

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

2021

伊藤 公一

目次

総論の部

緒言	-----	1
----	-------	---

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	-	2
---	---	---

- 1.1 DNA 超分子の作製及び物性評価
- 1.2 DNA 超分子の取り込みの評価
- 1.3 DNA 超分子の DNase に対する安定性の評価
- 1.4 DNA 超分子の免疫活性化能の評価
- 1.5 考察

第二章 DNA nanotube の細胞取り込み選択性に関する研究	-----	12
-----------------------------------	-------	----

- 2.1 DNA nanotube の形成確認
- 2.2 DNA nanotube の細胞種による取り込み選択性の評価
- 2.3 DNA nanotube の線維芽細胞による取り込み特性の評価
- 2.4 DNA nanotube の線維芽細胞による取り込み動態の直接的観察
- 2.5 考察

第三章 DNA nanotube の細胞取り込み選択性に対する collagen の関与	-----	20
--	-------	----

- 3.1 異なる細胞種における 1 型 collagen の発現量の評価
- 3.2 DNA nanotube の形成による collagen への親和性に与える影響の評価
- 3.3 DNA nanotube と collagen の細胞における局在
- 3.4 DNA nanotube の取り込みに及ぼす collagenase 処理の影響
- 3.5 考察

結論	-----	25
----	-------	----

謝辞	-----	27
----	-------	----

実験の部

第一章 実験の部	-----	28
----------	-------	----

第二章 実験の部	-----	31
----------	-------	----

第三章 実験の部 ----- 35

引用文献 ----- 37

総論の部

緒言

近年、医薬品の新規開発において医薬品となりえる低分子化合物候補の枯渇が懸念される中、核酸医薬が新たな治療モダリティとして注目を集めている。核酸医薬の中には既に承認されたものもあるが、それらは全て化学修飾体である。化学修飾体は DNA 分解酵素に対する安定性に優れる一方で安全性に懸念がある。このことから天然体を利用することが望まれるが、安定性が課題である。また、標的細胞以外の細胞への送達により誘起されるオフターゲット効果による副作用も解決すべき課題である。核酸医薬のさらなる開発には上記の課題を克服するための製剤設計、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が急務である。

核酸構造体は、核酸の塩基対形成能を利用して作製可能な様々な三次元構造体である。生体由来物質である核酸を基盤とする核酸構造体は、生体への毒性の懸念が少なく、アプタマー等の機能性配列をもつ核酸を組み合わせることによりターゲティングも可能である。また、三次元構造を形成することにより DNA 分解酵素に対する安定性が向上する構造体についても報告がある。すなわち、核酸構造体は、核酸医薬の DDS となりうることが期待される。

核酸構造体を作製する手法の一つに Rolling circle amplification (RCA) により調製された長鎖一本鎖 DNA (lss-DNA) を利用する方法がある。RCA において、一本鎖環状 DNA を鋳型としプライマーをアニーリングさせ、phi29 DNA polymerase 等の塩基置換活性を有する酵素を加えることで、鋳型 DNA の相補配列が反復した長鎖の DNA が得られる。lss-DNA は鋳型によって任意の配列を設計可能であり、生理活性を持つ配列を用いた場合に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がある。著者は lss-DNA を用いた核酸構造体の DDS への応用について、1 章では lss-DNA と疎水性基である Cholesterol を組み合わせることで DNA 超分子を新規に開発し、免疫賦活化剤である CpG DNA をモデル核酸医薬として免疫細胞への効率的なデリバリーを試みた。2 章では、lss-DNA と三角柱型ユニットを組み合わせることにより作製される DNA nanotube がそのユニークな形状により特徴的な細胞取込み特性を示しうると考え、その細胞取り込み選択性を評価した。3 章では、2 章において DNA nanotube が特徴的な細胞取込み特性を有することを見出したことから、その取込みメカニズムに関する研究を行った。以降本研究で得られた成果を 3 章に渡って論述する。

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

哺乳細胞の自然免疫システムは Toll-like receptor (TLR) シグナル経路により活性化される¹。非メチル化シトシン-グアニン配列を含む DNA (CpG DNA) は細菌やウイルス由来の DNA から同定され、免疫細胞の TLR9 に結合し TNF- α や IL-6 等の炎症性サイトカインの産生を引き起こす²。活性化された自然免疫システムは癌細胞に対する殺細胞作用、感染組織に対する防御反応やアレルギー性炎症の抑制を誘導する。従って、CpG DNA はこれらの疾患治療に利用できると考えられる^{3,4}。

Rolling circle amplification (RCA) 法は塩基置換活性を有する DNA polymerase を用いて長鎖一本鎖 DNA (lss-DNA) を産生する方法である。lss-DNA は環状の鋳型 DNA の相補配列が反復した配列をもつ^{5,6}。鋳型 DNA を任意に設計することによって、lss-DNA に CpG 配列^{7,8}、DNA aptamer^{9,10}、制限酵素配列¹¹等の機能性配列をもたせることが可能である。このような特性から、RCA 法はドラッグデリバリーやタンパク質検出等の様々な領域に応用されている¹²。

CpG 配列を含む lss-DNA は、カチオン性脂質の利用や疎水性基を CpG DNA に修飾する等の一般的な方法と比較して免疫活性化能を効率よく上昇させることが報告されている⁷。これは、CpG 配列を含む lss-DNA が CpG DNA の効率的なデリバリーキャリアとして機能する可能性を示唆する。しかしながら、lss-DNA は DNase I や FBS によって分解を受けやすく^{13,14}、これは免疫治療への応用を考慮した場合に克服する必要がある。

疎水性相互作用はナノメートルからマイクロメートルの粒子を作製できる駆動力である。これまでに lss-DNA と Cholesterol 修飾 DNA (Chol-DNA) を MgCl₂ 存在下でハイブリダイゼーションさせることにより大きさ約 200nm の粒子を作製できることが報告されている¹⁵。しかしながら、lss-DNA と Mg²⁺イオンのみから同様の粒子を形成できることが後に報告されており¹⁶、lss-DNA と Chol-DNA を組み合わせて作製された 200nm の粒子は Mg²⁺による沈殿物であることが示唆される。したがって、lss-DNA と Chol-DNA の疎水性相互作用を介した生成物については未だ不明の点が多い。

本章では、CpG DNA の効率的なデリバリーを目的に lss-DNA と Chol-DNA を用いた DNA 超分子の作製を試みた。RCA の鋳型に CpG DNA の相補配列を組み込むことによって、CpG 配列を反復して含む lss-DNA が作製される。また、Chol-DNA と lss-DNA をハイブリダイゼーションさせることによって Cholesterol 残基が疎水性相互作用により内側に配向した粒子状の超分子が作製される (Figure 1)。本章では、作製した DNA 超分子の取り込み効率、DNase に対する安定性及び免疫刺激能について評価した。

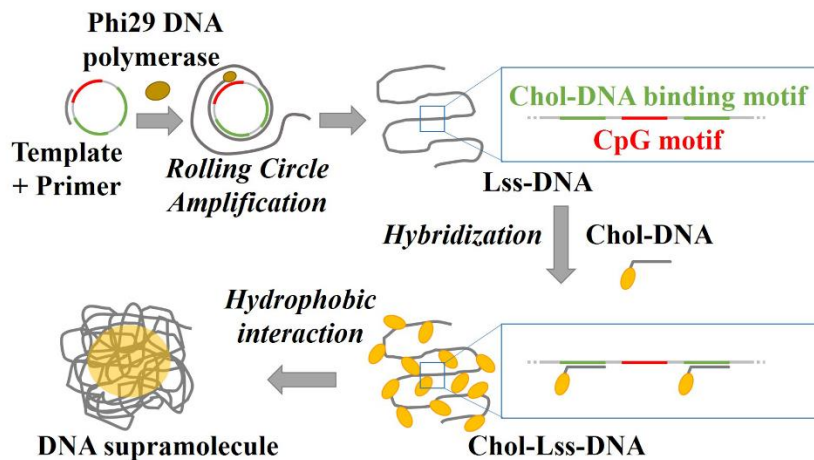


Figure 1. Schematic representation of the synthesis of DNA supramolecules.

Circular single-stranded DNA (template) was annealed with a primer. Rolling circle amplification was performed by adding phi29 DNA polymerase. The synthesized lss-DNA contained one CpG motif (red) and two chol-DNA binding motifs (green) per repeating unit. Chol-DNA was attached to lss-DNA by DNA hybridization. The amphiphilic polymers consisting of lss-DNA and chol-DNA can form spherical structures (DNA supramolecules) via the hydrophobic interactions involving cholesterol.

1.1 DNA 超分子の作製及び物性評価

Table 1 に今回設計した DNA 超分子の調製に使用した各 DNA の配列を示す。

ODN names	Sequences
chol2_template	5'-phosphate- GTCAGCCAAACATTACAGCTTGCT ACAGTCTGGAAACATTACAGCTTG CTACAGGAGGTCAGCATCAGGAAC <u>GTCATGGA</u> -3'
chol2_primer	5'-TGGCTGAC TCCATGAC-3'
chol-DNA	5'-AAACATTACAGCTTGCTACA-TEG- cholesterol-3'
nonchol-DNA	5'-AAACATTACAGCTTGCTACA-3'
CpG1668	5'-TCCATGACGTTCCCTGATGCT-3'

Table 1. Sequences of oligodeoxynucleotides

The complementary sequence to the CpG motif (AACGTC) in chol2_template and the murine CpG motif (GACGTT) in CpG1668 are underlined. Bold faces in chol2_template indicate the same sequences as chol-DNA/nonchol-DNA. Repeated sequences complementary to the chol2 template were synthesized by rolling circle amplification. TEG: triethylene glycol.

chol2_template ODN と chol2_primer のアニーリングをポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により確認した (Figure 2A)。アニーリングして得られた DNA を用いて RCA を行い得られた RCA 産物をアルカリアガロースゲル電気泳動により確認した。10 kb を超える位置にバンドが得られたことから RCA により lss-DNA が作製されたことが示唆された (Figure 2B)。

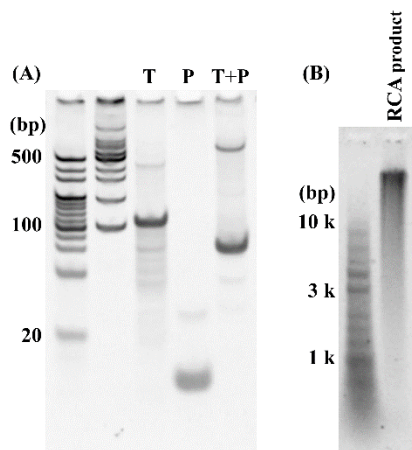


Figure 2. Electrophoretic analysis of RCA products.

(A) Annealing of circular template and primer for RCA was confirmed by 12% PAGE analysis. T: circular template, P: primer, T+P: circular template + primer. (B) DNA amplified through RCA was analyzed by 0.6% alkaline agarose gel electrophoresis.

異なる濃度比の Chol-DNA を lss-DNA とハイブリダイゼーションさせ、DNA 超分子の形成をアガロースゲル電気泳動により評価した。lss-DNA と Chol-DNA をリピーティングユニット比 1 : 2 で混合した場合に、lss-DNA の上部に生成物のバンドが見られた (Figure 3A)。lss-DNA と Chol 非修飾 DNA (nonchol-DNA) を混合させた場合には上部へのバンドシフトは起こらなかった (Figure 3B)。また、界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム (SDS) を用いてアガロースゲル電気泳動を行ったところ Figure 3A に見られた上部へのバンドシフトが消失した (Figure 3C)。これは界面活性剤により Chol-DNA の疎水性相互作用が消失したことによると考えられる。各 DNA の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察画像を Figure 3D に示す。lss-DNA において網目状の構造体が観察されたのに対し、lss-DNA と Chol-DNA を混合させた場合には大きさ 1-10 μ m の大きな複合体が観察された。この複合体を DNA 超分子と呼ぶ。Chol-DNA 及び lss-DNA 単独ではこのような複合体は観察されなかった。DNA 超分子のサイズ分布を測定したところ、大きさ 300 nm と 1000-7000 nm の位置にピークが得られた (Figure 3E)。疎水性環境下で蛍光強度が上昇する色素である DiO¹⁷ を lss-DNA、Chol-DNA 及び DNA 超分子と混合し、蛍光強度を比較したところ、lss-DNA と比較して Chol-DNA 及び DNA 超分子では蛍光強度の増大が見られた (Figure 3F)。これは Chol-DNA が疎水性残基を内側にミセルを形成するように、DNA 超分子も疎水性残基を内側に配向した疎水性コアを形成することを示唆する。

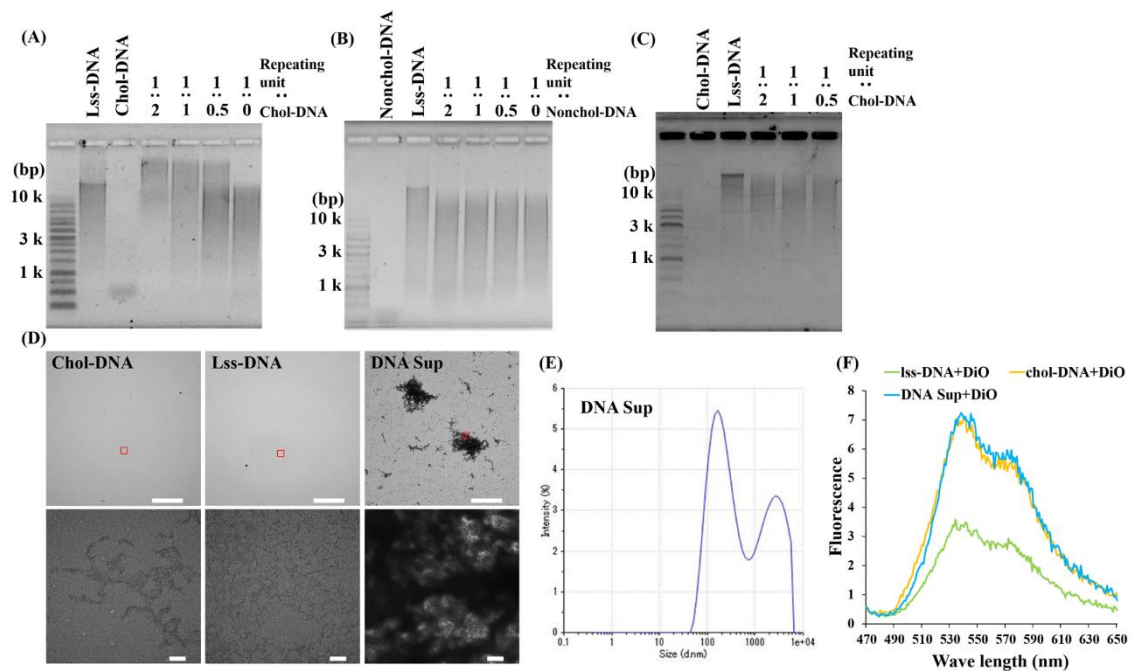


Figure 3. Characterization of DNA supramolecules.

