

京都大学	博士（薬学）	氏名	伊藤 公一
論文題目	Rolling circle amplification (RCA) 法により調製される長鎖一本鎖DNA (lss-DNA) を利用した核酸構造体のドラッグデリバリーシステムへの応用に関する研究		
<p>DNAの二本鎖形成を利用して調製可能な核酸ナノ構造体は、さまざまな三次元構造体を形成することができるが、核酸医薬を効率よく搭載できる、生体由来物質であるために生体適合性に関する懸念が少ない、様々な機能の賦与が可能である等の利点を有することからドラッグデリバリーシステムとしての利用が期待される。Rolling circle amplification (RCA) 法により調製される長鎖一本鎖DNA (lss-DNA) は鋳型DNAの高度な反復配列をもつ長鎖のDNAであり、生理活性をもつDNA配列を用いた場合には一分子当たり多価の生理活性配列を導入可能という利点を有する。申請者は、lss-DNAを用いた核酸構造体のドラッグデリバリーシステムの開発を目指し、lss-DNAを用いて形成可能な疎水性相互作用に基づくDNA超分子と細長い棒状構造体であるDNA nanotubeについて研究を行った。</p> <p>第一章 CpG DNAの免疫細胞への効率的なデリバリーを目的としたDNA超分子の開発</p> <p>非メチル化シトシグアニンDNA (CpG DNA) は免疫細胞のエンドソームに発現するToll-like receptor 9に認識され自然免疫を誘導する。CpG DNAは免疫疾患やアレルギー疾患の有用な治療手段となると期待されるが、生体内における易分解性や免疫細胞に対するデリバリー効率の低さが課題となっている。本章ではこれらの問題を解決すべく、CpG配列を反復配列としてもつlss-DNAとcholesterol修飾DNAを組み合わせることにより調製されるDNA超分子を新規に開発した。DNA超分子の形成はゲルシフトアッセイ及び透過型電子顕微鏡観察により確認した。DNA超分子の安定性をウシ胎児血清 (FBS) を用いて評価し、DNA超分子が安定性に優れることを見出した。マウスマクロファージ (RAW264.7) 細胞にDNA超分子、lss-DNA、CpG DNAを添加後の上清中TNF-<math>\alpha</math>量をELISAにより評価したところ、lss-DNAはCpG DNAに対して20倍のTNF-<math>\alpha</math>産生量を示したのに対しDNA超分子はさらにその3倍のTNF-<math>\alpha</math>産生量を示した。また、細胞毒性をLactate dehydrogenase (LDH) アッセイにより評価したところDNA超分子はRAW264.7細胞に対してほとんど毒性を示さなかった。以上よりDNA超分子は毒性の懸念が少なく高い免疫活性を持つドラッグデリバリーキャリアとなると考えられる。</p> <p>第二章 DNA nanotubeの細胞取り込み選択性に関する研究</p> <p>核酸構造体のドラッグデリバリーシステムへの応用には細胞取り込み選択性の情報が不可欠である。ナノサイズの核酸構造体の多くは貪食能をもつ免疫細胞に取り込まれやすいことが報告されているが、DNA nanotube等の特異な構造体の細胞取り込み選択性については未だ情報が少ない。そこでDNA nanotubeの細胞取り込み選択性を5種類の細胞株、マウスマクロファージ (RAW264.7)、マウス樹状細胞 (DC2.4)、マウス胎児線維芽細胞 (NIH3T3)、マウス筋芽細胞 (C2C12)、マウスメラノーマ (B16BL6)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) を用いて評価を行った。各細胞にFAM標識DNA nanotubeを添加しFACS法により細胞取り込みを比較した結果、NIH3T3及びC2C12に高い蛍光が観察された。DNA nanotubeのNIH3T3細胞による取り込み機構を各種エンドサイトーシス阻害剤を用いて評価したところ、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンB処理群ではDNA nanotubeの取り込みが有意に減少した。また、DNA nanotubeの線維芽細胞による取り込み様式を観察するために、金ナノ粒子 (AuNP) 標識DNA nanotubeを添加したNIH3T3細胞の細胞超薄切片の透過型電子顕微鏡観察を行った。その結果、DNA nanotubeは添加1時間後の比較的早い時間では細胞表面に分布し、食作用によって取り込まれることが示唆された。また、4時間後では細胞内にDNA nanotubeを</p>			

有したAutophagosomeが多数形成されていた。以上、DNA nanotubeはこれまでに報告されていない取り込み特性を示すこと及びその取り込み様式について明らかにした。

