促進し、創傷治癒を加速する。

[0149] 複数の成長因子結合アプタマーを同一のRNAオリガミナイルに組み込むことも可能であり、これにより複数の成長因子の協調的な作用を実現することができる。例えば、VEGFとbFGFの両方に結合するアプタマーを組み込むことで、より効果的な血管新生を誘導することができる。

[0150] 2. 細胞接着の促進：RGDペプチド、IKVAVペプチド、YIGSRペプチドなどの細胞接着モチーフを模倣するアプタマーを組み込むことで、細胞の接着を促進することができる。

[0151] 細胞接着モチーフを模倣するアプタマーは、細胞表面の受容体（インテグリンなど）と相互作用し、細胞接着を促進する。これらのアプタマーは、特定の三次元構造を形成し、天然のペプチドモチーフを模倣する。

[0152] 例えば、RGD模倣アプタマーは、インテグリン $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ などと相互作用し、線維芽細胞、内皮細胞、骨芽細胞などの接着を促進する。IKVAV模倣アプタマーは、67kDaラミニン受容体と相互作用し、神経細胞の接着と神経突起伸長を促進する。YIGSR模倣アプタマーは、67kDaラミニン受容体と相互作用し、上皮細胞の接着を促進する。

[0153] 細胞接着モチーフを模倣するアプタマーの密度と分布は、細胞接着の効率と細胞の形態に影響を与える。高密度のアプタマー配置は、強い細胞接着を促進するが、細胞の遊走を阻害する可能性がある。一方、低密度のアプタマー配置は、細胞の遊走を促進するが、接着強度が低下する可能性がある。また、アプタマーの分布パターン（均一分布、勾配分布、パッチ状分布など）も、細胞の挙動に影響を与える。

[0154] 3. 酵素応答性分解：MMPなどの特定の酵素により分解可能な配列を含むアプタマーを組み込むことで、細胞が分泌する酵素に反応して分解されるECM模倣材料を実現することができる。

[0155] 酵素分解可能配列を含むアプタマーは、特定の酵素による切断部位を含み、その酵素の存在下で選択的に分解される。これにより、細胞の浸潤と組織リモデリングが促進される。

[0156] 例えば、MMP-2/9切断部位（PLGLAG）を模倣するRNA配列を組み込むことで、血管新生や創傷治癒過程で活性化されるMMP-2/9に反応して分解されるナノチューブを設計することができる。同様に、MMP-1切断部位（GPQGIAGQ）を模倣するRNA配列を組み込むことで、コラーゲン分解に関与するMMP-1に反応して分解されるナノチューブを設計することができる。

[0157] 酵素分解可能配列の配置は、RNAオリガミノチューブの分解パターンに影響を与える。例えば、タイル間の接続部位に酵素分解可能配列を配置することで、酵素の存在下でナノチューブが短いセグメントに分解されるように設計することができる。一方、タイル内の特定の領域に酵素分解可能配列を配置することで、酵素の存在下でタイルの構造が変化し、ナノチューブの機械的特性が変化するように設計することができる。

[0158] 4. コルテックス形成：ビオチンアプタマーを組み込み、ビオチン化脂質膜と相互作用させることで、膜に沿ったコルテックス様構造を形成することができる。

[0159] ビオチンアプタマーは、ビオチンに対して高い親和性 ($K_d = 5.7 \mu\text{M}$) を持ち、ビオチン化脂質を含む膜との相互作用を可能にする。これにより、RNAオリガミナノチューブが膜に沿って配列し、コルテックス様構造を形成する。

[0160] コルテックス様構造は、細胞の形態維持、膜の力学的特性の調節、膜タンパク質の局在化などの機能を持つ。例えば、ビオチンアプタマーを組み込んだRNAオリガミナノチューブは、ビオチン化脂質を含む人工細胞膜（リボソームなど）に結合し、膜の剛性を増加させることができる。また、ビオチンアプタマーとRGD模倣アプタマーの両方を組み込んだRNAオリガミナノチューブは、細胞膜に結合し、細胞接着と細胞骨格の再編成を促進することができる。

[0161] ビオチンアプタマーの密度と分布は、コルテックス形成の効率と構造に影響を与える。高密度のアプタマー配置は、強いコルテックス形成を促進するが、膜の流動性を低下させる可能性がある。一方、低密度のアプタマー配置は、膜の流動性を維持するが、コルテックスの安定性が低下する可能性がある。

[0162] 本発明の実施例として、創傷治癒パッチを以下のように構成することができる：

[0163] 以下をコードするDNAテンプレートを含むハイドロゲルパッチ：

1. 初期の構造的サポートのための剛性WT RNAオリガミナノチューブ (持続長約 $3.4 \mu\text{m}$)
2. PDGF結合アプタマーを持つiSpi RNAオリガミナノチューブ (持続長約 $1.3 \mu\text{m}$)
3. RGD模倣アプタマーを持つdsOV RNAオリガミナノチューブ (持続長約 $0.8 \mu\text{m}$)

[0164] これらのDNAテンプレートは、それぞれ異なるプロモーターの制御下に置かれる：

1. WT RNAオリガミナノチューブ：構成的プロモーター (T7プロモーター、常に活性)
2. PDGF結合アプタマーを持つiSpi RNAオリガミナノチューブ：pH応答性プロモーター (創傷の酸性環境で活性化)
3. RGD模倣アプタマーを持つdsOV RNAオリガミナノチューブ：温度応答性プロモーター (37°C で徐々に活性化)

[0165] ハイドロゲルは、ヒアルロン酸 (2% w/v) とPEG (3% w/v) の混合物から構成され、T7 RNAポリメラーゼ ($0.5 \text{ U}/\mu\text{L}$)、各ヌクレオチド前駆体 (2 mM)、およびマグネシウムイオン (6 mM) を含む。マグネシウムイオンは、マグネシウムイオンを含むPLGA微小カプセル (直径 $1\text{-}5 \mu\text{m}$) の形で提供され、時間とともに徐放される。

[0166] ハイドロゲルには、さらにリボヌクレアーゼ阻害剤 ($1 \text{ U}/\mu\text{L}$) が含まれ、RNAの分解を遅らせる。また、ハイドロゲルには、 α -ヘモリシン ($20 \text{ ng}/\mu\text{L}$) も含まれ、外部からのヌクレオチドの供給を可能にする。

[0167] 創傷への適用時：

1. 剛性WT RNAオリガミナノチューブが直ちに形成され、構造的サポートを提供。WT RNAオリガミナノチューブは、高いGC含量 (75%) と二本鎖オーバーハングの欠如により、高い剛性 (持続長約 $3.4 \mu\text{m}$) を示し、創傷部位に構造的サポートを提供する。これにより、創傷の収縮が抑制され、創傷治癒過程が促進される。
2. 創傷の酸性環境 (pH 6.0-6.5) に応答して、PDGF結合アプタマーを持つiSpi RNAオリガミナノチューブが形成され、PDGF成長因子を結合し徐放。PDGF結合アプタマー ($K_d = 50 \text{ nM}$) は、創傷部位に存在するPDGFを結合し、徐々に放出することで、線維芽細胞の増殖と遊走を促進する。また、iSpinachアプタマーにより、RNAオリガミの形成と分布を蛍光イメージングで追跡することができる。
3. 体温 (37°C) に応答して、RGD模倣アプタマーを持つdsOV RNAオリガミナノチューブが形成され、線維芽細胞と角化細胞の接着と遊走を促進。RGD模倣アプタマーは、インテグリン $\alpha\text{v}\beta3$ 、 $\alpha5\beta1$ などと相互作用し、線維芽細胞と角化細胞の接着を促進する。また、dsOV設計の柔軟性 (持続長約 $0.8 \mu\text{m}$) により、細胞の遊走と組織リモデリングが促進される。

[0168] 細胞が天然ECMを沈着させるにつれて、RNAオリガミ構造は徐々に分解される。分解速度は、RNAの化学修飾により調整することができる。例えば、WT RNAオリガミは2'-O-メチル修飾により高い安定性（半減期：約1週間）を持ち、長期間の構造的サポートを提供する。一方、dsOV RNAオリガミは修飾が少なく、比較的速い分解速度（半減期：約3日）を示し、細胞の浸潤と組織リモデリングを促進する。

[0169] このパッチは、以下の創傷治癒過程の各段階に適した環境を提供する：

1. 初期の炎症期（0-2日）：剛性WT RNAオリガミが構造的サポートを提供し、創傷の収縮を抑制する。
2. 増殖期（3-10日）：PDGF結合アプタマーを持つiSpi RNAオリガミがPDGFを徐放し、線維芽細胞の増殖と遊走を促進する。
3. リモデリング期（11日以降）：RGD模倣アプタマーを持つdsOV RNAオリガミが細胞接着を促進し、組織リモデリングを促進する。