(A,B) Electrophoretic analysis of DNA supramolecules. Lss-DNAs hybridized with different molar amounts of chol-DNA (A) or nonchol-DNA (B) were analyzed by 0.6% agarose gel electrophoresis. Lss-DNA : chol-DNA = 1:0 means lss-DNA in dH₂O containing some ions heated to 95°C and cooled gradually. (C) Electrophoretic analysis of DNA supramolecules containing detergent (0.1% SDS). Detergent was mixed in both agarose gel and electrophoresis buffer. (D) TEM images of chol-DNA, lss-DNA and DNA supramolecule (lss-DNA : chol-DNA = 1:2) consisting of lss-DNA 0.5 μM and chol-DNA 1.0 μM was observed by TEM. Corresponding concentration of lss-DNA or chol-DNA was observed by TEM individually. Scale bar = 10 μm (up panels) or 100 nm (bottom panels). Red squares shown in up panels are expanded as bottom panels. (E) Size distribution of DNA Sup (lss-DNA : chol-DNA = 1:2) measured by DLS. (F) Fluorescence shift of DiO mixed with lss-DNA, chol-DNA or DNA Sup (lss-DNA : chol-DNA = 1:2).

1.2 DNA 超分子の取り込みの評価

CpG 配列を含む lss-DNA は複雑な構造体を形成することが知られている。したがって、lss-DNA は CpG DNA 単体と比較してマクロファージのような免疫細胞に取り込まれやすく、TLR9 に認識されやすいことが報告されている⁷。DNA 超分子も lss-DNA から構成されているため、同様に免疫細胞に取り込まれやすいことが期待される。この仮説を検証するために、マウスマクロファージ細胞 (RAW264.7) を用いて Cy5 標識した lss-DNA と DNA 超分子の取り込みを fluorescence-activated cell sorting (FACS) により評価した。アガロースゲル電気泳動により Cy5 標識が lss-DNA 及び DNA 超分子の物性に大きな影響を与えないことを確認した (Figure 4A)。Cy5 標識 lss-DNA 及び DNA 超分子を取り込ませた細胞の平均蛍光強度 (MFI) 及び蛍光分布は両者で大きな差はなかった (Figure 4B)。また、lss-DNA 及び DNA 超分子の細胞取り込みを共焦点顕微鏡により観察し、細胞内において lss-DNA 及び DNA 超分子由来の蛍光が観察された (Figure 4C)。

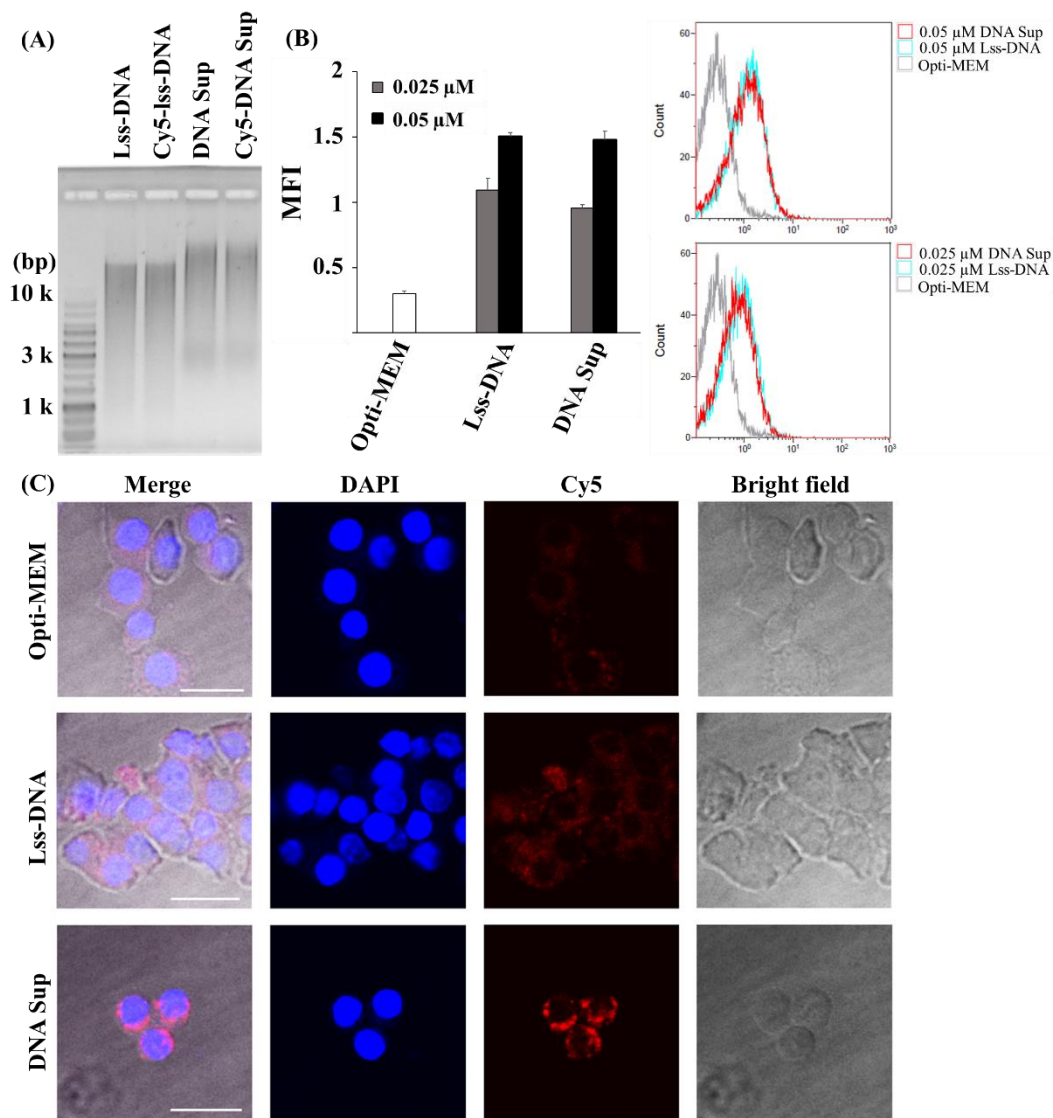


Figure 4. The cellular uptake of lss-DNA and DNA Sup by RAW264.7 cells.

(A) Electrophoretic analysis of non-labeled DNA and Cy5-labeled DNA. (B) The mean fluorescence intensity (MFI) derived from RAW264.7 cells incubated with Opti-MEM containing Cy5-labeled lss-DNA or DNA Sup at the final concentration of 0.025 μM (gray bar) or 0.05 μM (black bar) for 4 h. n=4. The comparison of histograms indicating the fluorescence at the final concentration of 0.05 μM (up picture) or 0.025 μM (bottom picture). MFI and histogram of the fluorescence were measured by FACS. (C) Confocal microscopic images of RAW264.7 cells incubated with Opti-MEM containing 0.1 μM of Cy5-labeled lss-DNA or DNA Sup (lss-DNA : chol-DNA = 1:2) for 4 h. Scale bar = 20 μm. All concentrations of lss-DNA or DNA Sup were noted as molar per lap of lss-DNA.

1.3 DNA 超分子の DNase に対する安定性の評価

生物学的安定性を評価するために、種々の DNase を含むウシ胎児血清 (FBS) に対する構造の安定性を評価した。lss-DNA が 2 時間以内にほとんどが分解されたのに対し、DNA 超分子は 24 時間後でも 80%程度が残存していた (Figure 5A, B)。この違いは DNA 超分子を形成させることにより DNase に対する安定性が向上したことを示唆すると考えられる。また、DNA 超分子は 24 時間後はゆっくりと分解された (Figure 5C, D)。lss-DNA : chol-DNA 比が 1 : 1 及び 1 : 2 で作製した DNA 超分子については、24 時間後でもバンドは残っている

ものの、そのバンドはスメアであった (Figure 5E)。また、DNA 超分子と FBS を混合することによって DNA 超分子のバンドに大きな変化はなかったことから、FBS 中の成分と DNA 超分子間で複合体形成は起こらないことが示唆された (Figure 5F)。これらの結果から、DNA 超分子作製時の lss-DNA : chol-DNA 比が低いほど DNase に分解されやすいことが示唆された。

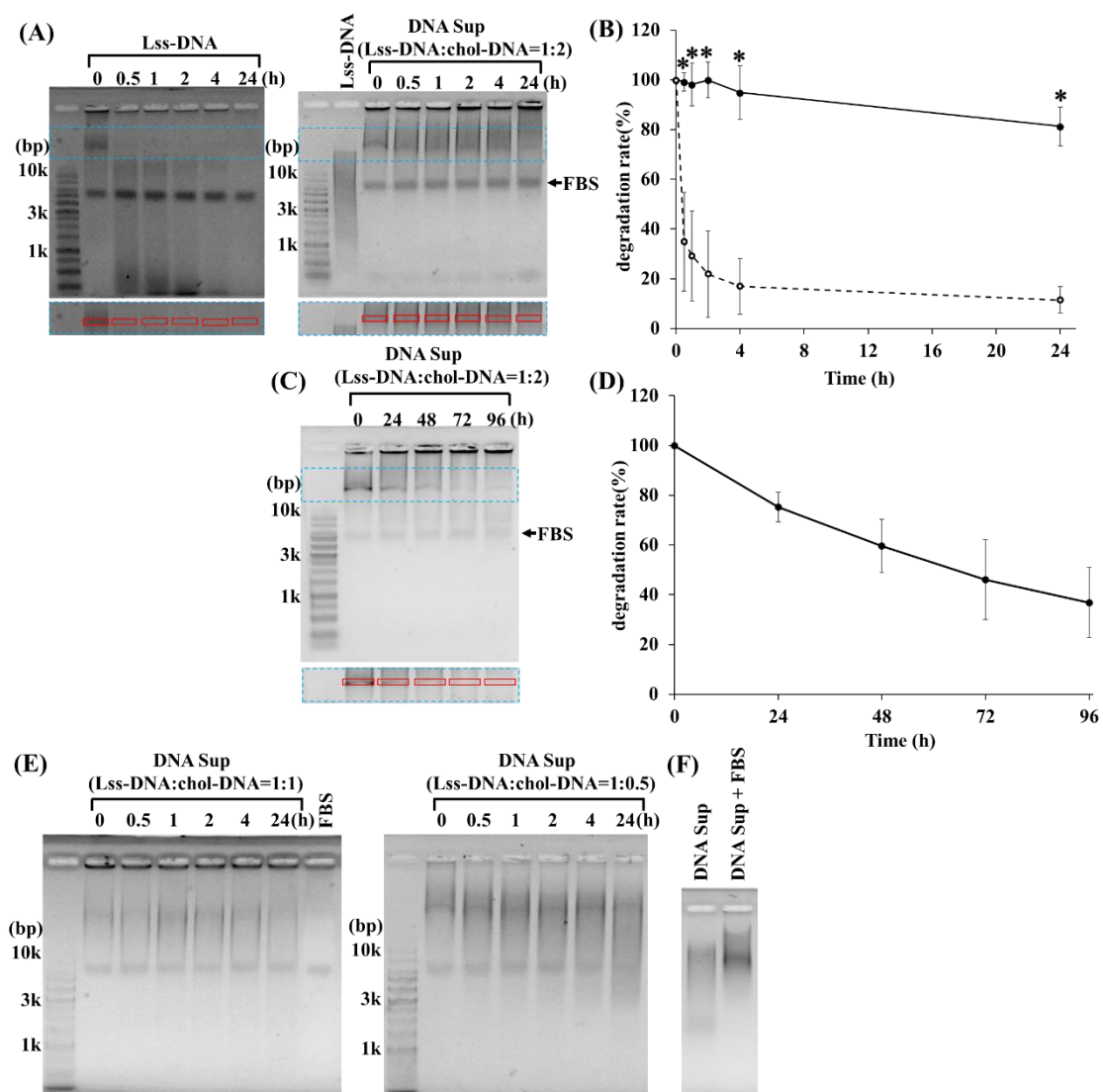


Figure 5. The structural stability against FBS.

(A,C) Electrophoretic analysis of the stabilities of lss-DNA (left gel) and DNA Sup (right gel) in 20% heat-inactivated FBS at indicated time points. (B,D) Degradation rate of lss-DNA and DNA Sup. Red squares shown in blue-dotted squares picked up under the gels indicate the areas quantified for (B,D). The data are shown as mean \pm S.D. quantified from three gels. (B) In this degradation graph, dotted line and white circles indicate lss-DNA, whereas solid line and black circles indicate DNA Sup; *: significant difference between lss-DNA and DNA Sup at each time point. (E) Electrophoretic analysis of the stability of DNA Sup at the molar ratio of lss-DNA : chol-DNA = 1:1 (right gel) and 1:0.5 (left gel) in 20% FBS at indicated time points. (F) Electrophoretic analysis of DNA Sup (lss-DNA : chol-DNA = 1:2) and DNA Sup + FBS.

1.4 DNA 超分子の免疫活性化能の評価

マウスマクロファージ細胞 (RAW264.7) を用いて DNA 超分子の免疫活性化能を評価し

た。RAW264.7 細胞に CpG1668、Chol-DNA、lss-DNA、DNA 超分子を添加し、8 時間インキュベートした後、培養上清中の TNF- α 量を ELISA 法により測定した。lss-DNA では CpG1668 と比較して 20 倍の TNF- α 産生量の増加を示した一方で、DNA 超分子 (lss-DNA : chol-DNA=1 : 0.5、1 : 1、1 : 2) では lss-DNA と比較して有意に高い TNF- α 産生量を示した (Figure 6A)。特に lss-DNA : chol-DNA=1 : 2 で作製した DNA 超分子は lss-DNA の約 3 倍の TNF- α 産生量を示した。また、DNA 超分子とポリプレックス (CpG1668+PEI、lss-DNA+PEI) 及びリポプレックス (CpG1668+lipofectamine、lss-DNA+lipofectamine) の免疫活性化能を比較したところ、いずれと比較しても DNA 超分子は有意に高い TNF- α 産生量を示した (Figure 6B)。これは、PEI や lipofectamine が DNA を細胞質へのデリバリーを目的に設計されているのに対し、DNA 超分子は CpG DNA の標的である TLR9 が発現するエンドソームに対して効率的なデリバリーキャリアであることを示唆する。これを検証する為に Lysotracker green と Cy5 標識 DNA の共局在を観察した。lss-DNA+lipofectamine 群ではライソソームとほとんど共局在を示さなかったのに対し、lss-DNA 及び DNA 超分子はライソソームとの共局在が観察された (Figure 6C)。さらに、DNA 超分子の RAW264.7 細胞に対する細胞毒性を LDH アッセイにより評価したところ、0.005-0.2 μ M の濃度で細胞毒性は認められなかった (Figure 6D)。以上より、DNA 超分子は免疫細胞に毒性を与えることなく、効率的に活性化することが示唆された。

