

多足型 DNA ナノ構造体を利用した核酸医薬の標的
指向化および体内動態制御に関する研究

2017

高 橋 洋 介

目次

総論の部

緒言	1
第一章 多足型 DNA ナノ構造体を利用した CpG DNA の自然免疫活性増強に関する <i>in vitro / in vivo</i> 関連の解明	
序論	2
結果	4
考察	13
第二章 多足型 DNA ナノ構造体を利用した免疫抑制性オリゴヌクレオチドの 免疫細胞へのデリバリー	
序論	16
結果	17
考察	22
第三章 多足型 DNA ナノ構造体を利用したモルフォリノ核酸の体内動態制御	
序論	24
結果	26
考察	35
結論	39
謝辞	40

実験の部

第一章 実験の部	41
第二章 実験の部	43
第三章 実験の部	45
引用文献	48

総論の部

緒言

近年、低分子化合物にはない特徴を持った様々なバイオ医薬品の創薬研究が活発に行われるようになり、バイオ医薬品の一つである核酸医薬品も複数品目が上市されている。1988年に米国で承認された Vitravene (fomivirsen sodium) が世界初の核酸医薬品であり、その後2005年に Macugen (pegaptanib sodium)、2013年に Kynamro (mipomersen sodium)、2016年には Exondys 51 (eteplirsen) 及び Spinraza (nusinersen) と、合計5品目の核酸医薬品がこれまでに承認されている。その一方で、前臨床段階や臨床段階で開発中止となった核酸医薬品の候補化合物は非常に多く、核酸医薬品の創薬研究から上市に至るまでの道のりには大きな死の谷が存在していると言われている。この死の谷を越えるためには、天然型の核酸が有する様々な問題点を改善する必要がある。具体的には、薬効(標的分子への親和性)の向上、生体内での安定性向上、生体内での薬物動態特性(血中滞留性)の改良、細胞膜透過性の向上、製造コストの削減などが改善すべき課題である。

この課題に対するアプローチは大きく二つに分けられる。一つは核酸そのものに化学修飾を施して、薬効や安定性を高めようとするものであり、もう一つは核酸をなんらかの輸送担体とともに投与し、薬物動態特性を高めようとするものである。前者のアプローチは、天然型の DNA や RNA 骨格のオリゴヌクレオチドのホスホジエステル (PO) 結合部分に硫黄原子を導入したホスホロチオエート (PS) 核酸、糖の 2'位の酸素原子をメトキシ化した 2'-OMe 核酸、糖の 2'位と 4'位を架橋した locked nucleic acid (LNA) に代表されるような bridged nucleic acid などの核酸骨格そのものを改良したものと、核酸に対して PEG やペプチド、糖などを共有結合的に付加したものなどに代表される。後者のアプローチはリポソームに代表されるようなキャリアを用いる手法であり、核酸とキャリアとの複合体を形成させ、薬物動態特性や細胞膜透過性を高めようとするものである。

本研究では後者のアプローチとして、相補鎖と二本鎖を形成する核酸の性質を巧みに利用して形成可能な DNA ナノ構造体、中でも多足型 DNA ナノ構造体 (polypod-like structured DNA : polypodna) に着目した。Polypodna は、構成する塩基数を調整することで任意の大きさに制御可能であり、また DNA のみから構成されるため生体に対して低毒性であることも担保されており、キャリアとしての利点を兼ね備えている。本研究では、polypodna の核酸医薬品のキャリアとしての応用可能性を3種の核酸医薬品を用いて評価した。具体的には、核酸医薬品の代表例として、免疫賦活化作用を有する核酸、免疫抑制作用を有する核酸、及びアンチセンス核酸 (ASO) の3種に関して、polypodna に搭載させた上で、これら核酸医薬品の薬物動態特性並びに薬理作用を変化させることが可能かを検討した。

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 多足型 DNA ナノ構造体を利用した CpG DNA の自然免疫 活性増強に関する *in vitro* / *in vivo* 相関の解明

序論

自然免疫は多くの生物で保存されている外部から侵入する病原体に対する防御システムであり、Toll-like receptor (TLR) が中心的な役割を果たす受容体として知られている¹。その TLR family の 1 つである TLR9 は、ウイルスや細菌由来の非メチル化 CpG モチーフを含む DNA (CpG DNA) をリガンドとして認識し、防御反応として炎症を誘発する^{2,3}。この作用を医薬品に応用しようとする研究も盛んであり、TLR9 リガンドとして化学合成された CpG DNA は、癌、アレルギー疾患、感染症などに対する治療剤として応用可能であると考えられる^{4,6}。一方で、遺伝子の発現抑制を狙った ASO のような核酸医薬品においては、サイトカインストームのような深刻な副作用を回避するために TLR9 刺激能を持たないものを選択する必要がある⁷。つまり、核酸医薬品開発においては、TLR9 刺激能を正確に評価し、目的に応じて使い分けていくことが重要であると言える。