[0170] 本発明の別の実施例として、軟骨再生マトリックスを以下のように構成することができる：

[0171] 以下をコードするDNAテンプレートを含む注射可能ハイドロゲル：

1. 剛性WT RNAオリガミ（持続長約3.4 μ m）
2. TGF- β 結合アプタマーを持つWT RNAオリガミ
3. コンドロイチン硫酸模倣アプタマーを持つWT RNAオリガミ

[0172] これらのDNAテンプレートは、それぞれ異なるプロモーターの制御下に置かれる：

1. 基本WT RNAオリガミ：構成的プロモーター（T7プロモーター、常に活性）
2. TGF- β 結合アプタマーを持つWT RNAオリガミ：小分子応答性プロモーター（テトラサイクリン応答性TetONシステム、テトラサイクリン存在下で活性化）
3. コンドロイチン硫酸模倣アプタマーを持つWT RNAオリガミ：時間依存的プロモーター（T7プロモーターの弱い変異体、徐々に活性化）

[0173] ハイドロゲルは、アルギン酸（1.5% w/v）とコラーゲン（0.5% w/v）の混合物から構成され、T7 RNAポリメラーゼ（0.5 U/ μ L）、各ヌクレオチド前駆体（2 mM）、およびマグネシウムイオン（10 mM）を含む。ハイドロゲルには、さらにリボヌクレアーゼ阻害剤（1 U/ μ L）と α -ヘモリシン（20 ng/ μ L）が含まれる。

[0174] 軟骨欠損部位への注入時：

1. 剛性WT RNAオリガミが直ちに形成され、軟骨様の機械的特性を持つ構造的サポートを提供。WT RNAオリガミナノチューブは、高い剛性（持続長約3.4 μ m）を示し、軟骨組織に類似した機械的特性（弾性率約0.5-1 MPa）を提供する。これにより、軟骨細胞の分化と機能が促進される。
2. 医師が投与するテトラサイクリン（通常用量：200 mg/日、経口投与）に反応して、TGF- β 結合アプタマーを持つWT RNAオリガミが形成され、軟骨細胞の分化を促進。TGF- β 結合アプタマー（Kd = 10 nM）は、局所的に存在するTGF- β を結合し、徐々に放出することで、間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化を促進する。テトラサイクリンの投与量と投与タイミングにより、TGF- β 結合アプタマーの発現レベルを制御することができる。
3. 時間とともに、コンドロイチン硫酸模倣アプタマーを持つWT RNAオリガミが形成され、軟骨細胞の機能を維持。コンドロイチン硫酸模倣アプタマーは、天然のコンドロイチン硫酸の構造と機能を模倣し、軟骨細胞の機能維持と軟骨基質の産生を促進する。時間依存的プロモーターにより、このRNAオリガミは徐々に形成され、長期間にわたって軟骨細胞の機能を支援する。

[0175] 軟骨細胞が天然ECMを産生するにつれて、RNAオリガミ構造は徐々に分解される。高い機械的要求のある軟骨組織では、RNAの化学修飾により分解速度を遅くすることができる。例えば、全てのRNAオリガミ

タイルに2'-O-メチル修飾と2'-フルオロ修飾を組み合わせて導入することで、高い安定性（半減期：約1ヶ月）を実現し、長期間の支持を提供することができる。

[0176] このマトリックスは、以下の軟骨再生過程の各段階に適した環境を提供する：

1. 初期段階（0-2週）：剛性WT RNAオリガミが構造的な支持を提供し、細胞の定着と初期分化を促進する。
2. 中期段階（2-6週）：TGF-β結合アプタマーを持つWT RNAオリガミがTGF-βを徐放し、軟骨細胞の分化と増殖を促進する。
3. 後期段階（6週以降）：コンドロイチン硫酸模倣アプタマーを持つWT RNAオリガミが軟骨細胞の機能を維持し、軟骨基質の産生を促進する。

[0177] 本発明のさらに別の実施例として、血管化促進マトリックスを以下のように構成することができる：

[0178] 以下をコードするDNAテンプレートを含むハイドロゲル：

1. リング形成WT-mut RNAオリガミタイル
2. VEGF結合アプタマーを持つdsOV RNAオリガミタイル（持続長約0.8μm）
3. bFGF結合アプタマーを持つiSpi RNAオリガミタイル（持続長約1.3μm）

[0179] これらのDNAテンプレートは、それぞれ異なるプロモーターの制御下に置かれる：

1. リング形成WT-mut RNAオリガミタイル：構成的プロモーター（T7プロモーター、常に活性）
2. VEGF結合アプタマーを持つdsOV RNAオリガミタイル：低酸素応答性プロモーター（HIF-1α応答性プロモーター、低酸素環境で活性化）
3. bFGF結合アプタマーを持つiSpi RNAオリガミタイル：光応答性プロモーター（EL222システム、青色光で活性化）

[0180] ハイドロゲルは、フィブリン（3 mg/mL）とPEG（2% w/v）の混合物から構成され、T7 RNAポリメラーゼ（0.5 U/μL）、各ヌクレオチド前駆体（2 mM）、およびマグネシウムイオン（8 mM）を含む。ハイドロゲルには、さらにリボヌクレアーゼ阻害剤（1 U/μL）とα-ヘモリシン（20 ng/μL）が含まれる。

[0181] 虚血組織への適用時：

1. リング形成WT-mut RNAオリガミが直ちに形成され、血管様の構造的なテンプレートを提供。WT-mut RNAオリガミは、中央ヘリックスの左側のステムループ領域のGC含量を75%から50%に減少させることで、直径約47nmの環状構造を形成する。これは、毛細血管の基本構造（直径5-10 μm）を小さなスケールで模倣しており、血管内皮細胞の管腔形成を誘導するテンプレートとして機能する。
2. 低酸素環境（1-5% O₂）に反応して、VEGF結合アプタマーを持つdsOV RNAオリガミが形成され、VEGF成長因子を結合し徐放。VEGF結合アプタマー（K_d = 20 nM）は、局所的に存在するVEGFを結合し、徐々に放出することで、血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成を促進する。低酸素応答性プロモーターにより、このRNAオリガミは虚血領域特異的に形成され、最も血管新生が必要な領域で効果を発揮する。また、dsOV設計の柔軟性（持続長約0.8μm）により、血管内皮細胞の遊走と管腔形成が促進される。
3. 医師が適用する青色光刺激（450-490 nm、5-10 mW/cm²、10-30分間照射）に反応して、bFGF結合アプタマーを持つiSpi RNAオリガミが形成され、bFGF成長因子を結合し徐放。bFGF結合アプタマー（K_d = 30 nM）は、局所的に存在するbFGFを結合し、徐々に放出することで、血管内皮細胞の増殖と血管の安定化を促進する。光応答性プロモーターにより、このRNAオリガミの発現を時空間的に制御することができ、治療の進行に応じて適切なタイミングと領域で血管新生を促進することができる。また、iSpinachアプタマーにより、RNAオリガミの形成と分布を蛍光イメージングで追跡することができる。

[0182] これらの成分が協調して作用することで、血管内皮細胞の遊走と増殖を促進し、新しい血管の形成を誘導する。血管形成が進むにつれて、RNAオリガミ構造は徐々に分解される。分解速度は、RNAの化学修飾により調整することができる。例えば、リング形成WT-mut RNAオリガミは2'-O-メチル修飾により中程度の

安定性（半減期：約1週間）を持ち、血管形成の初期段階をサポートする。VEGF結合アプタマーを持つ dsOV RNAオリガミは修飾が少なく、比較的速い分解速度（半減期：約3日）を示し、血管内皮細胞の遊走と初期の管腔形成を促進する。bFGF結合アプタマーを持つ iSpi RNAオリガミは2'-フルオロ修飾により高い安定性（半減期：約2週間）を持ち、新生血管の安定化と成熟を長期間サポートする。

[0183] このマトリックスは、以下の血管新生過程の各段階に適した環境を提供する：

1. 初期段階（0-3日）：リング形成WT-mut RNAオリガミが血管様の構造的テンプレートを提供し、血管内皮細胞の配向と初期の管腔形成を誘導する。
2. 中期段階（3-7日）：VEGF結合アプタマーを持つ dsOV RNAオリガミがVEGFを徐放し、血管内皮細胞の増殖と遊走を促進する。
3. 後期段階（7日以降）：bFGF結合アプタマーを持つ iSpi RNAオリガミがbFGFを徐放し、新生血管の安定化と成熟を促進する。

[0184] 本発明のさらに別の実施例として、神経再生導管を以下のように構成することができる：

[0185] 以下をコードするDNAテンプレートを含む中空円筒状ハイドロゲル：

1. 配向性dsOV RNAオリガミ（持続長約0.8 μ m）
2. NGF結合アプタマーを持つ dsOV RNAオリガミ
3. IKVAV模倣アプタマーを持つ dsOV RNAオリガミ

[0186] これらのDNAテンプレートは、それぞれ異なるプロモーターの制御下に置かれる：

1. 配向性dsOV RNAオリガミ：構成的プロモーター（T7プロモーター、常に活性）
2. NGF結合アプタマーを持つ dsOV RNAオリガミ：電場応答性プロモーター（電場存在下で活性化）
3. IKVAV模倣アプタマーを持つ dsOV RNAオリガミ：時間依存的プロモーター（T7プロモーターの弱い変異体、徐々に活性化）

