

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

要約

2016

梅木 佑夏



# 目次

## 総論の部

緒言-----	1
---------	---

第一章 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-----	2
--	---

- 1.1 注射投与可能な DNA ハイドロゲルの作製
- 1.2 DNA ハイドロゲルの粘弾性測定
- 1.3 DNA ハイドロゲルの免疫活性化能評価
- 1.4 DNA ハイドロゲルの組織分布評価
- 1.5 CpG DNA の組織分布と IL-6 発現の上昇の相関関係評価
- 1.6 DNA ハイドロゲルからの OVA の放出性評価
- 1.7 DNA ハイドロゲルの酵素安定性評価
- 1.8 抗原提示能評価
- 1.9 OVA 内包 DNA ハイドロゲルによる抗原特異的免疫応答の誘導評価
- 1.10 DNA ハイドロゲルによる炎症性副作用評価
- 1.11 DNA ハイドロゲルによる抗腫瘍効果評価
- 1.12 考察

第二章 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	
-----------------------------------	--

第一節 カチオン化抗原を利用した DNA ハイドロゲルからの抗原徐放化-----	19
--	----

- 2.1.1 カチオン化 OVA の合成
- 2.1.2 カチオン化 OVA と DNA の相互作用形成
- 2.1.3 カチオン化 OVA の DNA ハイドロゲルからの放出性評価
- 2.1.4 カチオン化 OVA の抗原提示細胞による取り込みおよび抗原提示能評価
- 2.1.5 カチオン化 OVA の投与部位滞留性評価
- 2.1.6 カチオン化 OVA による抗原特異的免疫応答の誘導
- 2.1.7 カチオン化 OVA による炎症性副作用評価
- 2.1.8 カチオン化 OVA による抗腫瘍効果評価
- 2.1.9 カチオン化抗原ペプチドの設計
- 2.1.10 カチオン化ペプチドと DNA の相互作用形成
- 2.1.11 カチオン化ペプチドの DNA ハイドロゲルからの放出性評価
- 2.1.12 カチオン化抗原ペプチドによる抗腫瘍効果
- 2.1.13 考察

第二節 コレステロール修飾 DNA ハイドロゲルからの抗原徐放化-----	40
第三章 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-----	41
結論-----	42
謝辞-----	44
実験の部	
第一章 実験の部-----	45
第二章 実験の部-----	50
引用文献-----	54

# 総論の部

## 緒言

ワクチン開発においては、抗原特異的な免疫応答を誘導するために免疫賦活剤であるアジュバントがワクチンの構成要素として必須と認識されている。しかしながら、アラムなどの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的問題とされる。また、ワクチンが有効性を示すためには、ワクチンを構成する抗原が投与後に抗原提示細胞へ持続的に送達されることが必要である。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。

病態情報薬学分野ではこれまでに、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、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。さらに、投与に際して切開が必要であり、臨床応用への大きな課題と考えられる。

そこで本研究では、DNA リガーゼを用いずに作製した DNA ハイドロゲルを利用した抗原デリバリーシステムを開発することを目的に、この DNA ハイドロゲルの物性を評価するとともに、抗原を内包した DNA ハイドロゲルによる抗腫瘍効果を評価した。第一章では、生理的条件下で自発的にゲル化する 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、モデル抗原として選択した卵白アルブミン (OVA) を用いて 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。第二章では、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目的に、抗原のカチオン化 (第一節) 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 (第二節) を検討した。第三章では、DNA ハイドロゲルを基盤とする抗原徐放システムに免疫細胞を組み合わせることによる抗腫瘍効果の増強について評価した。

以下、本研究で得られた結果を三章にわたり論述する。

## 第一章 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

DNA は細胞質あるいは細胞外において免疫調節活性を示す生体高分子である。メチル化されていないシトシン-リン酸-グアニン配列を有する DNA、いわゆる CpG DNA は、Toll-like receptor 9 (TLR9) のリガンドであり、自然免疫を強力に活性化する<sup>1-3)</sup>。CpG DNA は 1 型サイトカインの産生を誘導するため、癌を含む複数の疾患に対する臨床応用が期待されている<sup>4-6)</sup>。臨床試験においては生体内での安定性を向上したホスホロチオエート (PS) 型の CpG DNA が用いられるが、これは腎毒性が問題とされる<sup>7,8)</sup>。病態情報薬学分野ではこれまでに、CpG DNA を多足型核酸構造体 polypodna にすることで、PS 化を利用せずに CpG DNA の免疫活性を増大可能であることを報告してきた<sup>9,10)</sup>。

4 本足の polypodna である tetrapodna と同じ構造的特徴を有する X 型 DNA を連結することで、DNA ハイドロゲルが形成されることが Um らにより報告された<sup>11)</sup>。病態情報薬学分野では、これに自然免疫を活性化する CpG モチーフを組み込んだシステムを開発し、疾患治療への応用が検討されてきた<sup>12)</sup>。ここでは、オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) の 5' 末端における 4 塩基のパリンドローム配列を T4 DNA リガーゼで連結させることで CpG DNA ハイドロゲルを作製し、これにドキシソルピシンを内包することでマウスの腫瘍増殖の抑制が達成されている。しかしながら、ハイドロゲルの投与に際して外科的な切開あるいは注射可能な大きさに断片化する必要があること、またリガーゼの混入によりアナフィラキシーショックのような有害作用が生じることが懸念される。このような問題があることから、リガーゼを用いずに注射投与可能な DNA ハイドロゲルを開発することができれば、DNA ハイドロゲルの薬物徐放システムとしての有用性はさらに増大すると考えられる。DNA リガーゼを用いない DNA ハイドロゲルに関する報告は散見されるものの、注射投与可能な DNA ハイドロゲルに関する報告については皆無である<sup>13,14)</sup>。

そこで第一章では、リガーゼを必要としない注射投与可能な DNA ハイドロゲルの開発を試みた。すなわち、生理的条件下で 2 本鎖を形成する 4 塩基以上の配列を polypodna の 5' 末端に付加することで注射投与可能な DNA ハイドロゲルを設計した。得られたハイドロゲル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。

### 1.1 注射投与可能な DNA ハイドロゲルの作製

接着性突出末端を有する polypodna は、突出末端配列の熱安定性に応じて相補的な配列と生理的条件下で自発的に結合し、無数の polypodna 同士が結合することでゲル化しうると考

えられる。そこで、DNA ハイドロゲルの基本構造として、40 塩基の 6 本の ODN からなる hexapodna を設計した。各 ODN は、生理的条件下における polypodna 間の連結に必要な接着用配列として、5'末端に 8 塩基の非パリンδροーム配列 (8np) と、これに続いて他の ODN と相補鎖を形成する 16 ヌクレオチド (nt) 配列、さらに別の ODN と相補鎖を形成する 16nt 配列から構成されるように設計した。なお、8np として、互いに相補的な A (TCCTGACG) と B (CGTCAGGA) を、いずれの配列とも相補的でない C (GCAGACGA) を設計した。Table 1 に各 hexapodna を構成する 6 本の ODN の塩基配列を示す。配列を決定する際には、ODN の自由エネルギー ( $\Delta G$ ) およびヘアピン構造などの有無を確認し、 $\Delta G$  を指標に配列を最適化した。

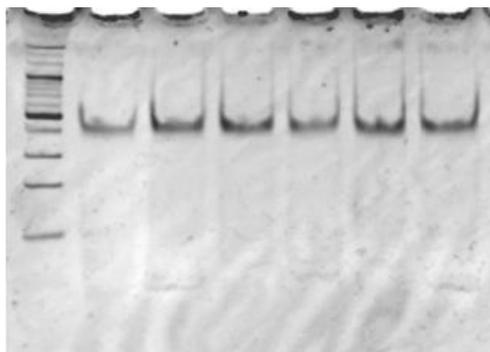
それぞれ 6 本の ODN をアニーリングすることで、hexapodna(GpC)<sub>8np-32-A</sub>、hexapodna(GpC)<sub>8np-32-B</sub>、hexapodna(GpC)<sub>8np-32-C</sub> を調製し、その形成をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により確認した。その結果、いずれの場合にも、およそ 500 塩基対 (bp) 付近に単一のバンドが認められた (Fig. 1)。

**Table 1. The sequences of ODNs used for preparation for DNA hydrogel.** All ODNs have a phosphodiester backbone.

	Sequence (5'→3')
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-A</sub>	
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-A1</sub>	TCCTGACG TTGCTAGACGCTGTCA GCACGTCGTAGTGCAA
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-A2</sub>	TCCTGACG TTGCACTACGACGTGC AGCAGACGTCGATCAA
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-A3</sub>	TCCTGACG TTGATCGACGTCTGCT TGACGCTCAGCTGCAA
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-A4</sub>	TCCTGACG TTGCAGCTGAGCGTCA GACGCTGATCTAGCAA
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-A5</sub>	TCCTGACG TTGCTAGATCAGCGTC CTCACGTTGACTACAA
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-A6</sub>	TCCTGACG TTGTAGTCAACGTGAG TGACAGCGTCTAGCAA
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-B</sub>	
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-B1</sub>	CGTCAGGA CGTTGAATCCATGACG TTGTATGACTGCAACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-B2</sub>	CGTCAGGA CGTTGCAGTCATACAA TCCTGACGCTCTGACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-B3</sub>	CGTCAGGA CGTCAGAGCGTCAGGA CGTTCATCAGTATACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-B4</sub>	CGTCAGGA CGTATACTGATGAACG AAGTGACGTCTCAACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-B5</sub>	CGTCAGGA CGTTGAGACGTCCTT ATCGACGTCTGAGACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-B6</sub>	CGTCAGGA CGTCTCAGACGTCGAT CGTCATGGATTCAACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-C</sub>	
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32-C1</sub>	GCAGACGA CGTTGAATCCATGACG TTGTATGACTGCAACG

Hexapodna(CpG) <sub>8np-32</sub> -C2	GCAGACGA CGTTGCAGTCATACAA TCCTGACGCTCTGACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32</sub> -C3	GCAGACGA CGTCAGAGCGTCAGGA CGTTCATCAGTATACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32</sub> -C4	GCAGACGA CGTATACTGATGAACG AAGTGACGTCTCAACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32</sub> -C5	GCAGACGA CGTTGAGACGTCACTT ATCGACGTCTGAGACG
Hexapodna(CpG) <sub>8np-32</sub> -C6	GCAGACGA CGTCTCAGACGTGCAT CGTCATGGATTCAACG
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -A	
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -A1	TCCTGAGC TTGCTAGAGCCTGTCA GGAGCAGCTAGTGCAA
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -A2	TCCTGAGC TTGCACTAGCTGCTCC AGCAGAGCTCGATCAA
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -A3	TCCTGAGC TTGATCGAGCTCTGCT TGAGCCTCAGCTGCAA
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -A4	TCCTGAGC TTGCAGCTGAGGCTCA GAGCCTGATCTAGCAA
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -A5	TCCTGAGC TTGCTAGATCAGGCTC CTCAGCTTGACTACAA
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -A6	TCCTGAGC TTGTAGTCAAGCTGAG TGACAGGCTCTAGCAA
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -B	
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -B1	GCTCAGGA GCTTGAATCCATGAGC TTGTATGACTGCAAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -B2	GCTCAGGA GCTTGCAGTCATACAA TCCTGAGCCTCTGAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -B3	GCTCAGGA GCTCAGAGGCTCAGGA GCTTCATCAGTATAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -B4	GCTCAGGA GCTATACTGATGAAGC AAGTGAGCTCTCAAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -B5	GCTCAGGA GCTTGAGAGCTCACTT ATGCAGCTCTGAGAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -B6	GCTCAGGA GCTCTCAGAGCTGCAT GCTCATGGATTCAAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -C	
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -C1	GCTGTCCA GCTTGAATCCATGAGC TTGTATGACTGCAAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -C2	GCTGTCCA GCTTGCAGTCATACAA TCCTGAGCCTCTGAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -C3	GCTGTCCA GCTCAGAGGCTCAGGA GCTTCATCAGTATAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -C4	GCTGTCCA GCTATACTGATGAAGC AAGTGAGCTCTCAAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -C5	GCTGTCCA GCTTGAGAGCTCACTT ATGCAGCTCTGAGAGC
Hexapodna(GpC) <sub>8np-32</sub> -C6	GCTGTCCA GCTCTCAGAGCTGCAT GCTCATGGATTCAAGC

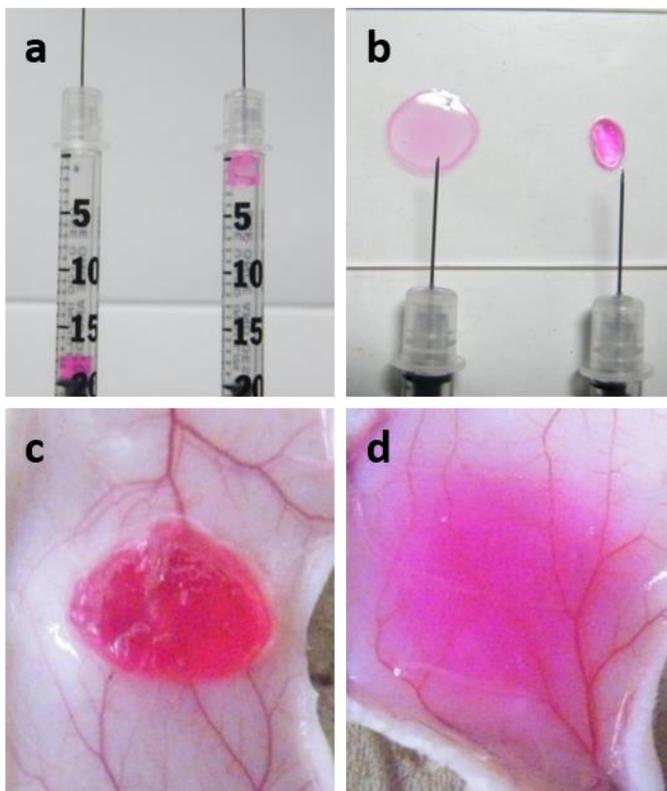
---



**Figure 1. PAGE analysis of polypodna.** Samples were run on 6% polyacrylamide gel at 200 V for 20 min. The gel was stained with ethidium bromide and photographed under ultraviolet light. Lane 1, 100 bp DNA ladder; lane 2, hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-A; lane 3, hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-B; lane 4, hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-C; lane 5, hexapodna(CpG)<sub>8np-32</sub>-A; lane 6, hexapodna(CpG)<sub>8np-32</sub>-B; and lane 7 hexapodna(CpG)<sub>8np-32</sub>-C.

1 2 3 4 5 6 7

Fig. 2aに29ゲージの針付きシリンジ内で2種類のhexapodna溶液を混合した様子を示す。なお、hexapodna溶液はDNAインターカレータであるヨウ化プロピジウム (PI) で標識した。末端部分が互いに相補的なhexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-Aとhexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-Bの混合によりDNA水ドロゲル(DNA hydrogel(GpC))が即座に形成されることが示された(Fig. 2a 右)。また、このDNA水ドロゲルは29ゲージの注射針を容易に通過し、通過後ほぼ即座に再度ゲル化した(Fig. 2b 右)。Fig. 2cで示すように、マウスの皮膚組織に投与した場合にも、投与部位でゲル化が認められた。これとは対照的に、末端部分が相補的では無い配列の2種類のhexapodnaの混合では水ドロゲルの形成は認められなかった(Fig. 2a 左、Fig. 2b 左、Fig. 2d)。



**Figure 2. Formation of DNA hydrogel without DNA ligase (a, b)** Hydrogel formation in syringe and injection through a 29-gauge needle. Hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-A and hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-B (right, DNA hydrogel[GpC]) or hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-A and hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-C (left), all of which were labeled using PI, were mixed in a 29-gauge insulin syringe (a), then injected (b). (c, d) Hydrogel formation in mouse skin after intradermal injection. Hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-A and hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-B (c, DNA hydrogel[GpC]) or hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-A and hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-C (d) was injected into the dorsal skin of mice at a dose of 30 mg/kg (660 μg/mouse), and the skin was collected and observed at 3 h after injection.

## 1.2 DNA ハイドロゲルの粘弾性測定

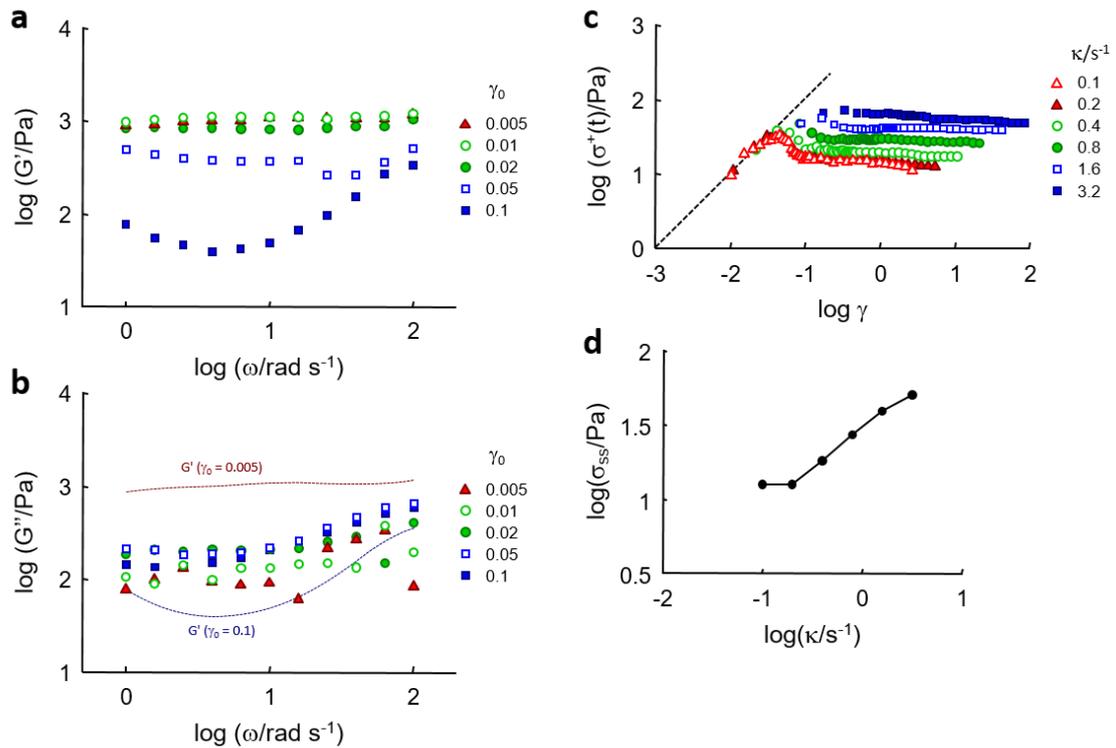
DNA ハイドロゲルの物理化学的特性を明らかにするために、DNA hydrogel(GpC)のレオロジー特性を評価した。ハイドロゲルは 22.1 mg/ml の濃度で 29G 針付きシリンジを用いて用時調製後に測定した。

Fig. 3a, b には、それぞれ様々な歪み ( $\gamma_0$ ) で回転振動を与えた際のハイドロゲルの貯蔵弾性率 ( $G'$ ) と損失弾性率 ( $G''$ ) を示す。Fig. 3b の点線は  $\gamma_0$  が 0.5 % と 10 % における  $G'$  を表す。 $\gamma_0$  が 1 % 以下の場合、 $G'$  は  $\gamma_0$  と周波数  $\omega$  に依存せずほぼ一定であった。一方で、 $G'$  と比較して  $G''$  は非常に低い値となった (Fig. 3b)。以上の結果から、平衡弾性率  $G_e$  は  $1.1 \times 10^3$  Pa と算出され、これにより hexapodna が末端部分で連結することで形成されるハイドロゲルは、微小歪み下では破壊されず、固体的な特性を有することが示唆された。

これとは対照的に、 $\gamma_0$  が 2 % 以上になると  $G'$  は低下し、 $G''$  は増大した。特に、 $\gamma_0$  が 10 % の場合では、 $G''$  が  $G'$  よりも高値となった (Fig. 3b)。この結果から、大きな歪み存在下においては、ハイドロゲルは非線形流動を示すと推察される。この非線形流動と関連して、 $\gamma_0$  が 10 % において、 $G'$  は  $\omega$  が 4 rad/s の点で極小値を示した。このような極小値は一般的なハイドロゲルではほとんど観察されない<sup>15)</sup>。このことから、ハイドロゲルの粘弾性は hexapodna 間の物理ネットワークにより決定付けられており、歪みが大きい場合にはこのネットワークの崩壊と再構築が行われると考えられ、この再構築は  $G'$  の極小値から  $\tau = 1/\omega = 0.25$  秒で生じると考えられる。すなわち、 $\omega$  が  $1/\tau$  以下では振動の 1 周期の間にネットワークは十分に再形成されるが、 $\omega$  が  $1/\tau$  以上の場合では、ネットワークが崩壊する時間が十分に存在しないために、 $G'$  は高値を示すと考えられる。 $\omega = 1/\tau$  における  $G'$  の極小値はそのような再形成と崩壊の競合の結果生じると考えられた。