CpG DNA には様々なものが存在し、天然型の DNA に代表される PO 結合を有する一本鎖 DNA を基本構造とし、安定性を高めるために PS 結合で置換された CpG DNA や、リボース環の 2'位の酸素原子と 4'位の炭素原子を架橋した locked nucleic acid (LNA) で置換された CpG DNA などが近年報告されている^{8,9}。また CpG DNA の作用の向上を意図して、CpG DNA のナノ構造化に関する研究報告も複数存在している。例えば、K3-SPG は Dectin-1 リガンドであるシゾフィラン (SPG) と CpG DNA から構成されており、高次のナノ構造体が形成されている¹⁰。Polypodna や DNA polyhedra は、DNA の 2 本鎖形成能を利用して複数の CpG DNA から構成されたナノ構造体である^{11,12}。これらはいずれもナノ構造体化により作用が著しく向上することが報告されている。

これらの CpG DNA の薬物動態プロファイルは互いに大きく異なっている。PO 結合型のオリゴヌクレオチド (PO 核酸) に比べると、PS 核酸は高いタンパク結合性を有するため、血中の半減期が比較的長い¹³。また LNA はヌクレアーゼに対する耐性が高いため、*in vivo* で PO 核酸よりも安定である¹⁴。また K3-SPG 等のナノ構造体は、単位構造あたりの分子量が大きいため、膜透過性や腎臓における糸球体ろ過の程度に違いがある可能性が高く、薬物動態特性は一本鎖の CpG DNA とは大きく異なると考えられる。これら様々な CpG DNA はそれぞれ異なる薬物動態学的特性を有しており、このことが *in vivo* での薬理作用または副作用 (TLR9 刺激能) に影響を及ぼす可能性がある。

これまでに polypodna が *in vitro* の実験系においてマクロファージや樹状細胞に対して効果的に取り込まれることが示されている^{15,16}。この polypodna は 3 本以上の ODN から構成された多足型核酸構造体であり、数ナノメートルのサイズの分子である。また、一本鎖 CpG DNA と比較して、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞及びマウス樹状細胞株である DC2.4 細胞、マウス骨髄由来樹状細胞に対して、CpG モチーフ含有 polypodna が

より効率的に取り込まれ、これらの細胞から強力な炎症性サイトカイン放出を誘導することを示している^{17,18}。さらに polypodna の細胞取り込みは、pod 数や分子のサイズに依存することも見出した。polypodna の細胞内取り込みの機構については、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤である dansylcadaverine と、ファゴサイトーシス阻害剤である cytochalasin B によって阻害され、これら取り込み機構が少なくとも部分的に関与していることも示唆されている¹⁷。In vivo での polypodna の作用に関する情報は限定的ではあるが、マウスに CpG モチーフ含有 polypodna 及び一本鎖 CpG DNA を皮内投与した場合、血清中 IL-12p40 濃度は CpG モチーフ含有 polypodna を投与した場合に有意に増加していた¹⁷。以上の情報を総合すると、CpG モチーフ含有 polypodna の TLR9 刺激能増強については、in vitro 及び in vivo 実験において十分に実証されている。