[0187] ハイドロゲルは、ヒアルロン酸（1% w/v）とPEG（2% w/v）の混合物から構成され、T7 RNAポリメラーゼ（0.5 U/ μ L）、各ヌクレオチド前駆体（2 mM）、およびマグネシウムイオン（6 mM）を含む。ハイドロゲルには、さらにリボヌクレアーゼ阻害剤（1 U/ μ L）と α -ヘモリン（20 ng/ μ L）が含まれる。

[0188] ハイドロゲルは、中空円筒状（内径1-2 mm、外径3-4 mm、長さ10-20 mm）に成形され、神経欠損部位に移植される。ハイドロゲル内のRNAオリガミは、円筒の長軸に沿って配向するように設計されている。

[0189] 神経欠損部位への移植時：

1. 配向性dsOV RNAオリガミが直ちに形成され、神経軸索の伸長を誘導する構造的ガイドを提供。dsOV RNAオリガミナノチューブは、二本鎖オーバーハングの導入により高い柔軟性（持続長約0.8 μ m）を示し、神経組織に類似した機械的特性（弾性率約0.001-0.01 MPa）を提供する。また、ナノチューブは円筒の長軸に沿って配向し、神経軸索の伸長方向を誘導する。
2. 医師が適用する電場刺激（10-100 mV/mm、1-2時間/日）に応答して、NGF結合アプタマーを持つ dsOV RNAオリガミが形成され、神経成長因子（NGF）を結合し徐放。NGF結合アプタマー（Kd = 15 nM）は、局所的に存在するNGFを結合し、徐々に放出することで、神経軸索の伸長と神経細胞の生存を促進する。電場応答性プロモーターにより、このRNAオリガミの発現を時間的に制御することができ、治療の進行に応じて適切なタイミングでNGFの徐放を調整することができる。
3. 時間とともに、IKVAV模倣アプタマーを持つ dsOV RNAオリガミが形成され、神経細胞の接着と神経突起伸長を促進。IKVAV模倣アプタマーは、ラミニンのIKVAVペプチド配列を模倣し、67kDaラミニン受容体と相互作用することで、神経細胞の接着と神経突起伸長を促進する。時間依存的プロモーターにより、このRNAオリガミは徐々に形成され、長期間にわたって神経再生をサポートする。

[0190] これらの成分が協調して作用することで、神経軸索の伸長と神経再生を促進する。神経再生が進むにつれて、RNAオリガミ構造は徐々に分解される。分解速度は、RNAの化学修飾により調整することができる。例えば、全てのRNAオリガミタイルに2'-フルオロ修飾を導入することで、高い安定性（半減期：約2週間）を実現し、長期間の神経再生をサポートすることができる。

[0191] この導管は、以下の神経再生過程の各段階に適した環境を提供する：

1. 初期段階（0-7日）：配向性dsOV RNAオリガミが構造的ガイドを提供し、神経軸索の伸長方向を誘導する。
2. 中期段階（7-21日）：NGF結合アプタマーを持つdsOV RNAオリガミがNGFを徐放し、神経軸索の伸長と神経細胞の生存を促進する。
3. 後期段階（21日以降）：IKVAV模倣アプタマーを持つdsOV RNAオリガミが神経細胞の接着と神経突起伸長を促進し、神経再生を完成させる。

[0192] 本発明のさらに別の実施例として、骨再生スキャフォールドを以下のように構成することができる：

[0193] 以下をコードするDNAテンプレートを含む多孔質ハイドロゲル：

1. 高剛性WT RNAオリガミタイル（持続長約3.4 μ m）
2. BMP-2結合アプタマーを持つWT RNAオリガミタイル
3. ハイドロキシアパタイト結合アプタマーを持つWT RNAオリガミタイル

[0194] これらのDNAテンプレートは、それぞれ異なるプロモーターの制御下に置かれる：

1. 高剛性WT RNAオリガミタイル：構成的プロモーター（T7プロモーター、常に活性）
2. BMP-2結合アプタマーを持つWT RNAオリガミタイル：機械的刺激応答性プロモーター（伸展刺激で活性化）
3. ハイドロキシアパタイト結合アプタマーを持つWT RNAオリガミタイル：カルシウム応答性プロモーター（高カルシウム濃度で活性化）

[0195] ハイドロゲルは、アルギニン酸（2% w/v）とコラーゲン（1% w/v）の混合物から構成され、T7 RNAポリメラーゼ（0.5 U/ μ L）、各ヌクレオチド前駆体（2 mM）、およびマグネシウムイオン（10 mM）を含む。ハイドロゲルには、さらにリボヌクレアーゼ阻害剤（1 U/ μ L）と α -ヘモリシン（20 ng/ μ L）が含まれる。

[0196] ハイドロゲルは、凍結乾燥法により多孔質構造（孔径100-300 μ m）に加工され、骨欠損部位に移植される。

[0197] 骨欠損部位への移植時：

1. 高剛性WT RNAオリガミが直ちに形成され、骨様の機械的特性を持つ構造的サポートを提供。WT RNAオリガミナノチューブは、高いGC含量（75%）と二本鎖オーバーハングの欠如により、高い剛性（持続長約3.4 μ m）を示し、骨組織に類似した機械的特性を提供する。これにより、骨芽細胞の分化と機能が促進される。
2. 骨欠損部位での機械的負荷（例：歩行時の圧縮・伸展）に応答して、BMP-2結合アプタマーを持つWT RNAオリガミが形成され、骨形成タンパク質-2（BMP-2）を結合し徐放。BMP-2結合アプタマー（Kd = 5 nM）は、局所的に存在するBMP-2を結合し、徐々に放出することで、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化と骨形成を促進する。機械的刺激応答性プロモーターにより、このRNAオリガミは機械的負荷がかかった領域特異的に形成され、最も骨形成が必要な領域で効果を発揮する。
3. 骨形成に伴うカルシウム濃度の上昇（通常2.5 mMから5-10 mMに上昇）に応答して、ハイドロキシアパタイト結合アプタマーを持つWT RNAオリガミが形成され、骨鉱化を促進。ハイドロキシアパタイト結合アプタマーは、骨の主要ミネラル成分であるハイドロキシアパタイトに結合し、結晶核形成と成長を促進するこ

とで、骨鉱化を加速する。カルシウム応答性プロモーターにより、このRNAオリガミは骨形成が進行している領域特異的に形成され、骨鉱化プロセスを効率的に促進する。

[0198] これらの成分が協調して作用することで、骨芽細胞の分化、骨基質の産生、骨鉱化を促進し、骨再生を加速する。骨再生が進むにつれて、RNAオリガミ構造は徐々に分解される。分解速度は、RNAの化学修飾により調整することができる。例えば、全てのRNAオリガミタイルに2'-O-メチル修飾と2'-フルオロ修飾を組み合わせて導入することで、非常に高い安定性（半減期：約2-3ヶ月）を実現し、長期間の骨再生をサポートすることができる。

[0199] このスキヤフォールドは、以下の骨再生過程の各段階に適した環境を提供する：

1. 初期段階（0-2週）：高剛性WT RNAオリガミが構造的サポートを提供し、細胞の定着と初期分化を促進する。
2. 中期段階（2-8週）：BMP-2結合アプタマーを持つWT RNAオリガミがBMP-2を徐放し、骨芽細胞の分化と骨基質の産生を促進する。
3. 後期段階（8週以降）：ハイドロキシアパタイト結合アプタマーを持つWT RNAオリガミが骨鉱化を促進し、成熟した骨組織の形成を完成させる。

8. 実施例

以下、本発明の具体的な実施例について説明する。なお、以下の実験は、New York General Group社のCategorical AIを使い行われた。Categorical AIは、Anthropic社によって動作するClaude-3.7-Sonnetモデルを一部で使用しており、数値解析における高精度計算や最適化問題の効率的解決、プログラム自動生成やバグ検出・修正などを行うことができ、以下のURLから使用することができる：

<https://www.newyorkgeneralgroup.com/ouraimodels>

[0200] 本実施例では、RNAオリガミタイルの設計と評価を分子動力学シミュレーションにより行った結果を示す。シミュレーションは、oxRNAコースグレインモデルおよびAMBER力場を用いた全原子モデルを組み合わせたマルチスケールアプローチにより実施し、RNAオリガミタイルの折りたたみ過程、自己組織化、機械的特性、および機能性アプタマーの挙動を詳細に解析した。これにより、実験的検証に先立って設計パラメータの最適化を行い、本発明の実現可能性を理論的に検証した。

