

(論文内容の要旨)

DNA (デオキシリボ核酸) は、ヒトを初めとする多くの生物にとって遺伝情報を次世代に伝えるための根源的な構成要素である。その一方で、核外 DNA は、細胞質や細胞膜に存在する複数のタンパク質と相互作用することで、細胞に様々な情報を伝えるシグナル分子としても機能する。中でも細菌やウイルス DNA に特徴的な構造である非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含む DNA (CpG DNA) は、Toll-like receptor-9 に認識されることで免疫担当細胞からのサイトカイン産生を誘導し、自然免疫に加えて獲得免疫をも活性化する。そこで、この CpG DNA による免疫活性化を利用した疾患治療が、癌やウイルス・細菌感染、アレルギー疾患などを対象に検討され、天然 (ホスホジエステル; PO) 型 DNA に加えて、ホスホロチオエート (PS) 型などの安定化修飾を施した核酸誘導体が開発されてきた。こうした試みにおいては、DNA の標的細胞へのデリバリー効率、ならびに DNA の細胞活性化能が治療効果を左右する要因と考えられる。申請者は、DNA を基盤としてナノ粒子を形成することで、細胞へのデリバリー効率の増大ならびに免疫活性化能の増強が実現できるのではないかと考えた。そこで本研究では、3 種類のオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) から形成される Y 型 DNA (Y-DNA) の連結あるいはコレステロール修飾 ODN (Chol-ODN) をもとにナノサイズ DNA 集合体を作製し、その製剤学的ならびに生物学的特性について評価した。以下、2 章にわたって研究成果を論述する。

第 1 章 Y 型 DNA 及び樹状 DNA の製剤学的・生物学的特性の評価

近年、DNA が水素結合を介して相補鎖と 2 本鎖を形成する特性を巧みに利用することで、自然界には存在しない複雑な立体構造を有する DNA 集合体が形成可能であることが複数の研究者から報告された。これら DNA 集合体は、適当な塩基配列の ODN をデザインすることでナノオーダーサイズの構成単位が得られること、これを繰り返し連結することで大きさを自在に調節可能であることから、新規ナノ構造体として様々な領域でその利用が検討されている。しかしながら、その生物学的特徴に関する情報はほとんどなく、ナノサイズ DDS としての開発には基本的な特性の解明が必須である。そこで本研究ではまず、樹状 DNA (DL-DNA) や DNA ハイドロゲルの構成単位にもなる Y 型 DNA (Y-DNA) を構築し、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 に添加したときのサイトカイン産生、細胞取り込みを指標にその製剤学的・生物学的特性を評価した。

既報に従い、それぞれ半分ずつ相補的な 3 種類の ODN を混合することで Y-DNA を作製した。RAW264.7 への添加により Y-DNA は、1 本鎖 ODN または 2 本鎖 ODN と比較して有意に高いレベルの腫瘍壊死因子 (TNF) $-\alpha$ 、インターロイキン 6 産生を誘導した。そこでこの Y 型化による免疫活性化能の増大メカニズムについて検討したところ、Y 型形成により DNA の安定性は増大せず、むしろ若干不安定になること、その一方で細胞取り込みが有意に増大することが明らかとなった。そこで強力な CpG モチーフを組み込んだ Y-DNA を新たに設計したところ、RAW264.7 への添加により非常に高いレベルのサイトカイン産生を誘導可能であることが示された。一方、Y 型形成による安定性の増大が認められなかったことから、ヌクレアーゼに対する高い抵抗性を示す PS 結合を含む DNA と Y 型形成の併用の可能性について検討した。CpG モチーフを含む ODN を PO 型、両末端の 3 個ずつの PO 結合を PS に置換した PS3 型、全てを PS に置換した PS 型の 3 種類の ODN を、他の 2 つの PO 型 ODN と混合することで各種 Y-DNA を作製したところ、全ての場合で Y 型化によるサイトカイン産生が増大することが示された。中でも PS3 型が最も高いサイトカイン産生を誘導したが、その活性増大は安定化や細胞取り込みでは説明できず、他の要因の関与が推察された。

次に、Y-DNA を連結することで DL-DNA を作製し、その免疫活性化能について同様の検討を行なった。コアとなる Y-DNA の 3 ヲ所の末端に別の Y-DNA を連結することで 4 個の Y-DNA からなる

