

京都大学	博士（薬科学）	氏名	梅木 佑夏
論文題目	免疫活性化DNAハイドロゲルを利用した抗原デリバリーシステムの開発に関する研究		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>疾患予防や治療において使用されるワクチンは、抗原に加えて、自然免疫を活性化することでその効果を増強するアジュバントで構成される。しかしながら、既存のアジュバントは、投与部位におけるアレルギー反応や炎症反応が臨床上の問題とされる。したがって、有効性と安全性に優れ、抗原を徐放する機能を有するワクチンアジュバントの開発が切望されている。申請者が所属する研究室ではこれまでに、相補鎖と二本鎖を形成する核酸の性質を利用することで多足型構造核酸（polypod-like structured nucleic acid; polypodna）を開発し、CpGモチーフを含むDNA（CpG DNA）をpolypodnaとすることでそのサイトカイン産生能が飛躍的に増大すること、その活性がpod数に依存することを明らかにしてきた。さらに、DNAリガーゼを用いてpolypodnaをライゲーション反応により連結することで得られるDNAハイドロゲルが、内包化合物の徐放に有用なデリバリーシステムであることも見出されてきた。しかしながら、ライゲーション反応を利用した場合、最終的に得られるDNAハイドロゲル中にDNAリガーゼが混入するために生体投与時のDNAリガーゼに対するアナフィラキシー反応が懸念される。そこで申請者は、polypodnaに接着性末端塩基配列を付与することで、DNAリガーゼを用いずに生理的条件下で自発的にゲル化する自己ゲル化核酸技術を開発し、これにより調製される注射投与可能なDNAハイドロゲルの物性を評価するとともに、自己ゲル化核酸技術で得られるDNAハイドロゲルを利用した抗原デリバリーシステムの開発を試みた。</p> <p>第1章 注射投与可能なDNAハイドロゲルの開発と抗原デリバリーへの応用</p> <p>申請者は、自己ゲル化核酸技術で調製可能なDNAハイドロゲルを開発し、そのレオロジー特性を解析するとともに、モデル抗原として卵白アルブミン（OVA）を選択し、この技術を利用して作成したCpG DNAハイドロゲルの癌抗原徐放システムへの応用について検討した。8塩基長の5'突出末端を含む40塩基長のオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）を用いてhexapodnaを構築し、相補的な配列の5'突出末端を有する2種類のhexapodnaを混合することでDNAハイドロゲルを作製した。レオメータを用いて粘弾性を評価した結果、DNAハイドロゲルは小さな静的および動的降伏応力を有することが見出され、hexapodnaの連結が非常に短時間で組み替わることが示唆された。この特性を反映して、このDNAハイドロゲルが容易に注射投与可能であることも明らかとなった。また、内包したOVAを徐放すること、ODNやhexapodnaと比較してマウス皮内投与後、投与部位に長時間残存することも見出された。またマウスに免疫することで、他のアジュバントと比較して有意に高い免疫活性化ならびに抗腫瘍効果を示した。以上より、自己ゲル化核酸技術で調製したDNAハイドロゲルは、注射投与が可能で、効率的に免疫応答を誘導可能な抗原デリバリーシステムであることが明らかとなった。</p> <p>第2章 DNAハイドロゲルからの抗原徐放化による抗腫瘍免疫の増強</p> <p>DNAは負電荷を帯びていることから、OVAのような負電荷を帯びた抗原タンパク質のDNAハイドロゲルからの放出が比較的早く、抗原提示細胞への抗原の持続的な送達は達成されていない。そこで申請者は、OVAをモデル抗原として選択し、抗原のカチオン化あるいはコレステロール修飾DNAと疎水性を増大した抗原との組み合わせにより、静電的相互作用または疎水性相互作用を利用したDNAハイドロゲルからの抗原の放出制御ならびに抗腫瘍免疫の増強を試みた。カチオン化OVA（ED-OVA）はOVAとエチレンジアミンの縮合</p>			