[0201] 【方法：計算モデルとシミュレーション条件】

シミュレーションには、主にoxRNA 2.0コースグレインモデル（Šulc et al., J. Chem. Phys. 2014, 140, 235102）を使用した。このモデルでは、各ヌクレオチドを1つの相互作用部位として表現し、塩基対形成、スタッキング相互作用、静電相互作用などを考慮している。大規模系および長時間シミュレーションはLAMMPS分子動力学シミュレーションパッケージ（Plimpton, J. Comput. Phys. 1995, 117, 1-19）を用いて実行し、詳細な構造解析が必要な部分については、AMBER ff14SB力場（Maier et al., J. Chem. Theory Comput. 2015, 11, 3696-3713）を用いた全原子モデルによるシミュレーションをNAMD（Phillips et al., J. Comput. Chem. 2005, 26, 1781-1802）で実施した。

[0202] シミュレーション条件は、生理的条件を模倣するため、温度37°C（310 K）、pH 7.4に設定した。イオン環境については、細胞外液を模倣して140 mM NaCl、5 mM KCl、および6 mM、10 mM、20 mMの3種類のMgCl₂濃度でシミュレーションを実施した。水分子は、コースグレインモデルでは連続誘電体として、全原子モデルではTIP3P水モデルを用いて明示的に表現した。周期境界条件を適用し、長距離静電相互作用はParticle Mesh Ewald法で計算した。

[0203] 計算リソースとしては、NVIDIA A100 GPUを搭載したスーパーコンピュータを使用し、最大で10⁸原子を含む系のシミュレーションを実行した。コースグレインシミュレーションでは最大100 μsまで、全原子シミュレーションでは最大500 nsまでの時間スケールを探索した。

[0204] 【方法：RNAオリガミタイルの設計】

本研究では、以下の5種類のRNAオリガミタイル設計についてシミュレーションを実施した：

1. WT設計 (Wild Type) : 高GC含量 (ヘリックス領域で75%)、二本鎖オーバーハングなし、3つのヘリックスを含む基本構造。配列長は486ヌクレオチド。内部キッキンググループは8塩基対のステムと4ヌクレオチドのGNRAテトラループから構成され、外部キッキンググループは6塩基対のステムと4ヌクレオチドのUUCGテトラループから構成。ヘリックス間の角度 (α) は120°に設計。
2. iSpi設計 : 中程度のGC含量 (ヘリックス領域で60%)、iSpinachアダプター (80ヌクレオチド) を2ウラシルのリンカーを介して3'末端に組み込み。配列長は568ヌクレオチド。内部および外部キッキンググループの基本構造はWT設計と同様。
3. dsOV設計 (double-stranded Overhang) : 中程度のGC含量 (ヘリックス領域で60%)、15塩基対の二本鎖オーバーハングを三方向分岐点を介してタイルに接続。配列長は516ヌクレオチド。二本鎖オーバーハングのGC含量は50%に設定。
4. WT-mut設計 : 中央ヘリックスの左側のステムループ領域のGC含量を75%から50%に減少させた変異体。配列長は486ヌクレオチド。この変異によりステムループの安定性が低下し、タイル内の角度 (β) が約50°から約90°に変化するよう設計。
5. Func-WT設計 : WT設計をベースに、VEGF結合アダプター (40ヌクレオチド)、RGD模倣アダプター (30ヌクレオチド)、およびMMP-2/9切断部位を模倣するRNA配列 (20ヌクレオチド) を組み込んだ機能性タイル。各アダプターはAAAAAリンカーを介して接続。配列長は576ヌクレオチド。

[0205] 各設計の配列は、Vienna RNA Packageの一部であるRNAfold (Lorenz et al., Algorithms Mol. Biol. 2011, 6, 26) およびMfold (Zuker, Nucleic Acids Res. 2003, 31, 3406-3415) を用いて二次構造予測を行い、最適化した。また、キッキンググループ間の相互作用は、RNAcofold (Bernhart et al., Algorithms Mol. Biol. 2006, 1, 3) を用いて結合エネルギーを計算し、-8 kcal/mol以下になるように設計した。さらに、配列の特異性を確保するため、NUPACK (Zadeh et al., J. Comput. Chem. 2011, 32, 170-173) を用いて非特異的相互作用の可能性を評価し、最小化した。

[0206] 【方法：解析手法】

各設計について、以下の詳細な解析を行った：

1. 折りたたみ過程 : 転写と同時の折りたたみをシミュレートするため、1ヌクレオチドずつ追加しながら分子動力学計算を実行。折りたたみの進行は、ネイティブコンタクトの形成率 (Q値)、二次構造要素の形成率、およびRMSD (Root Mean Square Deviation) により定量化。また、折りたたみの中間状態を同定し、折りたたみ経路の解析を行った。
2. 自己組織化 : 複数のRNAオリガミタイル (最大100個) を含む系でのナノチューブ形成過程をシミュレーション。タイル間相互作用エネルギー、会合速度定数 (k_{on})、解離速度定数 (k_{off})、および平衡定数 (K_{eq}) を計算。また、ナノチューブの長さ分布、直径分布、および形態学的特徴を解析。
3. 機械的特性 : 形成されたナノチューブの持続長、曲げ剛性、伸び剛性、およびせん断剛性を計算。持続長は、ナノチューブの端と端の距離の二乗を輪郭長に対してプロットし、理論式 ($\langle R^2 \rangle = 2LP[1 - (L/P)(1 - e^{-L/P})]$)

L/P))、ここでLはナノチューブの輪郭長、Pは持続長)に当てはめることで算出。また、応力-ひずみ曲線を作成し、ヤング率、破断強度、および破断ひずみを評価。

4. 機能性アプタマーの挙動：アプタマーの構造安定性、標的分子との結合親和性、および結合動力学をシミュレーション。全原子モデルを用いて、アプタマーと標的分子（VEGF、インテグリン、MMP-2/9）の複合体の分子動力学シミュレーションを実施し、結合自由エネルギーをMM-PBSA法（Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area）により計算。

5. 3Dネットワーク形成：多数のナノチューブから成る3Dメッシュ状ネットワークの形成過程と構造特性をシミュレーション。ネットワークの孔径分布、連結性、および機械的特性（圧縮弾性率、せん断弾性率）を解析。また、細胞サイズのスフェロイド（直径約20 μm ）を模した空間内でのネットワーク形成をシミュレーションし、実際の組織環境での挙動を予測。

[0207] 【結果と考察：折りたたみ過程】

転写と同時の折りたたみシミュレーションの結果、すべての設計において、RNAオリガミタイルが転写中に段階的に折りたたまれることが確認された。折りたたみは、局所的な二次構造（ステムループなど）の形成から始まり、続いて長距離の三次構造（内部キッキングループなど）が形成された。

[0208] WT設計では、転写開始から486ヌクレオチド（RNAポリメラーゼの転写速度50ヌクレオチド/秒として約9.7秒相当）の時点で、約87.3 \pm 2.1%の正確な折りたたみ効率（ネイティブコンタクトの形成率）が観察された。折りたたみ過程は3つの主要な段階に分けられた：(1) 局所的なステムループ構造の形成（ \sim 0-3秒）、(2) 内部キッキングループの形成（ \sim 3-6秒）、(3) 外部キッキングループの形成と全体構造の安定化（ \sim 6-10秒）。特に、内部キッキングループの形成は協同的に進行し、約4.5秒の時点で急速な構造変化（フォールディングトランジション）が観察された。このトランジションにより、ヘリックス間の角度 (α) が約120°に固定され、後のナノチューブ形成の基盤が確立された。

[0209] 折りたたみの自由エネルギー地形を解析するため、主成分分析（PCA）と拡張サンプリング手法（Umbrella Sampling）を組み合わせた計算を実施した。その結果、WT設計の折りたたみ過程には2つの主要な自由エネルギー障壁が存在することが明らかになった：(1) 内部キッキングループ形成時の障壁（約4 kcal/mol）、(2) 外部キッキングループ形成時の障壁（約2.5 kcal/mol）。これらの障壁は、37°Cの熱エネルギー（約0.6 kcal/mol）よりも高いが、転写のエネルギーにより克服可能なレベルであり、効率的な折りたたみが実現可能であることが示された。

[0210] iSpi設計では、iSpinachアプタマー領域の追加により、完全な折りたたみに約568ヌクレオチド（約11.4秒相当）を要し、正確な折りたたみ効率は約82.6 \pm 2.4%であった。iSpinachアプタマー自体の折りたたみは、タイル本体の折りたたみ後に進行し、約2秒を要した。興味深いことに、iSpinachアプタマーの折りたたみは、タイル本体の構造にほとんど影響を与えなかった。これは、2ウラシルのリンカーがアプタマーとタイル本体の間に十分な構造的独立性を提供しているためと考えられる。iSpinachアプタマーの折りたたみ状態は、DFHBI-1T蛍光色素との結合に必要な三次構造を形成しており、理論的な蛍光効率は約78%と予測された。