Fig. 3c では、様々な速度  $\kappa$  における流動開始後のハイドロゲルの応力  $\sigma^+(t)$  を、流動による歪み  $\gamma = \kappa t$  に対してプロットした。破線は線形域の平衡剛性率  $G_e$  を用いて計算した弾性応力  $\sigma^+ = G_e \gamma$  である。 $\gamma$  が 0.03 以下の微小歪み域では、全ての  $\kappa$  において  $\sigma^+(t)$  が  $G_e \gamma$  と一致した。このことから、DNA ハイドロゲルは線形域の弾性体として振舞っていることが示唆される。また、この  $\gamma^* = 0.03$  は動的測定で弾性率が低下し始めた歪み振幅  $\gamma_0 \cong 0.02$  に近い値となっている (Fig. 2a)。 $\gamma > \gamma^*$  では、 $\sigma^+(t)$  が  $G_e \gamma$  より低下し、一定応力  $\sigma_{ss}$  で定常流動しており、歪みにより網目の組み換えが起こっていることが示唆された (Fig. 3c)。Fig. 3d は定常応力  $\sigma_{ss}$  のずり速度  $\kappa$  依存性を示している。 $\kappa$  が低下するにつれて  $\sigma_{ss}$  は一定値 13 Pa に収斂しており、ハイドロゲルは定常流動状態での網目組み換えの臨界応力  $\sigma_{y, dyn} \cong 13$  Pa を有することが示唆される。 $\sigma_{y, dyn}$  の値は、歪みによる網目組み換えの臨界応力である臨界歪み値  $\gamma = \gamma^* \cong 0.03$  での応力  $\sigma_{y, dyn} \cong 32$  Pa よりも値が低くなっている (Fig. 3c)。このことから、流動状態における DNA ハイドロゲルのネットワークは、平衡状態時と比較して弱いことが推察される。それにも関わらず、定常流動後に行った動的測定から、ネットワークは即座に平衡状態に回復することが示された。この速やかなネットワークの再形成と小さな

$\sigma_{ss}$  により、DNA ハイドロゲルはシリンジで流すことが可能であり、シリンジから出た後に速やかにゲル特性を回復するものと考えられる。

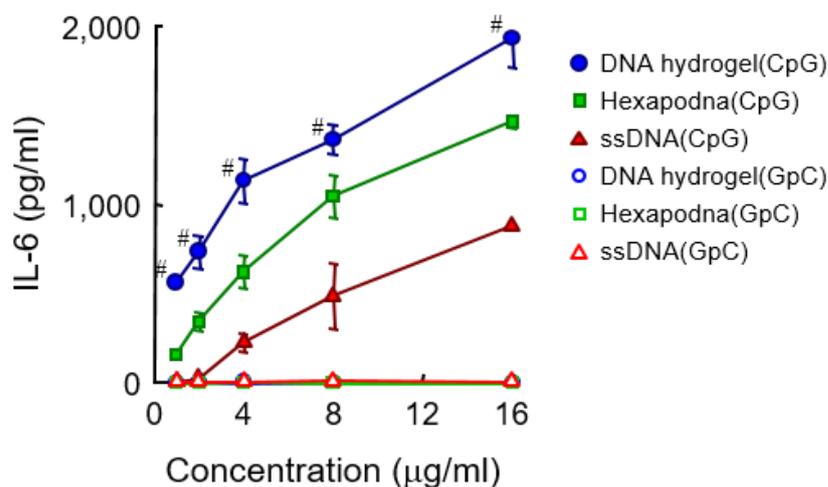


**Figure 3. Rheological characterization of DNA hydrogel exhibiting quick reorganization of hydrogen bonds at room temperature ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ).** (a) and (b) Storage and loss modulus ( $G'$  and  $G''$ ) measured for sinusoidal strain at various angular frequencies  $\omega$  and with the amplitude  $\gamma_0$  as indicated. In panels (a) and (b), respectively, The  $G'$  and  $G''$  data are plotted against  $\omega$  in the double-logarithmic scale. The dotted curves in panel (b) indicate the  $G'$  data for amplitude  $\gamma_0 = 0.005$  and  $0.1$  (0.5% and 10%). The minimum of  $G'$  at  $\omega = 4 \text{ s}^{-1}$  observed for large  $\gamma_0$  is indicative of the network reorganization process at a characteristic time  $\tau \cong 0.25 \text{ s}$ . (c, b) Time evolution of the shear stress  $\sigma^+(t)$  measured after start-up of shear flow at constant rates  $\kappa$  as indicated. The  $\sigma^+(t)$  are plotted against the strain,  $\gamma = \kappa t$ . (dc) Steady state shear stress  $\sigma_{ss}$  evaluated from the  $\sigma^+(t)$  data shown in Fig. 2cb. The  $\sigma_{ss}$  data are plotted against the shear rate  $\kappa$  and the dynamic yield stress,  $\sigma_{y,\text{dyn}} \cong 13 \text{ Pa}$ , is evaluated from those data at low  $\kappa$ . Data shown are representative of two independent experiments.

### 1.3 DNA ハイドロゲルの免疫活性化能評価

病態情報薬学分野のこれまでの検討において、CpG DNA を polypodna 構造に組み込むことでその免疫活性が飛躍的に増大することが示されている<sup>9, 10, 12, 16</sup>。そこで、新たに開発したリガーゼを必要としない DNA ハイドロゲルの免疫活性化能を評価するために、各種 DNA サンプル添加時のマウス樹状細胞株 DC2.4 からのインターロイキン (IL) -6 産生を評価した (Fig. 4)。5'末端に一本鎖 DNA を有さない hexapodna と同様に、hexapodna(CpG)は

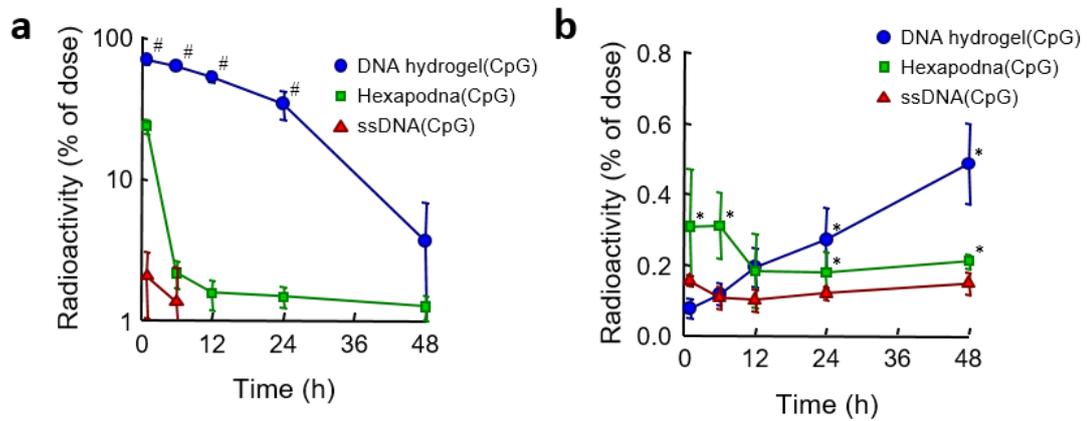
ssDNA(CpG)と比較して多量の IL-6 を産生することが示された<sup>10)</sup>。等モル濃度では、DNA hydrogel(CpG)は hexapodna(CpG)と比較して有意に高い IL-6 産生を示した。CpG を GpC に置換したサンプルでは、構造によらず IL-6 産生は検出されなかった。



**Figure 4. IL-6 production from DC2.4 cells by addition of DNA hydrogel(CpG).** (a) IL-6 release from DC2.4 cells. Cells were incubated with DNA samples at the indicated concentrations for 16 h. The IL-6 concentration in culture media was measured by ELISA, and was  $1.7 \pm 0.9$  pg/ml in untreated DC2.4 cells. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three independent wells per sample. Data shown are representative of three independent experiments. All the data obtained with DNA hydrogel(CpG) were statistically significant compared with the other groups.

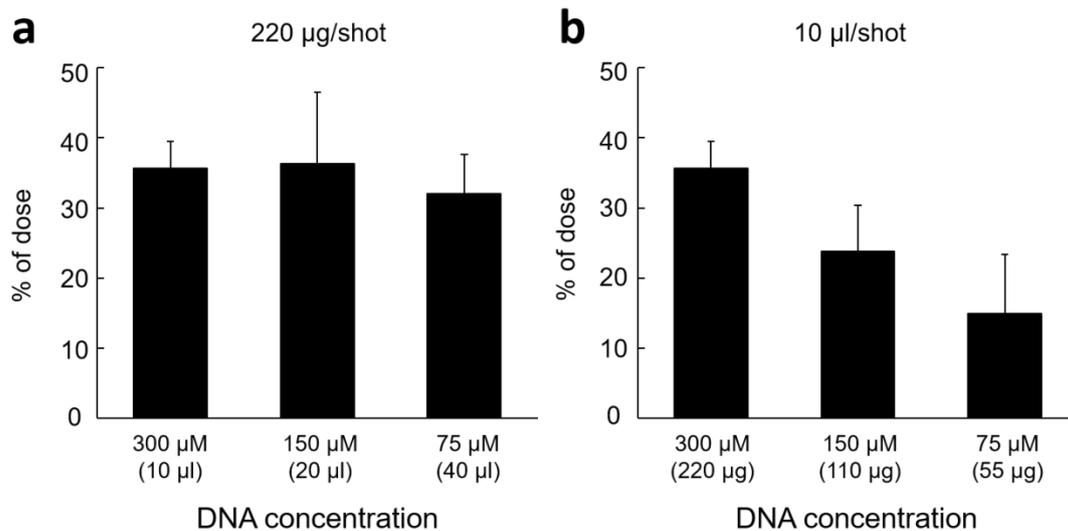
#### 1.4 DNA ハイドロゲルの組織分布評価

マウス背部皮内投与後の DNA の組織分布を評価するために、ssDNA(CpG)<sub>8np-32-A1</sub> を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP と T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、<sup>32</sup>P で放射標識した。そして、<sup>32</sup>P 標識 ssDNA(CpG)と hexapodna(CpG)、DNA hydrogel(CpG)を調製した。Fig. 5a は、マウス背部の <sup>32</sup>P 放射活性の経時変化を示す。<sup>32</sup>P-ssDNA(CpG)あるいは <sup>32</sup>P-hexapodna(CpG)の投与後、<sup>32</sup>P の放射活性は投与部位から急速に消失した。これとは対照的に、<sup>32</sup>P-DNA hydrogel(CpG)投与群では <sup>32</sup>P の放射活性は投与部位に長時間検出され、半減期約 12 時間で消失した。また、<sup>32</sup>P-DNA hydrogel(CpG)の投与により、リンパ節への <sup>32</sup>P の放射活性の緩やかで持続的な蓄積が認められた (Fig. 5b)。



**Figure 5. Tissue distribution of DNA hydrogel in mice.** Time course of radioactivity in the injection site (a) and in draining lymph nodes (b) after intradermal injection of  $^{32}\text{P}$ -DNA. Mice were injected with  $^{32}\text{P}$ -ssDNA(CpG),  $^{32}\text{P}$ -hexapodna(CpG) or  $^{32}\text{P}$ -DNA hydrogel(CpG) at a DNA dose of 10 mg/kg (220  $\mu\text{g}$ /mouse) into the dorsal skin. At the indicated times, the skin tissue including the injection site (a) and the draining lymph nodes (b) were collected, and radioactivity was counted. Data are normalized to the injected dose and are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three mice. Data shown are representative of three independent experiments.

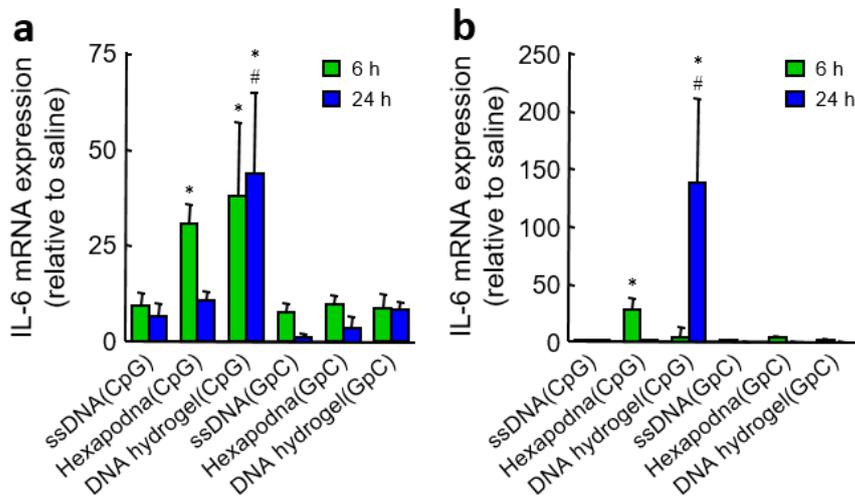
DNA ハイドロゲルの投与量を 220  $\mu\text{g}$  と一定にし、投与溶液量を変えることで DNA 濃度を変化させた際の DNA の投与部位滞留性を評価したところ、投与 24 時間後に残存する放射活性は DNA 濃度に依存しなかった (Fig. 6a)。一方で、投与するサンプルの体積を 10  $\mu\text{l}$  と一定にしたところ、サンプルの DNA 濃度が高くなる、すなわち DNA ハイドロゲルの投与量が高くなるほど投与 24 時間後に残存する放射活性が高くなった (Fig. 6b)。以上の結果から、投与する DNA の重量が皮膚に投与後の DNA ハイドロゲルの投与部位滞留性を決定することが示唆された。



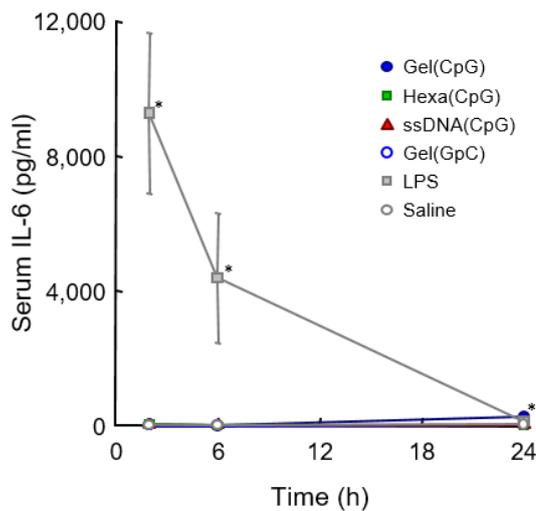
**Figure 6 Retentivity of DNA hydrogel at the injection site.** Radioactivity in the injection site after intradermal injection of  $^{32}\text{P}$ -DNA. Mice were injected with  $^{32}\text{P}$ -DNA hydrogel(CpG) at various DNA concentrations into the dorsal skin. (a) Dose of DNA was 220  $\mu\text{g}/\text{shot}$ . (b) Dose of DNA was 10  $\mu\text{l}/\text{shot}$ . 24 hour after injection, the skin tissue including the injection site was collected, and radioactivity was counted.

### 1.5 CpG DNA の組織分布と IL-6 発現の上昇の相関関係評価

マウス背部皮内に各種 DNA を投与し、投与部位ならびに所属リンパ節での免疫活性を評価するために、IL-6 の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法により定量した。ssDNA(CpG)の投与では、mRNA 発現はわずかに増大した (Fig. 7a)。一方で、hexapodna(CpG)と DNA hydrogel(CpG)では投与 6 時間で投与部位における有意な IL-6 mRNA の発現増大が認められた。DNA hydrogel(CpG)投与群においては、投与 24 時間後においても発現が高値を示した。また所属リンパ節においても移行プロファイルと対応して、24 時間後に高い IL-6 発現が認められた (Fig. 7b)。DNA サンプルを背部皮内に投与後の血清中の IL-6 濃度は非常に低かったことから、DNA hydrogel(CpG)は DNA が滞留および移行する局所において IL-6 発現を増大させることが示唆された (Fig. 8)。



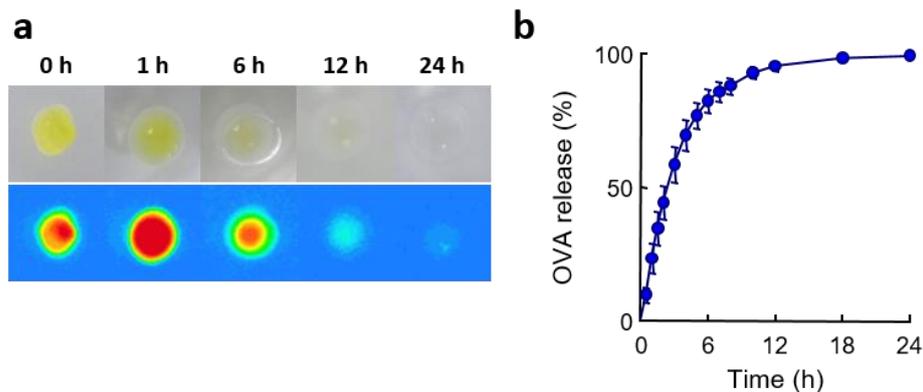
**Figure 7. Upregulation of IL-6 mRNA expression by DNA hydrogel(CpG).** mRNA expression of IL-6 in the injection site (a) and in draining lymph nodes (b) after intradermal injection of DNA. Mice were injected with DNA samples at a dose of 220  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  into the dorsal skin. At the indicated times, the IL-6 mRNA expression was evaluated by real-time PCR. Results are normalized to the internal control  $\beta$ -actin gene, and are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three or four mice. Data shown are representative of three independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with ssDNA(CpG) and all the GpC groups, # $P < 0.05$  compared with all the others at the same time point.



**Figure 8. IL-6 concentration in mouse serum after intradermal injection of DNA into mice.** Mice were treated as described in the caption of Fig.7, and serum samples obtained by bleeding from the tail vein at the times indicated. The IL-6 levels in serum samples were measured by ELISA. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three mice. Data shown are representative of two independent experiments. \*P < 0.05 compared with the saline group.

### 1.6 DNA ハイドロゲルからの OVA の放出性評価

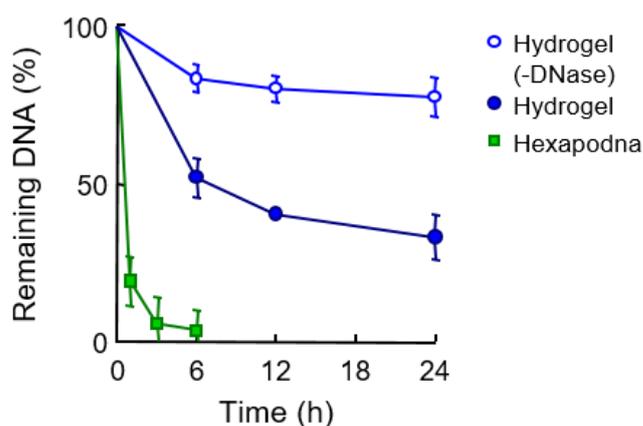
以上の検討により、DNA hydrogel(CpG)が、注射投与可能な免疫活性型ハイドロゲルであることが明らかとなった。そこで、卵白アルブミン OVA をモデル抗原として選択し、このハイドロゲルへの抗原の内包ならびに徐放化について検討した。OVA の放出を視覚化するために、FITC で標識した OVA、FITC-OVA を DNA hydrogel(CpG)に内包した。Fig. 9a に FITC-OVA/DNA hydrogel(CpG)の明視野画像と蛍光画像を示す。画像から、ハイドロゲルはインキュベート 1 時間後には膨潤し、FITC-OVA 由来の黄色は時間と共に薄くなっていくことが示された。また、溶液中の蛍光強度を測定したところ、FITC-OVA はハイドロゲルから半減期約 2.5 時間で放出されることが明らかとなった (Fig. 9b)。



**Figure 9. OVA release from DNA hydrogel.** (a, b) Time course of OVA release from DNA hydrogel. FITC-OVA (50  $\mu$ g) was encapsulated into 220  $\mu$ g of DNA hydrogel(CpG) and placed into the upper chamber of the Transwell (0.4  $\mu$ m pore size) with the bottom chamber containing PBS, and incubated at 37  $^{\circ}$ C. The bright field (a, upper) and fluorescent images (a, lower) of the gel were photographed at the indicated times. The concentration of FITC-OVA in the bottom chamber was measured and plotted against time (b). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three wells per sample. Data shown are representative of three independent experiments.

### 1.7 DNA ハイドロゲルの酵素安定性評価

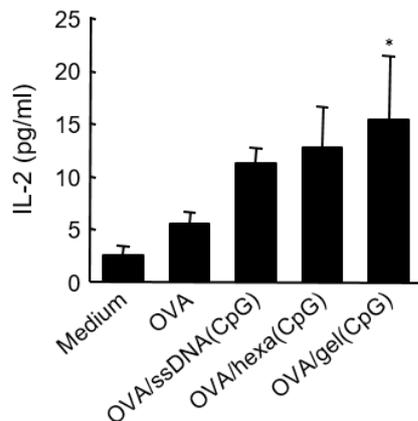
Fig. 10 に、DNase I 存在下における DNA hydrogel(CpG)と hexapodna(CpG)<sub>8np-32-A</sub> の安定性を示す。DNA hydrogel(CpG)は hexapodna(CpG)<sub>8np-32-A</sub> と比較して、高い酵素耐性を有することが明らかとなった。



**Figure 10. Degradation of DNA hydrogel and hexapodna by DNase I.** DNA samples were incubated at 37  $^{\circ}$ C in the presence of DNase I and the remaining amounts of DNA were plotted against time. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three independent determinations per sample.