反応により得た。ED-OVA は DNA ハイドロゲルから徐放された。また、OVA と比較して、ED-OVA は CpG DNA ハイドロゲルと組み合わせることで、マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞に効率よく取り込まれ、有意に高い抗原提示を示した。ED-OVA 内包 CpG DNA ハイドロゲルは OVA 特異的免疫応答を効率よく誘導し、OVA を発現するマウスリンパ腫 EG7-OVA の腫瘍増殖を顕著に抑制した。さらに、OVA の MHC class I エピトープペプチド pepI にオクタアルギニンを付加することで得たカチオン化ペプチドを用いた場合にも EG7-OVA 担癌マウスの生存期間が有意に延長された。一方、コレステロール修飾 DNA を利用して作製したコレステロール修飾 DNA ハイドロゲルを用いた検討では、native OVA と比較して、コレステロールとの結合性が高い尿素変性 OVA を内包することで、コレステロール非含有 DNA ハイドロゲルと比較して OVA の放出が遅延し、EG7-OVA 担癌マウスの腫瘍増殖が抑制できることを見出した。以上より、抗原をカチオン化すること、あるいはコレステロール修飾 DNA と疎水性を増大させた抗原を組み合わせることで DNA ハイドロゲルからの抗原徐放化が可能であり、これにより抗腫瘍免疫を増強可能であることを見出した。

第 3 章 DNA ハイドロゲルへの免疫細胞の内包による抗腫瘍免疫の増強

効率的な抗原特異的免疫応答の誘導には、充分量の抗原提示細胞による抗原の取り込みおよびアジュバントによる活性化が必要である。そこで申請者は、DNA ハイドロゲルと免疫細胞を組み合わせることによる抗腫瘍効果の増強の可能性について評価を行った。まず、マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞を利用して、免疫細胞内包 DNA ハイドロゲルの機能を評価した。その結果、DNA ハイドロゲルへの内包により、細胞の生存率は低下するものの、CpG DNA によるサイトカイン産生は増大することが示された。さらに、抗腫瘍効果評価のために、マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を抗原提示細胞として選択し、pepI を搭載した BMDC を DNA ハイドロゲルに内包してマウスに免疫を行った。免疫後に EG7-OVA を移植したところ、BMDC を含まない pepI 内包 DNA ハイドロゲルで免疫を行った場合と比較して高い抗腫瘍効果が得られた。以上より、DNA ハイドロゲルと免疫細胞を組み合わせることで、抗原特異的抗腫瘍免疫を増強可能であることが示唆された。

以上申請者は、polyodna を連結することで作製した DNA ハイドロゲルが、抗原特異的免疫応答を効率的に誘導可能な安全なアジュバントであり、これを利用することでマウスにおいて高い抗腫瘍効果を得ることに成功した。本研究で得られた成果は、CpG DNA ハイドロゲルを利用した癌免疫療法の開発を加速するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

疾患予防や治療において使用されるワクチンは、抗原に加えて、自然免疫を活性化することでその効果を増強するアジュバントで構成される。しかしながら、既存のアジュバントは、投与部位におけるアレルギー反応や炎症反応が臨床上の問題とされる。したがって、有効性と安全性に優れ、抗原を徐放する機能を有するワクチンアジュバントの開発が切望されている。申請者は、多足型構造核酸 (polypod-like structured nucleic acid; polypodna) に接着性末端塩基配列を付与することで、DNA リガーゼを用いずに生理的条件下で自発的にゲル化する自己ゲル化核酸技術を開発し、これにより調製される注射投与可能な DNA ハイドロゲルの物性を評価するとともに、自己ゲル化核酸技術で得られる DNA ハイドロゲルを利用した抗原デリバリーシステムの開発を試みた。その結果、以下の新知見を得た。

まず、自己ゲル化核酸技術で調製した DNA ハイドロゲルは、注射投与が可能で、効率的に免疫応答を誘導可能な抗原デリバリーシステムであることを明らかにした。また、抗原をカチオン化すること、あるいはコレステロール修飾 DNA と疎水性を増大させた抗原を組み合わせることで DNA ハイドロゲルからの抗原徐放化が可能であり、これにより抗腫瘍免疫を増強可能であることを見出した。さらに、DNA ハイドロゲルと免疫細胞を組み合わせることで、抗原特異的抗腫瘍免疫を増強可能であることを示した。以上、polypodna を連結することで作製した DNA ハイドロゲルが、抗原特異的免疫応答を効率的に誘導可能な安全なアジュバントであり、これを利用することでマウスにおいて高い抗腫瘍効果を得ることに成功した。本研究で得られた成果は、CpG DNA ハイドロゲルを利用した癌免疫療法の開発を加速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、平成 29 年 2 月 24 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、平成 31 年 3 月 31 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。