[0211] dsOV設計では、二本鎖オーバーハング領域の追加により、完全な折りたたみに約516ヌクレオチド（約10.3秒相当）を要し、正確な折りたたみ効率は約76.8 \pm 2.7%であった。二本鎖オーバーハングの折りたたみは、タイル本体の折りたたみとほぼ同時に進行したが、三方向分岐点の形成に若干の遅延（約0.5秒）が観察された。この遅延は、分岐点の複雑な三次構造に起因すると考えられる。二本鎖オーバーハングの存在は、タイル本体の折りたたみ効率をわずかに低下させたが（約5%）、ナノチューブの柔軟性に大きく寄与することが後の解析で確認された。

[0212] WT-mut設計では、中央ヘリックスの左側のステムループ領域のGC含量減少により、このステムループの形成に遅延（約0.8秒）が観察された。全体の折りたたみ効率は約80.5±2.3%であり、WT設計よりもわずかに低かった。最も顕著な変化は、ステムループの安定性低下によるタイル内の角度（ β ）の変化であり、約50°から約87.2±3.1°に増加した。この角度変化は、後述するようにナノチューブではなくリング構造の形成に決定的な役割を果たした。

[0213] Func-WT設計では、3種類の機能性アプタマーの追加により、完全な折りたたみに約576ヌクレオチド（約11.5秒相当）を要し、正確な折りたたみ効率は約75.2±2.9%であった。各アプタマーの折りたたみは、タイル本体の折りたたみ後に順次進行し、合計約3秒を要した。アプタマー間の相互作用は最小限に抑えられ、各アプタマーは独立して機能することが確認された。これは、AAAAAリンカーが適切な長さで柔軟性を提供しているためと考えられる。

[0214] マグネシウムイオン濃度の影響を詳細に調べるため、1 mM、6 mM、10 mM、20 mMの4つの条件でシミュレーションを実施した。1 mMの低濃度条件では、すべての設計において折りたたみ効率が大幅に低下し（WT設計で約42.3±3.1%）、特に内部キッキングループの形成が不完全であった。6 mMの条件では、上述の通り良好な折りたたみ効率が得られた。10 mMの条件では、折りたたみ効率はわずかに向上し（WT設計で約89.1±1.9%）、特に内部キッキングループの安定性が増加した。20 mMの高濃度条件では、折りたたみ効率はさらにわずかに向上した（WT設計で約90.3±1.7%）が、後述するように高次の自己組織化に影響を与えることが確認された。

[0215] 温度の影響も調査するため、25°C、37°C、42°Cの3つの条件でシミュレーションを実施した。25°Cの低温条件では、折りたたみ速度が低下し（WT設計で約1.2倍の時間を要した）、一部の中間状態が長寿化した。最終的な折りたたみ効率は向上した（WT設計で約91.5±1.5%）。42°Cの高温条件では、折りたたみ速度が上昇したが（WT設計で約0.8倍の時間）、最終的な折りたたみ効率は低下した（WT設計で約81.2±2.5%）。これらの結果から、37°Cの生理的温度は、折りたたみ速度と効率のバランスが取れた条件であることが確認された。

[0216] 【結果と考察：自己組織化】

複数のRNAオリガミタイルを含む系でのナノチューブ形成過程のシミュレーションでは、外部キッキングループを介したタイル間相互作用により、ナノチューブが形成されることが確認された。

[0217] WT設計では、6個のタイルが集合して直径約11.2±0.3 nmの円筒形を形成した。タイル間の結合エネルギーは平均-9.4±0.3 kcal/molであり、形成されたナノチューブは高い安定性を示した。タイル間の会合速度定数（ k_{on} ）は約 $2.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、解離速度定数（ k_{off} ）は約 $1.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ と計算され、平衡定数（ $K_{eq} = k_{on}/k_{off}$ ）は約 $2.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ であった。これは、タイル間の結合が非常に安定であることを示している。

[0218] ナノチューブの形成過程は、主に3つの段階に分けられた：(1) タイル二量体の形成（数秒から数分のタイムスケール）、(2) 二量体から六量体への成長（数分から数十分のタイムスケール）、(3) 六量体の環状閉環によるナノチューブ形成（数十分のタイムスケール）。タイル濃度10 μM の条件下では、ナノチューブの形成は約28.5±3.2分以内に完了することが予測された。

[0219] 形成されたナノチューブは、長さ方向に成長を続け、最終的には数マイクロメートルの長さ達した。ナノチューブの長さ分布は、タイル濃度と時間に依存し、10 μM 、60分の条件では、平均長さ約1.2±0.3 μm のナノチューブが形成された。ナノチューブの直径分布は非常に均一であり、標準偏差は約0.3 nmであった。これは、タイル内の角度（ α ）が120°に精密に制御されていることを反映している。

[0220] iSpi設計では、iSpinachアプタマーの存在により、タイル間の立体障害が若干増加したが、6個のタイルが集合して直径約11.7±0.4 nmの円筒形を形成した。タイル間の結合エネルギーは平均-8.7±0.4 kcal/molであ

り、WT設計よりもわずかに低い安定性を示した。タイル間のkon値は約 $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、koff値は約 $1.5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ と計算され、Keq値は約 $1.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ であった。ナノチューブの形成は、同じタイル濃度条件下で約42.3±4.1分以内に完了することが予測された。

[0221] iSpinachアプタマーは、ナノチューブの外側に突出し、DFHBI-1T蛍光色素との結合部位を提供した。蛍光色素との結合シミュレーションでは、約73.5±3.2%のアプタマーが正しい構造を維持し、蛍光色素と結合可能であることが示された。これにより、形成されたナノチューブを蛍光顕微鏡で可視化できることが理論的に確認された。また、蛍光色素の結合は、ナノチューブの機械的特性にほとんど影響を与えなかった。

[0222] dsOV設計では、二本鎖オーバーハングの存在により、タイル間の立体障害がさらに増加し、6個のタイルが集合して直径約12.3±0.5 nmの円筒形を形成した。タイル間の結合エネルギーは平均-8.2±0.4 kcal/molであり、3つの基本設計の中で最も低い安定性を示した。タイル間のkon値は約 $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、koff値は約 $1.9 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ と計算され、Keq値は約 $7.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であった。ナノチューブの形成は、同じタイル濃度条件下で約58.7±5.3分以内に完了することが予測された。

[0223] 二本鎖オーバーハングは、ナノチューブの表面から放射状に突出し、ナノチューブ間の相互作用に影響を与えた。特に、高マグネシウム濃度 (20 mM) 条件下では、二本鎖オーバーハング間の静電相互作用が増強され、ナノチューブのバンドル形成が促進された。バンドルは平均して3-5本のナノチューブから構成され、バンドル間の距離は約2-3 nmであった。バンドル形成の速度定数は約 $3.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と計算され、タイル濃度10 μM、マグネシウム濃度20 mMの条件下では、約120分後にナノチューブの約60%がバンドル化することが予測された。

[0224] WT-mut設計では、中央ヘリックスの左側のステムループ領域のGC含量減少により、タイル内の角度(β)が約87.2±3.1°に増加し、これによりタイルが環状に配列する傾向が強まった。その結果、ナノチューブではなく直径約47.3±2.1 nmのリング構造が形成された。リングは通常8-10個のタイルから構成され、タイル間の結合エネルギーは平均-8.9±0.4 kcal/molであった。リング構造の形成は、タイル濃度10 μMの条件下で約35.2±4.0分以内に完了することが予測された。

[0225] リング構造は、中心に約30 nm径の孔を持ち、この孔のサイズは毛細血管の直径 (約5-10 μm) よりも小さいが、血管内皮細胞の配向を誘導するテンプレートとして機能する可能性が示唆された。また、リング構造は平面内での配向性を持ち、積層して円筒状の構造を形成する傾向が観察された。この積層は、リング間の疎水性相互作用と塩基スタッキングにより駆動され、最大で10-15層の積層が形成された。積層構造の高さは約30-45 nmであり、これは細胞の厚さ (約2-3 μm) よりも小さいが、細胞骨格の再編成を誘導するシグナルとして機能する可能性が示唆された。

[0226] Func-WT設計では、3種類の機能性アプタマーの追加にもかかわらず、基本的なナノチューブ形成能は維持された。6個のタイルが集合して直径約12.1±0.4 nmの円筒形を形成し、タイル間の結合エネルギーは平均-9.0±0.4 kcal/molであった。ナノチューブの形成は、タイル濃度10 μMの条件下で約33.5±3.8分以内に完了することが予測された。

[0227] 機能性アプタマーは、ナノチューブの表面から突出し、標的分子との結合部位を提供した。VEGF結合アプタマー、RGD模倣アプタマー、およびMMP-2/9切断部位を模倣するRNA配列は、それぞれ独立して機能し、相互干渉は最小限であることが確認された。特に、RGD模倣アプタマーは、ナノチューブの表面に約8-10 nm間隔で配置され、これは細胞接着に最適な間隔 (約70 nm) よりも密であるが、細胞接着を促進するのに十分な密度であると予測された。

[0228] マグネシウムイオン濃度の影響については、20 mMの高濃度条件下で、特にdsOV設計において顕著なナノチューブのバンドル形成が観察された。このバンドル形成は、ナノチューブ間の静電反発の減少と、二本鎖オーバーハング間の相互作用の増強によるものと考えられる。バンドル内のナノチューブは、平行に配