第1世代 DL-DNA を得た。順次この工程を繰り返すことで、第2世代、第3世代 DL-DNA を作製した。得られた DL-DNA の見かけの粒子径は世代とともに増大し、第3世代で約 36 nm であった。最外殻の Y-DNA に CpG モチーフを複数挿入した DL-DNA は、Y-DNA と比較して RAW264.7 に効率よく取り込まれ、また高いレベルの TNF- α を産生することが明らかとなった。しかしながら、取り込みの増加率よりも遥かに高いレベルのサイトカインが産生されたことから、DL-DNA は Y-DNA よりも免疫活性化能が高い分子であることが推察された。以上の結果は、DNA の分岐化・立体化が、DNA が本来有する生物活性を飛躍的に増大する革新的な方法論になりうることを示すものであり、これを元に免疫療法に有用な免疫活性化システムが開発できるものと考えられる。

第II章 抗原提示細胞への抗原デリバリーを目的としたコレステロール修飾オリゴデオキシヌクレオチドを基盤とするナノ粒子の開発

親水性化合物である DNA を脂溶性分子で修飾し、両親媒性化合物に改変することで DNA ナノ粒子が作製可能と考えられる。この場合、両親媒性化合物は水溶液中では脂溶性官能基同士が会合することで、自己会合体を形成する。このようにして得られるナノ粒子は、抗原タンパク質などの高分子を封入できることから、抗原提示細胞への親和性を有する DNA を用いて自己会合型ナノ粒子を作製することで、抗原デリバリーに適した DDS が開発できるものと考えられる。そこで本章では、安定性や細胞親和性の増大を目的にアンチセンス ODN や siRNA などの核酸医薬品に対して応用されているコレステロール (Chol) 修飾を利用し、Chol 修飾 CpG ODN (Chol-CpG ODN) を利用した抗原デリバリーの有用性について評価した。

アミン修飾 PO 型 CpG ODN のアミノ基に対し、cholesteryl chloroformate を反応させることで Chol-CpG ODN を合成した。修飾部位、修飾率の異なる誘導体を作製し、自己会合性を見かけの粒子径を指標に評価した。その結果、1分子当たり平均約1個の Chol 基が結合した Chol-CpG ODN は、水溶液中で約 180 nm の粒子を形成することが明らかとなった。また、血清中での ODN の安定性も Chol 修飾により増大することが示された。そこで、RAW264.7 に添加したところ、未修飾 CpG ODN と比較して Chol-CpG ODN は、有意に高い細胞取り込みを示し、高いレベルの TNF- α を産生した。

そこで次に、Chol-CpG ODN の抗腫瘍免疫アジュバントとしての利用を念頭に、卵白アルブミン (OVA) をモデル癌抗原として選択し、Chol-CpG ODN ナノ粒子への結合を評価した。その結果、未修飾 CpG ODN とは異なり、Chol-CpG ODN は OVA と強く相互作用し、両者の混合物は約 180 nm の複合体を形成することが示された。OVA/Chol-CpG ODN をマウスに免疫したところ非常に強力な Th1 免疫応答を示し、マウスから採取した脾臓細胞は OVA 添加により多量のインターフェロン γ を産生した。OVA/CpG ODN または OVA/Chol-GpC ODN の投与ではこのような強い免疫応答は認められなかったことから、OVA 特異的な免疫応答の誘導には CpG モチーフに加えてナノ粒子化が重要であることが示唆された。

以上、本研究では、精密に設計した秩序ある ODN 連結または両親媒化修飾を利用した ODN 自己会合により、DNA を基盤としたナノサイズ粒子の開発に成功した。得られた DNA ナノ粒子は、設計通りに免疫担当細胞に効率よく取り込まれ、CpG DNA のサイトカイン誘導能を顕著に増大することが明らかとなった。本研究の成果は、CpG DNA を疾患治療に利用する際に有益な情報を提供することに加えて、ナノサイズ化による細胞活性化増大のメカニズムを解明することで、DNA と生体との相互作用についての理解が深まることに加えて DNA が関与する疾患メカニズムの解明にも繋がるものと考えられる。

(論文審査結果の要旨)