一方で、polypodna の in vivo における薬物動態プロファイルや組織分布特性はこれまでにほとんど評価されていない。³²P 標識した一本鎖 CpG DNA 及び CpG モチーフ含有 hexapodna (hexapod-like structured DNA) をマウスに皮内投与した時、いずれも投与部位から急速に消失した¹⁸。この情報以外に、polypodna または他の DNA ナノ構造体の in vivo 組織分布に関する報告はなく、in vivo における薬物動態プロファイルには不明な点が多い。また、CpG DNA による TLR9 刺激能を in vitro で評価する際には通常無血清培地が用いられるが、in vivo 条件においては血清タンパク結合や血清中での安定性なども考慮する必要があり、これらが polypodna の in vivo での作用に影響を及ぼす可能性がある。このように、polypodna による TLR9 刺激能の増強に対して、in vitro の評価結果を in vivo における効果に外挿可能かどうかは現状では不明である。そこで本研究では、CpG モチーフを一つだけ含有する一本鎖 CpG DNA (CpG-SS) を用いて、またそのキャリアとして polypodna の中で最も単純な構造である tripodna (tripod-like structured DNA) と、過去の報告から形成効率が高くかつ免疫細胞へ効果的に取り込まれる hexapodna を選択して、上記課題について検討した。CpG-SS を搭載した tripodna (CpG-tripodna) 及び hexapodna (CpG-hexapodna) を調製し、それらの in vitro 及び in vivo で免疫賦活活性を評価することで、構造体間での作用の in vitro 及び in vivo における相関関係を比較・評価した。本研究で用いた CpG-SS は、一本鎖 20 mer からなる PO DNA であり、高活性を有するとの報告がある PS 結合の CpG1668 と同一の配列を有するように設計した。CpG モチーフとして選択した GACGTT の完全相補配列は AACGTC であり、最適配列ではないものの CpG モチーフを含む。そこで、CpG-SS のキャリアとして選択した tripodna 及び hexapodna は、CpG モチーフの相補鎖部分に 1 塩基のミスマッチを導入した AACTTC 配列とし、CpG モチーフを有さない ODN のみから構成されるように設計した。本研究では、RAW264.7 細胞に添加後のサイトカイン誘導能及びマウス静脈内注射後の血清サイトカイン濃度をもとに、in vitro から in vivo への外挿性を評価した。

結果

DNA ナノ構造体の形成確認

評価に用いた ODN の塩基配列を Table 1-1 に示した。またこれらのオリゴヌクレオチドから形成されるナノ構造体の模式図を Figure 1-1 に示した。Figure 1-1 に示した通り、Tri-1～-3 から形成される tripodna を tripodna(cont) とし、また Hexa-1～-6 から形成される hexapodna を hexapodna(cont) とし、これら CpG DNA を含有しないナノ構造体を対照群として用いた。また CpG-SS を 3 分子含有する tripodna を CpG-tripodna、CpG-SS を 6 分子含有する hexapodna を CpG-hexapodna とした。なお、本章においては、濃度の記載は、ナノ構造体としてのモル濃度ではなく各構造体に含まれている CpG-SS のモル濃度として表記した。

Table 1-1 Sequences of ODNs used in Chapter 1

ODN	Sequence (5' to 3')
CpG-SS	TCCATGACGTTTCCTGATGC
Hexa-1	TAGCAGCACATCAGGTTCTGAGCCTTGCTGCAAGCATCAGGAACTTCATGGA
Hexa-2	TGCAGCAAGGCTCAGATCTGCTCAAGCCTGCAAGCATCAGGAACTTCATGGA
Hexa-3	TGCAGGCTTGAGCAGACAGAGCCTTGAGCCTAAGCATCAGGAACTTCATGGA
Hexa-4	TAGGCTCAAGGCTCTGGAGGCTCTTAAGCTGCAGCATCAGGAACTTCATGGA
Hexa-5	GCAGCTTAAGAGCCTCAGAGCTTGGCATAGCAAGCATCAGGAACTTCATGGA
Hexa-6	TGCTATGCCAAGCTCTACCTGATGTGCTGCTAAGCATCAGGAACTTCATGGA
Tri-1	GCTTGAATCCATGAGCTTGTATGACTGCAAGCAGCATCAGGAACTTCATGGA
Tri-2	GCTTGCAGTCATAACAATCCTGAGCCTCTGAGCAGCATCAGGAACTTCATGGA
Tri-3	GCTCAGAGGCTCAGGAGCTCATGGATTCAAGCAGCATCAGGAACTTCATGGA

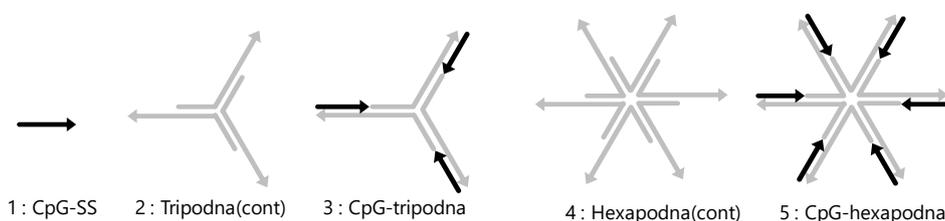


Figure 1-1 Two-dimensional representation of CpG-SS, tripodna(cont), CpG-tripodna, hexapodna(cont), and CpG-hexapodna

Each oligonucleotide is represented by an arrow, with the arrowhead corresponding to the 3' end of the oligonucleotide. The black arrows represent CpG motif-containing oligonucleotides and the dark arrows represent other oligonucleotides. CpG-tripodna was prepared by mixing CpG-SS, Tri-1, Tri-2, and Tri-3. CpG-hexapodna was prepared by mixing CpG-SS, Hexa-1, Hexa-2, Hexa-3, Hexa-4, Hexa-5, and Hexa-6.