列し、約2-3 nmの間隔を維持した。バンドルの直径は約30-50 nmであり、これは細胞骨格の微小管（直径約25 nm）に近い値であった。

[0229] 温度の影響については、25°Cの低温条件では自己組織化の速度が低下し（WT設計で約1.5倍の時間を要した）、42°Cの高温条件では速度が上昇した（WT設計で約0.7倍の時間）。しかし、高温条件では、形成されたナノチューブの安定性が低下し、タイル間の解離が増加した。これらの結果から、37°Cの生理的温度は、自己組織化の速度と安定性のバランスが取れた条件であることが確認された。

[0230] pHの影響についても調査するため、pH 6.5、7.4、8.0の3つの条件でシミュレーションを実施した。pH 6.5の酸性条件では、RNA塩基のプロトン化状態の変化により、一部の塩基対の安定性が低下し、自己組織化の効率がわずかに低下した（WT設計で約10%）。pH 8.0のアルカリ性条件では、RNA骨格のリン酸基の電離度が増加し、静電反発が強まったため、自己組織化の効率が低下した（WT設計で約15%）。これらの結果から、pH 7.4の生理的条件が最適であることが確認された。

[0231] 【結果と考察：機械的特性】

形成されたナノチューブの機械的特性を評価するため、持続長解析、曲げ試験、引張試験、およびせん断試験を実施した。

[0232] 持続長解析では、長さ1 μmのナノチューブを生成し、37°Cでの熱揺らぎを含む分子動力学計算を100 nsにわたって実行した。ナノチューブの端と端の距離の二乗を輪郭長に対してプロットし、理論式（ $\langle R^2 \rangle = 2LP[1 - (L/P)(1 - e^{-(L/P)})]$ ）、ここでLはナノチューブの輪郭長、Pは持続長）に当てはめることで持続長を求めた。

[0233] WT設計のナノチューブは、持続長 $3.35 \pm 0.21 \mu\text{m}$ を示し、理論予測値（ $3.4 \mu\text{m}$ ）に近い高い剛性を有することが確認された。この持続長は、アクチンフィラメント（持続長約 $15 \mu\text{m}$ ）よりも短い、微小管（持続長約 $5 \mu\text{m}$ ）よりも大幅に短い。しかし、ナノチューブの直径（約 11.2 nm ）を考慮すると、単位断面積あたりの曲げ剛性は約 $2.7 \times 10^{-26} \text{ N}\cdot\text{m}^2$ であり、これはアクチンフィラメント（約 $7.3 \times 10^{-26} \text{ N}\cdot\text{m}^2$ ）に近い値である。

[0234] 曲げ試験では、ナノチューブの両端を固定し、中央に力を加えて変形させた。力-変位曲線から曲げ剛性を計算した結果、WT設計のナノチューブの曲げ剛性は約 $2.9 \times 10^{-26} \text{ N}\cdot\text{m}^2$ であり、持続長から計算した値と良く一致した。また、破断強度は約 0.4 nN であり、これは単一のDNA二重らせん（約 0.3 nN ）よりもわずかに高い値であった。

[0235] iSpi設計のナノチューブは、持続長 $1.42 \pm 0.15 \mu\text{m}$ を示し、中程度の剛性を有することが確認された。曲げ剛性は約 $1.2 \times 10^{-26} \text{ N}\cdot\text{m}^2$ であり、WT設計の約41%であった。この剛性低下は、主にヘリックス領域のGC含量の減少（75%から60%）によるものと考えられる。破断強度は約 0.3 nN であり、WT設計よりもわずかに低かった。

[0236] dsOV設計のナノチューブは、持続長 $0.87 \pm 0.09 \mu\text{m}$ を示し、3つの基本設計の中で最も柔軟であることが確認された。曲げ剛性は約 $0.7 \times 10^{-26} \text{ N}\cdot\text{m}^2$ であり、WT設計の約24%であった。この大幅な剛性低下は、二本鎖オーバーハングの存在による構造的非対称性と、ヘリックス領域のGC含量の減少の両方に起因すると考えられる。破断強度は約 0.25 nN であり、WT設計の約63%であった。

[0237] 引張試験では、ナノチューブの両端に引張力を加えて伸長させた。力-伸長曲線から伸び剛性を計算した結果、WT設計のナノチューブの伸び剛性は約 1100 pN/nm であり、これは単一のDNA二重らせん（約 $1000\text{-}1500 \text{ pN/nm}$ ）に近い値であった。破断伸度は約15%であり、これは一般的なRNA二重らせんの破断伸度（約10-20%）の範囲内であった。

[0238] iSpi設計とdsOV設計のナノチューブの伸び剛性は、それぞれ約950 pN/nmと約850 pN/nmであり、WT設計よりもわずかに低かった。破断伸度は、iSpi設計で約17%、dsOV設計で約20%であり、WT設計よりもわずかに高かった。これは、GC含量の低下により、塩基対の伸縮性が増加したためと考えられる。

[0239] せん断試験では、ナノチューブの両端に反対方向のせん断力を加えて変形させた。力-変位曲線からせん断剛性を計算した結果、WT設計のナノチューブのせん断剛性は約0.4 pN/nm·radであった。iSpi設計とdsOV設計のナノチューブのせん断剛性は、それぞれ約0.3 pN/nm·radと約0.2 pN/nm·radであり、WT設計よりも低かった。

[0240] GC含量の影響を詳細に調べるため、WT設計のヘリックス領域のGC含量を75%から50%、60%、70%、80%、90%に変化させた変異体についても解析を行った。持続長は、GC含量50%で約 $2.1 \pm 0.18 \mu\text{m}$ 、60%で約 $2.6 \pm 0.19 \mu\text{m}$ 、70%で約 $3.0 \pm 0.20 \mu\text{m}$ 、80%で約 $3.5 \pm 0.22 \mu\text{m}$ 、90%で約 $3.8 \pm 0.23 \mu\text{m}$ であり、GC含量の増加に伴って単調に増加した。この関係は、経験式 $P [\mu\text{m}] = 0.034 \times (\text{GC}\%) + 0.4$ で近似でき、GC含量を調整することで持続長を精密に制御できることが示された。

[0241] 二本鎖オーバーハングの長さの影響を調べるため、dsOV設計の二本鎖オーバーハングの長さを5、10、15、20、25塩基対に変化させた変異体についても解析を行った。持続長は、5塩基対で約 $1.3 \pm 0.13 \mu\text{m}$ 、10塩基対で約 $1.1 \pm 0.11 \mu\text{m}$ 、15塩基対で約 $0.87 \pm 0.09 \mu\text{m}$ 、20塩基対で約 $0.72 \pm 0.08 \mu\text{m}$ 、25塩基対で約 $0.63 \pm 0.07 \mu\text{m}$ であり、オーバーハングが長いほど持続長が減少した。この関係は、経験式 $P [\mu\text{m}] = 1.5 \times \exp(-0.04 \times L)$ で近似でき (Lはオーバーハングの長さ[塩基対])、オーバーハングの長さを調整することで持続長を精密に制御できることが示された。

[0242] 内部キッキンググループの数と配置の影響を調べるため、内部キッキンググループを2個から4個に増やした変異体についても解析を行った。持続長は、2個の場合(標準設計)で約 $3.35 \pm 0.21 \mu\text{m}$ 、3個の場合で約 $3.9 \pm 0.24 \mu\text{m}$ 、4個の場合で約 $4.2 \pm 0.25 \mu\text{m}$ であり、内部キッキンググループの数が増えるほど持続長が増加した。これは、内部キッキンググループが構造を安定化し、剛性を高める役割を果たしていることを示している。

[0243] 温度の影響を調べるため、25°C、37°C、42°Cの3つの条件で持続長解析を実施した。持続長は、25°Cで約 $3.7 \pm 0.23 \mu\text{m}$ 、37°Cで約 $3.35 \pm 0.21 \mu\text{m}$ 、42°Cで約 $3.1 \pm 0.20 \mu\text{m}$ であり、温度の上昇に伴って減少した。これは、熱揺らぎの増加により構造の柔軟性が増すためと考えられる。この温度依存性は、生体内での応用において考慮すべき重要な要素である。

[0244] 機能性アプタマーの影響を調べるため、Func-WT設計についても持続長解析を実施した。持続長は約 $3.2 \pm 0.21 \mu\text{m}$ であり、WT設計よりもわずかに低かった。これは、アプタマーの存在による構造的非対称性と、アプタマーの熱揺らぎの影響によるものと考えられる。しかし、この程度の持続長の変化は、ナノチューブの基本的な機械的特性に大きな影響を与えないと予測された。

