

京都大学	博士（薬科学）	氏名	大槻 昇三
論文題目	<p>Elucidation and optimization of the interaction of nanostructured DNA and immune cells. （ナノ構造化DNAと免疫細胞との相互作用の解明と最適化に関する研究）</p>		
<p>DNAの2本鎖形成能を利用することで、構造的特徴の異なるユニークな形状の構造体を作製するDNAナノテクノロジー技術が発展し、薬物を標的部位に送達するドラッグデリバリーシステム（DDS）にも応用されている。しかしながら、ナノ構造化DNAの構造的特徴と細胞との相互作用の詳細についてはいまだ明らかではない。近年盛んに研究されている核酸アジュバントにおいては、その標的となる免疫細胞に効率よく送達する必要がある。そこで申請者は、ナノ構造化DNAを利用した免疫細胞への効率的な送達システムの開発を目的に、構造的特徴の異なるナノ構造化DNAを設計・開発することで免疫細胞との相互作用機構の解明ならびに効率的な送達を試みた。</p> <p>第1章 免疫細胞との相互作用に必要なナノ構造化DNAの構造的特徴の解明</p> <p>病態情報薬学分野ではこれまでに、DNAを4本足構造DNA（tetrapod-like structured DNA; tetrapodna）等の多足型構造とすることで、免疫刺激性CpG DNAのサイトカイン産生能を増強させることに成功している。一方で、正四面体構造DNA（tetrahedral DNA; tetrahedron）もCpG DNAの活性を増強するという報告がある。核酸アジュバントの免疫細胞への効率的な送達を可能にするナノ構造化DNAの開発には、調製効率や免疫活性化能に関する情報が必要である。そこで第1章では、オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）を用いて作製可能なナノ構造化DNAを用いて、免疫細胞への取り込みに及ぼす構造的特徴の解明を行った。それぞれ4本のODNで作製可能なtetrapodnaとtetrahedronに加え、正方形型DNA（tetragonal DNA; tetragon）を新たに設計し、3種のナノ構造化DNAを比較検討した。その結果、tetrahedronが最も効率よく免疫細胞であるマウスマクロファージ様細胞株RAW264.7細胞と相互作用したが、高濃度条件下では重合した。一方、tetrapodnaは、高濃度においても高い形成効率を示した。次に、ナノ構造化DNAの細胞との相互作用における細胞特異性を評価した。種々の細胞株での検討から、一本鎖DNAと比較して、tetrapodnaやtetrahedron等のナノ構造化DNAとすることによる取り込みの増大は、線維芽細胞株や血管内皮細胞と比較して、免疫細胞であるRAW264.7細胞とマウス樹状細胞株DC2.4細胞で顕著なことが明らかとなった。</p> <p>第2章 DNAオリガミおよびDNA超分子を利用したDNAを基盤とする免疫細胞への送達システムの設計</p> <p>第1章におけるtetrahedronの免疫細胞との強い相互作用には、tetrahedronの構造的自由度の低さ、すなわち剛直な構造であることが関与する可能性を考えた。そこで、ナノ構造化DNAの剛直さが細胞との相互作用に及ぼす影響を明らかにするために、ナノ構造化DNAの構造設計が比較的容易なDNA origami法を用いて、剛直さの異なる一連のナノ構造化DNAを作製し、RAW264.7細胞との相互作用を評価した。その結果、staple鎖を一部欠損させた構造的に柔</p>			

らかい構造体では細胞取り込みが低いことを見出した。また、rolling circle amplification法を利用することで作製した長い一本鎖DNAと、コレステロール修飾ODNを用いることでDNA超分子を作製し、RAW264.7細胞との相互作用を評価した。その結果、コレステロール修飾ODNを添加することで一本鎖DNAはコンパクトな超分子構造となり、細胞との相互作用が飛躍的に増大することを見出した。