まず、設計通りに DNA ナノ構造体が形成されるかを確認するため、polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) による解析を行った。Figure 1-2 は、PAGE 分析の結果を示した。全ての DNA サンプルはほぼ単一の主要バンドを呈した。レーン 2 及び 4 ではそれぞれ約 350 bp 及び 700 bp の DNA マーカーに相当する位置にバンドが認められ、これが tripodna(cont) 及び hexapodona(cont) であると考えられた。レーン 3 及び 5 では、tripodna(cont) 及び hexapodona(cont) に相当するバンドは消失し、また CpG-SS に相当するバンドも認められなかった。さらに、tripodna(cont) 及び hexapodona(cont) に相当するバンドが上方にシフトしていることから、CpG-tripodna 及び CpG-hexapodna が効率よく形成されていると考えられた。

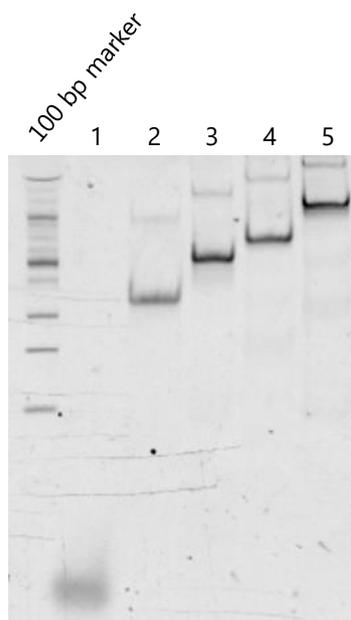


Figure 1-2 PAGE analysis of DNA nanostructures

Lane 1, CpG-SS; lane 2, tripodna(cont); lane 3, CpG-tripodna; lane 4, hexapodna(cont); and lane 5, CpG-hexapodna.

RAW264.7 細胞の TNF- α 産生量の経時変化

RAW264.7 細胞はマウス由来のマクロファージ様細胞であり、CpG DNA によって TLR9 が刺激されると、TNF- α などの炎症性サイトカインを培養培地中に放出する。培地中の TNF- α 濃度を測定することで TLR9 刺激能を評価可能であるが、CpG DNA 添加後の TNF- α 濃度の時間依存性は不明である。TLR9 刺激能を評価する際に最適な実験条件を探索するため、各 DNA ナノ構造体を添加した後の TNF- α 濃度を評価した。

Figure 1-3 には、CpG-SS (Figure 1-3a)、CpG-tripodna (Figure 1-3b)、または CpG-hexapodna (Figure 1-3c) を RAW264.7 細胞に添加した 1、2、4 及び 8 時間後における培養培地中の TNF- α 濃度を示した。同一の濃度で比較した時、CpG-hexapodna が最も培地中 TNF- α 濃度が高く、CpG-SS が最も低値であった。ただし、いずれの構造体においても、TNF- α 濃度は 8 時間までは時間とともに増加した。