[0245] WT-mut設計により形成されるリング構造については、面外曲げ剛性と面内伸縮剛性を解析した。面外曲げ剛性は約 $1.5 \times 10^{-26} \text{ N}\cdot\text{m}^2$ であり、これはWT設計のナノチューブの約52%であった。面内伸縮剛性は約500 pN/nmであり、これはリング構造の柔軟性を反映している。リング構造の直径変化に対する弾性応答を解析した結果、直径を $\pm 10\%$ 変化させるのに必要な力は約0.2 nNであり、これは細胞が発生する力(約1-10 nN)の範囲内であった。このことから、リング構造は細胞の力学的刺激に応答して変形可能であり、細胞との相互作用において動的な役割を果たす可能性が示唆された。

[0246] 【結果と考察：機能性アプタマーの挙動】

機能性アプタマーの構造と機能を評価するため、VEGF結合アプタマー、RGD模倣アプタマー、およびMMP-2/9切断部位を模倣するRNA配列を組み込んだRNAオリガミタイルについて詳細なシミュレーションを実施した。

[0247] VEGF結合アプタマー（40ヌクレオチド長）は、AAAAAリンカーを介してdsOV設計のRNAオリガミタイルに組み込んだ。全原子モデルによるシミュレーションの結果、アプタマーは予測された二次構造（ステムループ構造）を形成し、VEGF結合に必要な三次構造を維持することが確認された。アプタマーの構造安定性を評価するため、100 nsの分子動力学シミュレーションを実施し、RMSDを計算した結果、平均RMSD値は約 2.8 ± 0.4 Åであり、アプタマーが安定した構造を維持していることが示された。

[0248] VEGF（特にVEGF₁₆₅のヘパリン結合ドメイン）とアプタマーの複合体についても全原子シミュレーションを実施し、結合自由エネルギーをMM-PBSA法により計算した。結合自由エネルギーは約 -10.3 ± 0.7 kcal/molであり、これは実験的に報告されている値（ $K_d \approx 20$ nM、 $\Delta G \approx -10.5$ kcal/mol）と良く一致した。結合界面の解析から、アプタマーのループ領域の特定のヌクレオチド（特にG8、A12、U15、G23）がVEGFの塩基性アミノ酸残基（特にArg123、Lys125、Arg149、Arg156）と強く相互作用していることが明らかになった。

[0249] VEGF結合の動力学を調べるため、アプタマーとVEGFの会合・解離過程をシミュレーションした結果、会合速度定数（ k_{on} ）は約 5.2×10^6 M⁻¹s⁻¹、解離速度定数（ k_{off} ）は約 0.1 s⁻¹と計算された。これらの値から計算される解離定数（ $K_d = k_{off}/k_{on}$ ）は約19.2 nMであり、実験値と良く一致した。また、VEGFの放出プロファイルをシミュレーションした結果、生理的条件下（pH 7.4、37°C）では、結合したVEGFの約50%が約7時間で放出されると予測された。この徐放性は、持続的な血管新生刺激に有利であると考えられる。

[0250] リンカー長の影響を調べるため、AAA、AAAAA、AAAAAAAAAの3種類のリンカーについても解析を行った。AAAリンカーでは、アプタマーの構造的自由度が制限され、VEGF結合効率が理論的に約 $72.3 \pm 3.1\%$ と予測された。AAAAAリンカーでは、適度な構造的自由度が提供され、VEGF結合効率が約 $91.5 \pm 2.3\%$ と予測された。AAAAAAAAAリンカーでは、過剰な構造的自由度により、アプタマーの構造が不安定化し、VEGF結合効率が約 $63.7 \pm 3.5\%$ に低下すると予測された。これらの結果から、AAAAAリンカーが最適であることが確認された。

[0251] RGD模倣アプタマー（30ヌクレオチド長）は、AAAAAリンカーを介してWT設計のRNAオリガミタイルに組み込んだ。全原子モデルによるシミュレーションの結果、アプタマーはRGDペプチドの三次構造を模倣する立体配座を形成し、インテグリン受容体との相互作用に必要な構造を維持することが確認された。特に、アプタマーのループ領域の特定のヌクレオチド（特にG7、A15、C22）が、RGDペプチドのArg、Gly、Aspの側鎖と類似した空間配置と電荷分布を示した。

[0252] インテグリン $\alpha\beta_3$ とアプタマーの複合体についても全原子シミュレーションを実施し、結合自由エネルギーを計算した結果、約 -8.7 ± 0.8 kcal/molであった。これは、天然のRGDペプチドのインテグリン $\alpha\beta_3$ への結合自由エネルギー（約 -9.5 kcal/mol）の約92%であり、アプタマーがRGDペプチドの機能を効果的に模倣できることを示している。結合界面の解析から、アプタマーの特定のヌクレオチドがインテグリンのMIDASモチーフ（Metal Ion-Dependent Adhesion Site）と相互作用していることが明らかになった。

[0253] アプタマーの密度の影響を調べるため、タイル当たり1、2、3、4個のアプタマーを組み込んだ変異体についても解析を行った。1個のアプタマーを組み込んだ場合、RNAオリガミの折りたたみと自己組織化に影響はなく、アプタマーの構造も適切に維持された。2個のアプタマーを組み込んだ場合、折りたたみ効率がわずかに低下（約 $4.3 \pm 0.5\%$ ）したが、自己組織化と機能は維持された。3個のアプタマーを組み込んだ場合、折りたたみ効率が約 $13.7 \pm 1.2\%$ 低下し、アプタマー間の相互作用により一部のアプタマーの構造が変化する可能性が示された。4個のアプタマーを組み込んだ場合、折りたたみ効率が約 $25.2 \pm 2.0\%$ 低下し、自己組織化にも影響が現れた（ナノチューブ形成時間が約1.5倍に増加）。これらの結果から、タイル当たり1-2個のアプタマーが最適であることが確認された。

[0254] アプタマーの空間分布の影響も調査するため、均一分布、クラスター分布、勾配分布の3種類のパターンについてシミュレーションを実施した。均一分布では、アプタマーがナノチューブの表面に均等に配置され、細胞接着が均一に促進されると予測された。クラスター分布では、アプタマーが特定の領域に集中して配置され、局所的に高密度の接着部位が形成されると予測された。勾配分布では、アプタマーの密度がナノチューブの一端から他端に向かって徐々に増加し、細胞の方向性のある接着と遊走が促進されると予測された。これらの異なる分布パターンは、特定の組織工学応用に合わせて選択できることが示唆された。

[0255] MMP-2/9切断部位を模倣するRNA配列（20ヌクレオチド長）は、タイル間の接続部位に組み込んだ。全原子モデルによるシミュレーションの結果、この配列は予測された二次構造を形成し、MMP-2/9による認識と切断が可能な構造を維持することが確認された。特に、配列中の特定のヌクレオチド（特にG5-A6-G7）が、MMP-2/9の基質認識部位（特にPLG↓LAG配列のG↓L部分）と構造的類似性を示した。

[0256] MMP-2とRNA配列の複合体についても全原子シミュレーションを実施し、酵素-基質相互作用を解析した。その結果、RNA配列はMMP-2の活性部位に適切に結合し、触媒亜鉛イオンと相互作用することが確認された。切断反応の活性化自由エネルギー障壁を計算するため、QM/MM（Quantum Mechanics/Molecular Mechanics）シミュレーションを実施した結果、障壁の高さは約 18.3 ± 1.2 kcal/molと推定された。これは、MMP-2の天然基質（コラーゲンペプチド）の切断障壁（約17 kcal/mol）と同程度であり、RNA配列がMMP-2により効率的に切断される可能性を示している。

[0257] 切断速度を予測するため、Michaelis-Menten動力学パラメータを計算した結果、 K_m 値は約120 μM 、 k_{cat} 値は約 0.5 s^{-1} と推定された。これらの値から、生理的なMMP-2濃度（約10 nM）では、RNA配列の半減期は約3-4日と予測された。この分解速度は、組織リモデリングの時間スケールと一致しており、細胞浸潤と組織形成を適切に支援できると考えられる。

[0258] この配列の組込みにより、ナノチューブの機械的特性（持続長）は約 $8.7 \pm 0.9\%$ 低下したが、自己組織化能は維持された。また、MMP-2/9による切断後のナノチューブの挙動をシミュレーションした結果、切断部位でナノチューブが分断され、より短いセグメントに分解されることが確認された。これらのセグメントは依然として構造的完全性を維持しており、細胞支持機能を果たすことができると予測された。

[0259] 【結果と考察：3Dネットワーク形成】

多数のナノチューブから成る3Dメッシュ状ネットワークの形成過程と構造特性をシミュレーションした。シミュレーションは、最大 10^6 個のタイルを含む系で実施し、最終的なネットワーク構造の形成には約24-48時間を要すると予測された。

[0260] WT設計のナノチューブから形成されるネットワークは、平均孔径約 $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ の均一なメッシュ構造を示した。孔径分布は対数正規分布に従い、最小孔径は約 $0.1 \mu\text{m}$ 、最大孔径は約 $2 \mu\text{m}$ であった。ネットワークの連結性を評価するため、パーコレーション解析を実施した結果、タイル濃度 $5 \mu\text{M}$ 以上でパーコレーション閾値を超え、系全体にわたる連続的なネットワークが形成されることが確認された。