### 1.8 抗原提示能評価

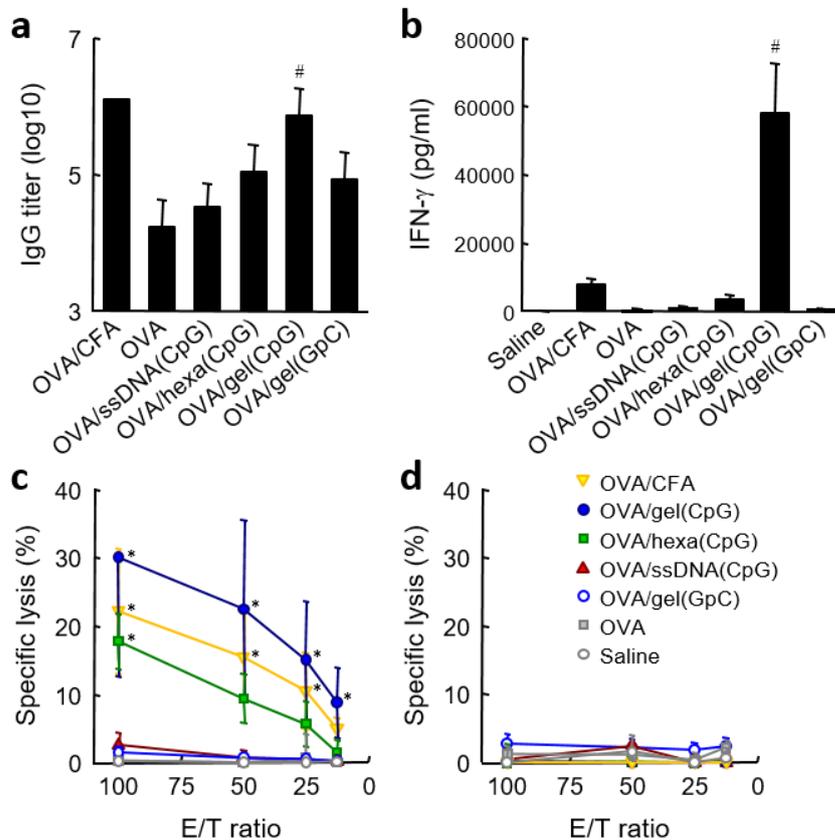
OVA を内包した DNA ハイドロゲルの抗原提示能を、マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞を用いて評価した。DC2.4 細胞に OVA を種々の DNA サンプルと同時に添加し、OVA の MHC class I エピトープ (OVA<sub>257-264</sub>) に反応して IL-2 を産生する CD8OVA1.3 細胞を用いて抗原提示を評価した。その結果、OVA 単独と比較して、DNA hydrogel(CpG)を添加することで IL-2 産生が有意に増大した (Fig. 11)。



**Figure 11. Antigen presentation in dendritic cells.** IL-2 secretion from CD8OVA1.3 cells. DC2.4 cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were added with OVA (2 mg/ml) and CpG DNA (2  $\mu$ g/ml), and incubated for 24 h. Thereafter, CD8OVA1.3 cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were added to each well and incubated for an additional 24 h. The IL-2 concentration in culture media was measured by ELISA. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of three independent determinations per sample. Data shown are representative of two independent experiments. \*P < 0.05 compared with the OVA alone group.

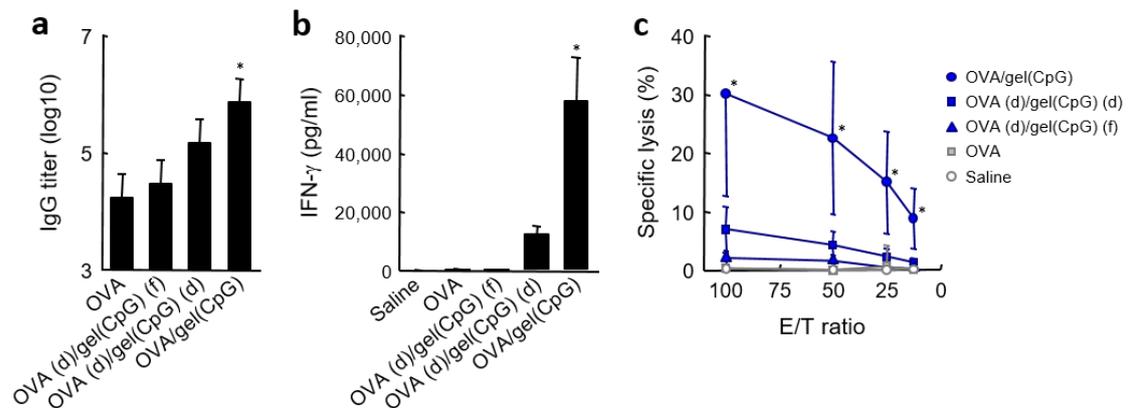
### 1.9 OVA 内包 DNA ハイドロゲルによる抗原特異的免疫応答の誘導評価

マウスに投与したときの *in vivo* における免疫アジュバント能を評価した。マウス背部皮内に 7 日間隔で 3 回免疫を行い、最終免疫から 7 日後に血清ならびに脾細胞を回収した。高い有効性を示すものの毒性が強いことで知られるフロイントの完全アジュバント (CFA) をポジティブコントロールとして使用した。血清中抗体価は、DNA hydrogel(CpG)に OVA を内包して免疫した群において、ssDNA(CpG)または hexapodna(CpG)免疫群と比較して有意に高い値を示した (Fig. 12a)。また、OVA 再刺激後の脾細胞からの IFN- $\gamma$  産生についても、DNA hydrogel(CpG)投与群で高く、この値は CFA 投与群よりも有意に高いことが示された (Fig. 12b)。さらに、OVA を発現する EG7-OVA 細胞に対する細胞傷害性 T 細胞、CTL 活性についても、OVA 単独投与群と比較して、DNA hydrogel(CpG)投与群で有意に高い活性を示した (Fig. 12c)。一方で、OVA を発現しない EL4 細胞に対する CTL 活性は認められなかった。



**Figure 12. Induction of OVA specific immune responses after intradermal injection of OVA into mice.** (a) OVA-specific total IgG in mouse serum after immunization. Mice were immunized with OVA with or without DNA by three intradermal injections at weekly intervals. At 7 days after the last immunization, the OVA-specific total IgG levels in serum were measured by ELISA. Serum total IgG titers were estimated by the dilution ratio at which the absorbance value of the saline group was obtained. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three or four mice. Data shown are representative of three independent experiments. #P < 0.05 compared with all the other OVA/DNA groups. (b) IFN- $\gamma$  production from splenocytes after re-stimulation with OVA. At seven days after the last immunization, splenocytes collected were added with OVA (1 mg/ml), and incubated for 4 days. The IFN- $\gamma$  concentration in culture media was measured by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three or four mice. Data shown are representative of two independent experiments. #P < 0.05, statistically significant compared with the other groups. (c, d) CTL activity after immunization of mice with OVA. Seven days after the last immunization, splenocytes collected ( $5 \times 10^7$  cells) were co-cultured with mitomycin C-treated EG7-OVA ( $5 \times 10^6$  cells) for 5 days. EG7-OVA (c) or EL4 (d) were labeled with  $^{51}\text{Cr}$  as target cells and co-incubated with the effector cells at the indicated ratio for 4 h. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three or four mice. Data shown are representative of two independent experiments. \*P < 0.05 compared with the OVA alone group.

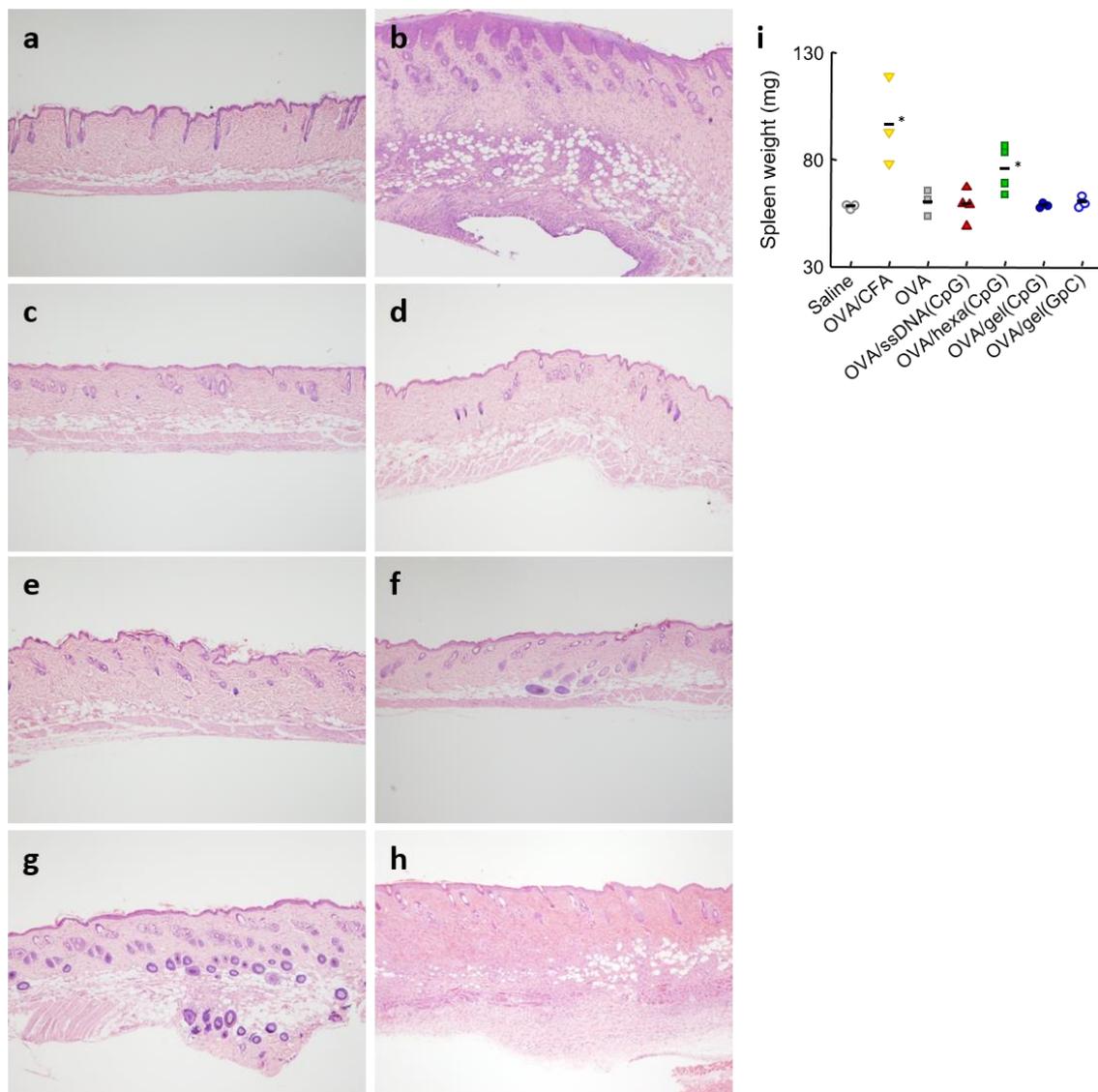
OVA を背部に投与し、DNA ハイドロゲルをフットパッドに投与した場合 (OVA(d)/gel(CpG)(f)) ならびに両者を背部の別々の場所に投与した場合 (OVA(d) gel(CpG)(d)) では、両者を背部の同じ場所に投与した場合 (OVA/gel(CpG)) と比較して、OVA 特異的抗体価、脾細胞を OVA で再刺激後 IFN- $\gamma$  産生、EG7-OVA 細胞に対する CTL 活性のすべての値が低くなった (Fig. 13)。



**Figure 13. Induction of OVA specific immune responses after injection of OVA and DNA hydrogel(CpG) to different sites.** Mice were immunized as indicated in the caption of Fig. 12 except for the injection sites. In some groups, OVA and DNA hydrogel(CpG) were separately injected into the dorsal skin (*d*) or footpad (*f*). Serum total IgG titers (a), IFN- $\gamma$  production from splenocytes (b), and CTL activity against EG7-OVA cells (c) were shown. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three mice. \* $P < 0.05$  compared with the OVA alone group.

#### 1.10 DNA ハイドロゲルによる炎症性副作用評価

アジュバント投与時に問題となる炎症性の副作用について検討した。CFA あるいは臨床で用いられるアジュバントであるアラムを投与した群では、投与部位で皮膚の著しい肥厚と、炎症性細胞の浸潤が認められた (Fig. 14a-h)。これに対し、DNA ハイドロゲル投与群では、顕著な変化は認められなかった。また、全身性の副作用として、脾臓の肥大化を評価したところ、CFA 投与群では有意な脾臓の肥大化が認められたものの、DNA ハイドロゲル投与群では肥大化は認められなかった (Fig. 14i)。以上より、DNA ハイドロゲルは、CFA やアラムとは異なり、炎症性副作用を強く誘導しないことが示唆された。

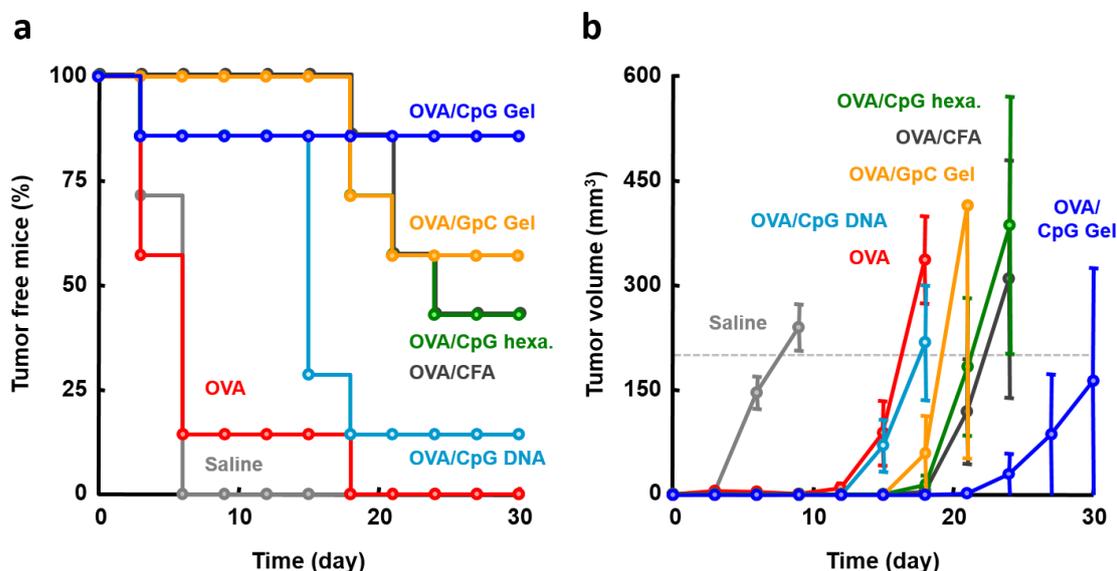


**Figure 14. Skin inflammation and splenomegaly after intradermal injection of OVA into mice.** (a–h) Hematoxylin and eosin-stained skin sections after intradermal injection of saline (a), OVA/CFA (b), OVA/DNA hydrogel(CpG) (c), OVA/ssDNA(CpG) (d), OVA (e), OVA/hexapodna(CpG) (f), OVA/DNA hydrogel(GpC) (g), or OVA/alum (h). At 7 days after injection, the paraffin sections of the skin tissue including the injection site were stained with hematoxylin and eosin. The original magnification was 25 ×. (i) Spleen weight of mice after immunization. Mice were immunized three times as described in the caption of Fig. 10 At 7 days after the last immunization, the weight of the spleen was measured. Results are expressed as mean (bar) and individual values (dots). \*P < 0.05 compared with the saline.

### 1.11 DNA ハイドロゲルによる抗腫瘍効果評価

抗腫瘍免疫の誘導について評価した。マウス背部皮内に 7 日間隔で、3 回免疫を行い、最終免疫から 7 日後に OVA を発現する EG7-OVA 細胞をマウスに移植し、腫瘍発生率と腫瘍体積を評価した。その結果、OVA 単独や他のアジュバントで免疫した群と比較して、

OVA/CpG DNA ハイドロゲル投与群で、腫瘍の形成および増殖が抑制されることが示された (Figure. 15)。



**Figure 15. Antitumor effect of OVA/DNA hydrogel(CpG).** Mice were immunized as indicated in the caption of Fig. 12. Seven days after last immunization, EG7-OVA cells ( $5 \times 10^6$  cells) were intradermally inoculated. The ratio of tumor free mice (a) and tumor volume (b) was evaluated. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M of seven mice.

## 1.12 考察

近年、DNA ナノテクノロジーに分類される研究領域は急速に発展しており、DNA を基盤とした多くのシステムが報告されている<sup>17-20</sup>。このようなシステムのうちの1つがDNA ハイドロゲルであり、病態情報薬学分野を含めた複数のグループがDNA ハイドロゲルを開発し、その応用例について報告している<sup>11-14</sup>。本研究で開発したDNA を基盤とした素材はFig. 2a で示すように微小歪みで弾性を示すハイドロゲルである。さらに、このハイドロゲルは自重では流れないものの、細い注射針を容易に通過すること、ゲルとしての特徴を有することを明らかにした。本研究で開発したDNA ハイドロゲルには他のDNA ハイドロゲルよりも優れた特性が複数存在する。第一に、このDNA ハイドロゲルはきわめて細い29ゲージの注射針を通過可能なことが挙げられる。患者への投与を考えた場合、埋め込み型のシステムと比較して注射投与可能なシステムの方が、侵襲性が低く優位性があると考えられる。第二に、ハイドロゲルの調製やゲル化に化学物質が不要な点が挙げられる。DNA ハイドロゲルは短鎖DNA と水、塩のみで構成されるために、生体適合性と生分解性が非常に高い。最後に、ハイドロゲルは生理活性物質の徐放システムとして非常に重要であると社会的に認識されている点が挙げられる<sup>21-23</sup>。以上より、本研究で開発したDNA ハイドロゲル

は有用な薬物徐放システムとなり得ると考えられる。さらに、CpGモチーフを含まない DNA hydrogel(GpC)では免疫活性化能は見られなかったことから、DNA の配列を目的に応じて調節することで、DNA ハイドロゲルは免疫活性化システムと免疫不活性システムの両方に応用可能である (Fig. 4、 7)。

Hexapodna 投与群ではアジュバント活性が低かったことから、DNA ハイドロゲルは実際に注射投与後に形成されること、ゲルの形成が OVA 特異的免疫応答の誘導に重要と考えられる。局所に注射投与された DNA のクリアランスは主に DNase による分解と DNA の全身循環への吸収を介して行われる<sup>24)</sup>。ゲル化により立体障害だけでなく、遊離した末端の数が減少するために、ゲルの形成により分解が抑制されると考えられる。投与部位からの化合物の吸収は分子量と相関することから、ゲル形成は DNA サンプルのクリアランスの遅延に有効である。Liu らは抗原と CpG DNA の複合体が抗原特異的免疫応答の誘導に重要であることを報告しており、OVA と CpG hexapodna の複合体が OVA 特異的免疫応答の誘導に有用である可能性がある<sup>25)</sup>。

また、本研究では、DNA ハイドロゲルが極めて短時間で網目の組み換えを起こすことが明らかとなった。動的測定から、ハイドロゲルは 0.25 秒のタイムスケールで再構築されることが示唆され、この特性は大部分のハイドロゲルには見られない DNA ハイドロゲルに独特な特性である<sup>15)</sup>。ハイドロゲルに応力が加わると、架橋が乖離するとともに、遊離した末端は結合相手を変えて即座に水素結合を介して再会合する。この乖離・会合の過程により、DNA ハイドロゲルはきわめて細い注射針を通過可能であり、注射後即座にゲル化するものと考えられる。

CpG DNA ハイドロゲルと GpC DNA ハイドロゲルでは反応性が大きく異なっていたことから、TLR9 による CpG DNA の認識が OVA 特異的免疫応答の誘導に関与していると考えられる。また、抗原特異的免疫応答の誘導には免疫活性化が重要であることが、CpG DNA を利用した複数の報告で示されている<sup>26-28)</sup>。ssDNA や hexapodna の機能は限定的であったことから、OVA 特異的免疫応答の誘導には OVA の持続的放出が重要であることが示唆された。

以上、第一章では、免疫を活性化する CpG モチーフを含む ODN を利用して、リガーゼを使用せずに、注射投与可能で免疫活性化作用のある DNA ハイドロゲルを開発することに成功し、この DNA ハイドロゲルは OVA を徐放し抗原特異的免疫応答を効率的に誘導可能な安全なシステムであることを明らかにした。

## 第二章 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

### 第一節 カチオン化抗原を利用した DNA ハイドロゲルからの抗原徐放化

癌免疫療法に限らず、癌に対する放射線療法や化学療法においても、免疫の活性化により癌細胞が排除されることで治療効果が得られると考えられる<sup>29)</sup>。前臨床および臨床試験において、癌関連抗原を投与することで腫瘍増殖抑制に必要な抗原特異的免疫応答が誘導されることが示されている<sup>30)</sup>。近年、自然免疫を活性化するアジュバントが強力な受動免疫を誘導するために必要であることが報告されている<sup>31)</sup>。さらに、抗原デリバリーシステムは、自然免疫を活性化するだけでなく、抗原提示細胞に抗原を持続的に送達する機能が必要とされる<sup>31)</sup>。また、アジュバントは安全かつシンプルであり化学合成可能で生分解性であることが求められる<sup>32)</sup>。近年、抗原デリバリーに関する研究が活発に行われおり、化学合成されたハイドロゲルやナノ粒子を利用した例が多く報告されている<sup>33-35)</sup>。

活発に研究されているアジュバントの1つが哺乳類の免疫細胞に発現するTLR9により認識されるCpG DNAである<sup>5, 6, 36)</sup>。前章では、リガーゼを使用せずにDNA ハイドロゲルを製作することに成功し、このDNA ハイドロゲルが注射投与可能で、ハイドロゲルの構成ユニットとOVAを混合するだけでOVAを内包可能であることを明らかにした。さらに、OVAを内包したCpG DNA ハイドロゲルが、フロイントの完全アジュバントCFAやアラムと比較して、炎症性の強い副作用を誘導せずに、効率的にOVA特異的な免疫応答が誘導可能であることを見出した。しかしながら、OVAのDNA ハイドロゲルからの放出は半減期約2.5時間と比較的速やかであり、この速やかな放出がアジュバント活性を有する抗原デリバリーシステムとしてのCpG DNA ハイドロゲルの効果を減弱させている可能性が考えられる。

抗原放出速度の異なるPLGA ナノ粒子を用いた検討において、抗原の持続的な放出により抗原特異的免疫応答の誘導が増強されることが報告されている<sup>37)</sup>。DNAは負電荷を帯びたOVAとは強く相互作用をしないが、カチオン性化合物とは静電的相互作用により複合体を形成すると考えられる。そこで本節では、モデル抗原としてOVAを選択し、化学修飾によりOVAに正電荷を付与したカチオン化OVA及びOVAのMHC class I エピトープペプチドに正電荷アミノ酸を連結したカチオン化抗原ペプチドを利用することで、DNA ハイドロゲルからの抗原の放出制御ならびに抗腫瘍効果の増強を試みた。

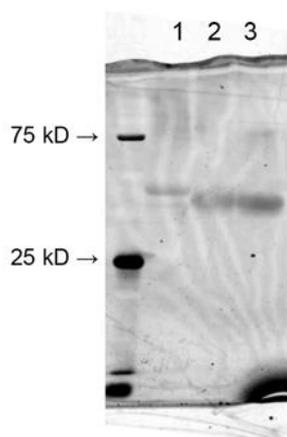
#### 2.1.1 カチオン化OVAの合成

縮合剤である1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDAC)を用いて、OVAのカルボキシル基とエチレンジアミン(ED)のアミノ基との脱水縮合反応に

よりカチオン化 OVA (ED-OVA) を合成した。反応後の ED-OVA は限外濾過により精製し、その後、タンパク定量とアミノ基定量により、反応物と生成物中の 1 分子あたりのアミノ基の数を算出した。Table 2 に ED-OVA のカルボキシル基の修飾数と電荷を示す。エチレンジアミンと OVA の割合を変えて反応させることで、OVA 一分子当たりのカルボキシル基の平均修飾数が 7.3 の ED<sub>7</sub>-OVA と 16.7 の ED<sub>17</sub>-OVA を得た。アミノ酸構成と修飾数から総電荷を計算したところ、どちらの ED-OVA も正電荷を有するものと考えられた。また、ED-OVA について SDS-PAGE を行ったところ、OVA とほぼ同じ位置に単一バンドが認められたことから、合成反応により分子間での共有結合形成に基づくオリゴマーは形成されていないことが示唆された (Fig. 16)。

**Table 2.** Characteristic of ED-OVA derivatives. OVA was modified with ED using EDAC. The degree of cationization was assessed by estimating the additional amino groups as measured by TNBS.