### 第三章 DNA nanotubeの細胞取り込み選択性に対するCollagenの関与

DNA nanotubeが線維芽細胞に高い細胞取り込み選択性を示したメカニズムとして、線維芽細胞が他の細胞と比較して高く発現するCollagenに着目した。取り込みを評価した上記の5つの細胞株におけるCollagen type Iの発現量をウェスタンブロットにより確認したところ、DNA nanotubeの取り込みとCollagen type Iの発現量は正に相関した。プレートにCollagen type Iを固定しFAM標識DNA nanotubeを添加することで、タンパク質との親和性を測定したところ、DNA nanotubeを形成させることでCollagenへの親和性が上昇した。FITC標識Collagenを作製し酸性条件でNIH3T3細胞に添加することで細胞表面にCollagenを吸着させ、Cy5標識DNA nanotubeを添加し共焦点顕微鏡により観察したところ、細胞内において緑及び赤の蛍光の共局在が観察された。Collagenase処理による細胞表面のCollagenを除去したNIH3T3細胞では、未処理の細胞と比較してDNA nanotubeの細胞取り込みが有意に低下した。以上よりDNA nanotubeの線維芽細胞への取り込みにはCollagenが関与すると考えられる。

以上、申請者はIss-DNAを疎水性相互作用に基づき形成されるDNA超分子とすることでその安定性の改善と、免疫細胞の活性能の増強が可能であることを明らかにした。また、DNA nanotubeは細胞表面のCollagenを介した細胞取り込み特性を示すことを見出した。本研究で提示した知見は、核酸構造体を用いたドラッグデリバリーシステムの開発において有益な情報を提示するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、Rolling circle amplification (RCA) 法により調製される長鎖一本鎖DNA (lss-DNA) を用いた核酸構造体のドラッグデリバリーシステムの開発を目指し、lss-DNAを用いて形成可能な疎水性相互作用に基づくDNA超分子と細長い棒状構造体であるDNA nanotubeについて以下の三章にわたり研究を行った。

第一章 CpG DNAの免疫細胞への効率的なデリバリーを目的としたDNA超分子の開発

非メチル化シトシグアニンDNA (CpG DNA) の生体内における易分解性や免疫細胞に対するデリバリー効率の低さという問題を解決すべく、CpG配列を反復配列としてもつlss-DNAとcholesterol修飾DNAを組み合わせることにより調製されるDNA超分子を新規に開発した。その結果、DNA超分子が安定性に優れること、またマウスマクロファージ (RAW264.7) 細胞からの効率的なTNF- $\alpha$ 誘導能を有することを見出した。

第二章 DNA nanotubeの細胞取り込み選択性に関する研究

DNA nanotubeの細胞取り込み選択性を5種類の細胞株、マウスマクロファージ (RAW264.7)、マウス樹状細胞 (DC2.4)、マウス胎児線維芽細胞 (NIH3T3)、マウス筋芽細胞 (C2C12)、マウスメラノーマ (B16BL6)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293) を用いて評価を行った結果、NIH3T3及びC2C12が高い取り込みを示すことが明らかとなった。また、各種エンドサイトーシス阻害剤を用いて評価したところ、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンB処理群ではDNA nanotubeの取り込みが有意に減少した。DNA nanotubeの線維芽細胞による取り込み様式を観察するために、金ナノ粒子 (AuNP) 標識DNA nanotubeを添加したNIH3T3細胞の細胞超薄切片の透過型電子顕微鏡観察を行った結果、食作用によって取り込まれることが示唆された。また、Autophagosomeが多数形成されることも観察され、DNA nanotubeはこれまでに報告されていない取り込み特性を示すことが明らかとなった。

第三章 DNA nanotubeの細胞取り込み選択性に対するCollagenの関与

取り込みを評価した上記の5つの細胞株におけるCollagen type Iの発現量をウェスタンブロットにより確認したところ、DNA nanotubeの取り込みとCollagen type Iの発現量は正に相関した。またFAM標識DNA nanotubeがCollagen type IIに親和性有することを確認した。FITC標識Collagenを作製し酸性条件でNIH3T3細胞に添加することで細胞表面にCollagenを吸着させ、Cy5標識DNA nanotubeを添加し共焦点顕微鏡により観察したところ、細胞内において緑及び赤の蛍光の共局在が観察された。Collagenase処理による細胞表面のCollagenを除去したNIH3T3細胞では、未処理の細胞と比較してDNA nanotubeの細胞取り込みが有意に低下した。以上よりDNA nanotubeの線維芽細胞への取り込みにはCollagenが関与することが示された。

以上、申請者はlss-DNAを疎水性相互作用に基づき形成されるDNA超分子とすることでその安定性の改善と、免疫細胞の活性能の増強が可能であることを明らかにした。また、DNA nanotubeは細胞表面のCollagenを介した細胞取り込み特性を示すことを見出した。本研究で提示した知見は、核酸構造体を用いたドラッグデリバリーシステムの開発において有益な情報を提示するものと考えられる。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認める。また、

令和4年2月8日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、（令和6年3月24日までの間）当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降