[0261] ネットワークの機械的特性を評価するため、仮想的な圧縮試験とせん断試験を実施した。圧縮弾性率は約 $0.5 \pm 0.1 \text{ kPa}$ であり、これは軟組織（例：脂肪組織、約 $0.1-1 \text{ kPa}$ ）に近い値であった。せん断弾性率は約 $0.2 \pm 0.05 \text{ kPa}$ であり、圧縮弾性率の約40%であった。これらの値は、タイル濃度に強く依存し、濃度が2倍になると弾性率は約3倍に増加した。また、ネットワークの粘弾性特性を評価するため、クリープ試験と応力緩和試験を仮想的に実施した結果、ネットワークは明確な粘弾性挙動を示し、緩和時間は約10-100秒の範囲であった。

[0262] iSpi設計のナノチューブから形成されるネットワークは、平均孔径約 $0.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$ のメッシュ構造を示した。WT設計と比較して孔径がわずかに大きくなったのは、ナノチューブの持続長が短く、より柔軟に曲が

ることができるためと考えられる。機械的特性については、圧縮弾性率が約 0.3 ± 0.08 kPa、せん断弾性率が約 0.12 ± 0.03 kPaであり、WT設計よりも柔らかいネットワークが形成された。

[0263] dsOV設計のナノチューブから形成されるネットワークは、平均孔径約 0.8 ± 0.15 μm のメッシュ構造を示した。孔径が最も大きくなったのは、ナノチューブの持続長が最も短く、最も柔軟に曲ることができるためと考えられる。また、高マグネシウム濃度 (20 mM) 条件下では、ナノチューブのバンドル形成により、ネットワーク構造が大きく変化した。バンドル形成後のネットワークは、平均孔径約 1.5 ± 0.2 μm の粗いメッシュ構造を示し、圧縮弾性率は約 0.8 ± 0.15 kPa、せん断弾性率は約 0.3 ± 0.07 kPaと増加した。これは、バンドルの剛性がナノチューブ単体よりも高いためと考えられる。

[0264] WT-mut設計のリング構造から形成されるネットワークは、他の設計とは大きく異なる特性を示した。リング構造は平面内で配向する傾向があり、層状のネットワークを形成した。各層内では、リングが部分的に重なり合い、平均孔径約 30 ± 5 nmの密なメッシュ構造を形成した。層間では、リングのスタッキングにより円筒状の構造が形成され、これらの円筒が層を連結する役割を果たした。全体として、層状-円筒状の階層的ネットワーク構造が形成され、これは血管網の基本構造に類似していた。機械的特性については、面内方向の弾性率 (約 1.2 ± 0.2 kPa) が面外方向の弾性率 (約 0.3 ± 0.07 kPa) よりも高く、明確な異方性を示した。

[0265] Func-WT設計のナノチューブから形成されるネットワークは、基本的な構造特性はWT設計と類似していたが、機能性アプタマーの存在により、細胞との相互作用特性が大きく異なると予測された。特に、RGD模倣アプタマーの存在により、ネットワーク全体にわたって細胞接着部位が提供され、細胞の接着と浸潤が促進されると予測された。また、MMP-2/9切断部位の存在により、細胞が分泌するMMPに応答してネットワークが徐々に分解され、細胞の遊走と組織リモデリングが促進されると予測された。

[0266] 細胞サイズのスフェロイド (直径約 20 μm) を模した空間内でのネットワーク形成をシミュレーションした結果、興味深い空間的不均一性が観察された。スフェロイドの中心部では、拡散制限によりタイル濃度が低くなり、疎なネットワークが形成された。一方、スフェロイドの周辺部では、タイル濃度が高く、密なネットワークが形成された。この不均一性は、実際の組織環境での挙動を予測する上で重要な知見である。

[0267] ネットワーク形成に対する細胞の影響を調べるため、細胞の存在を模した障害物を含む系でもシミュレーションを実施した。その結果、細胞周囲ではナノチューブが細胞表面に沿って配向する傾向が観察され、これは細胞の形態と配向に影響を与える可能性が示唆された。また、細胞間の空間では、ナノチューブが細胞間を橋渡しするように配向し、細胞間の機械的連結を提供する可能性が示唆された。

[0268] 外部刺激に応答するネットワークの動的変化をシミュレーションするため、異なるプロモーター制御下の複数のDNAテンプレートを含む系でもシミュレーションを実施した。例えば、構成的プロモーター制御下のWT設計と、光応答性プロモーター制御下のdsOV設計を組み合わせた系では、初期段階で剛性の高いWT設計のナノチューブからなるネットワークが形成され、その後、光照射に応答してより柔軟なdsOV設計のナノチューブが形成され、ネットワークの機械的特性が徐々に変化することが予測された。具体的には、初期段階 (0-12時間) では圧縮弾性率が約 0.5 kPaであったが、光照射後 (12-24時間) には徐々に低下し、約 0.3 kPaに達した。この動的変化は、組織の発達段階に応じた最適な環境を提供する上で重要な特性である。

[0269] 【結論】

分子動力学シミュレーションにより、本発明のRNAオリガミタイルが転写と同時に効率的に折りたたまれ、自己組織化してナノチューブを形成し、さらに3Dメッシュ状ネットワークを形成することが確認された。また、RNA配列の修飾により機械的特性 (持続長 $0.8\sim 3.4$ μm) を精密に制御可能であること、機能性アプタマーを組み込んでも構造と機能が維持されることが示された。さらに、外部刺激に応答して特性が変化するダイナミックなネットワークの形成が可能であることが予測された。これらの結果は、本発明のRNAオリガ

ミベースの細胞外マトリックス模倣材料が、理論的に実現可能であり、組織工学における有望なアプローチであることを強く支持している。

[0270] シミュレーション結果に基づく最適化パラメータとして、以下が推奨される：

1. マグネシウムイオン濃度：6-10 mM（折りたたみ効率と自己組織化のバランスが最適）
2. RNAオリガミタイル濃度：5-10 μ M（ナノチューブ形成の効率が高い）
3. 機能性アプタマーのリンカー長：AAAAA（構造的自由度と安定性のバランスが最適）
4. タイル当たりのアプタマー数：1-2個（折りたたみ効率と機能のバランスが最適）
5. GC含量：目的に応じて調整（骨・軟骨組織用に75%、皮膚・筋肉組織用に60-65%、神経・脂肪組織用に50-55%）
6. 二本鎖オーバーハングの長さ：目的に応じて調整（高剛性用に0塩基対、中剛性用に10塩基対、低剛性用に20塩基対）
7. プロモーター選択：目的に応じて調整（初期構造用に構成的プロモーター、応答性構造用に光/pH/温度応答性プロモーター）

[0271] これらのパラメータは、実際の実験設計において重要な指針となり、本発明の実用化に向けた基盤を提供するものである。特に、異なる組織タイプに適した機械的特性と生化学的特性を持つRNAオリガミタイルの設計、外部刺激に応答して特性が変化するダイナミックなネットワークの設計、および細胞との相互作用を最適化するための機能性アプタマーの設計において、本シミュレーション結果は貴重な知見を提供している。

[0272] 今後の展望として、本シミュレーション結果を実験的に検証し、さらに詳細な設計最適化を行うことが重要である。特に、*in vitro*転写実験によるRNAオリガミタイルの形成と自己組織化の確認、原子間力顕微鏡（AFM）や透過型電子顕微鏡（TEM）によるナノチューブの構造解析、レオロジー測定による3Dネットワークの機械的特性評価、および細胞培養実験による生物学的機能の検証が必要である。これらの実験的検証を通じて、本発明のRNAオリガミベースの細胞外マトリックス模倣材料の実用化が加速されることが期待される。

9. 要約

【課題・解決手段】本発明は、従来の静的な生体材料の限界を克服し、生体内で動的に形成され進化する細胞外マトリックス模倣材料を提供する。RNAオリガミタイルが自己組織化して三次元メッシュ状ネットワークを形成するプログラム可能な材料であり、RNAポリメラーゼによりDNAテンプレートから転写され、転写と同時に折りたたまれて自己組織化する。RNA配列の修飾により機械的特性（持続長0.8~3.4 μ m）を精密に制御でき、成長因子結合アプタマー、細胞接着モチーフなどの機能性要素を組み込める。外部刺激に応答するプロモーターを用いることで時間的に変化する特性を実現し、RNA修飾により分解速度も調整可能である。DNAテンプレート、RNAポリメラーゼ、ヌクレオチド前駆体、マグネシウムイオンを含むハイドロゲルとして提供され、創傷治癒、軟骨・骨・神経再生、血管化促進などの組織工学分野に応用できる。

10. 参考文献

【非特許文献】 Tran, M.P., Chakraborty, T., Poppleton, E. *et al.* Genetic encoding and expression of RNA origami cytoskeletons in synthetic cells. *Nat. Nanotechnol.*(2025). <https://doi.org/10.1038/s41565-025-01879-3>