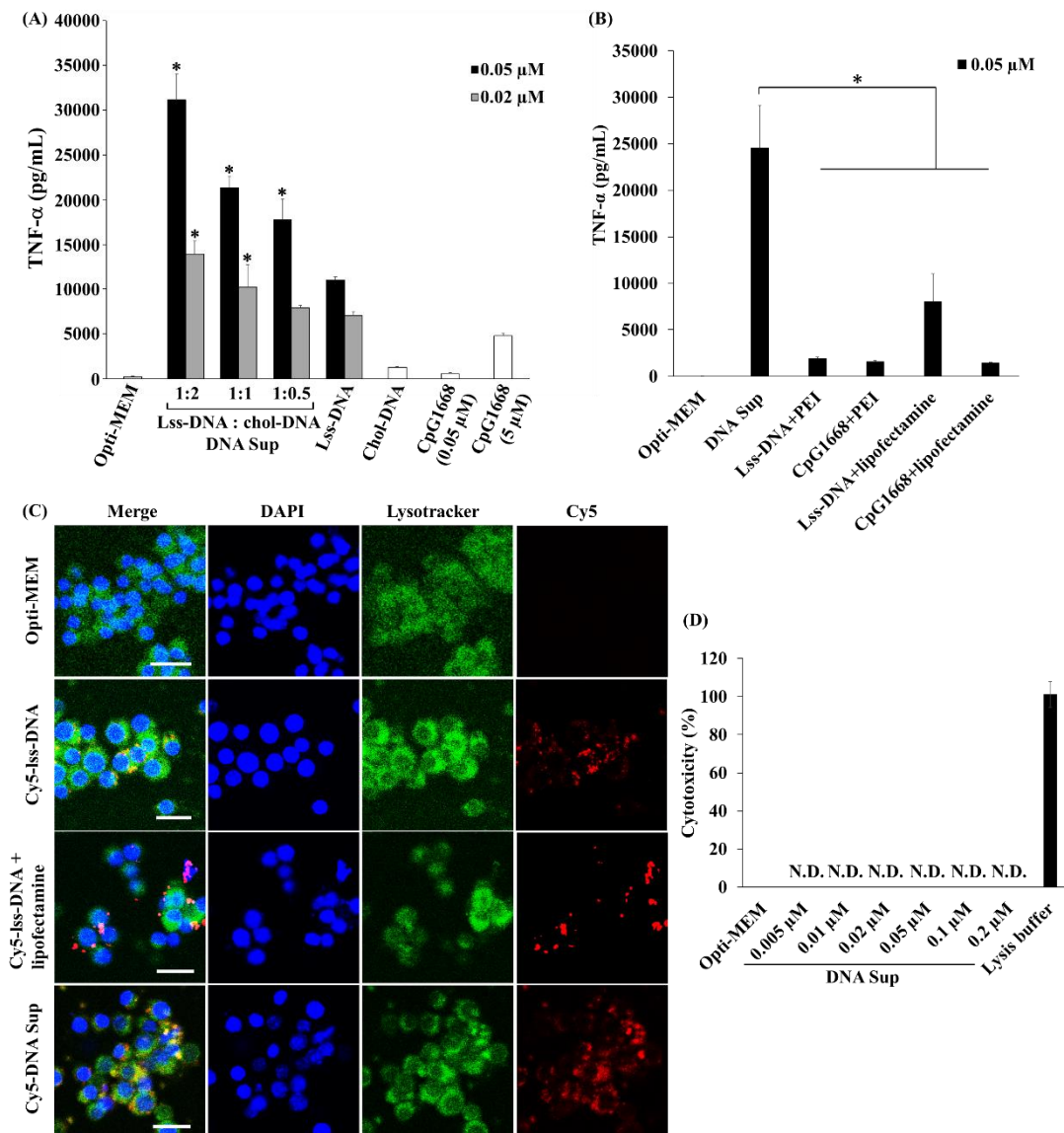


Figure 6. TNF- α release from RAW264.7 cells.

(A) TNF- α released from RAW264.7 cells incubated with Opti-MEM containing DNA Sup/lss-DNA/chol-DNA/CpG-DNA for 8 h was investigated by ELISA. (B) TNF- α released from RAW264.7 cells incubated with Opti-MEM containing DNA Sup (lss-DNA : chol-DNA = 1:2)/lss-DNA-PEI polyplex/CpG1668-PEI polyplex/lss-DNA-lipofectamine liposome/CpG1668-lipofectamine liposome for 8 h was investigated by ELISA. Data are shown as mean \pm S.D; n=4. The concentration of chol-DNA was the same as that of lss-DNA : chol-DNA = 1:2; *: significant difference compared with lss-DNA at the same concentration. (C) Confocal images of Cy5-labeled DNAs (red) and lysotracker (green) in RAW264.7 cells after 4 h incubation. (D) Cytotoxicity of DNA Sup (lss-DNA : chol-DNA = 1:2) evaluated by LDH assay. N.D.: not detected. All concentrations of lss-DNA or DNA Sup were noted as molars per lap of lss-DNA.

1.5 考察

本章では、Watson-Crickの塩基対形成とCholesterolによる疎水性相互作用を利用してDNA超分子を作製し、CpG DNAのデリバリーキャリアとしての応用を試みた。ゲルシフトアッセイ及びTEM観察の結果よりlss-DNAとchol-DNAを組み合わせるによりマイクロメートルオーダーの構造体を作製できることを明らかにした。一方で、lss-DNAとCholesterol非修飾DNAをハイブリダイゼーションさせた場合にはバンドシフトは見られなかった

(Figure 3B)。また、TEM 観察の結果では、lss-DNA 及び chol-DNA 単独では DNA 超分子で見られたような構造体は観察されなかった。したがって、DNA 超分子の形成には Cholesterol 基による疎水性相互作用が関与すると考えられる。

DNA 超分子形成には、単独の lss-DNA による分子内相互作用及び複数の lss-DNA による分子間相互作用の両方が関与すると推察される。DNA nanoflower は RCA の反応の際に lss-DNA と MgPPi の沈殿物として生成される大きさ 100-300 nm の粒子である^{7,18}。DNA polymerase は鋳型から解離することなく lss-DNA を生成するため、1 分子の lss-DNA からは 100-300 nm の粒子が生じると思われる。一方で、DNA 超分子はマイクロメートルオーダーの構造体であるため、その形成には複数の lss-DNA が Cholesterol による疎水性相互作用により分子間相互作用することで形成されると考えられる。しかしながら、その形成の際に分子内相互作用が関与する可能性を否定できないため、分子内相互作用と分子間相互作用の両方が DNA 超分子の形成に関与すると考える。また、DNA 超分子はヘテロな集団であると推察される (Figure 3E)。この解決策として、限外ろ過やサイズ排除クロマトグラフィーなどのサイズをもとに分離する手法によって、より均質な DNA 超分子を精製することができると考えられる。

DNA 超分子はモノマーの CpG DNA と比較して高い RAW264.7 細胞からの TNF- α 産生量を示した (Figure 6A)。100-1000 nm のリポソームがマクロファージによって取り込まれやすいことが報告されているため¹⁹、CpG DNA よりサイズが大きい lss-DNA や DNA 超分子も RAW264.7 細胞に取り込まれやすく、その結果高い免疫活性化能を示したと推察される。さらに、取り込みには大きな違いがなかったにも関わらず (Figure 4B)、DNA 超分子が lss-DNA と比較して高い免疫活性化能を示した原因として、DNase に対する安定性が向上したことが考えられる (Figure 5)。すなわち、lss-DNA がエンドソームで速やかに分解されたのに対し、DNA 超分子は分解されずにエンドソームに留まり続け、持続的に TLR9 を刺激したと思われる。

DNA 超分子が DNase に対する安定性が上昇した原因として構造体表面の密度の上昇と核酸アライメントによる塩濃度の上昇によると考えられる。Spherical nucleic acids (SNPs)において、上記のメカニズムによりヌクレアーゼに対する安定性が上昇することが報告されている¹⁸⁻²⁰。金ナノ粒子のような金属イオンをコアとする SNPs だけでなく、DNA micelle のような疎水性コアを有する SNPs についても高い生物学的安定性が報告されている²⁰。DNA 超分子の場合、Cholesterol 基を内側に配向させた構造をとることが示唆されており (Figure 3F)、構造体表面は chol-DNA とハイブリダイゼーションしていない lss-DNA 領域が露出していると推察される。したがって、DNA 超分子は SNPs と近い構造をしているため、SNPs と同様のメカニズムにより DNase に対する安定性が上昇したと考えられる。

今回は、lss-DNA と chol-DNA の Repeating unit 比を 1 : 2 が上限となるように lss-DNA の配列を設計したが、lss-DNA 中の chol-DNA 結合領域を増やすことによって、さらに Repeating unit 比を上げることが可能である。それによって、さらに疎水性相互作用を高め、より生物

学的に安定で免疫活性化能を示す DNA 超分子を作製できる可能性がある。

以上、本章では、*lss*-DNA と Cholesterol 修飾 DNA を組み合わせることで、DNA 分解酵素に対する安定性が高く、免疫細胞を効率よく活性化する DNA 超分子を新規開発した。

第二章 DNA nanotube の細胞取り込み選択性に関する研究

核酸構造体がどの種類の細胞に取り込まれやすいかの情報は、核酸構造体を用いた DDS の開発において重要な知見である。病態情報薬学分野では、これまでに天然型のホスホジエステル DNA からなる多足型 DNA ナノ構造体 (polypod-like nanostructured DNA : polypodna) が、癌細胞やその他の細胞と比較して、マクロファージや樹状細胞に効率的に取り込まれることを報告している^{21,22}。

DNA nanotube は細長い棒状の構造体であり、5つの短い DNA をアニーリングすることで得られる三角柱型ユニットと lss-DNA をハイブリダイゼーションさせるデザインが報告されている²³。このデザインにおいて、lss-DNA の長さを変えることにより幅 10 nm、長さ 1 μm 以上の DNA nanotube を作製することができる。DNA nanotube は polypodna と全く異なる形状をもつため、polypodna と異なる細胞種に効率的に取り込まれる可能性がある。しかしながら、その細胞による取り込みについてはヒト子宮頸癌細胞 (HeLa 細胞) への取り込みが報告されているのみで、細胞種による選択性については調べられていなかった²⁴。

本章では、DNA nanotube の細胞種による取り込みの選択性を評価し、その細胞局在、取り込み機構を調べた。また、金ナノ粒子標識と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を組み合わせることで、DNA nanotube の取り込み動態の直接的可視化を試みた。

2.1 DNA nanotube の形成確認

DNA nanotube のデザインは Graham D. Hamblin らの報告を参考にした²³。DNA nanotube の作製スキームを Figure 1A に示す。このデザインでは、5つの短い DNA (A1, C1, C2, R1, R2) を互いにハイブリダイゼーションさせ、三角柱型ユニット (U1) を作製した。U1 の形成をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により評価した (Figure 1B)。RCA の反応時間が長くなるほど、生成物の lss-DNA の長さも長くなることが報告されている²⁵。異なる長さをもつ DNA nanotube を作製するために、RCA の反応時間を変えることによって異なる長さの lss-DNA を作製した。lss-DNA の長さをアルカリアガロースゲル電気泳動によって評価したところ、RCA の反応時間依存的に lss-DNA の長さが増大し 30 分以上では 10000 base 以上となることが分かった (Figure 1C)。RCA の反応時間を 2.5 分、10 分、1 時間、16 時間で設定し DNA nanotube を作製した。DNA nanotube の形成を PAGE により評価したところ (Figure 1D)、U1 と lss-DNA を Repeating unit 比=1 : 1 で混合することにより、U1 と lss-DNA のバンドが消失し、ウェルからほとんど移動しない位置に新たなバンドが得られた。次に DNA nanotube を TEM 観察によって確認した (Figure 1E)。その結果、lss-DNA が網目状の構造体として観察されたのに対し、DNA nanotube を形成させることで幅 10 nm 以下の棒状の構造体が観察された。lss-DNA の長さによって DNA nanotube の見え方に違いがあっ

たことから異なる長さの DNA nanotube を形成できたと考えられる。

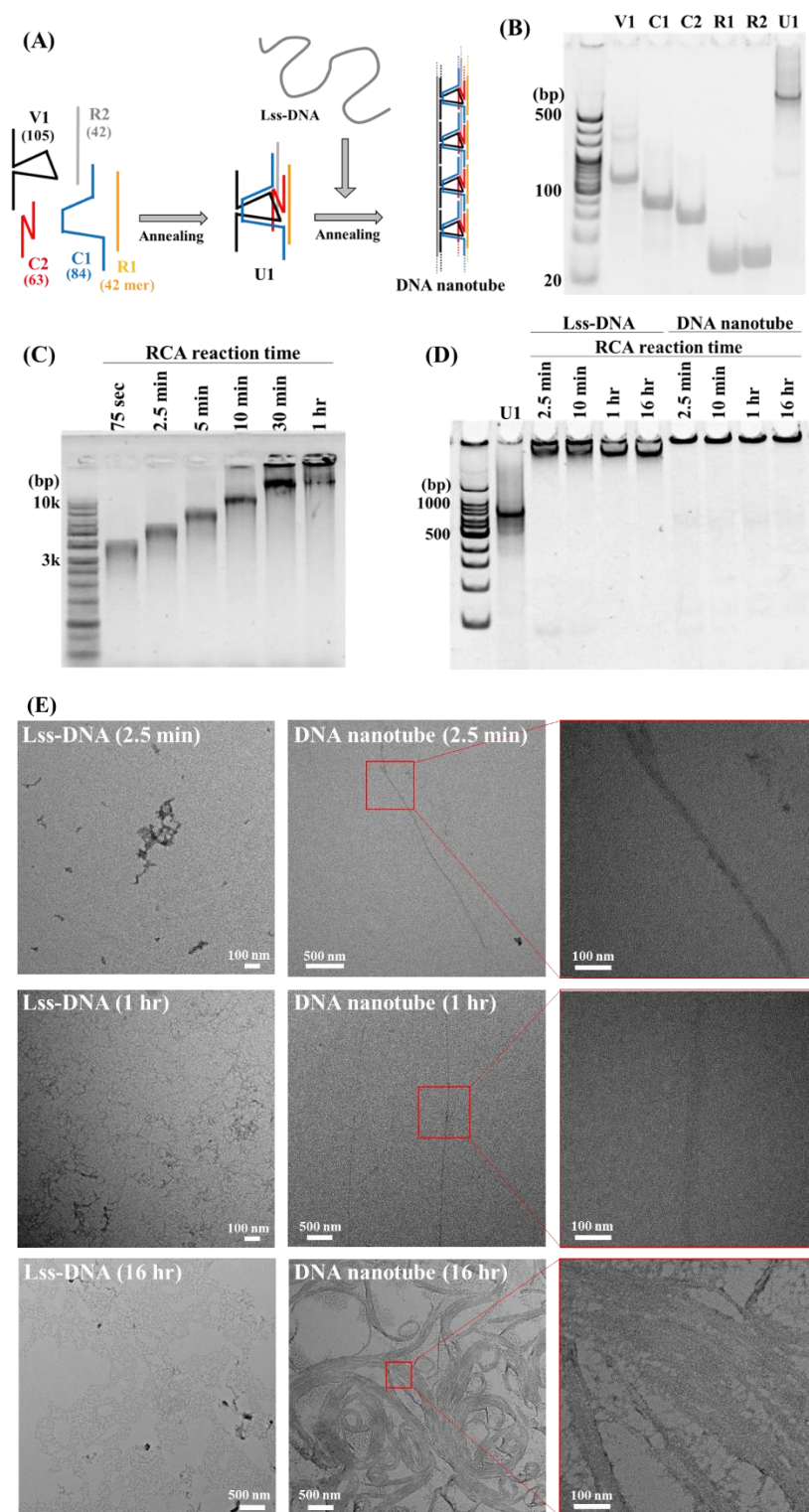


Figure 1. Formation and characterization of DNA nanotube

(A) Schematic image of formation of DNA nanotube. (B) Electrophoretic analysis of U1 or its component DNAs. Annealing of all strands was confirmed by 12% PAGE analysis.