	Amount of reactant			Modified carboxyl group	Net charge
	OVA	0.5 M ED	EDAC		
	(mg)	(mL)	(mg)		
OVA	—	—	—	0	-5.0
ED <sub>7</sub> -OVA	100	10.0	31.2	7.3	+9.6
ED <sub>17</sub> -OVA	100	16.0	53.0	16.7	+28.4

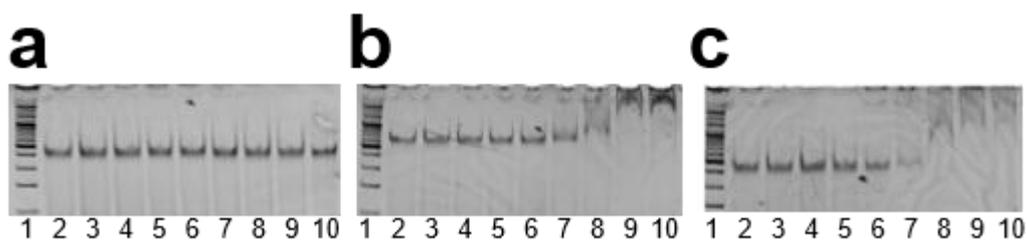


**Figure 16.** SDS PAGE analysis of synthesized ED-OVAs. Protein was detected with Lumitein Protein Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, USA). Lane 1: OVA, lane 2: ED<sub>7</sub>-OVA, lane 3: ED<sub>17</sub>-OVA.

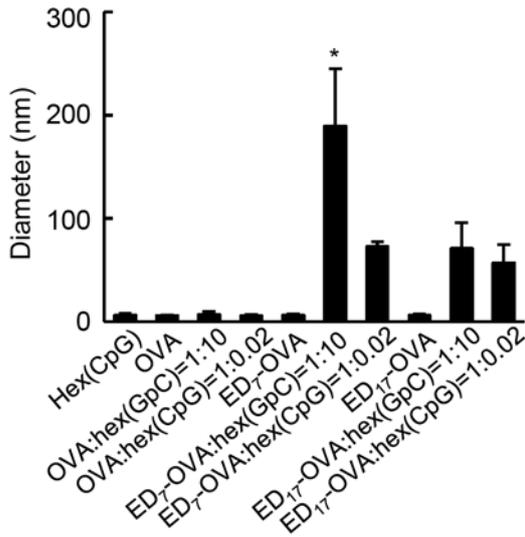
## 2.1.2 カチオン化 OVA と DNA との相互作用

本節において使用した DNA ハイドロゲルの DNA 配列は第一章における DNA hydrogel(CpG)と同じものであり、第一章と同様に DNA ハイドロゲルを調製した。また、CpG 配列を GpC 配列に置換した GpC DNA ハイドロゲルをコントロールとして使用した。

OVA あるいは ED-OVA と DNA との複合体形成をポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) により評価した。すなわち、モデル DNA として GpC hexapodna-1 と OVA あるいは ED-OVA を様々な割合で混合し、37°C で 15 分間インキュベート後に PAGE を行い、エチジウムブロマイド (EtBr) により DNA を検出することで、移動度の比較により相互作用を評価した。その結果、ED-OVA の混合割合を多くする程、PAGE における GpC hexapodna-1 の移動度が低下した (Fig. 17)。一方で、OVA では GpC hexapodna-1 と混合しても、DNA の移動度は変化しなかった。また、DLS 測定から、ED-OVA と GpC hexapodna-1 との混合物の粒子径は、ED-OVA 単独、GpC hexapodna-1 単独と比較して大きいことが示された (Fig. 18)。OVA と GpC hexapodna-1 を混合したサンプルでは、OVA 単独、GpC hexapodna-1 と比較して粒子径に変化は認められなかった。さらに、OVA と ED-OVA では、粒子径に有意な差が認められず、カチオン化により分子間の凝集体は形成されていないことが示された。以上の結果から、ED-OVA と DNA を混合することで、静電的相互作用による複合体が形成されることが示唆された。



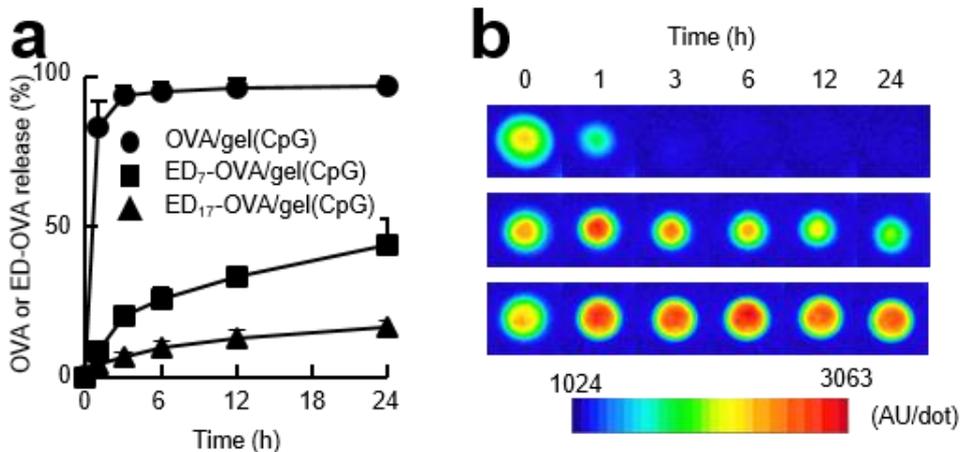
**Figure 17. Properties of OVA and ED-OVAs mixed with hexapodna.** (a) OVA, (b) ED<sub>7</sub>-OVA, or (c) ED<sub>17</sub>-OVA was incubated with hexapodna at different mixing ratios for 15 min at 37 °C. The mixture was then subjected to electrophoresis using a 6 % polyacrylamide gel at 200 V for 20 min, and DNA was detected with ethidium bromide. The molar ratios of GpC hexapodna and OVA or ED-OVAs were 1:0 (lane 2), 1:0.1 (lane 3), 1:0.2 (lane 4), 1:0.4 (lane 5), 1:1 (lane 6), 1:5 (lane 7), 1:10 (lane 8), 1:50 (lane 9), and 1:100 (lane 10). The 100 bp DNA ladder is shown in lane 1 (Watson, Tokyo, Japan).



**Figure 18. Measurement of diameter.** Saline solutions of OVA or ED-OVAs (0.1 mg/ml), and CpG hexapodna-1 (0.1 mg/ml) were prepared, and mixed at various proportions. The size was then measured by DLS and expressed as the mean  $\pm$  S.D. of twenty independent measurements. \* $P < 0.05$  compared with the other groups.

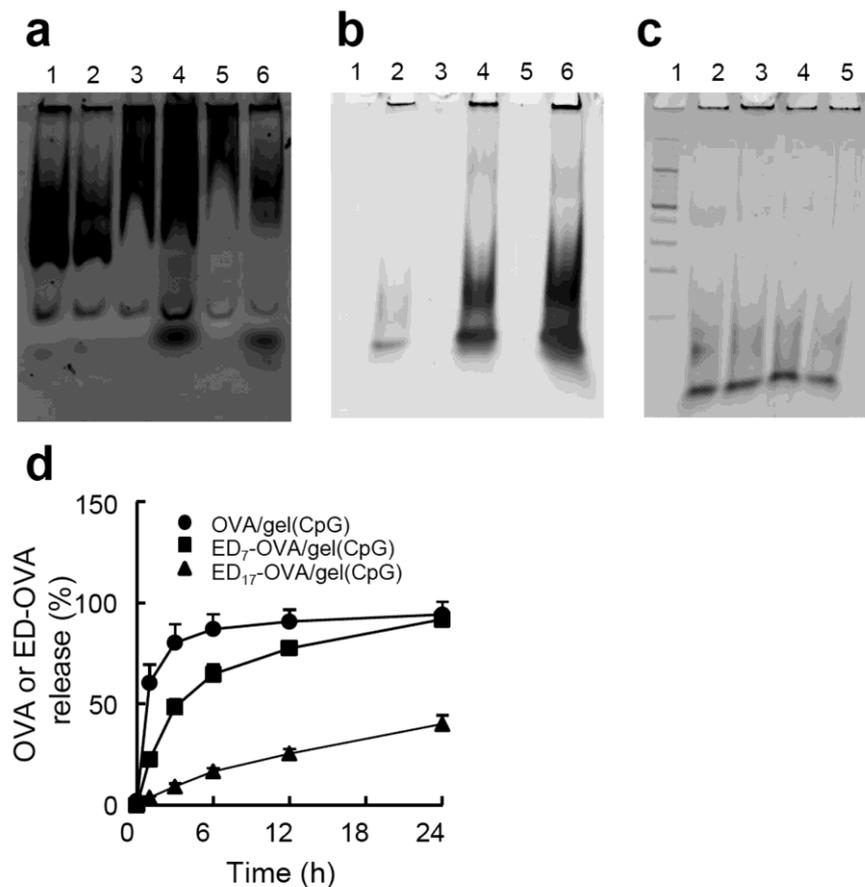
### 2.1.3 カチオン化 OVA の DNA ハイドロゲルからの放出性評価

FITC で標識した OVA (FITC-OVA) または ED-OVA (FITC-ED-OVA) を CpG DNA ハイドロゲルに内包し、Transwell の upper chamber に添加後の bottom chamber の蛍光強度の経時変化を Fig. 19a に示す。FITC 由来の蛍光強度の測定及び蛍光イメージングから評価を行った。FITC-OVA は DNA ハイドロゲルから 1 時間以内に 80%以上が放出されたのに対し、FITC-ED-OVA の放出は緩やかであった。また、ED<sub>7</sub>-OVA と比較して ED<sub>17</sub>-OVA の放出は遅かったことから、放出速度は修飾数に依存して遅延することも示された。また、蛍光画像からも FITC-ED-OVA の徐放性が確認された (Fig. 19b)。



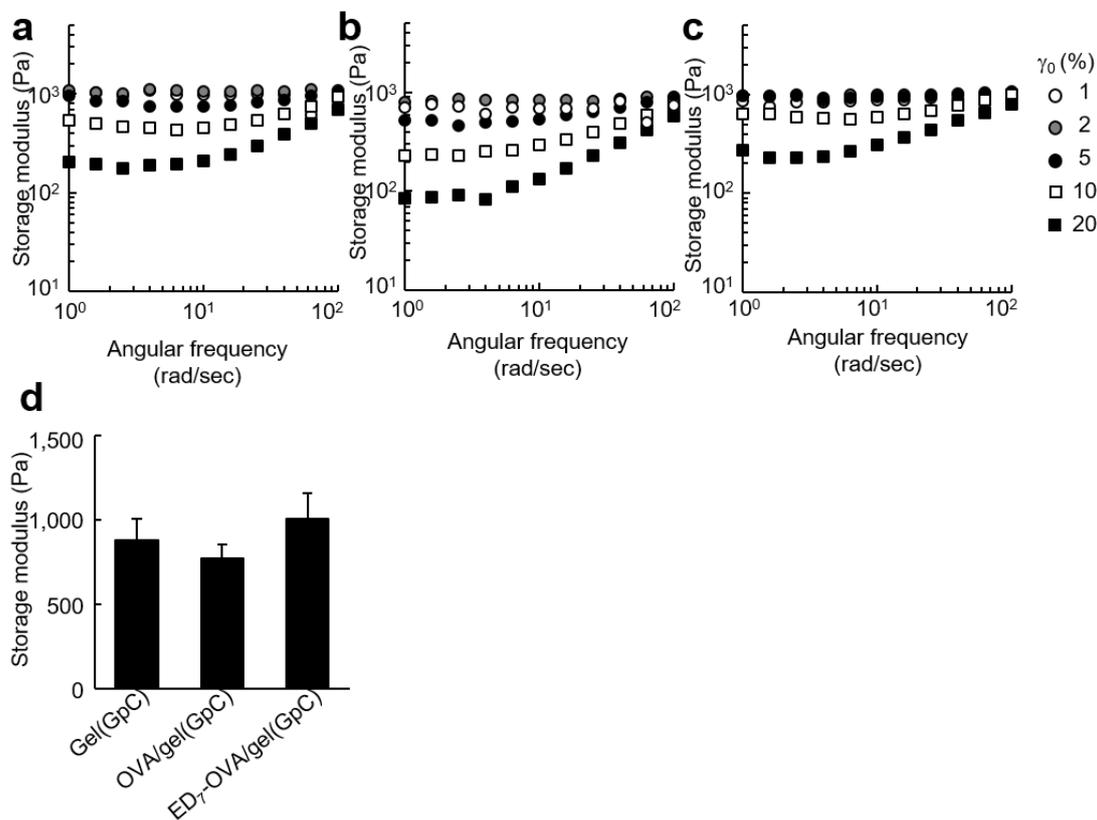
**Figure 19. Release of OVA and ED-OVAs from DNA hydrogel.** (a) FITC-OVA or FITC-ED-OVAs (10  $\mu$ g) were incorporated into 100  $\mu$ g of CpG DNA hydrogel, and the product was placed into the upper chamber of the Transwell (0.4  $\mu$ m pore size) with the bottom chamber containing phosphate buffered saline (PBS), and incubated at 37°C. The fluorescence intensity of the solution in the bottom chamber was measured, and the percentages of OVA or ED-OVAs released were calculated and plotted against time. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of four independent samples. Results are typical of three separate experiments with similar results. (b) The fluorescent images of the hydrogel in the upper chamber were photographed at the indicated times: (upper) OVA, (middle) ED<sub>7</sub>-OVA, and (lower) ED<sub>17</sub>-OVA.

DNA ハイドロゲルから放出されたサンプルの存在状態を評価するために、FITC-OVA または FITC-ED-OVA 内包 CpG DNA ハイドロゲルをインキュベート 3 時間後の上清を回収し、PAGE を行った (Fig. 20a-c)。非変性条件で泳動を行ったため、FITC-OVA と FITC-ED-OVA のバンドはスミアであった (Fig. 20a)。ED-OVA と DNA のバンドの位置が一部重なったことから、ED-OVA は DNA と複合体を形成した状態でハイドロゲルから放出されることが示唆された。また、FITC-ED-OVA の放出は、DNase を含む FBS 存在下で加速された (Fig. 20d)。この結果は、DNase により DNA が分解されることで、静電的相互作用で DNA に結合していた ED-OVA が放出された結果と推察された。



**Figure 20. Release of OVA or ED-OVAs in the presence of FBS and PAGE analysis of released samples from DNA hydrogel.** (a - c) FITC-OVA or FITC-ED-OVAs (10  $\mu$ g) were incorporated into 100  $\mu$ g of CpG DNA hydrogel (10  $\mu$ l) in a 0.6 ml tube, and 10  $\mu$ l PBS was added. After a 3 h incubation at 37°C, the supernatant was collected and subjected to electrophoresis using a 6 % polyacrylamide gel at 200 V for 20 min. (a) FITC-OVA or FITC-ED-OVAs were detected by fluorescence intensity. Lane 1, FITC-OVA; lane 2, FITC-OVA/gel (CpG); lane 3, FITC-ED<sub>7</sub>-OVA; lane 4, FITC-ED<sub>7</sub>-OVA/gel (CpG); lane 5, FITC-ED<sub>17</sub>-OVA; lane 6, FITC-ED<sub>17</sub>-OVA/gel (CpG). (b, c) DNA was detected with ethidium bromide. (b) Lane 1, FITC-OVA; lane 2, FITC-OVA/gel (CpG); lane 3, FITC-ED<sub>7</sub>-OVA; lane 4, FITC-ED<sub>7</sub>-OVA/gel (CpG); lane 5, FITC-ED<sub>17</sub>-OVA; lane 6, FITC-ED<sub>17</sub>-OVA/gel (CpG). (c) Lane 1, 100 bp DNA ladder; lane 2, Gel (CpG); lane 3, FITC-OVA/gel (CpG); lane 4, FITC-ED<sub>7</sub>-OVA/gel (CpG); lane 5, FITC-ED<sub>17</sub>-OVA/gel (CpG). (d) FITC-OVA or FITC-ED-OVAs (10  $\mu$ g) were incorporated into 100  $\mu$ g of CpG DNA hydrogel, and the product was placed into the upper chamber of the Transwell (0.4  $\mu$ m pore size) with the bottom chamber containing PBS (25% FBS), and incubated at 37°C. The fluorescence intensity of the PBS in the bottom chamber was measured, and the percentages of OVA or ED-OVAs released were calculated and plotted against time. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of four independent samples. Results are typical of two separate experiments with similar results.

さらに、レオメーターにより GpC DNA ハイドロゲル及び OVA 内包 GpC DNA ハイドロゲル、ED-OVA 内包 GpC DNA ハイドロゲルの粘弾性測定を行ったところ、貯蔵弾性率に有意差は認められなかった。このことから、抗原タンパク質を内包しても DNA ハイドロゲルの粘弾性は有意に変化しないことが示された (Fig. 21)。

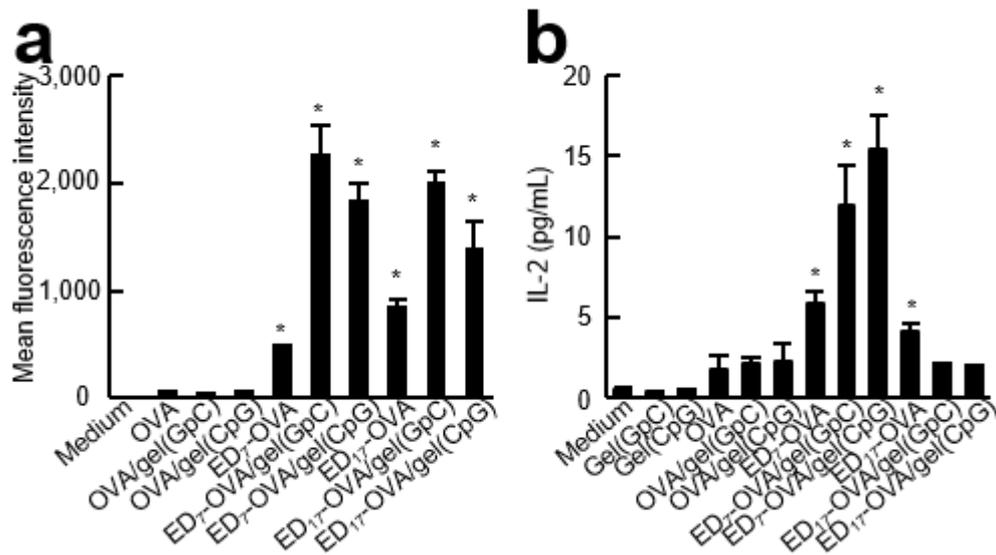


**Figure 21. Rheological characterization of DNA hydrogel containing OVA or ED<sub>7</sub>-OVA at room temperature.** OVA or ED<sub>7</sub>-OVA (22 μg each) was incorporated into 220 μg of GpC DNA hydrogel (10 μl). Storage modulus (G') was measured for sinusoidal strain at various angular frequencies ( $\omega$ ) and with the amplitude ( $\gamma_0$ ) as indicated. Data shown are representative of three independent experiments. (a) Gel (GpC), (b) OVA/gel(GpC), (c) ED<sub>7</sub>-OVA/gel(GpC). (d) Storage modulus at sinusoidal strain 1 %. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of three independent samples.