第3章 ナノ構造化DNAの細胞取り込みに関与する細胞表面受容体の解明

前章までの検討において、ナノ構造化DNAは、その構造的特徴に依存して免疫細胞と相互作用することを見出した。DNAと細胞との相互作用に関しては様々な細胞表面受容体の関与が報告されているが、その詳細は不明である。そこで本章では、ナノ構造化DNAの取り込みに関与する受容体の解明を試みた。Toll-like receptor (TLR) 9を発現させたHEK-Blue hTLR9細胞の、天然型CpG DNAに対する応答性が非常に低いことを見出されたことから、この細胞に受容体候補分子を導入することで、そのナノ構造化DNAの取り込みへの関与を評価した。ヒトマクロファージスカベンジャーレセプター (hMSR1) を導入したHEK-Blue hTLR9/hMSR1細胞を新たに樹立し、tetrapodnaの細胞取り込みを評価したところ、tetrapodnaの取り込みはhMSR1の導入により有意に増大した。一方、マクロファージ抗原であるMAC1やマンノースレセプターの導入ではtetrapodnaの取り込みは増大しなかった。以上より、MSR1がナノ構造化DNAを認識する細胞表面受容体である可能性が示された。

以上、申請者は、ナノ構造化DNAの免疫細胞との相互作用には構造依存性があり、剛直な構造のナノ構造化DNAが効率よく取り込まれることを見出した。また、DNAのナノ構造化による細胞との相互作用増大には、MSR1を含む細胞表面受容体が関与することを明らかにした。本研究で解明したナノ構造化DNAの細胞との相互作用増大におけるメカニズムは、ナノ構造化DNAを利用した免疫細胞への効率的な送達システムの開発に有用な知見を提供するものとする。

(論文審査の結果の要旨)

DNAの2本鎖形成能を利用することで、構造的特徴の異なるユニークな形状の構造体を作製するDNAナノテクノロジー技術が発展し、薬物を標的部位に送達するドラッグデリバリーシステム(DDS)にも応用されている。しかしながら、ナノ構造化DNAの構造的特徴と細胞との相互作用の詳細に関してはいまだ明らかではない。近年盛んに研究されている核酸アジュバントにおいては、その標的となる免疫細胞に効率よく送達する必要がある。そこで申請者は、ナノ構造化DNAを利用した免疫細胞への効率的な送達システムの開発を目的に、構造的特徴の異なるナノ構造化DNAを設計・開発することで免疫細胞との相互作用機構の解明ならびに効率的な送達を試み、以下の新知見を得た。

まず、4本足構造DNA(tetrapod-like structured DNA; tetrapodna)、正四面体構造DNA(tetrahedral DNA; tetrahedron)、正方形型DNA(tetragonal DNA; tetragon)に免疫刺激性CpG DNAを組み込んだ3種のナノ構造化DNAを設計し、免疫細胞による取り込みを評価した結果、tetrapodnaが効率よく免疫細胞と相互作用すると共に高い形成効率を示すことが明らかとなった。次に、DNA origami法を用いて、剛直さの異なる一連のナノ構造化DNAを作製して免疫細胞との相互作用を評価した結果、構造的に柔らかい構造体では細胞取り込みが低いことを見出した。また、rolling circle amplification法で作製した長い一本鎖DNAとコレステロール修飾ODNを組み合わせることでDNA超分子を作製し、免疫細胞との相互作用を評価した結果、コンパクトな超分子構造を形成させることにより相互作用が飛躍的に増大することを見出した。さらに、ナノ構造化DNAの細胞取り込みに関与する細胞表面受容体の解明を試み、新たに樹立したヒトマクロファージスカベンジャーレセプター(hMSR1)を導入したHEK-Blue hTLR9/hMSR1細胞を用いて検討を行った結果、MSR1がナノ構造化DNAを認識する細胞表面受容体である可能性が示された。以上、本研究で解明したナノ構造化DNAの細胞との相互作用増大におけるメカニズムは、ナノ構造化DNAを利用した免疫細胞への効率的な送達システムの開発に有用な知見を提供するものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成30年2月20日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。