DNA (デオキシリボ核酸) は、ヒトを初めとする多くの生物にとって遺伝情報を次世代に伝えるための根源的な構成要素である。その一方で、核外 DNA は、細胞質や細胞膜に存在する複数のタンパク質と相互作用することで、細胞に様々な情報を伝えるシグナル分子としても機能する。中でも細菌やウイルス DNA に特徴的な構造である非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含む DNA (CpG DNA) は、Toll-like receptor-9 に認識されることで免疫担当細胞からのサイトカイン産生を誘導し、自然免疫に加えて獲得免疫をも活性化する。そこで、この CpG DNA による免疫活性化を利用した疾患治療が、癌やウイルス・細菌感染、アレルギー疾患などを対象に検討され、天然 (ホスホジエステル; PO) 型 DNA に加えて、ホスホロチオエート (PS) 型などの安定化修飾を施した核酸誘導体が開発されてきた。こうした試みにおいては、DNA の標的細胞へのデリバリー効率、ならびに DNA の細胞活性化能が治療効果を左右する要因と考えられる。申請者は、DNA を基盤としてナノ粒子を形成することで、細胞へのデリバリー効率の増大ならびに免疫活性化能の増強が実現できるのではないかと考えた。そこで本研究では、3 種類のオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) から形成される Y 型 DNA (Y-DNA) の連結あるいはコレステロール修飾 ODN (Chol-ODN) をもとにナノサイズ DNA 集合体を作製し、その製剤学的ならびに生物学的特性について評価した。以下、2 章にわたって研究成果を論述する。

第 1 章 Y 型 DNA 及び樹状 DNA の製剤学的・生物学的特性の評価

近年、DNA が水素結合を介して相補鎖と 2 本鎖を形成する特性を巧みに利用することで、自然界には存在しない複雑な立体構造を有する DNA 集合体が形成可能であることが複数の研究者から報告された。これら DNA 集合体は、適当な塩基配列の ODN をデザインすることでナノオーダーサイズの構成単位が得られること、これを繰り返し連結することで大きさを自在に調節可能であることから、新規ナノ構造体として様々な領域でその利用が検討されている。しかしながら、その生物学的特徴に関する情報はほとんどなく、ナノサイズ DDS としての開発には基本的な特性の解明が必須である。そこで本研究ではまず、樹状 DNA (DL-DNA) や DNA ハイドロゲルの構成単位にもなる Y 型 DNA (Y-DNA) を構築し、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 に添加したときのサイトカイン産生、細胞取り込みを指標にその製剤学的・生物学的特性を評価した。

既報に従い、それぞれ半分ずつ相補的な 3 種類の ODN を混合することで Y-DNA を作製した。RAW264.7 への添加により Y-DNA は、1 本鎖 ODN または 2 本鎖 ODN と比較して有意に高いレベルの腫瘍壊死因子 (TNF) $-\alpha$ 、インターロイキン 6 産生を誘導した。そこでこの Y 型化による免疫活性化能の増大メカニズムについて検討したところ、Y 型形成により DNA の安定性は増大せず、むしろ若干不安定になること、その一方で細胞取り込みが有意に増大することが明らかとなった。そこで強力な CpG モチーフを組み込んだ Y-DNA を新たに設計したところ、RAW264.7 への添加により非常に高いレベルのサイトカイン産生を誘導可能であることが示された。一方、Y 型形成による安定性の増大が認められなかったことから、ヌクレアーゼに対する高い抵抗性を示す PS 結合を含む DNA と Y 型形成の併用の可能性について検討した。CpG モチーフを含む ODN を PO 型、両末端の 3 個ずつの PO 結合を PS に置換した PS3 型、全てを PS に置換した PS 型の 3 種類の ODN を、他の 2 つの PO 型 ODN と混合することで各種 Y-DNA を作製したところ、全ての場合で Y 型化によるサイトカイン産生が増大することが示された。中でも PS3 型が最も高いサイトカイン産生を誘導したが、その活性増大は安定化や細胞取り込みでは説明できず、他の要因の関与が推察された。

次に、Y-DNA を連結することで DL-DNA を作製し、その免疫活性化能について同様の検討を行なった。コアとなる Y-DNA の 3 ヲ所の末端に別の Y-DNA を連結することで 4 個の Y-DNA からなる