#### 2.1.4 カチオン化 OVA の抗原提示細胞による取り込みおよび抗原提示能評価

マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞によるカチオン化 OVA の細胞取り込み及び抗原提示を評価した。細胞取り込みは、DC2.4 細胞に FITC-OVA または FITC-ED-OVA を DNA ハイドロゲルと同時に添加し、インキュベート 2 時間後の DC2.4 細胞の蛍光強度をフローサイトメトリーを用いて測定することで評価した (Fig. 22a)。FITC-ED-OVA 添加群は FITC-OVA 添加群と比較して高い平均蛍光強度 (MFI) 値を示した。また、CpG DNA ハイドロゲルの添加により、FITC-ED-OVA の細胞取り込みは有意に増大した。一方で、CpG DNA ハイドロゲルを添加しても FITC-OVA の細胞取り込みは増大しなかった。CpG DNA ハイドロゲルに変えて GpC DNA ハイドロゲルの添加でも同様の結果が得られた。

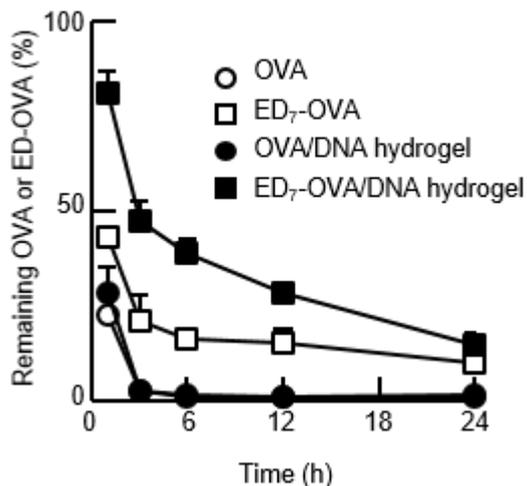
抗原提示は、DC2.4 細胞に OVA または ED-OVA を DNA ハイドロゲルと同時に添加し、OVA の MHC class I エピトープに反応して IL-2 を産生する CD8OVA1.3 細胞を用いて、IL-2 を指標に評価した (Fig. 22b)。その結果、OVA と比較して ED-OVA 添加群において高い IL-2 産生が見られた。ED-OVA を比較すると、修飾率の低い ED<sub>7</sub>-OVA でより高い抗原提示が得られた。この修飾率が高い誘導体のほうが抗原提示が低いという結果は、病態情報薬学分野で行われた先行研究の結果と一致している<sup>38)</sup>。さらに、ED<sub>7</sub>-OVA に CpG DNA ハイドロゲルあるいは GpC DNA ハイドロゲルを添加することで IL-2 産生が有意に増大した。以上より、以降の検討にはより効率的に抗原提示される ED<sub>7</sub>-OVA を用いることとした。



**Figure 22. Cellular uptake and antigen presentation.** (a) DC2.4 cells were incubated with 500  $\mu\text{g/ml}$  FITC-OVA or FITC-ED-OVAs in the presence or absence of 10  $\mu\text{g/ml}$  CpG DNA hydrogel. The amounts of FITC-OVA or FITC-ED-OVAs associated with the cells were measured by flow cytometry. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of four independent samples. Results are typical of four separate experiments with similar results. \* $P < 0.05$  compared with the medium group. (b) DC2.4 cells were plated on 96-well culture plates at a density of  $5 \times 10^4$  cells/well and incubated overnight. DNA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) and OVA or ED-OVAs (500  $\mu\text{g/ml}$ ) were added to each well, and then  $5 \times 10^4$  CD8OVA1.3 cells were added and incubated at 37°C in 5%  $\text{CO}_2$  for an additional 24 h. The IL-2 concentration in culture media was measured by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of four independent samples. Results are typical of four separate experiments with similar results. \* $P < 0.05$  compared with the medium group.

### 2.1.5 カチオン化 OVA の投与部位滞留性評価

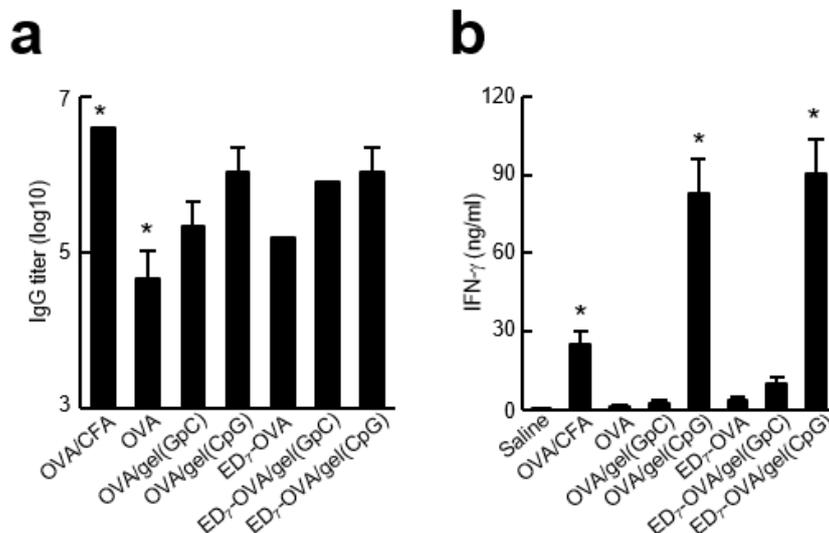
投与部位滞留性は FITC-OVA または FITC-ED<sub>7</sub>-OVA を DNA ハイドロゲルに内包し、マウス背部皮内に投与後、経時的にサンプリングした投与部位の蛍光強度を測定することで評価した (Fig. 23)。その結果、FITC-OVA 投与後の投与部位における蛍光強度は急速に低下した。また、FITC-OVA では CpG DNA ハイドロゲルに内包した場合においても消失速度に変化は認められなかった。一方で、FITC-ED<sub>7</sub>-OVA の投与部位からの消失は緩やかであり、さらに CpG DNA ハイドロゲルに内包して投与することで投与部位滞留性が有意に上昇した。このことから、カチオン化抗原を利用することで DNA ハイドロゲルからの抗原放出を遅延可能なことが示唆された。



**Figure 23. Disappearance of OVA or ED<sub>7</sub>-OVA from the injection.** ICR mice were intradermally injected with 10 µg FITC-OVA or FITC-ED<sub>7</sub>-OVA in the presence or absence of 100 µg CpG DNA hydrogel (10 µl/shot). At the indicated times after injection, mice were anesthetized and the skin tissues including the injection site were excised and homogenized. The fluorescence intensity of the supernatant of the homogenates was then measured. Results are expressed as mean ± S.D. of four mice. Results are typical of two separate experiments with similar results. \**P*<0.05 compared with the other groups.

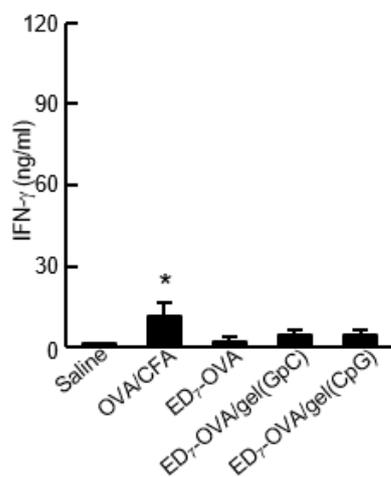
#### 2.1.6 カチオン化 OVA による抗原特異的免疫応答の誘導

OVA 特異的免疫応答の誘導を評価するために、マウス背部皮内に 7 日間隔で 3 回免疫を行い、最終免疫から 7 日後に血清及び脾細胞を回収した。OVA 特異的血清総 IgG 力価と、脾臓由来リンパ球を OVA で再刺激することで産生されるサイトカインを ELISA 法により測定した。Fig. 24a に血清中の OVA 特異的 IgG 抗体価を示す。OVA 投与群と比較して、ED<sub>7</sub>-OVA 投与群において高い OVA 特異的抗体価が認められた。また、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲル投与群では、ED<sub>7</sub>-OVA 単独投与群と比較して、より高い抗体価が得られた。ED<sub>7</sub>-OVA/GpC DNA ハイドロゲルは、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルと比較して、体液性免疫を誘導する効率は低いことが示された。Fig. 24b には OVA で再刺激後の脾細胞からの IFN-γ 産生を示す。OVA 単独投与群と比較して、ED<sub>7</sub>-OVA 単独投与群で高い IFN-γ 産生が見られた。また、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルの投与により、ED<sub>7</sub>-OVA 単独あるいは OVA/CpG DNA ハイドロゲルよりも高い IFN-γ 産生が認められた。



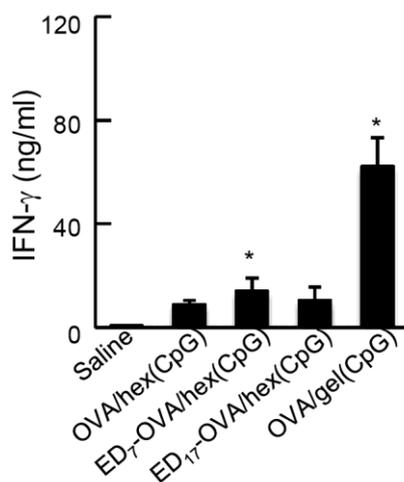
**Figure 24. Induction of OVA-specific immune responses after intradermal injection of OVA or ED<sub>7</sub>-OVA into mice.** (a) C57BL/6 mice were immunized with OVA or ED<sub>7</sub>-OVA with or without DNA by three intradermal injections at weekly intervals. On day 7 post the last immunization, OVA-specific total IgG levels in serum were measured by ELISA. Serum total IgG titers were estimated by the dilution ratio at which the absorbance value of the saline group was obtained. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of four mice (saline-, CFA-, and OVA-treated groups) or five mice (other groups). Results are typical of two separate experiments with similar results. \* $P$ <0.05 compared with the other groups. (b) On day 7 post the last immunization, splenocytes were collected, stimulated with OVA (1 mg/ml), and incubated for 4 days. The IFN- $\gamma$  concentration in culture media was measured by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of four mice (saline-, CFA-, and OVA-treated groups) or five mice (other groups). Results are typical of two separate experiments with similar results. \* $P$ <0.05 compared with the saline group.

また、TLR9 ノックアウトマウスに免疫した場合には CpG DNA ハイドロゲルによる IFN- $\gamma$  産生増強作用は認められなかった。したがって、TLR9 依存的に抗原特異的免疫応答が誘導されることが示唆された (Fig. 25)。



**Figure 25. Induction of OVA-specific immune responses after intradermal injection of OVA or ED<sub>7</sub>-OVA into TLR9 knockout mice.** TLR9 knockout mice were immunized with OVA or ED<sub>7</sub>-OVA with or without DNA by three intradermal injections at weekly intervals. On day 7 post the last immunization, splenocytes were collected, stimulated with OVA (1 mg/ml), and incubated for 4 days. The IFN- $\gamma$  concentration in culture media was measured by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of five mice. Results are typical of two separate experiments with similar results. \* $P$ <0.05 compared with the other groups.

第一章において、DNA hydrogel と比較して、hexapodna は急速に投与部位から消失することを示した。このため、ED<sub>7</sub>-OVA を hexapodna と混合して投与した場合は、ED<sub>7</sub>-OVA の投与部位からの消失は速やかになると考えられる。そこで、さらに、ED<sub>7</sub>-OVA と CpG hexapodna を混合後にマウスに免疫を行ったところ、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG hexapodna 投与群は OVA/CpG DNA ハイドロゲル投与群と比較して IFN- $\gamma$  の産生量は低く、効率的に抗原特異的免疫応答を誘導するためには、抗原が徐放されることが必要であることが示唆された (Fig. 26)。

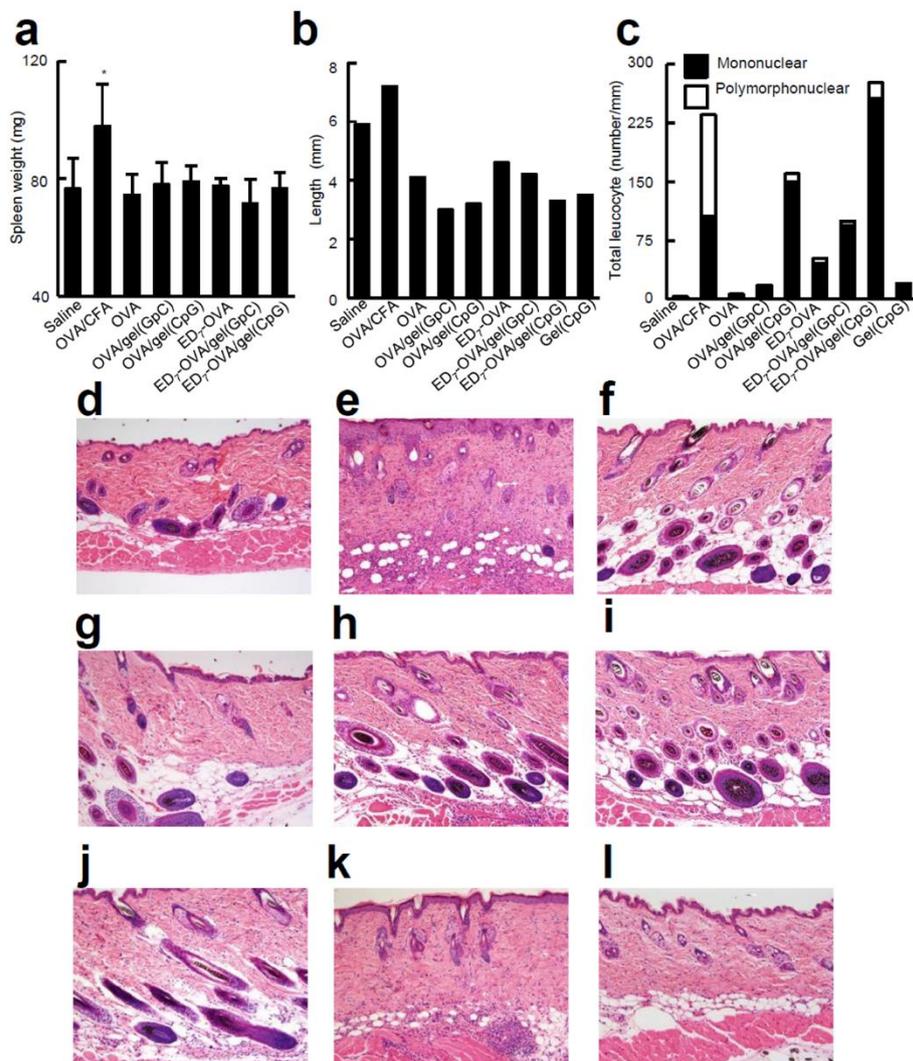


**Figure 26. Induction of OVA-specific immune responses after intradermal injection of OVA or ED-OVAs into mice.** Mice were immunized with 50  $\mu$ g OVA or ED-OVAs and 220  $\mu$ g hexapodna or DNA hydrogel by three intradermal injections at weekly intervals. On day 7 post last immunization, splenocytes were collected, stimulated with OVA (1 mg/ml), and incubated for 4 days. The IFN- $\gamma$  concentration in culture media was measured by ELISA. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of four mice. \* $P$ <0.05 compared with the saline group.

### 2.1.7 カチオン化 OVA による炎症性副作用評価

脾臓の肥大化を指標に全身性の副作用を評価したところ、OVA/CFA 投与群では有意な肥大化が認められた。これに対し、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲル投与群を含む他の群では有意な脾臓重量の増加は認められなかった (Fig. 27a)。

投与局所での副作用評価のために、投与部位における HE 切片から炎症の程度と炎症性細胞の浸潤を数値化した (Fig. 27b-l)。OVA/CFA 投与群と ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲル投与群では、投与部位に浸潤した炎症性細胞数には大きな違いは見られなかったものの、OVA/CFA 投与群では、表皮の著しい肥厚と、急性炎症反応の指標である多形核白血球の顕著な浸潤が認められた。一方で、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲル投与群では、免疫応答に関与するリンパ球を含む単核白血球の浸潤が認められたが、表皮の肥厚や多形核白血球の浸潤は認められなかった。このことから、OVA/CFA とは対照的に、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルでは強い急性炎症反応が誘導されないことが示唆された。

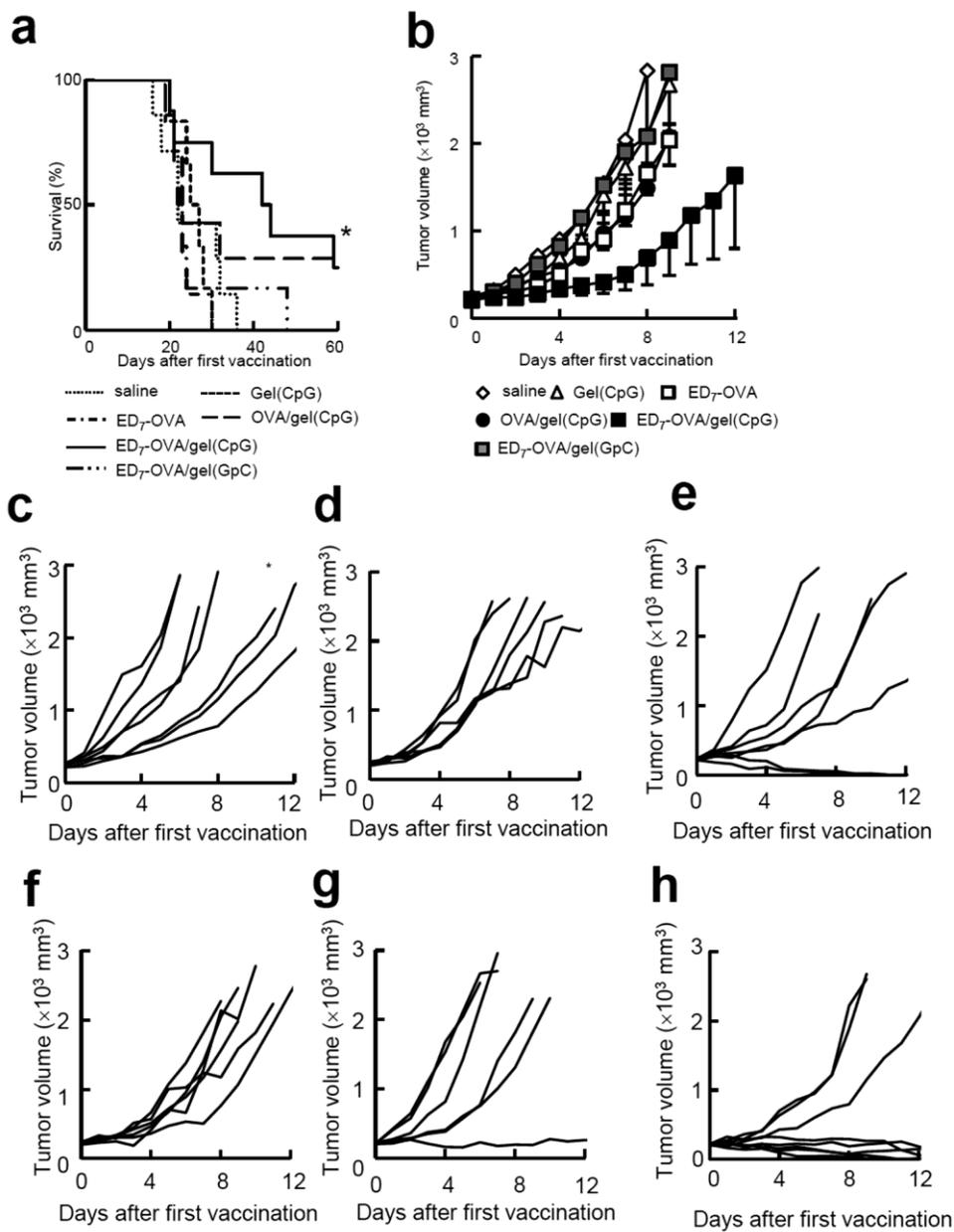


**Figure 27. Systemic and local adverse reactions after intradermal injection of OVA or ED<sub>7</sub>-OVA into mice.** (a) Spleens were collected from C57BL/6 mice on day seven after the third immunization at weekly intervals. Spleen weight was measured and large spleens indicated splenomegaly. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of five mice. \* $P < 0.05$  compared with the other groups. (b) Dermis length on day seven after the third immunization. (c) The number of leucocytes per length of dermis (number/mm). (d-l) Hematoxylin and eosin staining of the skin sections. (d) saline, (e) OVA/CFA, (f) OVA, (g) OVA/gel(GpC), (h) OVA/gel(CpG), (i) ED<sub>7</sub>-OVA, (j) ED<sub>7</sub>-OVA/gel(GpC), (k) ED<sub>7</sub>-OVA/gel(CpG), (l) Gel(CpG).

### 2.1.8 カチオン化 OVA による抗腫瘍効果

OVA を発現する癌細胞 EG7-OVA 担癌マウスの腫瘍内に ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルを投与することで、生存率および腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果を評価した (Fig. 28)。ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲル投与群では saline 投与群と比較して生存率が有意に改善され、腫瘍増殖も有意に抑制された (Fig. 28a,b)。また、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルの投与により、8 匹中 2 匹で腫瘍が完全に退縮した (Fig. 28c-h)。OVA/CpG DNA ハイドロゲル

ルおよび ED<sub>7</sub>-OVA/GpC DNA ハイドロゲルの投与によっても腫瘍の増殖の抑制が見られたものの、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルよりもその効果は低かった。



**Figure 28. EG7-OVA tumor growth after intratumoral injection of ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA hydrogel into mice.** EG7-OVA cells ( $5 \times 10^6$  cells) were intradermally inoculated into C57BL/6 mice. (a and b) When tumor volumes reached  $>200 \text{ mm}^3$ , OVA or ED<sub>7</sub>-OVA (10  $\mu\text{g}$ ) and DNA hydrogel (100  $\mu\text{g}$ ) were intratumorally injected three times at five-day intervals. Survival (a) and tumor size (b) were measured every day. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of six mice (Gel (CpG)-, ED<sub>7</sub>-OVA-, and ED<sub>7</sub>-OVA/gel (GpC)-treated groups), seven mice (saline-, and OVA/gel (CpG)-treated groups) or eight mice (ED<sub>7</sub>-OVA/gel (CpG)-treated group). Results are typical of two separate experiments with similar results. \* $P < 0.05$  compared with the saline group. (c-h) Tumor volume of individual animals treated with the following agents was plotted: (c) saline, (d) Gel (CpG), (e) OVA/gel(CpG), (f) ED<sub>7</sub>-OVA, (g) ED<sub>7</sub>-OVA/gel(GpC), (h) ED<sub>7</sub>-OVA/gel(CpG). Results are typical of two separate experiments with similar results.