(C) Lss-DNAs amplified by RCA depending on different reaction time were analyzed by 0.6% alkaline agarose gel electrophoresis.

(D) Electrophoretic analysis of DNA nanotube. Lss-DNA amplified by each reaction time hybridized with U1 was analyzed by 6% PAGE analysis. The time shown in lanes of DNA nanotube means RCA reaction time for amplification of lss-DNA. (E) TEM images of lss-DNA or DNA nanotube. Scale bar = 100 nm. Right pictures are magnification images of red square shown in the center pictures.

2.2 DNA nanotube の細胞種による取り込み選択性の評価

RCA1 時間により調製した lss-DNA から作製した DNA nanotube の細胞種による取り込みをマウスマクロファージ細胞 (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)、マウスメラノーマ細胞 (B16BL6) 及び人胎児腎細胞 (HEK293) を用いて評価した。DNA nanotube を形成させることで、他の細胞と比較して NIH3T3 及び C2C12 に取り込まれやすくなることを見出した (Figure 2A)。DNA nanotube の長さによる細胞取り込み選択性の影響を評価した。高取り込み群から NIH3T3 細胞、低取り込み群から RAW264.7 細胞を選び、RCA2.5 分、10 分、1 時間、16 時間により調製した lss-DNA から作製した DNA nanotube の取り込み効率を測定したところ、DNA nanotube の長さによって両細胞への取り込み効率に大きな変化はなかった (Figure 2B)。

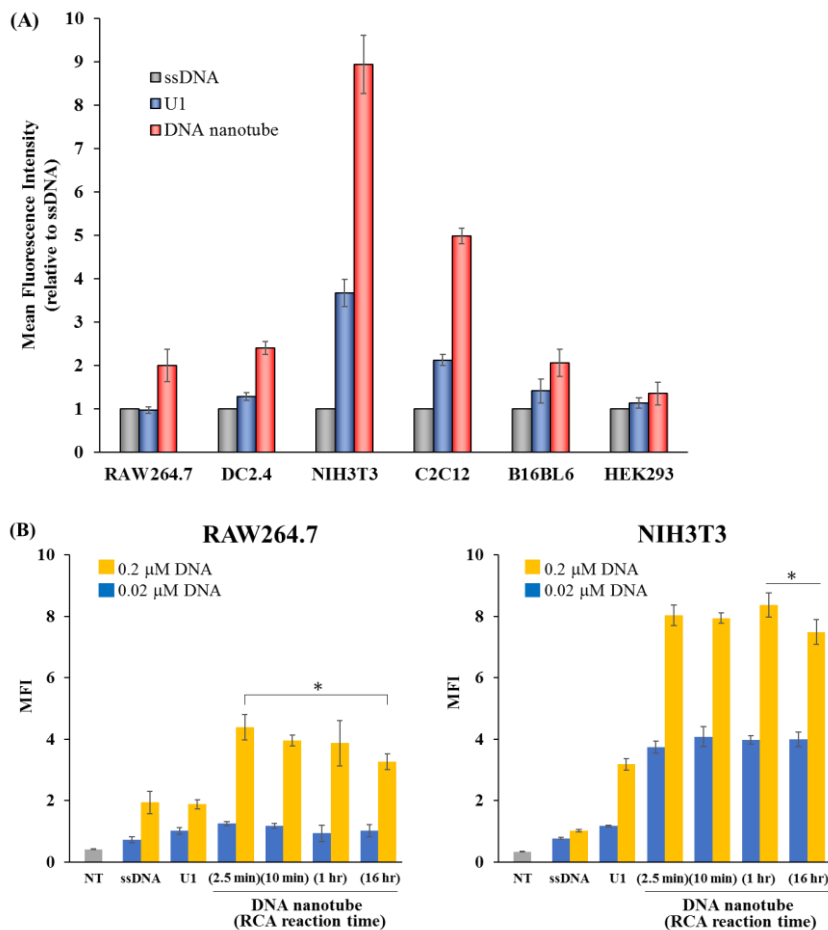
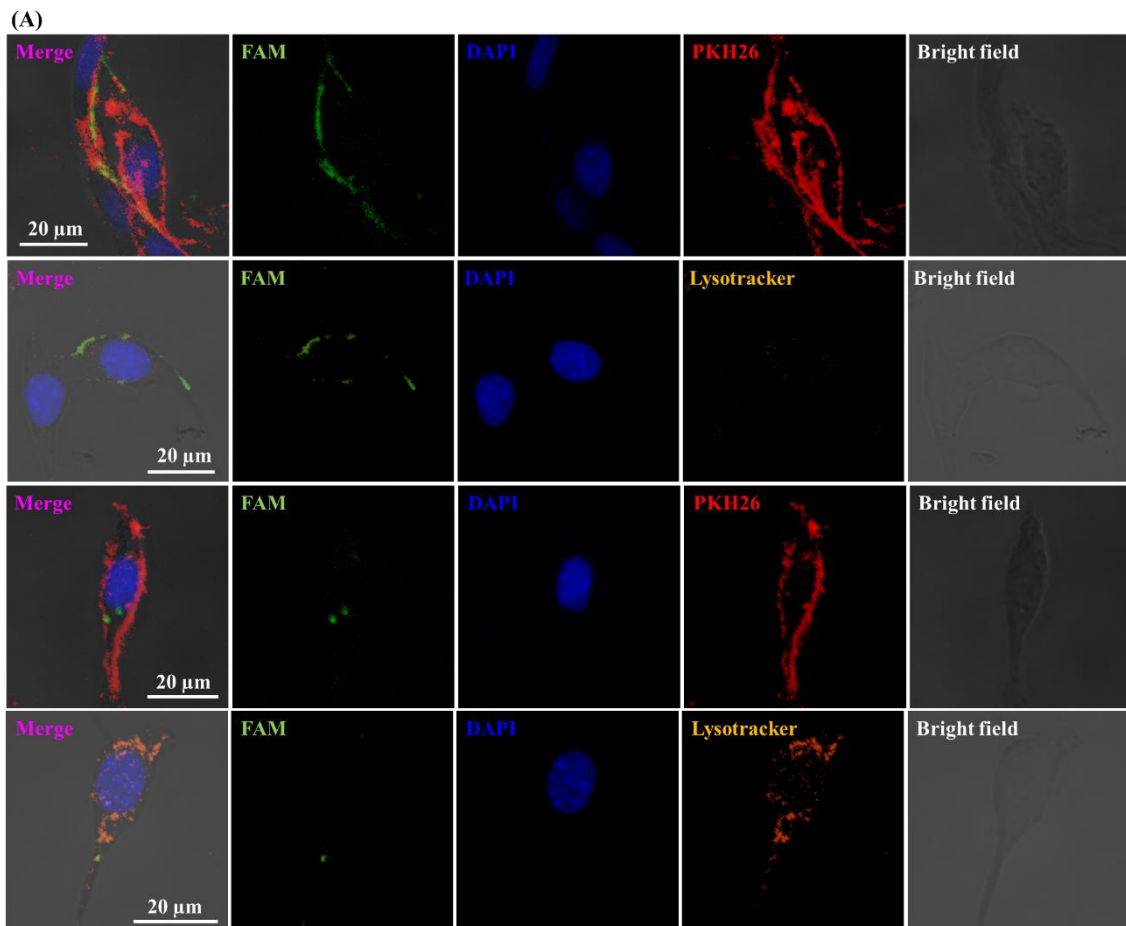


Figure 2. Comparison of cellular uptake of DNA nanotube by different types of cells.

(A) Mean fluorescence intensity (MFI) of indicated cells incubated with Opti-MEM containing 0.2 μM of FAM-labeled ssDNA, U1, DNA nanotube (1 h) for 4 h was investigated by flow-cytometry. Data were shown as mean \pm S.D relative to ssDNA. $n=3-4$. (B) MFI of RAW264.7 cells or NIH3T3 cells incubated with Opti-MEM containing 0.2 or 0.02 μM of ssDNA, U1, DNA nanotube (prepared with lss-DNA synthesized by RCA for 2.5 min, 10 min, 1 h or 16 h) for 4 h were investigated by flow-cytometry. Data were shown as mean \pm S.D. $n=3-4$. *; p value < 0.05. All concentrations of DNA nanotube were noted as molar per lap of lss-DNA.

2.3 DNA nanotube の線維芽細胞による取り込み特性の評価

DNA nanotube の線維芽細胞での局在を共焦点顕微鏡により観察した (Figure 3A)。細胞膜を PKH26、ライソソームを LysoTracker red により染色し、FAM 標識 DNA nanotube との共局在を観察したところ、細胞表面及び細胞内において DNA nanotube 由来の蛍光が観察された。細胞表面に局在する DNA nanotube 由来の蛍光は広く分布していたのに対し、細胞内に局在する DNA nanotube 由来の蛍光は点状に観察された。DNA nanotube の細胞内への取り込みをトリパンブルー (TB) 消光アッセイによって確認した (Figure 3B)。TB は濃度依存的に細胞表面由来の緑蛍光をマスキングするため、細胞表面の吸着と細胞内の内在化を分けるために用いられる²⁶⁻²⁹。異なる濃度の TB の処理後でも、45%程度の蛍光が残存していたことから、DNA nanotube の細胞の内在化が示唆された。次に DNA nanotube の取り込みの経時変化を評価した (Figure 3C)。その結果、FAM 標識 DNA nanotube を取り込んだ細胞の MFI は時間依存的に上昇したが、その時間に対する MFI の上がり幅の傾きは 4 時間以降で緩やかになった。



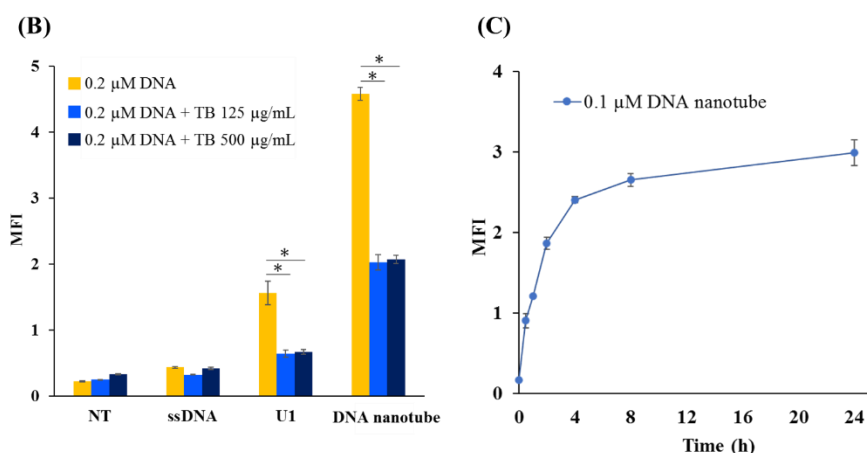


Figure 3. Internalization and uptake properties of DNA nanotube into NIH3T3 cells.

(A) Confocal microscopic images of NIH3T3 cells incubated with Opti-MEM containing 0.2 μM of FAM-labeled DNA nanotube for 4 h. Cellular membranes and lysosomes were stained with PKH26 (up pictures) or lysotracker (bottom pictures) respectively. (B) Trypan blue (TB) quenching assay. Fluorescence derived from cellular surface was vanished by different concentrations of trypan blue. MFI of NIH3T3 cells incubated with Opti-MEM containing FAM-labeled ssDNA, U1, DNA nanotube for 4 h was investigated by flow-cytometry. Trypan blue was mixed into cell solution just before measurement. * $p < 0.05$. (C) Cellular uptake of DNA nanotube with different time by NIH3T3 cells. Cells incubated with Opti-MEM containing 0.1 μM of FAM-labeled DNA nanotube for 0-24 h was investigated by flow-cytometry. All concentrations of DNA nanotube were noted as molar per lap of ss-DNA.

2.4 DNA nanotube の線維芽細胞による取り込み動態の直接的観察

核酸構造体を金ナノ粒子 (AuNP) で標識し、細胞に添加し TEM 観察を行うことで核酸構造体の細胞取り込み動態を可視化できることが報告されている³⁰。この手法を用いて DNA nanotube の取り込み動態を観察するために、AuNP 標識 DNA nanotube を作製した。チオール (SH) 修飾 R1 を用いて作製した SH 修飾 DNA nanotube と AuNP を反応させることで AuNP 修飾 DNA nanotube を調製した。AuNP 標識 DNA nanotube が形成されていることを TEM 観察により行った (Figure 4A)。AuNP 標識 DNA nanotube を NIH3T3 細胞に添加し、1 時間及び 4 時間インキュベートした細胞の超薄切片を作製し TEM 観察を行った。その結果、DNA nanotube の線維芽細胞による取り込みには以下の 4 つのフェーズがあることが示唆された (Figure 4B)。すなわち、細胞に添加された DNA nanotube は I. 吸着によって細胞表面に分布し細胞表面においてコンパクトに折りたたまれ断片化を受ける。その後、II. ファゴサイトーシスと思われる細胞の突起を介した膜流動によって細胞内に取り込まれ、III. エンドソームを形成し細胞内輸送を受ける。最終的に、IV. 特徴的な渦巻き様構造体を有するオートファゴソームに移行する。TEM 観察により得られた知見の整合性を確かめるために、DNA nanotube の取り込みに及ぼす細胞取り込み阻害剤の影響を調べた (Figure 4C)。その結果、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤であるクロルプロマジン処理群では、未処理群と比較して有意な取り込みの低下は見られなかったのに対し、アクチン重合阻害剤でファゴサイトーシスを阻害する目的で用いられるサイトカラシン B 処理群では未処理群と比較して有意な取り込みの低下が見られた。また、DNA nanotube を添加した細胞では、添加していない細胞と比較して渦巻き様構造体が多く観察された (Figure 4D)。オートファゴソ

ームマーカーである LC3-BII をウェスタンブロットによって検出したところ DNA nanotube 添加により、LC3-BII の増加が見られた。これら結果は、細胞が DNA nanotube を取り込んだ際にそれを分解しようとする細胞応答が誘導されていることを示唆する。