第1世代 DL-DNA を得た。順次この工程を繰り返すことで、第2世代、第3世代 DL-DNA を作製した。得られた DL-DNA の見かけの粒子径は世代とともに増大し、第3世代で約 36 nm であった。最外殻の Y-DNA に CpG モチーフを複数挿入した DL-DNA は、Y-DNA と比較して RAW264.7 に効率よく取り込まれ、また高いレベルの TNF- α を産生することが明らかとなった。しかしながら、取り込みの増加率よりも遥かに高いレベルのサイトカインが産生されたことから、DL-DNA は Y-DNA よりも免疫活性化能が高い分子であることが推察された。以上の結果は、DNA の分岐化・立体化が、DNA が本来有する生物活性を飛躍的に増大する革新的な方法論になりうることを示すものであり、これを元に免疫療法に有用な免疫活性化システムが開発できるものと考えられる。

第II章 抗原提示細胞への抗原デリバリーを目的としたコレステロール修飾オリゴデオキシヌクレオチドを基盤とするナノ粒子の開発

親水性化合物である DNA を脂溶性分子で修飾し、両親媒性化合物に改変することで DNA ナノ粒子が作製可能と考えられる。この場合、両親媒性化合物は水溶液中では脂溶性官能基同士が会合することで、自己会合体を形成する。このようにして得られるナノ粒子は、抗原タンパク質などの高分子を封入できることから、抗原提示細胞への親和性を有する DNA を用いて自己会合型ナノ粒子を作製することで、抗原デリバリーに適した DDS が開発できるものと考えられる。そこで本章では、安定性や細胞親和性の増大を目的にアンチセンス ODN や siRNA などの核酸医薬品に対して応用されているコレステロール (Chol) 修飾を利用し、Chol 修飾 CpG ODN (Chol-CpG ODN) を利用した抗原デリバリーの有用性について評価した。

アミン修飾 PO 型 CpG ODN のアミノ基に対し、cholesteryl chloroformate を反応させることで Chol-CpG ODN を合成した。修飾部位、修飾率の異なる誘導体を作製し、自己会合性を見かけの粒子径を指標に評価した。その結果、1分子当たり平均約1個の Chol 基が結合した Chol-CpG ODN は、水溶液中で約 180 nm の粒子を形成することが明らかとなった。また、血清中での ODN の安定性も Chol 修飾により増大することが示された。そこで、RAW264.7 に添加したところ、未修飾 CpG ODN と比較して Chol-CpG ODN は、有意に高い細胞取り込みを示し、高いレベルの TNF- α を産生した。

そこで次に、Chol-CpG ODN の抗腫瘍免疫アジュバントとしての利用を念頭に、卵白アルブミン (OVA) をモデル癌抗原として選択し、Chol-CpG ODN ナノ粒子への結合を評価した。その結果、未修飾 CpG ODN とは異なり、Chol-CpG ODN は OVA と強く相互作用し、両者の混合物は約 180 nm の複合体を形成することが示された。OVA/Chol-CpG ODN をマウスに免疫したところ非常に強力な Th1 免疫応答を示し、マウスから採取した脾臓細胞は OVA 添加により多量のインターフェロン γ を産生した。OVA/CpG ODN または OVA/Chol-GpC ODN の投与ではこのような強い免疫応答は認められなかったことから、OVA 特異的な免疫応答の誘導には CpG モチーフに加えてナノ粒子化が重要であることが示唆された。

以上、本研究では、精密に設計した秩序ある ODN 連結または両親媒化修飾を利用した ODN 自己会合により、DNA を基盤としたナノサイズ粒子の開発に成功した。得られた DNA ナノ粒子は、設計通りに免疫担当細胞に効率よく取り込まれ、CpG DNA のサイトカイン誘導能を顕著に増大することが明らかとなった。本研究の成果は、CpG DNA を疾患治療に利用する際に有益な情報を提供することに加えて、ナノサイズ化による細胞活性化増大のメカニズムを解明することで、DNA と生体との相互作用についての理解が深まることに加えて DNA が関与する疾患メカニズムの解明にも繋がるものと考えられる。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。更に、平成 21 年 8 月 17 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。