長期的な抗原特異的抗腫瘍免疫の誘導を評価するために、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルの投与により腫瘍が完全に退縮したマウスに EG7-OVA およびマウスメラノーマ B16BL6 を移植し、腫瘍の生着を指標に評価した。その結果、B16BL6 は生着したものの、EG7-OVA は生着しなかった (Table 3)。このことから、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルの投与により、EG7-OVA 細胞に対する長期的な抗原特異的免疫応答が誘導されることが示唆された。

**Table 3. Tumor rechallenge experiment.** Mice that initially rejected EG7-OVA tumors by intratumoral injections of OVA or ED<sub>7</sub>-OVA incorporated into CpG DNA hydrogel were rechallenged with intradermally injected EG7-OVA cells ( $5 \times 10^6$  cells) after more than 80 days of the first EG7-OVA challenge. After one month of observation, mice that rejected EG7-OVA tumor growth for a second time were challenged with intradermally injected B16-BL6 cells ( $2 \times 10^5$  cells). The number of tumor free mice was assessed.

	EG7-OVA			B16-BL6		
	Tumor implanted mice	Mice with a palpable tumor	Tumor take rate (%)	Tumor implanted mice	Mice with a palpable tumor	Tumor take rate (%)
control (EG7-OVA)	52	51	98	—	—	—
Control (B16-BL6)	—	—	—	5	5	100
OVA/gel(CpG)	2	0	0	2	2	100
ED <sub>7</sub> -OVA/gel(CpG)	2	0	0	2	2	100

### 2.1.9 カチオン化抗原ペプチドの設計

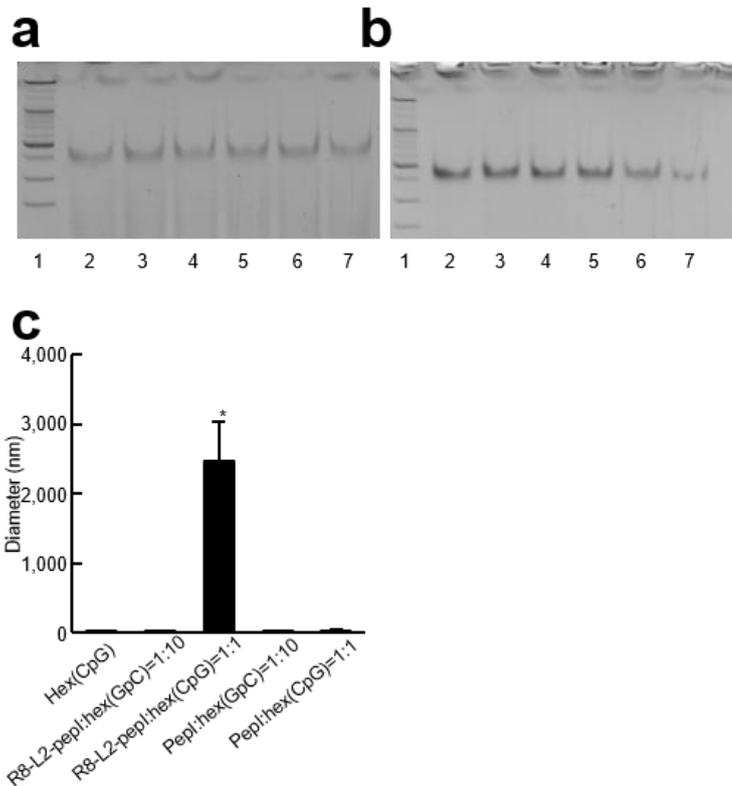
ペプチドを抗原として利用したペプチドワクチンは、タンパク質ワクチンと比較して低コストで大量合成が可能、品質管理が容易で安全性が高い、投与量の増大が可能といった優位性がある。そこで、ED-OVA で得られた結果をペプチド抗原に応用することとした。DNA ハイドロゲルから徐放され、効率的に抗原特異的免疫応答が誘導可能であることが予想される抗原ペプチドとして、OVA の MHC class I エピトープである SIINFEKL (pepI) の N 末端側に、リソソーム経路と非リソソーム経路の両方で切断されることが報告されているリンカー配列 FFRK を介してオクタアルギニンを付加したカチオン化ペプチド R8-L2-pepI を設計した。Table 4 に今回設計したカチオン化ペプチドのアミノ酸と物理化学的特徴を示す。

**Table 4. Characteristics of peptides.**

	Sequence	Length	Molecular weight	Net charge
PepI	SIINFEKL	8	963.13	0
R8-L2-pepI	RRRRRRRRFFRKSIIINFEKL	20	2791.33	+10

### 2.1.10 カチオン化ペプチドと DNA の相互作用形成

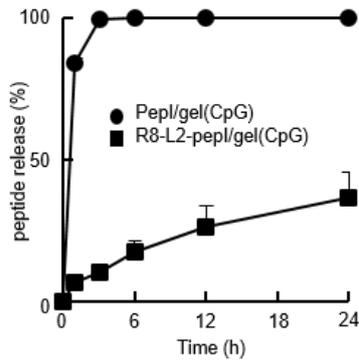
CpG hexapodna-1 と pepI あるいは R8-L2-pepI を様々な割合で混合し、37°C で 15 分間インキュベート後、PAGE を行い、EtBr より DNA を検出することで、移動度の比較により両者の相互作用を評価した。その結果、R8-L2-pepI の混合割合を多くする程、ポリアクリルアミド電気泳動における CpG hexapodna-1 のバンドが薄くなった (Fig. 29b)。一方で、pepI では CpG hexapodna-1 と混合することによる CpG hexapodna-1 のバンドの変化は見られなかった (Fig. 29a)。また、DLS 測定から、R8-L2-pepI と CpG hexapodna-1 を混合することで、R8-L2-pepI 単独及び CpG hexapodna-1 単独と比較して粒子径が有意に増大した (Fig. 29c)。PepI と CpG hexapodna-1 を混合したサンプルでは、pepI 単独、CpG hexapodna-1 と比較して粒子径に変化は認められなかった。以上の結果から、R8-L2-pepI と DNA を混合することで、静電的相互作用による複合体が形成されることが示唆された。



**Figure 29. Complex formation of hexapodna and.** (a) pepI or (b) R8-L2-pepI was incubated with hexapodna at different mixing ratios for 15 min at 37°C. The mixture was subjected to electrophoresis using a 6% polyacrylamide gel at 200 V for 20 min and DNA was detected with ethidium bromide. The molar ratios of CpG hexapodna and pepI or R8-L2-pepI were 1:0 (lane 2), 1:0.1 (lane 3), 1:1 (lane 4), 1:10 (lane 5), 1:50 (lane 6), 1:100 (lane 7). The 100 bp DNA ladder is shown in lane 1. (c) 0.1 mg/ml pepI or R8-L2-pepI, and CpG hexapodna-1 was prepared using saline and mixed at various proportions. The size was then measured by DLS and expressed as the mean  $\pm$  S.D. of twenty independent measurements. \* $P < 0.05$  compared with the other groups.

#### 2.1.11 カチオン化ペプチドの DNA ハイドロゲルからの放出性評価

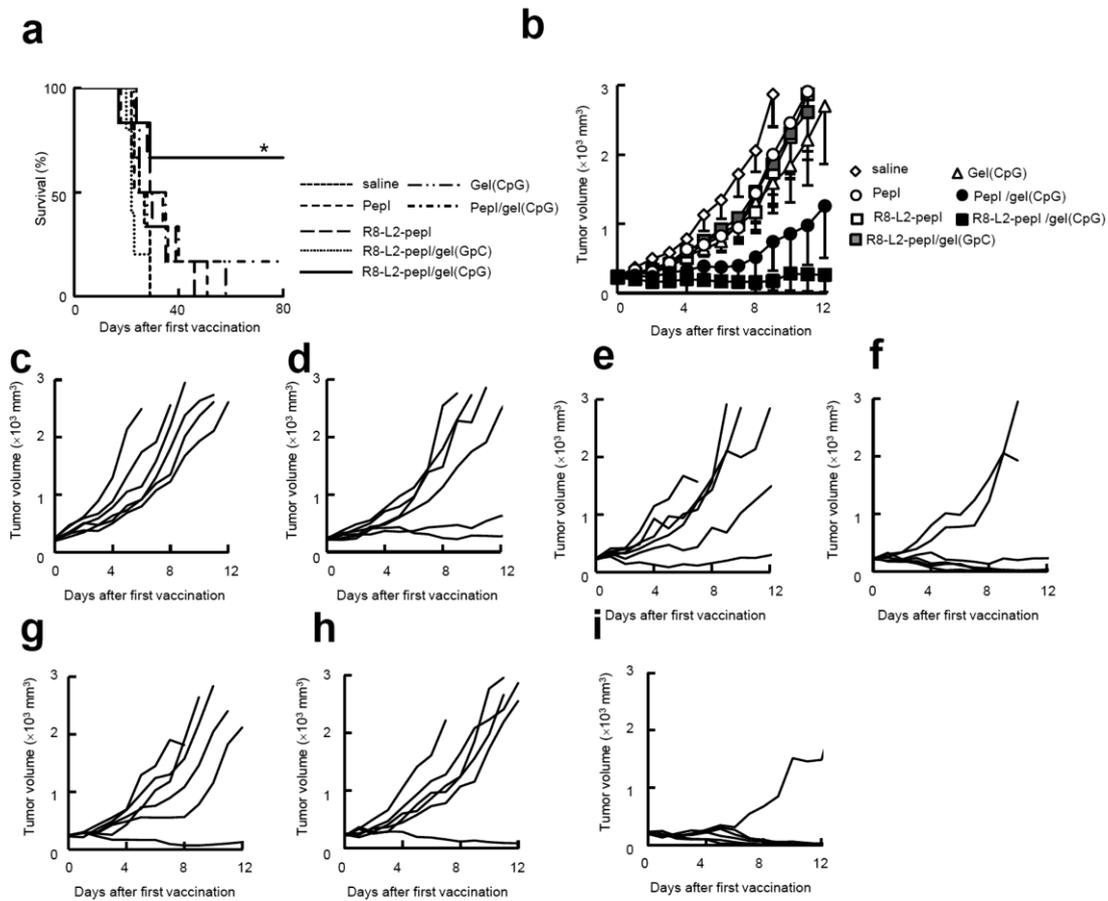
FITC 標識した pepI (FITC-pepI) または R8-L2-pepI (FITC-R8-L2-pepI) を DNA ハイドロゲルに内包し、FITC 由来の蛍光強度を指標に放出挙動を評価した。その結果、FITC-R8-L2-pepI の DNA ハイドロゲルからの放出は FITC-pepI と比較して遅延した (Fig. 30)。



**Figure 30. Peptide release from DNA hydrogel.** FITC-pepI (3.45  $\mu$ g) or FITC-R8-L2-pepI (10  $\mu$ g) was incorporated into 100  $\mu$ g of CpG DNA hydrogel, and the product was placed into the upper chamber of the Transwell (0.4  $\mu$ m pore size) with the bottom chamber containing PBS, and incubated at 37°C. The fluorescence intensity of the solution in the bottom chamber was measured, and the percentages of pepI or R8-L2-pepI released were calculated and plotted against time. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.D. of four independent samples. Results are typical of two separate experiments with similar results.

### 2.1.12 カチオン化抗原ペプチドによる抗腫瘍効果

EG7-OVA 担癌マウスの腫瘍内に R8-L2-pepI/CpG DNA ハイドロゲルを投与し、腫瘍体積およびマウスの生存率から抗腫瘍効果を評価した。その結果、R8-L2-pepI/CpG DNA ハイドロゲル投与群では saline 投与群と比較して腫瘍増殖も有意に抑制され、生存率が有意に改善されることが示された (Fig. 31a,b)。また、R8-L2-pepI/CpG DNA ハイドロゲルの投与により、6 匹中 5 匹で腫瘍が完全に退縮した (Fig. 31c-i)。



**Figure 31. EG7-OVA tumor growth after intratumoral injection of R8-L2-pepI/CpG DNA hydrogel into mice.** EG7-OVA cells ( $5 \times 10^6$  cells) were intradermally inoculated into C57BL/6 mice. (a and b) When tumor volumes reached  $>200 \text{ mm}^3$ , pepI ( $3.45 \mu\text{g}$ ) or R8-L2-pepI ( $10 \mu\text{g}$ ) and DNA hydrogel ( $100 \mu\text{g}$ ) were intratumorally injected three times at five-day intervals. Survival (a) and tumor sizes (b) were measured every day. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of six mice. Results are typical of two separate experiments with similar results.  $*P < 0.05$  compared with the saline group. (c-h) Tumor volume of individual animals treated with the following agents was plotted: (c) saline, (d) Gel (CpG), (e) pepI, (f) pepI/gel(GpC), (g) R8-L2-pepI, (h) R8-L2-pepI/gel(GpC), (i) R8-L2-pepI/gel(CpG). Results are typical of two separate experiments with similar results.

さらに、長期的な抗原特異的抗腫瘍免疫の誘導を評価するために腫瘍が完全に退縮したマウスにEG7-OVAまたはマウスメラノーマB16BL6を移植し、腫瘍の生着を評価した。その結果、B16BL6は全てのマウスで生着したものの、EG7-OVAは生着しなかったことから、長期的な抗原特異的免疫応答の誘導が示唆された (Table 5)。

**Table 5. Tumor rechallenge experiment.** Mice that initially rejected EG7-OVA tumors by intratumoral injections of pepI or R8-L2-pepI incorporated into CpG DNA hydrogel were rechallenged with intradermally injected EG7-OVA cells ( $5 \times 10^6$  cells) after more than 80 days of the first EG7-OVA challenge. After one month of observation, mice that rejected EG7-OVA tumor growth for a second time were challenged with intradermally injected B16-BL6 cells ( $2 \times 10^5$  cells). The number of tumor free mice was assessed.

	EG7-OVA			B16-BL6		
	Tumor implanted mice	Mice with a palpable tumor	Tumor take rate (%)	Tumor implanted mice	Mice with a palpable tumor	Tumor take rate (%)
Control (EG7-OVA)	10	9	90	—	—	—
Control (B16-BL6)	—	—	—	5	5	100
Pepl/gel(CpG)	2	0	0	2	2	100
R8-L2-pepl/gel(CpG)	5	0	0	5	5	100

### 2.1.13 考察

アジュバントは効率的に抗原特異的免疫応答を誘導するために必要不可欠なワクチンの構成要素である<sup>31)</sup>。しかしながら、安全性や原料の問題から、ヒトへの使用が認められたワクチンアジュバントは極めて限られている<sup>37)</sup>。現在臨床で用いられているワクチンの例としては、1920年代に初めて報告された不溶性のアルミニウム塩で構成されるアルムが挙げられる<sup>39, 40)</sup>。一般に、ワクチンアジュバントが臨床応用されるためには、安全かつ単純な構造であり生分解性で化学合成可能である必要がある<sup>40)</sup>。免疫を活性化作用のあるCpGモチーフを含むDNAハイドロゲルはこれらすべての条件を満たしていると考えられる。このDNAハイドロゲルの欠点としては、ハイドロゲルからの抗原放出が比較的速やかであることが挙げられる。本研究では、抗原のカチオン化によりDNAハイドロゲルからの抗原徐放化が可能であること、カチオン化抗原とDNAハイドロゲルの組み合わせにより効率的に抗原特異的免疫応答を誘導可能であることを明らかにした。

ハイドロゲルからの薬物放出は主に拡散制御に基づくと考えられ、放出速度は拡散係数に依存する<sup>41)</sup>。拡散係数が小さくなることで、ハイドロゲルからの薬物放出は遅延する。拡散係数は、網目の大きさの縮小あるいは薬物とゲルマトリックスとの相互作用向上により低下する<sup>42)</sup>。負電荷を帯びたDNAハイドロゲルからの薬物放出に関しては、カチオン化抗原の利用によりみかけの拡散係数を低下させることが可能である。DNAハイドロゲルは静電的相互作用によりカチオン化抗原を保持し、ハイドロゲルからのDNAの乖離により放出が促進されると考えられる。この仮説は、DNaseを含むFBS存在下ではED-OVAの放出が促進されたことにより支持される (Fig. 20d)。すなわち、DNaseがDNAを分解すること

でハイドロゲルからの DNA の乖離が加速され、これに伴って ED-OVA が放出されたものと考えられる。GpC DNA ハイドロゲルは、マウス皮内への単独投与では IL-6 の mRNA 発現を亢進しないことが第一章で示されていることから免疫不活性なデリバリーシステムと考えられる。一方で、本章において、ED<sub>7</sub>-OVA 単独投与群と比較して、ED<sub>7</sub>-OVA を DNA ハイドロゲルに内包して投与することで有意に ED<sub>7</sub>-OVA の投与部位滞留性が向上することが示された (Fig. 23)。ED<sub>7</sub>-OVA 単独投与群と比較して ED<sub>7</sub>-OVA/GpC DNA ハイドロゲル投与群においてより高い抗原特異的免疫応答が誘導されたことから、OVA 特異的免疫応答の誘導には OVA の徐放化が重要であることが示唆される (Fig. 24)。一方で、第一章で投与部位から急速に消失することを示した hexapodna と ED<sub>7</sub>-OVA を混合して投与した ED<sub>7</sub>-OVA/CpG hexapodna 投与群よりも OVA/CpG DNA ハイドロゲルでより高い抗原特異的免疫応答が誘導されることを明らかにしており、強力な抗腫瘍免疫の誘導には抗原の徐放化が重要であることが示唆される (Fig. 26)。つまり、これらの結果から、抗原徐放化と CpG DNA ハイドロゲルによる高い免疫活性化作用の両方が抗原特異的免疫応答の誘導に必要であることが示唆された (Fig. 28, 31)。

先行研究において、カチオン化抗原タンパク質である ED-OVA やポリアルギニン融合 OVA が、高い抗原特異的免疫応答を誘導可能であることが報告されてきた<sup>38, 43, 44)</sup>。本研究では、ED<sub>7</sub>-OVA と比較してより高い修飾率の ED<sub>17</sub>-OVA は、高い細胞取り込みを示したものの、抗原提示は低かった (Fig. 22)。この結果も先行研究と同様であり、過剰な ED 修飾によりエピトープ認識が阻害されたものと推察される。本研究において、IgG 抗体価については有意差が認められなかったものの、OVA/CpG DNA ハイドロゲルと比較して ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルにおいてより高い治療効果が得られた (Fig. 24a, 28)。OVA/CpG DNA ハイドロゲルと ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルとの間で有意差が認められたのは、抗原提示細胞による抗原取り込みと抗原提示、投与部位における白血球の浸潤である (Fig. 22, 27)。腫瘍内投与後の抗原特異的免疫応答の誘導に関する詳細なメカニズムはまだ解明されていないものの、これらの違いが OVA/CpG DNA ハイドロゲルと比較して ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルでより高い抗腫瘍効果が得られた結果を部分的に説明するものと考えられる。

カチオン化 OVA 誘導体が投与部位で顕著な組織傷害性を示さないという結果 (Fig. 27) は先行論文の結果と一致する<sup>38)</sup>。また本研究では、ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲル投与群と OVA/CFA 投与群では投与部位に浸潤する単核球白血球の割合が異なることが明らかになった (Fig. 27)。CFA の構成成分には、投与部位滞留性の高いミネラルオイルが含まれる<sup>45)</sup>。一方で、DNA ハイドロゲルは投与部位から半減期約 12 時間で消失することを前章で示した。ハイドロゲルにすることで投与部位滞留性が有意に向上するものの、DNA は生体内でヌクレアーゼによって速やかに分解され、この分解が DNA ハイドロゲルのクリアランスに関与すると考えられる。この生分解性の高いことにより投与部位で炎症を惹起しにくく、組織障害性が低い結果になったものと考えられる。これは CpG DNA ハイドロゲルに使用し

ているホスホジエステル結合型 DNA の特徴によるものと考えられる。CpG DNA を利用した研究においては、ホスホロチオエート型 CpG DNA が汎用されるが、この安定化誘導体と比較してホスホジエステル結合型 DNA はヌクレアーゼによる分解を受けやすい<sup>5, 46)</sup>。このように酵素に対する安定性が低いことから、配列中に多量の CpG モチーフを含むものの、CpG DNA ハイドロゲルによる副作用はほとんどみられないと考えられる。ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲル投与群では脾臓の肥大化が認められなかったことから、この投与形態により有害な全身性免疫反応は誘導されないことが示唆される (Fig. 27a)。また、OVA/CpG DNA ハイドロゲルの皮内投与により血清中 IL-6 濃度はほとんど上昇しないことを前章で示しており、局所で産生された IL-6 などのサイトカインの効果は投与部位近傍に限られると考えられる。

本研究では、EG7-OVA 担癌マウスに対する治療効果を評価するために腫瘍内投与を選択した。CpG ODN を直接腫瘍内に投与することで T 細胞による抗腫瘍反応が誘導され、腫瘍の退縮につながることを報告されている<sup>47, 48)</sup>。CpG ODN は担癌マウスにおける骨髄由来ミエロイド細胞の抑制的な機能を阻害することも知られている<sup>49)</sup>。皮膚 T 細胞性リンパ腫患者に対して、CpG ODN を用いた *in situ* 免疫と部分的な放射線照射の併用が実現可能であることを示す第 1/2 相試験が報告されており、このことは、CpG ODN の腫瘍内投与は安全であることを示唆している<sup>50)</sup>。さらに、ペプチドの腫瘍内投与により癌細胞の抗原性が上昇することが報告されている<sup>30)</sup>。以上のような先行研究で報告されている現象がカチオン化抗原内包 CpG DNA ハイドロゲルの腫瘍内投与による抗腫瘍効果発現に関与していると考えられる。