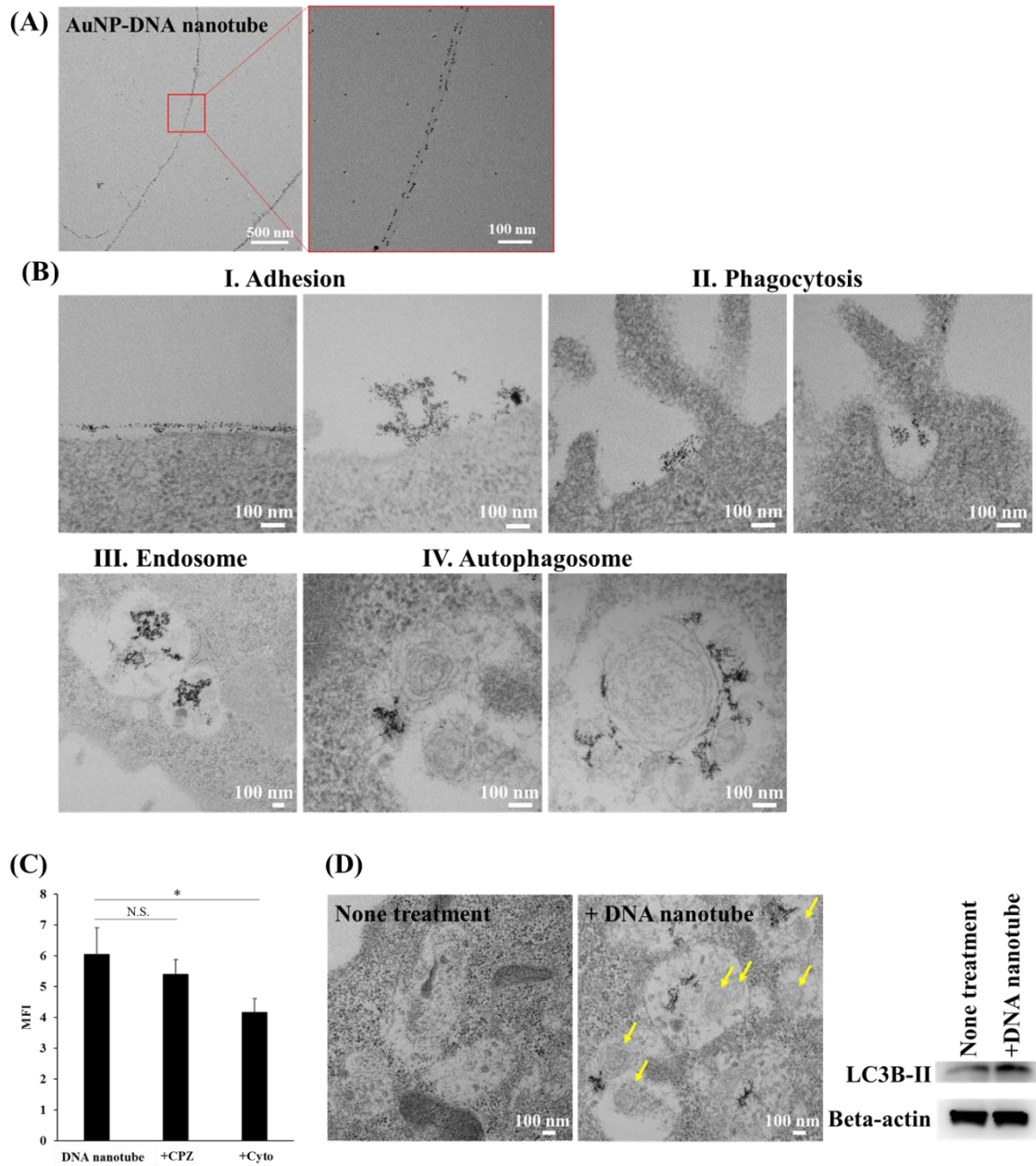


Figure 4. Direct observation of AuNP-labeled DNA nanotube taken up by NIH3T3 cells. (A) TEM images of AuNP-labeled DNA nanotube. Red square was expanded as right image. (B) TEM images of thin-sliced NIH3T3 cells incubated with Opti-MEM containing 0.05 μM of AuNP-labeled DNA nanotube for 1-4 h. (C) Uptake inhibitor assay. NIH3T3 cells co-incubated with 0.2 μM of FAM-labeled DNA nanotube and 10 μM of chlorpromazine (CPZ) or 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cytochalasin B (Cyto) for 4 h were investigated by flow-cytometry. Data were shown as mean \pm S.D. n=3-4. * ; p value < 0.05. (D) Accentuation of autophagy in NIH3T3 cells by DNA nanotube. (Left)TEM images of thin-sliced NIH3T3 cells incubated with or without DNA nanotube. Yellow arrows : autophagosome-like structures. (Right)Western-blot analysis of LC3B-II (autophagosome marker) or beta-actin (control).

2.5 考察

本章では、lss-DNA を用いて作製される棒状の核酸構造体である DNA nanotube の種々の細胞種による取り込みの選択性について評価した。その結果、DNA nanotube は線維芽細胞株及び筋芽細胞株である NIH3T3 細胞及び C2C12 細胞に取り込まれやすいという特性を示した (Figure 2A)。また、免疫細胞である RAW264.7 細胞や DC2.4 細胞での取り込みは上記の細胞より低く、これは DNA nanotube はこれまでに病態情報薬学分野で報告してきたマクロファージや樹状細胞に取り込まれやすい多足型 DNA ナノ構造体 (polypodna) とは異なる細胞取り込み選択性を有していることを示す結果である。

DNA nanotube が線維芽細胞及び筋芽細胞に選択的に取り込まれるメカニズムとして細胞表面に発現する collagen の関与が考えられる。これについては、3 章で詳細に論述する。また、マクロファージや樹状細胞の取り込みが低かった原因の一つとして、これらの細胞が核酸構造体を取り込む際に認識する受容体である macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) の認識機構が挙げられる。Polypodna を含む核酸構造体は MSR1 を介して細胞に取り込まれることが報告されている³¹。Polypodona の足の数が多くなるほど細胞に取り込まれやすく、免疫細胞の取り込みには DNA の負電荷密度が関与する報告がある³²。構造体の表面が長鎖の DNA である DNA nanotube は polypodona と比較して構造が複雑ではなく、DNA の負電荷密度は高くないと考えられる。これによって MSR1 による認識が低く、マクロファージや樹状細胞の取り込みが低かった可能性がある。

DNA nanotube は細胞表面と細胞内の両方に局在した (Figure 3A)。共焦点顕微鏡により観察した画像では表面由来の蛍光は表面に広く分布したが、細胞内においては点状に蛍光が観察された。これは、DNA nanotube が取り込まれた後、エンドソームに分布する Figure 4B の所見と一致する。細胞表面の蛍光を TB により消光した場合でも、DNA nanotube の蛍光は 45%程度残存した。また、取り込み阻害剤を用いた実験では、サイトカラシン B により DNA nanotube の取り込みが 66%程度まで減少したが (Figure 4C)、残りは細胞表面に吸着した DNA nanotube に由来すると考えられる。

本研究では DNA nanotube の長さを変える実験も行ったが、細胞取り込みの選択性に大きな差はなかった (Figure 2B)。この原因として、短時間の RCA 反応で作製した DNA nanotube でも細胞に取り込まれるために十分な長さを有しており、その取り込みには DNA nanotube を断片化する必要があることによる考えられる。実際、RCA2.5 分で調製した lss-DNA の長さでも 6000 base と想定され (Figure 1C)、これにより作製した DNA nanotube の長さは 2 μ m 程度であった (Figure 1E)。これよりも短い DNA nanotube を作製した場合に、取り込みが変化する可能性がある。また、より長い DNA nanotube では取り込みに変化が見られなかったが、その理由として、DNA nanotube が細胞表面において折りたたまれ断片化されることが考えられる (Figure 4B)。この画像において、II. Phagocytosis で観察される金ナノ粒子の数が I. Adhesion で観察される金ナノ粒子の数よりも少なかったことから、この間に DNA

nanotube が断片化されたと考えられる。DNA nanotube がこのような取り込み動態を示した原因として、DNA nanotube の構造が比較的柔軟であることが考えられる。より多数の ss-DNA から作製される構造が強固な DNA オリガミでは、構造が保たれたまま取り込まれる様子が観察されている³⁰。今回作製した DNA nanotube は1本の支えとなる lss-DNA 上に U1 が連結した構造であるため、DNA オリガミと比較して構造が柔軟であると推察される。このような構造的特徴によって、マイクロメートルオーダーの長さをもつ構造であっても、細胞が取り込みやすい大きさまで折りたたみ断片化できた可能性がある。

以上、本章では、DNA nanotube がマクロファージや樹状細胞といった本来、DNA 構造体を取り込みやすい免疫細胞よりもむしろ線維芽細胞及び筋芽細胞に対して高い親和性を有するという新たな知見を見出すと共に、それらの細胞がマイクロメートルオーダーの構造を取り込む動態の直接的な可視化に成功した。

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

二章において、DNA nanotube が線維芽細胞や筋芽細胞に選択的に取り込まれるという知見を得た。本章では、線維芽細胞に焦点を当て DNA nanotube が高い取り込みを示したメカニズムについて検討を行った。

線維芽細胞は細胞外マトリックスの主成分である collagen を分泌する特異な役割をもつことが知られている³³。分泌された collagen は細胞接着や結合組織の形成に関与する³⁴。また、動物から単離した collagen を DNA と混合した場合、複合体を形成することが報告されており^{35,36}、collagen とプラスミド DNA を組み合わせた DDS の開発も行われている³⁷。

以上のことから、DNA nanotube の線維芽細胞に選択的に取り込まれる原因として、細胞から分泌される collagen が関与するという仮説を立てた。三章では、この仮説を立証するためにまず DNA nanotube の取り込みを評価した細胞における collagen の発現量を評価した。また、DNA nanotube 形成が collagen との親和性に与える影響を評価した。さらに、蛍光標識した collagen と DNA nanotube の細胞局在を観察すると共に collagenase により細胞表面の collagen を分解することによる DNA nanotube の取り込みの変化を評価した。

3.1 異なる細胞種における 1 型 collagen の発現量の評価

DNA nanotube の取り込みを評価した細胞株 (RAW264.7、DC2.4、NIH3T3、C2C12、B16BL6 及び HEK293) における 1 型 collagen 及び β アクチンの発現量をウェスタンブロットにより評価した (Figure 1)。DNA nanotube の取り込みが最も高かった NIH3T3 細胞とその次に高かった C2C12 細胞で、高い 1 型 Collagen 発現量が見られた。一方、コントロールとして検出した、 β アクチンの発現量は 6 種の全ての細胞間で顕著な違いは認められなかった。

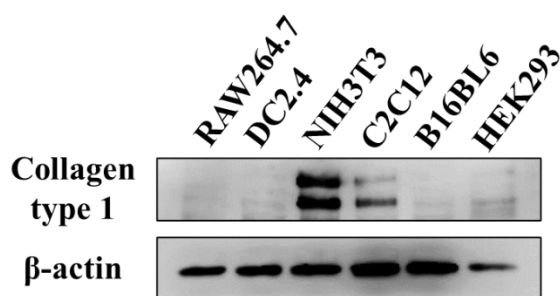


Figure 1. Expressions of collagen type 1 and β -actin. The expressions of collagen type 1 and β -actin were confirmed by using whole cell lysates. Collagen type 1 was detected as double bands (upper: COL1A1, lower: COL1A2).

3.2 DNA nanotube の形成による collagen への親和性に与える影響の評価

1 型 collagen と、ネガティブコントロールとしてウシ血清アルブミン (BSA) を 96 ウェルプレートに固定し、FAM 標識 ssDNA、U1、DNA nanotube を添加した後、フリーの DNA を除き残存した蛍光を測定することで各タンパク質と結合した DNA 量を評価した (Figure 2)。1 型 collagen 群において、DNA nanotube を形成することにより蛍光強度の増大が見られた。一方で、BSA 群ではいずれの場合も有意な蛍光強度が見られなかったことから、1 型 collagen 群で見られた蛍光強度の増大はタンパク質の非特異的相互作用に起因したのではないことが示唆された。

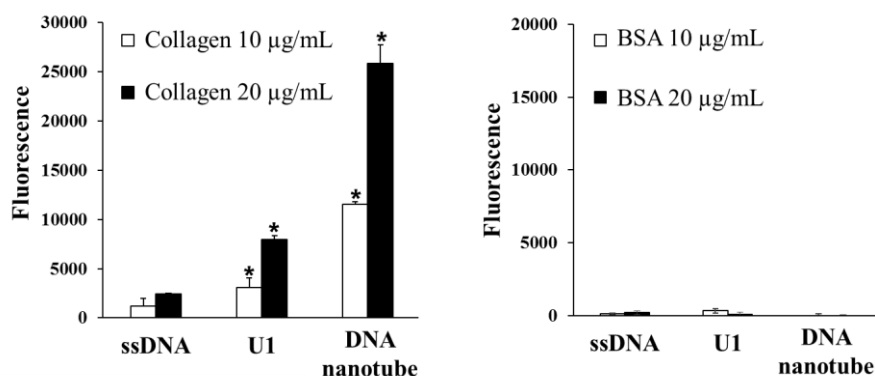


Figure 2. Affinity of FAM-labeled DNA samples to collagen type 1 and BSA.

FAM-labeled ssDNA (R1), U1, and DNA nanotube were added to the prepared protein-coated plates and incubated at 37°C for 4 h. Then, the fluorescence intensity was measured by microplate reader. Results are expressed as mean \pm S.D. of four wells.

3.3 DNA nanotube と collagen の細胞における局在

細胞に添加した DNA nanotube と collagen の存在状態を観察するために、FITC 標識 1 型 collagen を作製した。作製した標識体を SDS-PAGE により評価し、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色および FITC 由来蛍光の検出により、FITC 標識 1 型 collagen が作製できたことが確認された (Figure 3A)。Collagen は中性 pH において凝集体を形成することが知られている³⁸。細胞添加時に collagen が凝集することを避けるために FITC 標識 1 型 collagen を酸性の glycine-HCl buffer に溶解し、実験を行うこととした。種々の濃度における細胞生存率を MTT アッセイにより評価したところ、2.5 mM 以下の濃度では 60 分までは細胞生存率に影響は認められなかった (Figure 3B)。また、collagen の凝集の有無を TEM 観察により評価したところ、中性条件では巨大な凝集体が観察されたのに対し、酸性条件では凝集体は観察されなかった (Figure 3C)。以上の結果に基づき、2.5 mM の glycine-HCl buffer に溶解した FITC 標識 1 型 collagen を短時間 NIH3T3 細胞に添加し、細胞表面に Collagen を吸着させた。フリーの collagen を除いた後、Cy5 標識 DNA nanotube を添加し共焦点顕微鏡により観察した (Figure 3D)。その結果、DNA nanotube 由来の蛍光と 1 型 collagen 由来の蛍光の共局在が細胞内において観察された。この結果は、DNA nanotube が 1 型 collagen と複合体を形成して取り込まれることを示唆する。