R8-L2-pepI/CpG DNA ハイドロゲルは ED<sub>7</sub>-OVA/CpG DNA ハイドロゲルよりも効率的に抗原特異的抗腫瘍免疫を誘導した (Fig. 28, 31)。今回の検討では、どちらの場合にもマウス一匹当たり 10 μg の抗原を投与したことから、ED<sub>7</sub>-OVA と比較して R8-L2-pepI は約 16 倍のエピトープを含む条件であり、これが一因と考えられる。さらに、ペプチドワクチンはタンパク質ワクチンと比較して複数の優れた特性を有する。例えば、ペプチドは感染性材料を使用せずに大スケールでの化学合成が可能であること、液体クロマトグラフィーのような技術の利用により、品質管理が容易であることが挙げられる<sup>51)</sup>。さらに、R8-L2-pepI を含めたカチオン化ペプチドは ED-OVA のような化学修飾によりカチオン化された抗原タンパク質と比較して、高純度で得られるという特徴がある。このため、カチオン化抗原を利用したがんワクチンに抗原としてペプチドを選択することが有効な癌治療になり得ると考えられる。

以上、本節では、カチオン化により抗原の徐放化が可能であり、カチオン化抗原内包 CpG DNA ハイドロゲルの腫瘍内投与により効率的に抗原特異的抗腫瘍免疫を誘導可能であることを見出した。

## 第二節 コレステロール修飾 DNA ハイドロゲルからの抗原徐放化

DNA ハイドロゲルからの抗原徐放化には、第一節で利用した静電的相互作用以外の徐放化機構も利用可能と考えられる。中でも有望視されるのが疎水性相互作用である<sup>52)</sup>。脂肪酸やコレステロールのような様々な疎水性化合物がパクリタキセルなどの疎水性薬物の薬物キャリアからの放出制御に利用されている<sup>53)</sup>。コレステロールは細胞膜を構成する脂質であり、タンパク質を含む様々な分子と疎水的に会合する<sup>54)</sup>。このため、ドラッグキャリアをコレステロール修飾することで、コレステロールと疎水性相互作用により会合する抗がん剤やタンパク質などの薬物のデリバリーが可能と考えられている<sup>55, 56)</sup>。さらに、コレステロール修飾により細胞膜への親和性が向上することから、核酸医薬の細胞内へのデリバリーにもコレステロール修飾が応用されている<sup>57)</sup>。

本節では、抗原と CpG DNA の双方が DNA ハイドロゲルから徐放されることが癌免疫療法において有効であるとの仮説に基づき、DNA ハイドロゲルからの抗原の持続的な放出を実現するために DNA ハイドロゲルを構成する ODN にコレステロール修飾を施した。さらに本節では、OVA とコレステロール修飾 DNA ハイドロゲルとの疎水性相互作用を増大させることを目的に、尿素変性 OVA (udOVA) を抗原として選択した。そして、マウスを用いて udOVA 内包コレステロール修飾 DNA ハイドロゲルによる抗原特異的癌免疫の誘導について評価した。

コレステロール修飾 tetrapodna と OVA を混合することで、PAGE における tetrapodna の移動度が低下したことから、コレステロールと OVA が相互作用することが示唆された。また、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、さらに、EG7-OVA 担癌マウスの腫瘍増殖が抑制できることが示された。以上より、抗原-DNA 間相互作用の制御により 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。

### 第三章 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

第一章において、CpG DNA ハイドロゲルは、効率的に抗原特異的免疫応答を誘導可能な安全なアジュバントであることを示し、第二章では、抗原内包 CpG DNA ハイドロゲルの腫瘍内投与により高い抗腫瘍効果を得られることを示した。しかしながら、腫瘍内投与が可能な癌腫ならびに症例は限られることから、より簡便な皮内投与で抗腫瘍効果の得られるシステムの開発が必要と考えられる。これにより、DNA ハイドロゲルを利用した癌免疫治療システムの有用性はさらに高まると考えられる。

近年、癌免疫療法の1種である樹状細胞ワクチンに関する研究が盛んに行われている<sup>58,59)</sup>。樹状細胞は、主要組織適合抗原複合体 (MHC) 分子を介して細胞内に取り込んだ癌抗原を T 細胞に提示することで、抗原特異的 CTL を誘導し、腫瘍の退縮に寄与する<sup>58)</sup>。ヒトの血中に存在する樹状細胞は表面マーカーの違いから、主に骨髄系樹状細胞 (mDC) と形質細胞様樹状細胞 (pDC) の2種類に分類される。ヒトでは pDC のみが TLR9 を発現することが知られている<sup>60, 61)</sup>。抗原を搭載した骨髄由来樹状細胞を CpG ODN で処理することで高い抗腫瘍効果が得られることが報告されている<sup>62)</sup>。病態情報薬学分野では、CpG モチーフを組み込んだ polyodna により TLR9 を発現する樹状細胞を効率的に活性化可能であることを報告してきた<sup>63)</sup>。このため、TLR9 を発現する樹状細胞を CpG DNA ハイドロゲルに内包することで、樹状細胞を効率よくかつ強力に活性化することができ、高い抗原特異的抗腫瘍免疫を誘導可能と考えられる。

そこで第三章では、CpG DNA ハイドロゲルと TLR9 を発現する免疫細胞を組み合わせることによる抗腫瘍効果の増強を試みた。まず、マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞を用いて免疫細胞内包 DNA ハイドロゲルの機能を評価した。その後、抗原提示細胞としてマウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を選択し、BMDC 内包 DNA ハイドロゲルによる抗腫瘍効果を評価した。

マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞を利用した検討から、DNA ハイドロゲルへの内包により、有意な細胞の生存率の改善効果は認められなかったものの、CpG DNA によるサイトカイン産生は有意に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い、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有意に高い抗腫瘍効果が示された。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。

## 結論

著者は三章にわたり、DNA リガーゼを用いずに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、この 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ついて検討し、以下の結論を得た。

### 第一章 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

Polypodna に接着性末端塩基配列を付加することで、生理的条件下で自発的にゲル化する DNA ハイドロゲルの作製に成功した。そして、レオメーターを用いて DNA ハイドロゲルの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。この特性を反映するために、開発した DNA ハイドロゲルは容易に注射投与可能であることが示された。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示された。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、DNA リガーゼを使用せずに作製した 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示唆された。

### 第二章 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

カチオン化 OVA (ED-OVA) は DNA ハイドロゲルから徐放され、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すことが明らかとなった。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することが示された。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ることが示された。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が示された。以上より、抗原-DNA 間相互作用の制御により 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。

### 第三章 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

マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞を利用した検討から、DNA ハイドロゲルへの内包により、有意な細胞の生存率の改善効果は認められなかったものの、CpG DNA によるサイトカイン産生は有意に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い、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有意に高い抗腫瘍効果が示された。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、著者は、*polypodna* を連結することで作製した注射投与可能な 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。これらの成果は、核酸構造体を基盤とした疾患治療に対し有益な情報を提供するものとする。

## 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 西川元也准教授、高橋有己助教に謹んで深く感謝の意を表します。

実験の一部に御協力、御助言、御指導を賜りました京都大学化学研究所 渡辺 宏教授、同志社女子大学 高橋 玲教授に心からの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齋藤昌朗学士に深謝します。

## 実験の部

### 第一章 実験の部

#### 【1】 試薬

RPMI1640 培地、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、Hanks' balanced salt solution (HBSS) は日水製薬株式会社より購入した。Opti-modified Eagle's medium (Opti-MEM) は Invitrogen 社より購入した。DNase I と T4 ポリヌクレオチドキナーゼはタカラバイオ株式会社より購入した。Transwell プレートは Corning Costar 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。DC2.4 細胞は 10% FBS、0.15% 炭酸水素ナトリウム、50  $\mu$ M モノチオグリセロール、非必須アミノ酸、100 units/ml ペニシリン、100 mg/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% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。マウス T 細胞リンパ腫細胞株 EL4 細胞および EL4 に OVA を発現させた癌細胞 EG7-OVA 細胞は、American Type Culture Collection 社 (Rochville, MD, USA) から購入した。EL4 細胞は 10% FBS、0.15% 炭酸水素ナトリウム、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを添加した DMEM 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。EG7-OVA 細胞は 10% FBS、0.15% 炭酸水素ナトリウム、50  $\mu$ M モノチオグリセロール、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを添加した RPMI1640 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。マウス T 細胞ハイブリドーマ CD8OVA1.3 細胞は、ケース・ウェスタン・リザーブ大学 C. V. Harding 博士より供与して頂いた。CD8OVA1.3 細胞は 10% FBS、0.15% 炭酸水素ナトリウム、50  $\mu$ M モノチオグリセロール、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを添加した DMEM 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。単離した脾細胞は 10% FBS、0.15% 炭酸水素ナトリウム、50  $\mu$ M モノチオグリセロール、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを添加した RPMI1640 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。

#### 【3】 実験動物

4 週齢の ICR 雄性マウスと 6 週齢の C57BL/6 系雄性マウスを日本 SLC 株式会社(静岡、日本)より購入し、コンベンショナル環境下で標準餌と水を与えて飼育した。すべての動

物実験は、京都大学大学院薬学研究科の動物実験委員会の承認を得て行った。

#### 【4】オリゴヌクレオチド (ODN)

全てのホスホジエステル型 ODN は、Integrated DNA Technologies 社より購入した。各 ODN の配列は Table 1 に記した。

#### 【5】 Polypodna および DNA ハイドロゲルの調製

種々の構造を形成するように設計した 40 塩基のオリゴヌクレオチドを等モルずつ混合し、アニーリングすることで各 polypodna を得た。また、polypodna の形成は 6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により確認した。DNA ハイドロゲルは、お互いに相補的な 5'突出末端を付与した 2 種類の polypodna を等モルずつ混合することで作製した。5'突出末端が相補的でない 2 種類の polypodna をゲル化しないコントロールとして用いた。すべてのサンプルは、150 mM NaCl 条件下で調製した。

#### 【6】 DNA ハイドロゲルの粘弾性測定

レオメーター (ARES、TA インストルメント、USA) を用いて、約 25°C の室温条件下で DNA ハイドロゲルのレオロジー特性を評価した。レオロジー測定の一般的なプロトコルに則って、直径 8.0 mm の平行平板を用いて動的測定と定常流動測定を行った<sup>64)</sup>。

#### 【7】 DC2.4 細胞からの IL-6 産生

$5 \times 10^4$  個の DC2.4 細胞を 96 ウェルプレートに播いた。24 時間培養後、Opti-MEM で希釈した各種 DNA を細胞に添加した。16 時間インキュベート後、上清を回収し、-80°C で保存した。上清中の IL-6 濃度は ELISA 法を用いて測定した。

#### 【8】 ODN の放射標識

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  と ODN (ssDNA(CpG)<sub>8np-32-A1</sub>) を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (T4 PNK、タカラバイオ、日本) を用いて、37°C で 30 分間反応させた。その後、70°C で 10 分加熱することで T4 PNK を失活させた。放射標識した ODN は NAP5 カラム (GE Healthcare、東京、日本) を用いて精製した。精製した ODN を用いて、 $^{32}\text{P}$ -ssDNA(CpG)、 $^{32}\text{P}$ -hexapodna(CpG)、 $^{32}\text{P}$ -DNA hydrogel (CpG) を調製した。

#### 【9】 $^{32}\text{P}$ -DNA を皮内投与後の放射活性の組織分布の評価

4 週齢の雄性 ICR マウスの背部皮内に  $^{32}\text{P}$  標識 DNA を 10 mg DNA/kg (220  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) の投与量で投与した。投与一定時間後に、マウスを安楽死させ、投与部位とリンパ節を回収した。回収した組織は、700  $\mu\text{l}$  の Soluene-350 (ParkinElmer Japan Co., Ltd、神奈川、日本) を加えた 20 ml の液体シンチレーション測定用ガラスバイアルに移し、60°C で一晩イン

キュベートすることで溶解させた。その後、2-プロパノール (200  $\mu$ l) と過酸化水素 (200  $\mu$ l、30 % w/v; 和光純薬工、日本) をバイアルに加えることで脱色操作を行った。サンプルは泡が消えるまで室温で静置した。続いて、5 M HCl (100  $\mu$ l) と Clear-sol I (5 ml、ナカライテスク、京都、日本) をバイアルに加え、Tri-Carb 3110 TR (Perkin-Elmer、Norwalk、CT、USA) を用いてサンプルの放射活性を測定した。

#### 【10】 IL-6 mRNA 発現の定量的測定

イソフルランによる麻酔下で C57BL/6 マウスの背部皮内に各種 DNA を 220  $\mu$ g 投与した。投与一定時間後に、投与部位とリンパ節を回収した。皮膚組織から回収した total RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN、Hilden、Germany) を利用して抽出した。リンパ節の total RNA は、Sepasol RNA I super (ナカライテスク) を利用して抽出した。逆転写は、ReverTra Ace qPCR RT PCR Kit (TOYOBO、大阪、日本) を用いて行った。mRNA の定量的解析には、KAPA SYBR FAST ABI Prism 2X qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS、Boston、MA、USA) を用いてリアルタイム PCR を行った。増幅のために使用したオリゴヌクレオチドプライマーは次のものである：IL-6、forward (5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3')、reverse (5'-TGTACTCCAGGTAGCTATGG-3')； $\beta$ -actin、forward (5'-CATCCGTAAAGACCTCTA-TGC-3')、reverse (5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3')。増幅産物は、StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) を使用して蛍光色素である SYBR Green のインターカレーションを利用して検出した。IL-6 mRNA 発現の相対定量時の標準として  $\beta$ -actin を用いた。

#### 【11】 血清中 IL-6 濃度の測定

イソフルランによる麻酔下、C57BL/6 マウスの背部皮内に各種 DNA を 220  $\mu$ g 投与した。投与後継時的に血清を回収し、-80  $^{\circ}$ C で保存した。血清中の IL-6 濃度は ELISA 法を用いて測定した。

#### 【12】 DNA ハイドロゲルからの OVA の放出性評価

OVA (albumin from chicken egg white、Sigma-Aldrich) をフルオレセインイソチオシアネート (FITC; fluorescein isothiocyanate isomer 1、Sigma-Aldrich) と反応させることで FITC-OVA を得た。ゲルを構成する 2 種類の hexapodna 溶液に FITC-OVA を添加後に混合することで FITC-OVA 内包 DNA ハイドロゲルを調製した。得られた FITC-OVA/DNA hydrogel (10  $\mu$ l) を Transwell (Product#3460、0.4  $\mu$ m pore size、Corning Inc.、Corning、NY、USA) の upper chamber に添加し、bottom chamber に PBS (500  $\mu$ l) を添加後、37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。一定時間ごとに、FITC-OVA/DNA hydrogel の DIGITAL CAMERA FinePix S8100fd (Fujifilm、東京、日本) を用いて明視野画像と LAS3000 system (Fujifilm) を用いて蛍光画像を撮像するとともに、PBS を 500  $\mu$ l の新しい PBS と交換した。回収した PBS の蛍光強度は Wallac 1420

ARVO MX-2 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) を用いて測定した。

#### 【13】 DNase による DNA ハイドロゲルの分解

Hexapodna 溶液 (220 µg/100 µl) を DNase 存在下 (0.002 U/µg of DNA、タカラバイオ、日本) 37°C でインキュベートした。一定時間ごとにサンプルを 10 µl 回収し、分解を停止させるために 20 µl の 0.5 M EDTA と混合後、-20°C で保存した。サンプルは 6% PAGE で泳動し、DNA をエチジウムブロマイドで染色した。Multi Gauge software (Fujifilm) を用いて DNA のバンドの濃さを定量的に解析した。DNA ハイドロゲル (220 µg/10 µl) はプラスチックチューブ内で調製し、DNase 溶液 (0.002 U/µg of DNA) を添加後に 37°C でインキュベートした。一定時間後に上清を除去し、95°C での 260 nm の吸光度を測定することで残存する DNA 量を評価した。

#### 【14】 抗原提示評価

$5 \times 10^4$  個の DC2.4 細胞を 96 ウェルプレートに播き、24 時間培養した。Opti-MEM で希釈した各種 DNA (2 µg/ml) と OVA (2 mg/ml) を DC2.4 細胞に添加後に、 $5 \times 10^4$  個の CD8OVA1.3 細胞を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。上清の IL-2 濃度を ELISA 法 (mouse IL-2 BD OptEIA Set, BD Bioscience) を用いて測定した。

#### 【15】 マウスへの免疫

イソフルランによる麻酔下で、6 週齢の雄性 C57BL/6 マウスの背部皮内に OVA 50 µg を 220 µg の各種 DNA と同時に投与することで、7 日間隔で 3 回免疫した。完全フロイントアジュバント、CFA は OVA 溶液と容量比 1:1 で混合し、20 µl を投与した。最終免疫 7 日後にマウスを安楽死させ、血清、脾臓及び所属リンパ節を回収した。回収した血清は -80°C で保存した。

#### 【16】 OVA 特異的抗体価の測定

OVA 特異的抗体価を測定するために、血清を段階希釈した。まず、1 mg/ml OVA を 96 ウェルプレートに添加し、4°C で 8 から 16 時間インキュベートすることでコーティングした。次に、5% BSA を含む 0.5 w/w % Tween-20 in phosphate buffered saline (T-PBS) でウェルをブロッキングした。T-PBS による洗浄後、段階希釈した血清サンプルを 100 µl ウェルに添加した。37°C で 2 時間インキュベート後、ウェルを T-PBS で 5 回洗浄し、5% BSA を含む T-PBS で 3000 倍希釈した anti-IgG-HRP conjugate (Sigma, St. Louis, MO, USA) を 100 µl ウェルに添加した。37°C で 1 時間インキュベート後、ウェルを T-PBS で 5 回洗浄し、用事調製した *o*-phenylenediamine dihydrochloride (和光純薬工業、大阪、日本) と 20 µl の過酸化水素を含有するリン酸クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を 200 µl ウェルに添加した。4 分間インキュベート後、50 µl の 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加し、490 nm における吸光度を測定した。血清中の IgG 抗体

価は、ネガティブコントロール群の吸光度を下回る希釈倍率から見積もった。

#### 【17】脾細胞からのインターフェロン $\gamma$ 産生

最終免疫から7日後に脾細胞を回収した。赤血球は1.5 M ammonium chloride (和光純薬工業)で溶解した。脾細胞は1 mg/ml OVA 存在下  $5 \times 10^6$  cells/ml の濃度で、48 ウェルプレートあるいは96 ウェルプレート中で4日間培養した。回収した培養上清は $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。上清中のIFN- $\gamma$ 濃度はELISA法(Ready-SET-Go! Mouse IFN- $\gamma$  ELISA, eBioscience, San Diego, CA, USA)により測定した。

#### 【18】細胞傷害性T細胞アッセイ

最終免疫から7日後に脾細胞を回収した。赤血球は1.5 M ammonium chloride (和光純薬工業)で溶解した。細胞傷害性T細胞をプライミングするために、脾細胞( $5 \times 10^7$  cells)をマイトマイシンC(和光純薬工業)で処理したEG7-OVA細胞( $5 \times 10^6$  cells)と $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、加湿条件下で5日間共培養した。エフェクター細胞でブーストされた脾細胞を段階希釈し、標的細胞と $37^{\circ}\text{C}$ で4時間共培養した。 $^{51}\text{Cr}$ の自然放出量と最大放出量はエフェクター細胞無しでの培養と、1% Triron-Xによる細胞溶解から評価した。ガンマカウンターを使用して上清の放射活性を測定した。特異的溶解の割合は次の式から計算した： $\% \text{ of specific lysis} = (\text{observed release} - \text{spontaneous release} / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release}))$ 。

#### 【19】皮膚組織のヘマトキシリン・エオジン染色

イソフルランによる麻酔下、6週齢の雄性C57BL/6マウスの背部皮内にOVA 50  $\mu\text{g}$ を220  $\mu\text{g}$ の各種DNAと同時に投与した。また、完全フロイントアジュバント、CFAはOVA溶液と容量比1:1で混合し、20  $\mu\text{l}$ を投与した。加えて、臨床で使用されるアジュバントとしてAlumを選択し、Alum 100  $\mu\text{g}$  (aluminum potassium sulfate dodecahydrate、ナカライテスク)をOVA 50  $\mu\text{g}$ と混合して投与した。投与7日後に投与部位を回収し、4%パラホルムアルデヒド(ナカライテスク)で固定し、パラフィンに包埋後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。HE切片を用いて顕微鏡下で組織学的評価を行った。

#### 【20】脾臓重量の測定

C57BL/6マウスに7日間隔で3回免疫し、最終免疫から7日後に脾臓を回収した。脾臓肥大を免疫刺激性化合物による全身性副作用の指標として評価するために、脾臓重量を測定した。

#### 【21】抗腫瘍効果評価

イソフルランによる麻酔下、6週齢の雄性C57BL/6マウスの背部皮内にOVA 50  $\mu\text{g}$ を220  $\mu\text{g}$ の各種DNAと同時に投与することで、7日間隔で3回免疫した。完全フロイントアジュ

バント、CFA は OVA 溶液と容量比 1:1 で混合し、20  $\mu$ l を投与した。最終免疫から 7 日後に、HBSS に懸濁した EG7-OVA 細胞 ( $5 \times 10^6$  cells) をマウス背部皮内に移植した。腫瘍体積と腫瘍の生着したマウスの割合から抗腫瘍効果を評価した。

## 第二章第一節 実験の部

### 【1】試薬

エチレンジアミンは和光純薬工業より購入した。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

DC2.4 細胞、EG7 細胞、CD8OVA1.3 細胞、マウス脾細胞は第一章と同様の方法で実験に用いた。マウスメラノーマ B16BL6 細胞は、10% FBS、0.15% 炭酸水素ナトリウム、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを添加した DMEM 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、加湿条件下で培養した。

### 【3】実験動物

4 週齢の ICR 雄性マウスと 6 から 8 週齢の C57BL/6 系雄性マウスを日本 SLC 株式会社より購入し、コンベンショナル環境下で標準餌と水を与えて飼育した。遺伝的なバックグラウンドが C57BL/6 の TLR9 ノックアウト (TLR9<sup>-/-</sup>) マウスはオリエンタル酵母工業株式会社 (東京、日本) より購入し SPF 環境下で標準餌と水を与えて飼育した。すべての動物実験は、京都大学大学院薬学研究科の動物実験委員会の承認を得て行った。

### 【4】オリゴヌクレオチド (ODN)

第一章と同様のものを使用した。尚、本節では、hexapodna(CpG)<sub>8np-32</sub>-A を CpG hexapodna-1、hexapodna(CpG)<sub>8np-32</sub>-B を CpG hexapodna-2、hexapodna(CpG)<sub>8np-32</sub>-C を CpG hexapodna-3、hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-A を GpC hexapodna-1、hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-B を GpC hexapodna-2、hexapodna(GpC)<sub>8np-32</sub>-C を GpC hexapodna-3 と表記した。

### 【5】Polypodna および DNA ハイドロゲルの調製

第一章と同様の方法で 150 mM NaCl 条件下で調製した。

### 【6】カチオン化 OVA の合成

OVA を塩酸により pH 5.5 に合わせたエチレンジアミン溶液 (ED、和光純薬工業) に添加した。その後、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-carbodiimide (EDAC、Sigma-Aldrich) を添加し室温で 1 時間攪拌し、さらに EDAC を添加後 6 時間室温で攪拌した。生成物は限外濾過に

より精製し、凍結乾燥を行った。修飾数は trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS、ナカライテスク) を用いて測定した遊離アミノ基数から算出した<sup>65)</sup>。反応条件は Table 1 に示す。

#### 【7】 ペプチド

OVA の MHC クラス I エピトープである pepI (SIINFEKL) と R8-L2-pepI (RRRRRRRRFFRKSIIINFEKL) は GenScript (Piscataway, NJ, USA) より購入した。HPLC による純度は、pepI が 96.9 %、R8-L2-pepI が 84.9 %であった。FITC がペプチドの N 末に修飾された FITC-pepI と FITC-R8-L2-pepI も GenScript (Piscataway, NJ, USA) より購入した。HPLC による純度は、FITC-pepI が 91.8 %、FITC-R8-L2-pepI が 99.2 %であった。

#### 【8】 DNA ハイドロゲルの粘弾性測定

OVA あるいは ED<sub>7</sub>-OVA (66 µg) を GpC DNA ハイドロゲル (660 µg/30 µl) に内包した。粘弾性は第一章と同様の方法で測定した。

#### 【9】 抗原と DNA の複合体形成

抗原と GpC hexapodna-1 を種々の比率で混合し、37°C で 15 分間インキュベートした。複合体形成を確認するために、サンプルについて 6% PAGE (200V、20 分) を行い、DNA をエチジウムブロマイドにより検出した。

#### 【10】 動的光散乱法

Malvern Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK) を用いて、動的光散乱法 (DLS) により、20°C における抗原と hexapodna の混合サンプルのみかけの粒子径を測定した。

#### 【11】 DNA ハイドロゲルからの抗原の放出性

OVA と ED-OVA を FITC で標識することで FITC-OVA と FITC-ED-OVA を得た。FITC 標識抗原を hexapodna 溶液に添加後に混合することで FITC 標識抗原内包 DNA ハイドロゲルを調製し、第一章と同様の方法で DNA ハイドロゲルからの抗原の放出を評価した。

#### 【12】 DNA ハイドロゲルから放出されたサンプルの存在状態評価

0.6 ml チューブ内で FITC-OVA あるいは FITC-ED-OVA (10 µg) を 100 µg の CpG DNA ハイドロゲルに内包 (10 µl) 後に PBS を 10 µl 添加した。37°C で 3 時間インキュベート後、上清を回収し 6% PAGE (200V、20 分) を行った。FITC-OVA あるいは FITC-ED-OVA は FITC 由来の蛍光から検出し、DNA はエチジウムブロマイドにより検出した。

#### 【13】 抗原提示評価

DNA (10 µg/ml) と OVA あるいは ED-OVA (500 µg/ml)、CD8OVA1.3 を DC2.4 細胞に添加後 37°C で 24 時間培養し、第一章と同様の方法で抗原提示を評価した。

#### 【14】 抗原の細胞取り込み

1×10<sup>5</sup> 個の DC2.4 細胞を 48 ウェルプレートに播いた。24 時間培養後、Opti-MEM で希釈した DNA (10 µg/ml) と OVA あるいは ED-OVA (500 µg/ml) を細胞に添加し 37°C で 2 時間培養した。細胞を 200 µl の PBS で 2 回洗浄後、フローサイトメトリー (FACS Calibur、BD Bioscience) を使用して細胞の蛍光強度を測定し、CellQuest software (version 3.1、BD Bioscience) で細胞取り込みの指標である mean fluorescent intensity (MFI) を算出した。

#### 【15】 投与部位からの抗原の消失

イソフルランによる麻酔下、ICR マウスの背部皮内に 10 µg の FITC-OVA あるいは FITC-ED<sub>7</sub>-OVA を 100 µg の DNA ハイドロゲルに内包して投与した (10 µl/shot)。投与一定時間後に投与部位を回収し、重量を測定した。0.05% TritonX-100 と 0.02 M NaOH 溶液を添加後にホモジナイズを行い、5000 rpm で 15 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清の蛍光強度を測定した。

#### 【16】 マウスへの免疫

イソフルランによる麻酔下で、C57BL/6 マウスの背部皮内に OVA あるいは ED<sub>7</sub>-OVA 10 µg を 100 µg の DNA と同時に 10 µl 投与することで、7 日間隔で 3 回免疫した。完全フロイントアジュバント、CFA は OVA 溶液と容量比 1:1 で混合し、20 µl を投与した。最終免疫 7 日後にマウスを安楽死させ、血清と脾臓を回収した。回収した血清は -80 °C で保存した。

#### 【17】 OVA 特異的抗体価の測定

第一章と同様の方法により測定した。

#### 【18】 脾細胞からのインターフェロン γ 産生

第一章と同様の方法により測定した。

#### 【19】 脾臓重量の測定

第一章と同様の方法により測定した。

#### 【20】 投与部位のヘマトキシリン・エオジン染色

イソフルランによる麻酔下で、C57BL/6 マウスの背部皮内に OVA あるいは ED<sub>7</sub>-OVA 10 µg を 100 µg の DNA と同時に 10 µl 投与することで、7 日間隔で 3 回免疫した。完全フロイントアジュバント、CFA は OVA 溶液と容量比 1:1 で混合し、20 µl を投与した。最終免疫 7 日

後にマウスを安楽死させ、投与部位を回収した。第一章と同様の方法で投与部位の HE 染色を行った。

#### 【21】 担癌マウスへの治療効果評価

HBSS に懸濁した EG7-OVA 細胞 ( $5 \times 10^6$  cells) を C57BL/6 マウスの背部皮内に移植した。腫瘍体積が  $200 \text{ mm}^3$  を超えた時点から DNA を  $100 \mu\text{g}$ 、OVA あるいは ED<sub>7</sub>-OVA、R8-L2-pepI を  $10 \mu\text{g}$ 、pepI を  $3.45 \mu\text{g}$  ( $10 \mu\text{l}$ ) 5 日間隔で 3 回腫瘍内に投与した。腫瘍径はキャリパーを用いて測定し、次の式から腫瘍体積を算出した： $\text{tumor volume}(\text{mm}^3) = 0.5 \times \text{length}(\text{mm}) \times [\text{width}(\text{mm})]^2$ 。

#### 【22】 腫瘍の再移植

EG7-OVA が完全に退縮したマウスに対し、最初に EG7-OVA を移植してから 80 日以上経過したのちに EG7-OVA 細胞 ( $5 \times 10^6$  cells) を背部皮内に再移植した。EG7-OVA を再び拒絶したマウスに対して、一カ月後に B16BL6 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells) を背部皮内に投与し、腫瘍の生着しなかったマウスの割合を評価した。

## 引用文献

1. G. Hartmann, R.D. Weeratna, Z.K. Ballas, P. Payette, S. Blackwell, I. Suparto, W.L. Rasmussen, M. Waldschmidt, D. Sajuthi, R.H. Purcell, H.L. Davis, A.M. Krieg, Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo, *J. Immunol.* 164 (2000) 1617-1624.
2. W. Barchet, V. Wimmenauer, M. Schlee, G. Hartmann, Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids, *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 389-395.
3. H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira, A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature* 408 (2000) 740-745.
4. M. Roman, E. Martin-Orozco, J.S. Goodman, M.D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R.S. Kornbluth, D.D. Richman, D.A. Carson, E. Raz, Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants, *Nat. Med.* 3 (1997) 849-854.
5. D.M. Klinman, Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 249-258.
6. A.M. Krieg, Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 471-484.
7. E.J. Hennessy, A.E. Parker, L.A. O'Neill, Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 293-307.
8. J. Karbach, A. Neumann, C. Wahle, K. Brand, S. Gnjatic, E. Jäger, Therapeutic administration of a synthetic CpG oligodeoxynucleotide triggers formation of anti-CpG antibodies, *Cancer Res.* 72 (2012) 4304-4310.
9. M. Nishikawa, M. Matono, S. Rattanakit, N. Matsuoka, Y. Takakura, Enhanced Immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation, *Immunology* 124 (2008) 247-255.
10. K. Mohri, M. Nishikawa, N. Takahashi, T. Shiomi, N. Matsuoka, K. Ogawa, M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, Y. Takahashi, Y. Takakura, Design and development of nanosized DNA assemblies in polypod-like structures as efficient vehicles for immunostimulatory CpG motifs to immune cells, *ACS Nano* 6 (2012) 5931-5940.
11. S.H. Um, J.B. Lee, N. Park, S.Y. Kwon, C.C. Umbach, D. Luo, Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel, *Nat. Mater.* 5 (2006) 797-801.
12. M. Nishikawa, Y. Mizuno, K. Mohri, N. Matsuoka, S. Rattanakit, Y. Takahashi, H. Funabashi, D. Luo, Y. Takakura, Biodegradable CpG DNA hydrogels for sustained delivery of doxorubicin

- and immunostimulatory signals in tumor-bearing mice, *Biomaterials* 32 (2011) 488-494.
13. E. Cheng, Y. Xing, P. Chen, Y. Yang, Y. Sun, D. Zhou, L. Xu, Q. Fan, D. Liu, A pH-triggered, fast-responding DNA hydrogel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 7660-7663.
  14. Y. Xing, E. Cheng, Y. Yang, P. Chen, T. Zhang, Y. Sun, Z. Yang, D. Liu, Self-assembled DNA hydrogels with designable thermal and enzymatic responsiveness, *Adv. Mater.* 23 (2011) 1117-1121.
  15. R. Larson, *The Structure and Rheology of Complex Fluids*; Oxford University Press, New York, 1999.
  16. S. Rattanakit, M. Nishikawa, H. Funabashi, D. Luo, Y. Takakura, The assembly of a short linear natural cytosine-phosphate-guanine DNA into dendritic structures and its effect on immunostimulatory activity, *Biomaterials* 30 (2009) 5701-5706.
  17. N.C. Seeman, An overview of structural DNA nanotechnology, *Mol. Biotechnol.* 37 (2007) 246-257.
  18. M. Nishikawa, S. Rattanakit, Y. Takakura, DNA-based nano-sized systems for pharmaceutical and biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 626-632.
  19. A.V. Pinheiro, D. Han, W.M. Shih, H. Yan, Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology, *Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 763-772.
  20. J.B. Lee, S. Peng, D. Yang, Y.H. Roh, H. Funabashi, N. Park, E.J. Rice, L. Chen, R. Long, M. Wu, D. Luo, A mechanical metamaterial made from a DNA hydrogel, *Nat. Nanotechnol.* 7 (2012) 816-820.
  21. A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 3-12.
  22. S. Young, M. Wong, Y. Tabata, A.G. Mikos, Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules, *J. Control. Release* 109 (2005) 256-274.
  23. T. Nochi, Y. Yuki, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, I.G. Kong, A. Sato, N. Kataoka, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, H. Kiyono, Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines, *Nat. Mater.* 9 (2010) 572-578.
  24. P.A. Cossum, L. Truong, S.R. Owens, P.M. Markham, J.P. Shea, S.T. Crooke, Pharmacokinetics of a <sup>14</sup>C-labeled phosphorothioate oligonucleotide, ISIS 2105, after intradermal administration to rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269 (1994) 89-94.
  25. X. Liu, Y. Xu, T. Yu, C. Clifford, Y. Liu, H. Yan, Y. Chang, A DNA nanostructure platform for directed assembly of synthetic vaccines, *Nano Lett.* 12 (2012), 4254-4259
  26. A.K. Yi, J.G. Yoon, A.M. Krieg, Convergence of CpG DNA- and BCR-mediated signals at the c-Jun N-terminal kinase and NF- $\kappa$ B activation pathways: regulation by mitogen-activated protein kinases, *Int. Immunol.* 15 (2003) 577-591.
  27. D.M. Klinman, D. Currie, I. Gursel, D. Verthelyi, Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune

- adjuvants, *Immunol. Rev.* 199 (2004) 201-216.
28. D. Valmori, N.E. Souleimanian, V. Tosello, N. Bhardwaj, S. Adams, D. O'Neill, A. Pavlick, J.B. Escalon, C.M. Cruz, A. Angiulli, F. Angiulli, G. Mears, S.M. Vogel, L. Pan, A.A. Jungbluth, E.W. Hoffmann, R. Venhaus, G. Ritter, L.J. Old, M. Ayyoub, Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 8947-8952.
  29. JM. Kirkwood, LH. Butterfield, AA. Tarhini, H. Zarour, P. Kalinski, S. Ferrone, Immunotherapy of cancer in 2012, *Ca-Cancer J. Clin.* 62 (2012) 309-335.
  30. D. Nobuoka, T. Yoshikawa, M. Takahashi, T. Iwata, K. Horie, M. Shimomura, S. Suzuki, N. Sakemura, M. Nakatsugawa, H. Sadamori, T. Yagi, T. Fujiwara, T. Nakatsura, Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity recognized by cytotoxic T lymphocytes: a potential option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy, *Cancer Immunol. Immunother.* 62 (2013) 639-652.
  31. A. Batista-Duharte, EB. Lindblad, E. Oviedo-Orta, Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms, *Toxicol. Lett.* 203 (2011) 97-105.
  32. DT. O'Hagan, E. De. Gregorio, The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road', *Drug Discovery Today* 14 (2009) 541-551.
  33. A. Singh, NA. Peppas, Hydrogels and scaffolds for immunomodulation, *Adv. Mater.* 26 (2014) 6530-6541.
  34. JM. Silva, M. Videira, R. Gaspar, V. Preat, H. Florindo, Immune system targeting by biodegradable nanoparticles for cancer vaccines, *J. Controlled Release*, 168 (2013) 179-199.
  35. Y. Wen, JH. Collier, Supramolecular peptide vaccines: tuning adaptive immunity, *Curr. Opin. Immunol.* 35 (2015) 73-79.
  36. M. Roman, E. Martin-Orozco, JS. Goodman, MD. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, RS. Kornbluth, DD. Richman, DA. Carson, E. Raz, Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants, *Nat. Med.* 3 (1997) 849-854.
  37. SL. Demento, W. Cui, JM. Criscione, E. Stern, J. Tulipan, SM Kaech, TM. Fahmy. Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. *Biomaterials.* 33(19) (2012), 4957-4964.
  38. T. Ikenaga, Y. Yamasaki, K. Shakushiro, M. Nishikawa, Y. Takakura, Induction of cytotoxic T lymphocytes following immunization with cationized soluble antigen, *Vaccine* 22 (2004) 2609-2616.
  39. AT. Glenny, GAH. Buttle, MF. Stevens, Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea - pigs: Toxoid precipitated with alum, *J. Pathol. Bacteriol.* 34 (1931) 267-275.
  40. SG. Reed, S. Bertholet, RN. Coler, M. Friede, New horizons in adjuvants for vaccine

- development, *Trends Immunol.* 30 (2009) 23-32.
41. CC. Lin, AT. Metters, Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling, *Adv. Drug Delivery Rev.* 58 (2006) 1379-1408.
  42. KH. Bae, LS. Wang, M. Kurisawa, Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 5371-5388.
  43. RJ. Apple, PL. Domen, A. Muckerheide, JG. Michael, Cationization of protein antigens. IV. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells, *J. Immunol.* 140 (1988) 3290-3295.
  44. H. Mitsui, T. Okamoto, M. Kanzaki, T. Inozume, N. Shibagaki, S. Shimada, Intradermal injections of polyarginine-containing immunogenic antigens preferentially elicit Tc1 and Th1 activation and antitumour immunity, *Br. J. Dermatol.* 162 (2010) 29-41.
  45. RK. Gupta, EH. Relyveld, EB. Lindblad, B. Bizzini, S. Ben-Efraim, CK. Gupta, Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity, *Vaccine* 11 (1993) 293-306.
  46. A. de Titta, M. Ballester, Z. Julier, C. Nembrini, L. Jeanbart, AJ. Van der Vlies, MA. Swartz, JA. Hubbell, Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 19902-19907.
  47. AS. Lonsdorf, H. Kuekrek, BV. Stem, BO. Boehm, PV. Lehmann, M. Tary-Lehmann, Intratumor CpG-oligodeoxynucleotide injection induces protective antitumor T cell immunity, *J. Immunol.* 171 (2003) 3941-3946.
  48. Y. Shirota, H. Shirota, DM. Klinman, Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells, *J. Immunol.* 188 (2012) 1592-1599.
  49. C. Zoglmeier, H. Bauer , D. Nörenberg , G. Wedekind , P. Bittner , N. Sandholzer , M. Rapp , D. Anz , S. Endres , C. Bourquin, CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice, *Clin. Cancer Res.* 17 (2011) 1765-1775.
  50. YH. Kim, D. Gratzinger, C. Harrison, JD. Brody, DK. Czerwinski, WZ. Ai, A. Morales, F. Abdulla, L. Xing, D. Navi, RJ. Tibshirani, RH. Advani, B. Lingala, S. Shah, RT. Hoppe, R. Levy, In situ vaccination against mycosis fungoides by intratumoral injection of a TLR9 agonist combined with radiation: a phase 1/2 study, *Blood.* 119 (2012) 355-363.
  51. AW. Purcell, J. McCluskey, J. Rossjohn, More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design, *Nat. Rev. Drug Discovery.* 6 (2007) 404-414.
  52. X. Niu, Z. Liu, J. Hu, KJ. Ambhia, Y. Fan, PX. Ma. Microspheres Assembled from Chitosan-Graft-Poly(lactic acid) Micelle-Like Core-Shell Nanospheres for Distinctly Controlled Release of Hydrophobic and Hydrophilic Biomolecules, *Macromol. Biosci.*, 16 (2016) 1039-1047.
  53. X. Ke, VW. Ng, RJ. Ono, JM. Chan, S. Krishnamurthy, Y. Wang, JL. Hedrick, YY. Yang. Role of non-covalent and covalent interactions in cargo loading capacity and stability of polymeric

- micelles, *J. Control Release*. 193 (2014) 9-26.
54. F. Ercole, MR. Whittaker, JF. Quinn, TP. Davis. Cholesterol Modified Self-Assemblies and Their Application to Nanomedicine, *Biomacromolecules*. 16 (2015) 1886-1914.
  55. T. Shimizu, T. Kishida, U. Hasegawa, Y. Ueda, J. Imanishi, H. Yamagishi, K. Akiyoshi, E. Otsuji, O. Mazda. Nanogel DDS enables sustained release of IL-12 for tumor immunotherapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367(2) (2008), 330-335
  56. AL. Lee, S. Venkataraman, SB. Sirat, S. Gao, JL. Hedrick, YY. Yang. The use of cholesterol-containing biodegradable block copolymers to exploit hydrophobic interactions for the delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*. 33(6) (2012), 1921-1928.
  57. K. Cheng, Z. Ye, RV. Guntaka, RI. Mahato. Enhanced hepatic uptake and bioactivity of type alpha1(I) collagen gene promoter-specific triplex-forming oligonucleotides after conjugation with cholesterol, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317(2) (2006) 797-805.
  58. K. Palucka, J. Banchereau. Cancer immunotherapy via dendritic cells, *Nat. Rev. Cancer*. 12(4) (2012) 265-277.
  59. PJ. Tacken, IJ. de Vries, R. Torensma, CG. Figdor. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting, *Nat. Rev. Immunol.* 7(10) (2007) 790-802.
  60. B. Pulendran. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors, *Immunol. Rev.* 199 (2004) 227-250.
  61. G. Schreibelt, J. Tel, KH. Sliepen, D. Benitez-Ribas, CG. Figdor, GJ. Adema, IJ. de Vries. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy, *Cancer Immunol. Immunother.* 59(10) (2010) 1573-1582.
  62. F. Chagnon, S. Tanguay, OL. Ozdal, M. Guan, ZZ. Ozen, JS. Ripeau, M. Chevette, MM. Elhilali, LA. Thompson-Snipes. Potentiation of a dendritic cell vaccine for murine renal cell carcinoma by CpG oligonucleotides, *Clin. Cancer Res.* 11(3) (2005) 1302-1311.
  63. S. Uno, M. Nishikawa, K. Mohri, Y. Umeki, N. Matsuzaki, Y. Takahashi, H. Fujita, N. Kadowaki, Y. Takakura. Efficient delivery of immunostimulatory DNA to mouse and human immune cells through the construction of polypod-like structured DNA, *Nanomedicine*.10 (2014) 765-774.
  64. J.D. Ferry, *Viscoelastic Properties of Polymers*, 3rd ed., Wiley, New York, 1980.
  65. AF. Habeeb. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid, *Anal. Biochem.* 14 (1966) 328.