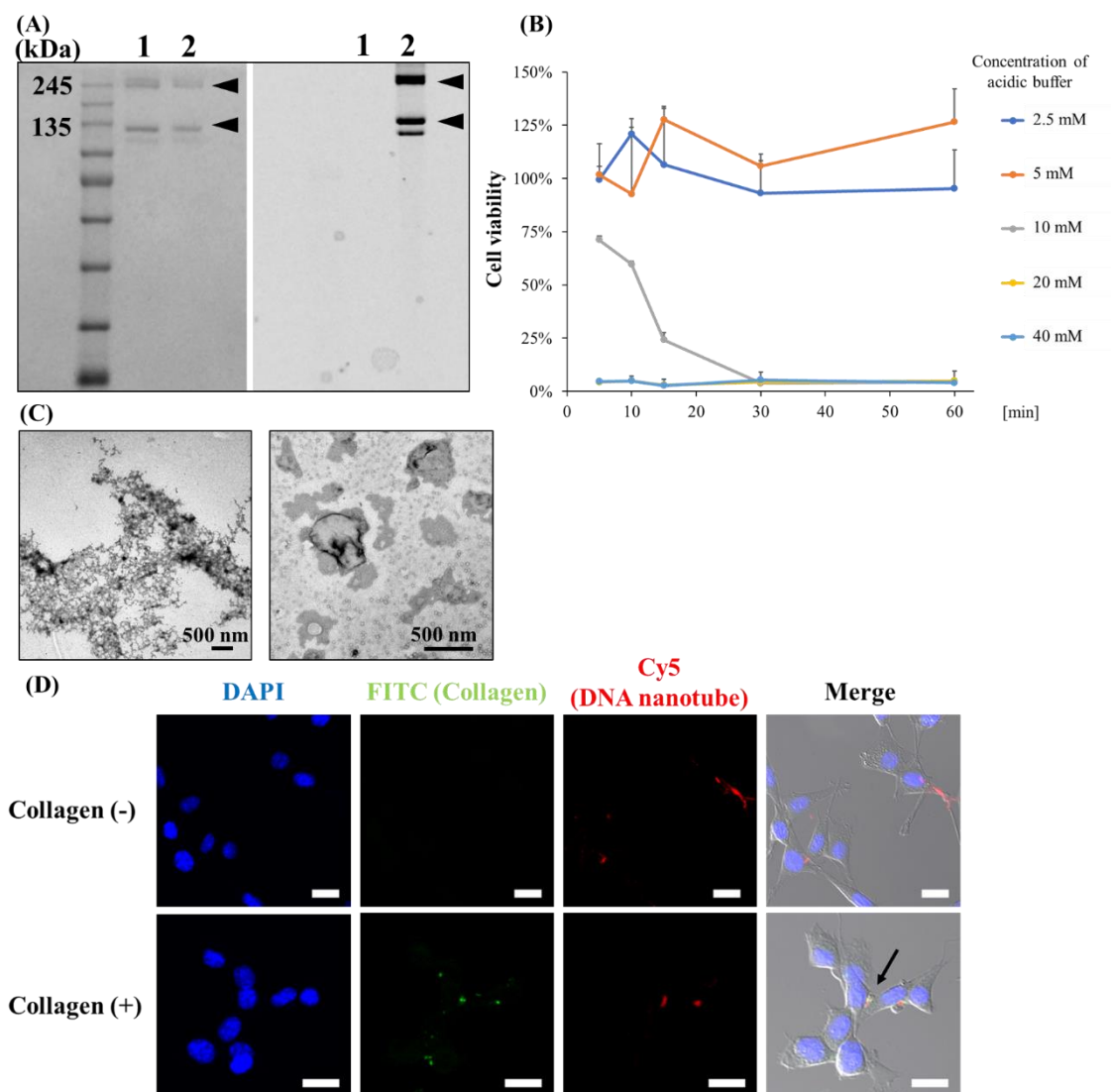


Figure 3. Colocalization of DNA nanotube and collagen in the NIH3T3 cells.
 (A) Confirmation of produced FITC-labeled collagen by SDS-PAGE. Lane 1 : nonlabelled type I collagen. Lane 2 : FITC-labeled type I collagen. Left image : CBB staining. Right image : FITC detection. (B) Cell viability of NIH3T3 cells incubated with different concentrations of glycine-HCl buffer. (C) Inhibition of aggregation formation of collagen in glycine-HCl buffer. Left image : collagen in neutral pH. Right image : collagen in 2.5 mM glycine-HCl buffer. (D) Observation of colocalization of DNA nanotube and collagen by confocal microscopy. NIH3T3 cells were treated by FITC-labeled collagen for 0.5 h, washed by Opti-MEM twice, then incubated with Cy5-labeled DNA nanotube at a concentration of 0.2 μM diluted with Opti-MEM for 4 h. The scale bar indicates 20 μm.

3.4 DNA nanotube の取り込みに及ぼす collagenase 処理の影響

Collagenase 処理により細胞表面の collagen を分解することによる DNA nanotube の取り込みの影響を評価した。Collagenase により、NIH3T3 細胞から分泌される 1 型 collagen が分解されることをウェスタンブロットにより確認した (Figure 4A)。また collagenase 処理群の 1 型 collagen のバンドは処理していない群と比較してほとんど検出されなかったことから、ほとんどの collagen が分解されたと考えられる。Collagenase 処理及び処理していない NIH3T3

細胞に FAM 標識 DNA nanotube あるいは対照サンプルとして collagen を介さずに取り込まれることが知られている FITC-dextran を添加し、FACS 法により平均蛍光強度 (MFI) を測定した (Figure 4B)。DNA nanotube 群では collagenase 処理により処理していない群と比較して MFI が有意に減少した。一方で、dextran 群では collagenase 処理により MFI が有意に増加した。この結果は、DNA nanotube の NIH3T3 細胞による取り込みの減少が、collagenase 処理による collagen を分解することで細胞自体の機能が低下することによるものではないことを示唆する。

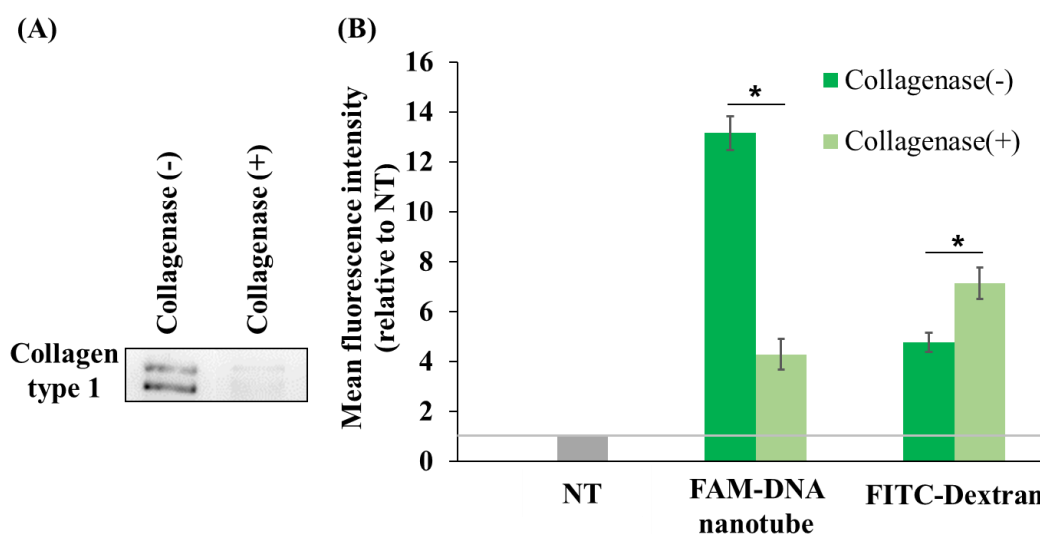


Figure 4. (A) Confirmation of collagen degradation and (B) cellular uptake of DNA nanotube by collagenase treated NIH3T3 cells. NIH3T3 cells were incubated with FAM-labeled DNA nanotube or FITC-dextran at a concentration of 0.2 μ M, 300 μ g/mL, respectively, diluted with Opti-MEM. The fluorescence intensity of the cells was determined by flow cytometry. NT is non-treated group. Results are expressed as mean \pm S.D. of four wells. * $p < 0.05$ vs collagenase (-) group.

3.5 考察

本章では、DNA nanotube の線維芽細胞による選択的取り込みにおける collagen の関与について検討を行った。

まず、DNA nanotube の取り込みを評価した細胞種における 1 型 collagen の発現量を評価したところ、NIH3T3 細胞及び C2C12 細胞において、高い 1 型 collagen 発現量が示された (Figure 1)。この結果は、1 型 collagen が線維芽細胞や線維芽細胞様の形態をもつ細胞に高発現するという報告と一致する^{39,40}。

DNA nanotube を形成することによりプレートに結合させた 1 型 collagen 群に蛍光標識 DNA を添加後の蛍光強度の増大が見られた (Figure 2)。これは、DNA nanotube を形成させることで、1 型 collagen への親和性が上昇したことによると考えられる。DNA nanotube を形成させることで 1 型 collagen への親和性が上昇した原因として、DNA nanotube の棒状の構造が寄与する可能性がある。DNA と collagen の複合体形成として両者が平行に配向し相互作用するモデルが提唱されている⁴¹。DNA nanotube は 3 角柱型の DNA が棒状に結合した構造体であり、collagen と相互作用しやすいコンフォメーションを有するものと推察される。

共焦点顕微鏡観察により、DNA nanotube と collagen の共局在が細胞内において観察された (Figure 3D)。外部から加えた collagen が NIH3T3 細胞に取り込まれることが報告されており⁴²、DNA nanotube が collagen に親和性をもつため collagen に吸着し、その複合体のまま取り込まれたことが示唆される。また、DNA nanotube が collagen と共局在せずに細胞内に局在する様子も観察された。これについては、DNA nanotube が内在性の collagen に吸着し取り込まれた可能性が考えられる。または、DNA nanotube が細胞内において collagen と分離した可能性もある。

DNA nanotube の取り込みは collagenase 処理により collagen を分解することにより減少した (Figure 4B)。これは、collagenase 処理による細胞表面の collagen の分解が DNA nanotube の collagen 依存的取り込みを抑制した効果が大いと考えられる。Dextran はマクロピノサイトーシスによって取り込まれることが分かっている。また、collagen の分解によって生成される collagen フラグメントはマクロピノサイトーシスによって取り込まれることが報告されており⁴²、collagenase 処理によって生成された collagen フラグメントがマクロピノサイトーシスを促進し、その結果 dextran の取り込みが上昇した可能性がある。

Collagen は全部で 28 種類存在することが報告されているが⁴³、今回は普遍的に豊富に存在する (全 collagen の 70%以上) 1 型 collagen に着目した。DNA nanotube の *in vitro* 及び *in vivo* の挙動をより詳細に解析するためには、他の種類の collagen の関与についても検討する必要があるが、最も豊富に存在する 1 型 collagen の寄与が大いと推察される。

以上、本章では DNA nanotube が線維芽細胞に取り込まれやすい原因として、1 型 collagen が関与することを明らかにした。これらの結果は、DNA nanotube の取り込み特性に有益な知見を提供すると考える。

結論

著者は三章にわたり、RCA 法により調製される 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を行い、以下の結論を得た。

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

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 超分子は DNA 分解酵素に対する安定性に優れることを見出した。DNA 超分子は免疫細胞を効率よく活性化することを見出した。また、DNA 超分子は免疫活性化能を示す濃度において細胞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能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。

第二章 DNA nanotube の細胞取り込み選択性に関する研究

lss-DNA と三角柱型ユニットから作製される棒状の構造体である DNA nanotube の細胞取り込み選択性を評価したところ、DNA nanotube を形成させることによって線維芽細胞や筋芽細胞に対して取り込まれやすくなることを見出した。また、金ナノ粒子 (AuNP) 標識 DNA nanotube を作製し、繊維芽細胞である NIH3T3 細胞の細胞超薄切片の TEM 観察を行うことで DNA nanotube の取り込み動態の可視化に成功した。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折りたたまれ断片化され、食作用によって取り込まれることが示唆された。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 を添加することにより autophagosome が多く観察された。以上、DNA nanotube は線維芽細胞及び筋芽細胞に対して取り込まれやすいという、これまでに報告されていない取り込み特性を提示し、その取り込み動態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。第二章で取り込みを評価した細胞株における 1 型 collagen の発現量を確認したところ、DNA nanotube の取り込みと 1

型 collagen の発現量は正に相関した。また、DNA nanotube は collagen に高い親和性を有していた。次に、蛍光標識した collagen と DNA nanotube を添加し観察したところ、細胞内において両者の共局在が観察された。さらに 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 の細胞取込みが有意に低下することが示された。以上より DNA nanotube の線維芽細胞への取り込みには collagen が関与することが明らかとなった。

以上、著者は 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 を介して細胞に取り込まれるために、繊維芽細胞への選択的な取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、RCA 法により調製される lss-DNA を利用した核酸構造体を用いたドラッグデリバリーシステムの応用において有益な情報を提示するものと考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 高倉喜信教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、終始御懇篤なる御助言と御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科 高橋有己准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに、種々の貴重な御助言を賜りました京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野教室一同、特に実験の一部に御協力戴いた前田幸輝氏、刈屋睦氏、安井健人氏に深謝します。

最後に、研究に専念できる環境を与えて下さった父 浩行、母 陽子に深く感謝致します。

実験の部

第一章 実験の部

【1】 試薬

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地は日水製薬株式会社より購入した。Opti-modified Eagle's medium (Opti-MEM)、FBS、SYBR Gold nucleic acid gel stain は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。20 base pair (bp)及び 100 bp DNA ladder はタカラバイオ株式会社より購入した。1 kbp DNA ladder はパーキンエルマー株式会社より購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

【2】 細胞株

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。RAW264.7 細胞は 10%非働化 FBS、0.2% 炭酸水素ナトリウム、100 IU/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを添加した RPMI1640 培地で、37°C、5% CO₂、加湿条件下で培養した。細胞は使用 24 時間前に 5×10^4 cells/well で 96well プレートに播種し 37°C、5% CO₂、加湿条件下で培養した。

【3】 オリゴヌクレオチド

CpG1668 はファスマック株式会社より購入した。他のオリゴヌクレオチドは Integrated DNA Technologies 株式会社より購入した。本章で用いた DNA 配列は第一章 Table 1 に記載する。

【4】 RCA に用いる鋳型 DNA の作製

Chol2_template ODN と chol2_primer ODN をアニーリングバッファー(10 mM Tris-HCl [pH 8]、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA]及び 200 mM NaCl)にそれぞれ 100 µM となるように溶解した。溶液をサーマルサイクラーで、95°Cで 5 分加熱し、その後、75 分かけて 20°Cまで徐々に溶液を冷やすことで、両 ODN をアニーリングさせた。溶液に 10 U/µL T4 DNA ligase (タカラバイオ社製)、66 mM Tris-HCl (pH 7.6)、6.6 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol (DTT)及び 0.1 mM ATP となるように加え 16°C、4 時間反応させることにより Chol2_template ODN の 5'リン酸基と 3'水酸基をライゲーションさせ環状化させた。溶液に 25 U/mL exonuclease I (タカラバイオ社製)及び 1000 U/mL exonuclease III (タカラバイオ社製)となるように加え 37°C、2 時間反応させることにより、環状化していない DNA を分解させた。環状

化した DNA をフェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿により精製し、RCA の鑄型として用いた。

【5】 lss-DNA の調整

環状化 chol2_template と chol2_primer ODN をアニーリングバッファー中にそれぞれ 10 μ M となるように溶解し、95 $^{\circ}$ C、5 分加熱した後、75 分かけて 20 $^{\circ}$ C まで冷やすことで両 DNA をアニーリングさせた。溶液に、終濃度として 1 μ M 環状化 chol2_template 及び chol2_primer ODN、0.4 U/ μ L Phi29 DNA polymerase (Lucigen 社製)、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、10 mM (NH₄)₂SO₄、4 mM DTT、200 μ g/mL BSA、2 mM of each dNTP (Invitrogen 社製) 及び 0.002 U/ μ L pyrophosphatase, inorganic (yeast) (New England BioLabs 社製) となるように加え、30 $^{\circ}$ C、16 時間 RCA 反応を行った。溶液を 80 $^{\circ}$ C、10 分加熱することにより酵素を失活させた。溶液の粘性を下げるために溶液を水で 5 倍に希釈し、15 mM EDTA 及び 20 mM NaOH となるように加え、95 $^{\circ}$ C、25 分加熱した。NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL 社製) により lss-DNA を精製した。

【6】 DNA 超分子の作製

精製した lss-DNA の濃度を NanoDrop2000 により測定し、1 ラップ当たりの濃度に換算した。例えば、100 ng/ μ L の lss-DNA は 4.06 μ M として換算した (=100/24617 \times 1000、24617 は 1 ラップの分子量)。lss-DNA と chol-DNA をアニーリングバッファー中に lss-DNA が 0.5 μ M となるように希釈し、95 $^{\circ}$ C、5 分加熱した後、75 分かけて 20 $^{\circ}$ C まで冷やすことで DNA 超分子を作製した。

【7】 ゲル電気泳動

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 6%ポリアクリルアミドゲルで 200 V、20 分電気泳動した。アガロースゲル電気泳動は 0.6%アガロースゲルで 100 V、30 分電気泳動した。アルカリアガロースゲル電気泳動は 0.5%アガロースゲルに 50 mM NaOH 及び 1 mM EDTA となるように加えたゲルで 30 V、4 時間電気泳動した。DNA を SYBR Gold または ethidium bromide で 30 分染色し、LAS3000 (富士フィルム社製) により撮影した。

【8】 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

DNA を親水化処理した carbon/formvar film-coated TEM grid (Alliance Biosystems 社製) に添加し、室温で 10 分静置した。サンプルを 1% uranyl acetate で 1 分染色し、TEM (日立社製) により観察した。

【9】 物性評価

サイズ分布は、0.5 μ M の DNA を、Zetasizer (Malvern Instruments 社製) を用いて動的光散

乱法により測定した。溶液内の疎水性環境を評価するために、3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate (DiO) (Cayman Chemical 社製)を dimethyl sulfoxide (DMSO)中に溶解した溶液と 0.5 μM の DNA を 10 mM DiO 及び 1% DMSO となるように混合し、蛍光強度を蛍光スペクトロメトリー(Horiba scientific 社製)により測定した。

【10】 RAW264.7 細胞による取り込みの評価

RCA 反応の際に Cy5 標識 dCTP(Integrated DNA Technologies 社製)を 0.02 mM となるように加えることで Cy5 標識 lss-DNA を作製した。Cy5 標識 lss-DNA を用いて Cy5 標識 DNA 超分子を作製した。96well プレートに RAW264.7 細胞を播種し、Cy5 標識 DNA を Opti-MEM で希釈した溶液と 37°C、4 時間インキュベートした。その後、PBS により細胞を 2 回洗浄し、蛍光をフローサイトメトリー(Gallios 社製)により測定した。共焦点顕微鏡観察において、RAW264.7 細胞を 8well chamber slide (Watson 社製)に播種し、Cy5 標識 DNA を Opti-MEM に 0.1 μM となるよう希釈した溶液 300 μL と 37°C、4 時間インキュベートした。ライソソーム染色においては、Opti-MEM で 3 回洗浄後、0.5 μM LysoTracker™ Green DND-26 (Invitrogen 社製)により 30 分染色した。その後、細胞を PBS により 2 回洗浄し、4% paraformaldehyde により固定化し、再び PBS により 2 回洗浄した。細胞の核を 1.2 mM DAPI で染色し、共焦点顕微鏡(Nikon 社製)により観察した。

【11】 RAW264.7 細胞から放出される TNF- α の測定

RAW264.7 細胞を 96well プレートに播種し、DNA を Opti-MEM に溶解した溶液 100 μL と 37°C、8 時間インキュベートした。ポリプレックスの作製においては、lss-DNA または CpG1668 を polyethylenimine (PEI) max (Polysciences 社製)と混合することにより作製した。まず、0.5 μg の lss-DNA または CpG1668 と 4 μL の PEI 溶液 (0.323 mg/mL) をそれぞれ 150 mM NaCl 溶液 100 μL に希釈し、DNA 溶液と PEI 溶液を混合し、室温で 15 分静置させた。リポソームの作製においては、lss-DNA と CpG1668 を lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen 社製)と混合することにより作製した。まず、0.5 μg の lss-DNA または CpG1668 と 1 μL の lipofectamine をそれぞれ 25 μL の Opti-MEM に希釈し、DNA 溶液と lipofectamine 溶液を混合し、室温で 15 分静置させた。細胞培養液を Opti-MEM に置換し、DNA 超分子を添加した場合と等量の DNA 量のポリプレックスまたはリポソームを RAW264.7 細胞に添加し、37°C、8 時間インキュベートした。その後、上清を回収し、-80°Cで保存した。上清中の TNF- α 量を OptEIA™ mouse TNF (Mono/Mono) ELISA set (Biosciences 社製)を用いて ELISA 法により測定した。

【12】 統計分析

統計分析は Student's t-test を用いて 2 つの群を比較した。P 値が 0.05 より小さい場合を統計学的に有意と見なした。

第二章 実験の部

【1】試薬

Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)培地は日水製薬株式会社より購入した。その他の試薬は第一章と同様のもの、もしくは市販の特級品を用いた。

【2】細胞株

RAW264.7 細胞は第一章に記載する方法で培養した。マウス樹状細胞株 (DC2.4 細胞) はマサチューセッツ医科大学病理学部 Kenneth Rock 博士より供与して頂いた。マウス胎児線維芽細胞株 (NIH3T3 細胞)、マウス筋芽細胞株 (C2C12 細胞)、マウスメラノーマ細胞株 (B16BL6 細胞)、ヒト胎児腎細胞株 (HEK293 細胞) は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。DC2.4 細胞は 10%非働化 FBS、0.2% 炭酸水素ナトリウム、100 IU/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、0.5 mM モノチオールグリセロール、0.5 mM 非必須アミノ酸を添加した RPMI1640 培地で培養した。NIH3T3 細胞、C2C12 細胞及び HEK293 細胞は 10%非働化 FBS、0.2% 炭酸水素ナトリウム、100 IU/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを添加した DMEM 培地で培養した。B16BL6 細胞は 10%非働化 FBS、0.2% 炭酸水素ナトリウム、100 IU/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、0.5 g/L D-グルコースを添加した DMEM 培地で培養した。全ての細胞を 37°C、5% CO₂、加湿条件下で培養した。

【3】オリゴヌクレオチド

3'末端にチオール修飾した SH-R1 は Integrated DNA Technologies 株式会社より購入した。その他のオリゴヌクレオチドはファスマック株式会社より購入した。DNA 配列を Table 2 に示す。

Table 2. Sequences of oligodeoxynucleotides
3ThioMC3-D : 3' Thiol Modifier C3 S-S (Disulfide)

ODN names	Sequences
RCA_template	5'-phosphate- TCCTAAAGCATGACCTTCCGTAGTTTCAAGCGCAGCCAGATT-3'
padlock	5'- TGCTTTAGGAAATCTGGCTG -3'
Hairpin primer	5'- GGACCTCAGTAGCTGACTGAGGTCCAATCTGGCTGCGCTTGAA-3'
V1	5'- TCCTAAAGCATGACCTTCCGAACATTCGAGGCACGTTGTACGTCCA CACTTGGAACCTCATCGCACATCCGCCTGCCACGCTCTTGTTCAA

	GCGCAGCCAGATT-3'
C1	5'- TGTTATCTCCGACGGTACTTCGTACAACGTGCCTCGAATGTAGAGCG TGGCAGGCGGATGTGAAGCAGTTGCACCGGCATTGTC -3'
C2	5'- GTCACTACTAATACACCTGTCGATGAGGTTCCAAGTGTGGATAGCTA GGTAAGACCGCATCTC-3'
R1	5'-AATGCCGGTGCAACTGCTACCAGGTGTATTAGTAGTGACGAC-3'
FAM-R1	5'-AATGCCGGTGCAACTGCTACCAGGTGTATTAGTAGTGACGAC-6- FAM-3'
SH-R1	5'-AATGCCGGTGCAACTGCTACCAGGTGTATTAGTAGTGACGAC- 3ThioMC-D-3'
R2	5'-ATGCGGTCTTACCTAGCTCCAGTACCGTCGGAGATAACAGAG-3'
Cy5-R2	5'-5-Cy5- ATGCGGTCTTACCTAGCTCCAGTACCGTCGGAGATAACAGAG-3'

【4】 RCA に用いる鋳型 DNA の作製

RCA_template ODN と padlock ODN を用いて鋳型 DNA を作製した。作製手順は第一章と同様の方法で作製した。

【5】 Iss-DNA の調整

環状化させた RCA_template ODN と Hairpin primer ODN を用いて RCA 反応により Iss-DNA を調整した。RCA の反応時間を 0.75 分、2.5 分、10 分、30 分、1 時間、16 時間で反応を行った。その他の手順は第一章と同様の方法で調整した。

【6】 DNA nanotube の作製

5 つの ODN (V1、C1、C2、R1、R2) を TAMg バッファー (45 mM Tris、7.6 mM MgCl₂、pH8.0) 中にそれぞれの DNA 濃度が 3 μM となるように溶解し、95°C、5 分加熱した後、75 分かけて 20°C まで冷やすことで U1 を作製した。Iss-DNA と U1 をそれぞれ 1 μM となるように混合し、30°C、16 時間静置し DNA nanotube を形成させた。FAM 標識 DNA nanotube は、FAM-R1 を R1 の代わりに用いることにより作製した。

【7】 AuNP 標識 DNA nanotube の作製

AuNP 標識 DNA nanotube の作製については Pengfei Wang らの報告を参考にした⁴⁴。まず、AuNP (OD = 1、シグマアルドリッチ社製) 776 μL と 2.5 mM Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine (BSPP、シグマアルドリッチ社製) 224 μL を混合し 16 時間

室温で反応させた。NaCl を溶液の色が赤から紫に変わるまで加え、溶液を Millipore® 50kDa centrifugal filter unit (シグマアルドリッチ社製) を用いて 14000 × g、室温で遠心分離することにより限外ろ過した。ろ液を除去し、100 μL の 2.5 mM BSPP 及び 300 μL のメタノールを加え再度遠心分離した。ろ液を除去し、400 μL の 2.5 mM BSPP を加え再度遠心分離した濃縮液の AuNP 濃度を Nanodrop2000 により 520 nm の波長の吸光度から算出した。SH-R1 と tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP、シグマアルドリッチ社製) をそれぞれ 50 μM と 5 M となるように混合し、30 分以上室温で反応させることで SH-R1 を還元させた。SH-R1 を用いて SH-U1 を作製した。U1 と SH-U1 及び Iss-DNA の濃度比が 5 : 1 : 6 となるように混合し、SH-DNA nanotube を作製した。BSPP と SH-DNA nanotube がそれぞれ 0.2×10^{-6} particles/L、0.2 μM となるように混合し、室温で 16 時間反応させることで AuNP 標識 DNA nanotube を作製した。

【8】電気泳動

第一章と同じ手順で実験を行った。

【9】TEM による観察

第一章と同じ手順で実験を行った。

【10】FACS

各細胞を 96well プレートまたは 48well プレートに 2×10^4 cells/well で播種し、37°C、5% CO₂、24 時間加湿条件下で培養した。培養上清を除き、FAM 標識 DNA を 0.2 μM となるように Opti-MEM で希釈した溶液と 37°C、4 時間インキュベートした。上清を除き、PBS により 2 回洗浄した後、蛍光をフローサイトメトリー(Gallios 社製)により測定した。TB (ナカライテスク社製) は蛍光を測定する直前に混合した。取り込み阻害剤による影響を評価した実験では、クロルプロマジン及びサイトカラシン B の濃度は先行研究を参考にした⁴⁵⁻⁴⁷。上記の条件で播種した NIH3T3 細胞に、クロルプロマジン (シグマアルドリッチ社製) または サイトカラシン B (和光純薬社製) がそれぞれ 10 μM、5 μg/mL となるように Opti-MEM で希釈した溶液と 30 分インキュベートした後、上清を除き、取り込み阻害及び FAM 標識 DNA nanotube が 0.2 μM となるように Opti-MEM で希釈した溶液とインキュベートした。

【11】共焦点顕微鏡による観察

NIH3T3 細胞を 5×10^4 cells/well で 8well チャンバースライド (ワトソン社製) に播種し、37°C、5% CO₂、24 時間加湿条件下で培養した。上清を除き、FAM 標識 DNA nanotube が 0.2 μM となるように Opti-MEM に溶解した溶液と 4 時間インキュベートした。ライソソーム染色においては、LysoTracker™ Red DND-99 (Invitrogen 社製) と FAM 標識 DNA nanotube がそれぞれ 0.1 μM となるように Opti-MEM に溶解した溶液と 4 時間インキュベートした。そ

の後、上清を除き、細胞を PBS で 2 回洗浄し、4% PFA で 20 分固定した。再び PBS により 2 回洗浄した。細胞膜は PKH26 (シグマアルドリッチ社製) を用いて製品のプロトコルに従って染色した。細胞の核を 1.2 mM DAPI で染色し、共焦点顕微鏡(Nikon 社製)により観察した。

【12】 TEM による細胞取り込み動態の観察

NIH3T3 細胞を 5×10^4 cells/well で 8well チャンバースライド (Thermo Scientific 社製) に播種し、37°C、5% CO₂、24 時間加湿条件下で培養した。上清を除き、AuNP 標識 DNA nanotube が 0.05 μ M となるように Opti-MEM に溶解した溶液と 1 及び 4 時間インキュベートした。その後、上清を除き PBS により 2 回洗浄し、固定液 (2% PFA、1% glutaraldehyde) で 4°C、オーバーナイトし、1% osmium tetroxide で 90 分固定した。次に、細胞を段階的なエタノール浴 (50-100%) で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。超薄切片をウルトラミクロトームで切断し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、TEM (日立社製) により観察した。

【13】 ウェスタンブロット

細胞を RIPA バッファー (50 mM Tris (pH 7.6)、150 mM NaCl、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、0.1% TritonX-100、1% NP-40、100x Protease inhibitor cocktail (ナカライテスク社製)) で溶解することで whole lysate を作製した。Whole lysate 中のタンパク質濃度を Quick Start Bradford 1x Dye Reagent (Biorad laboratories 社製) を用いて Bradford assay により算出した。タンパク質量として 4 μ g の whole lysate を 10% SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレン Millipore 社製) に転写した。メンブレンを Blocking one (ナカライテスク社製) でブロッキングした。その後、1 次抗体 (rabbit anti-LC3 IgG (アブカム社製) 及び rabbit anti-beta actin IgG (Biolegend 社製)) をそれぞれ 1 : 2000 及び 1 : 500 に希釈した溶液でメンブレンを浸し、4°C でオーバーナイトさせた。メンブレンを TBS-t (137 mM NaCl、2.68 mM KCl、25 mM Tris、pH7.4、0.1w/v% Tween20) で 3 回洗浄し、2 次抗体 (horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Santa Cruz 社製)) を 1 : 2000 に希釈した溶液と室温で 1 時間浸し、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore 社製) と反応させた。メンブレンは LAS3000 (富士フイルム社製) を用いて観察した。

【14】 統計分析

統計分析は Student' s t-test を用いて 2 つの群を比較した。P 値が 0.05 より小さい場合を統計学的に有意と見なした。

第三章 実験の部

【1】 試薬

第二章と同様のもの、もしくは市販の特級品を用いた。

【2】 細胞株

第二章と同様のものを用いた。

【3】 オリゴヌクレオチド

第二章と同様のものを用いた。

【4】 DNA nanotube の作製

Cy5-R2 を R2 の代わりに用いることにより Cy 標識 DNA nanotube を作製した。その他は第二章と同様のものを用いた。

【5】 ウェスタンブロット

第二章と同様の手順で実験を行った。1 型 collagen の検出については、1 次抗体 (goat anti-type 1 collagen (Southern Biotechnology 社製、1 : 1000)) と 2 次抗体 (horseradish peroxidase-conjugated anti-goat antibody (SantaCruz 社製、1 : 5000)) を用いた。

【6】 DNA nanotube と 1 型 collagen の親和性の評価

96-well plates type H for ELISA (Sumitomo Bakelite 社製) に 10 及び 20 $\mu\text{g/mL}$ の 1 型 collagen (Corning 社製) または BSA を添加し、4°C でオーバーナイトした。プレートを PBS で 2 回洗浄しフリーのタンパク質を除去した。FAM 標識 DNA を 0.2 μM となるように希釈した溶液を添加し、37°C で 4 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄することによりフリーの DNA を除去し、蛍光をマイクロプレートリーダー (PerkinElmer 社製) により測定した。

【7】 FITC 標識 1 型 Collagen の作製

1 型 collagen を 0.5 M 炭酸バッファー (pH9.5) に 2 mg/mL となるように希釈した。Fluorescein isothiocyanate (FITC、シグマアルドリッチ社製) を Dimethyl sulfoxide (DMSO) に 2 mg/mL となるように希釈し、1 型 collagen 溶液と FITC 溶液を 10 : 1 で混合し、4°C で 3 時間反応させた。5 M HCl を添加し溶液を中性化し 12-14 kDa の透析膜によりフリーの FITC を除去した。透析は溶媒の色が無色になるまで繰り返した。溶液を凍結乾燥し、PBS に溶解した溶液を FITC 標識 1 型 collagen として 8% SDS-PAGE により評価した。

【8】 glycine-HCl バッファーによる 1 型 collagen の凝集の回避

MTT assay において、NIH3T3 細胞を 5×10^4 cells/well で 96well プレートに播種し、37°C、5% CO₂、24 時間加湿条件下で培養した。培養液を除去し、100 μ L の Glycine-HCl バッファー (0.1 M glycine 及び 0.02 M HCl) 0-40 mM の濃度となるように Opti-MEM で希釈した溶液を加え、0-60 分 37°C でインキュベートした。上清に thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT、ナカライテスク社製) 溶液 (50 mL PBS 中 250 mg MTT) 20 μ L を加え、37°C で 3.5 時間インキュベートした。上清を除き、150 μ L の MTT 溶出液 (イソプロパノール中 4 mM HCl、0.1% NP40) を加え 30 分シェイクした後、波長 590 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。FITC 標識 1 型 collagen を 0 及び 2.5 mM glycine-HCl 中に 5 μ g/mL となるように溶解した溶液を TEM で観察した。

【9】 共焦点顕微鏡による観察

NIH3T3 細胞を 5×10^4 cells/well で 6well プレートに播種し、37°C、5% CO₂、24 時間加湿条件下で培養した。上清を除き、FITC 標識 1 型 collagen 及び glycine-HCl がそれぞれ 5 μ g/mL 及び 2.5 mM となるように Opti-MEM で希釈した溶液で 30 分インキュベートした。細胞を PBS で 2 回洗浄し Cy5 標識 DNA nanotube が 0.2 μ M となるように Opti-MEM に溶解した溶液で 37°C、4 時間インキュベートした。上清を除き、細胞を PBS で 2 回洗浄し、4% PFA で 20 分固定した。再び PBS により 2 回洗浄した。細胞の核を 1.2 mM DAPI で染色し、共焦点顕微鏡(Nikon 社製)により観察した。

【10】 collagenase 処理の DNA nanotube の取り込みへの影響

NIH3T3 細胞を 3×10^4 cells/well で 48well プレートに播種し、37°C、5% CO₂、24 時間加湿条件下で培養した。細胞を collagenase (シグマアルドリッチ社製) を 0.03 mg/mL となるように PBS で希釈した溶液と 37°C、10 分インキュベートした。上清を除き、FAM 標識 DNA nanotube 及び FITC 標識 dextran (FD40、シグマアルドリッチ社製) がそれぞれ 0.2 μ M 及び 300 μ g/mL となるように Opti-MEM に溶解した溶液と 37°C、4 時間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し蛍光をフローサイトメトリー(Gallios 社製)により測定した。

【11】 統計分析

統計分析は Student' s t-test を用いて 2 つの群を比較した。P 値が 0.05 より小さい場合を統計学的に有意と見なした。

引用文献

1. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(8):546-558. doi:10.1038/nri3713
2. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:709-760. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
3. Krieg AM. Therapeutic potential of toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(6):471-484. doi:10.1038/nrd2059
4. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(4):249-258. doi:10.1038/nri1329
5. Fire Andrew, Si-Qun Xu. Rolling replication of short DNA circles. *PNAS*. 1995;92(Biochemistry):4641-4645.
6. Liu D, Daubendiek SL, Zillman MA, Ryan K, Kool ET. Rolling circle DNA synthesis: Small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases. *J Am Chem Soc*. 1996;118(7):1587-1594. doi:10.1021/ja952786k
7. Zhang L, Zhu G, Mei L, et al. Self-Assembled DNA Immunonanostructures as Multivalent CpG Nanoagents. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(43):24069-24074. doi:10.1021/acsami.5b06987
8. Jung H, Kim D, Kang YY, Kim H, Lee JB, Mok H. CpG incorporated DNA microparticles for elevated immune stimulation for antigen presenting cells. *RSC Adv*. 2018;8(12):6608-6615. doi:10.1039/c7ra13293j
9. Zhou L, Ou LJ, Chu X, Shen GL, Yu RQ. Aptamer-based rolling circle amplification: A platform for electrochemical detection of protein. *Anal Chem*. 2007;79(19):7492-7500. doi:10.1021/ac071059s
10. Al-Ogaili AS, Liyanage R, Lay JO, et al. DNA aptamer-based rolling circle amplification product as a novel immunological adjuvant. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-12. doi:10.1038/s41598-020-79420-w
11. Yata T, Takahashi Y, Tan M, Hidaka K, Sugiyama H. Efficient amplification of self-gelling polypod-like structured DNA by rolling circle amplification and enzymatic digestion. *Nat Publ Gr*. 2015;(September):1-9. doi:10.1038/srep14979
12. Ouyang X, Li J, Liu H, et al. Rolling circle amplification-based DNA origami

- nanostructures for intracellular delivery of immunostimulatory drugs. *Small*. 2013;9(18):3082-3087. doi:10.1002/sml.201300458
13. Kim KR, Röthlisberger P, Kang SJ, et al. Shaping rolling circle amplification products into DNA nanoparticles by incorporation of modified nucleotides and their application to in vitro and in vivo delivery of a photosensitizer. *Molecules*. 2018;23(7). doi:10.3390/molecules23071833
 14. Hollenstein M, Damha MJ. Rolling circle amplification with chemically modified nucleoside triphosphates. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2016;67(December):7.26.1-7.26.15. doi:10.1002/cpnc.17
 15. Kim JH, Jang M, Kim YJ, Ahn HJ. Design and Application of Rolling Circle Amplification for a Tumor-Specific Drug Carrier. *J Med Chem*. 2015;58(19):7863-7873. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01126
 16. Zhao H, Yuan X, Yu J, et al. Magnesium-Stabilized Multifunctional DNA Nanoparticles for Tumor-Targeted and pH-Responsive Drug Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(18):15418-15427. doi:10.1021/acsami.8b01932
 17. Amberlynn M. Peterson, Zhesen Tan, Evelyn M. Kimbrough, Jennifer M. Heemstra. 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanine perchlorate (DiO) as a fluorogenic probe for measurement of critical micelle concentration. *Anal Methods*. 2015;7(16). doi:10.1039/c5ay01444a
 18. Dwight S. Seferos, Andrew E. Prigodich, David A. Giljohann, Pinal C. Patel CAM. Polyvalent DNA Nanoparticle Conjugates Stabilize Nucleic Acids. *Nano Lett*. 2009;9(1):308–311. doi:10.1021/nl802958f.Polyvalent
 19. Li H, Zhang B, Lu X, et al. Molecular spherical nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(17):4340-4344. doi:10.1073/pnas.1801836115
 20. Wang Y, Wu C, Chen T, et al. DNA micelle flares: A study of the basic properties that contribute to enhanced stability and binding affinity in complex biological systems. *Chem Sci*. 2016;7(9):6041-6049. doi:10.1039/c6sc00066e
 21. Mohri K, Nishikawa M, Takahashi N, et al. Design and development of nanosized DNA assemblies in polypod-like structures as efficient vehicles for immunostimulatory cpg motifs to immune cells. *ACS Nano*. 2012;6(7):5931-5940. doi:10.1021/nn300727j
 22. Mohri K, Nagata K, Ohtsuki S, et al. Elucidation of the Mechanism of Increased Activity of Immunostimulatory DNA by the Formation of Polypod-like Structure. *Pharm Res*. 2017;34(11):2362-2370. doi:10.1007/s11095-017-2243-y
 23. Hamblin GD, Hariri AA, Carneiro KMM, Lau KL, Cosa G, Sleiman HF. Simple design for DNA nanotubes from a minimal set of unmodified strands: Rapid, room-

- temperature assembly and readily tunable structure. *ACS Nano*. 2013;7(4):3022-3028. doi:10.1021/nn4006329
24. Hamblin GD, Carneiro KMM, Fakhoury JF, Bujold KE, Sleiman HF. Rolling circle amplification-templated DNA nanotubes show increased stability and cell penetration ability. *J Am Chem Soc*. 2012;134(6):2888-2891. doi:10.1021/ja2107492
 25. Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, Ward DC. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*. 1998;19(3):225-232. doi:10.1038/898
 26. Van Amersfoort ES, Van Strijp JAG. Evaluation of a flow cytometric fluorescence quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry*. 1994;17(4):294-301. doi:10.1002/cyto.990170404
 27. Busetto S, Trevisan E, Patriarca P, Menegazzi R. A Single-Step, Sensitive Flow Cytofluorometric Assay for the Simultaneous Assessment of Membrane-Bound and Ingested *Candida albicans* in Phagocytosing Neutrophils. *Cytom Part A*. 2004;58(2):201-206. doi:10.1002/cyto.a.20014
 28. Nuutila J, Lilius EM. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytom Part A*. 2005;65(2):93-102. doi:10.1002/cyto.a.20139
 29. Illien F, Rodriguez N, Amoura M, et al. Quantitative fluorescence spectroscopy and flow cytometry analyses of cell-penetrating peptides internalization pathways: Optimization, pitfalls, comparison with mass spectrometry quantification. *Sci Rep*. 2016;6(April):1-13. doi:10.1038/srep36938
 30. Wang P, Rahman MA, Zhao Z, et al. Visualization of the Cellular Uptake and Trafficking of DNA Origami Nanostructures in Cancer Cells. *J Am Chem Soc*. 2018;140(7):2478-2484. doi:10.1021/jacs.7b09024
 31. Umemura K, Ohtsuki S, Nagaoka M, et al. Critical contribution of macrophage scavenger receptor 1 to the uptake of nanostructured DNA by immune cells. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2021;34:102386. doi:10.1016/j.nano.2021.102386
 32. Maezawa T, Ohtsuki S, Hidaka K, et al. DNA density-dependent uptake of DNA origami-based two-or three-dimensional nanostructures by immune cells. *Nanoscale*. 2020;12(27):14818-14824. doi:10.1039/d0nr02361b
 33. Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;121:43-56. doi:10.1016/j.addr.2017.07.014

34. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med*. 2001;33(1):7-21. doi:10.3109/07853890109002055
35. Mrevlishvili GM, Svintradze D V. Complex between triple helix of collagen and double helix of DNA in aqueous solution. *Int J Biol Macromol*. 2005;35(5):243-245. doi:10.1016/j.ijbiomac.2005.02.004
36. Kaya M, Toyama Y, Kubota K, et al. Effect of DNA structure on the formation of collagen-DNA complex. *Int J Biol Macromol*. 2005;35(1-2):39-46. doi:10.1016/j.ijbiomac.2004.11.005
37. Ochiya T, Takahama Y, Nagahara S, et al. New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: The Minipellet. *Nat Med*. 1999;5(6):707-710. doi:10.1038/9560
38. Harris JR, Reiber A. Influence of saline and pH on collagen type I fibrillogenesis in vitro: Fibril polymorphism and colloidal gold labelling. *Micron*. 2007;38(5):513-521. doi:10.1016/j.micron.2006.07.026
39. McAlinden A, Havlioglu N, Liang L, Davies SR, Sandell LJ. Alternative splicing of type II procollagen exon 2 is regulated by the combination of a weak 5' splice site and an adjacent intronic stem-loop cis element. *J Biol Chem*. 2005;280(38):32700-32711. doi:10.1074/jbc.M505940200
40. Alexakis C, Partridge T, Bou-Gharios G. Implication of the satellite cell in dystrophic muscle fibrosis: A self-perpetuating mechanism of collagen overproduction. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2007;293(2). doi:10.1152/ajpcell.00061.2007
41. Svintradze D V, Mrevlishvili GM, Metreveli N, et al. Collagen – DNA Complex. *Biomacromolecules*. 2008;9:21-28.
42. Sprangers S, Everts V. Molecular pathways of cell-mediated degradation of fibrillar collagen. *Matrix Biol*. 2019;75-76:190-200. doi:10.1016/j.matbio.2017.11.008
43. Varma S, Orgel JPRO, Schieber JD. Nanomechanics of Type I Collagen. *Biophys J*. 2016;111(1):50-56. doi:10.1016/j.bpj.2016.05.038
44. Wang P, Gaitanaros S, Lee S, Bathe M, Shih WM, Ke Y. Programming Self-Assembly of DNA Origami Honeycomb Two-Dimensional Lattices and Plasmonic Metamaterials. *J Am Chem Soc*. 2016;138(24):7733-7740. doi:10.1021/jacs.6b03966
45. Sun W, Ji W, Hall JM, et al. Self-Assembled DNA Nanoclews for the Efficient Delivery of CRISPR-Cas9 for Genome Editing. *Angew Chemie*. 2015;127(41):12197-12201. doi:10.1002/ange.201506030
46. Mo R, Jiang T, Disanto R, Tai W, Gu Z. ATP-triggered anticancer drug delivery. *Nat Commun*. 2014;5:1-10. doi:10.1038/ncomms4364

47. Everts V, Beertsen W. The Role of Microtubules in the Phagocytosis of Collagen by Fibroblasts. *Top Catal.* 1987;7(1):1-15. doi:10.1016/S0174-173X(87)80017-1