本実験結果より、以降の実験においては各ナノ構造体添加 8 時間後の TNF- α 濃度を用いて、TLR9 刺激能を評価することにした。

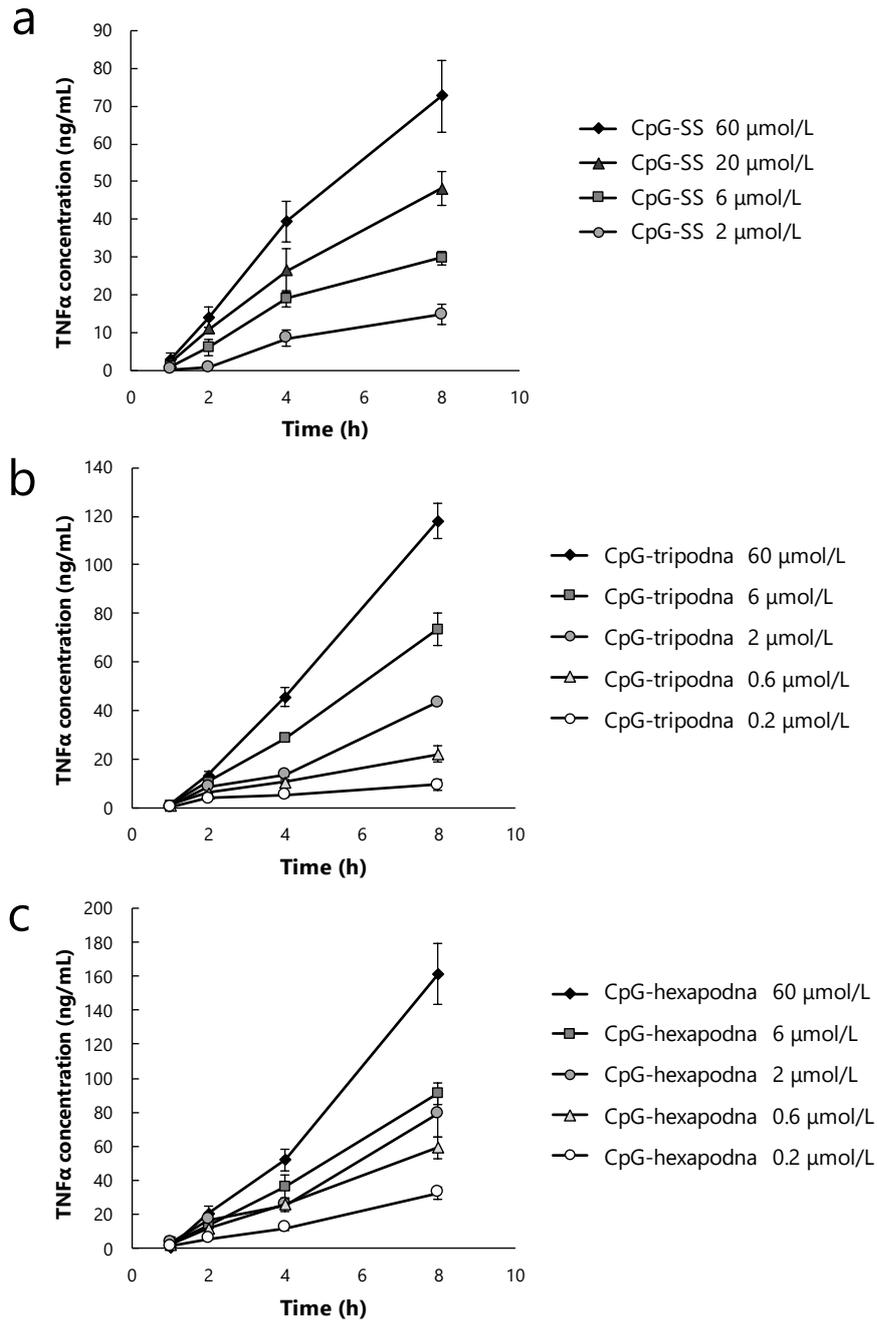


Figure 1-3 Time course of TNF- α production by RAW 264.7 cells after addition of CpG-SS, CpG-tripodna and CpG-hexapodna

RAW 264.7 cells were incubated with (a) CpG-SS, (b) CpG-tripodna or (c) CpG-hexapodna. At 1, 2, 4, and 8 h after incubation at 37°C, the TNF- α concentrations in culture media were measured. Results are expressed as mean \pm SD of four samples.

RAW264.7 細胞における CpG-DNA の TNF- α 産生

RAW264.7 細胞に各 DNA ナノ構造体添加 8 時間後の TNF- α 濃度を用いて、TLR9 刺激能の強度を比較した。Figure 1-4 は、CpG-SS、CpG-tripodna 及び tripodna(cont)の結果を示した。CpG-SS 及び CpG-tripodna は濃度依存的に TNF- α 産生を誘導し、一方で CpG モチーフのない tripodna(cont)は TNF- α を誘導しなかった。また CpG-tripodna による TNF- α 誘導能は、CpG-SS に比べて高く、6 μ M 及び 60 μ M の CpG-SS による TNF- α 誘導能は、それぞれ 0.6 μ M 及び 6 μ M の CpG-tripodna による TNF- α 誘導能と同程度であることを鑑みると、CpG-tripodna は CpG-SS より約 10 倍強力な TNF- α 誘導能を有すると考えられた。

Figure 1-5 は、CpG-SS、CpG-hexapodna 及び hexapodna(cont)の結果を示した。CpG-SS 及び CpG-hexapodna は濃度依存的に TNF- α を誘導し、一方で CpG motif のない hexapodna(cont)は TNF- α を誘導しなかった。CpG-hexapodna による TNF- α 産生の効率、CpG-SS 及び CpG-tripodna による効率よりも高かった。また CpG-hexapodna と CpG-SS による TNF- α 誘導能を比較すると、60 μ M の CpG-SS による TNF- α 誘導能は 2 μ M または 6 μ M の CpG-hexapodna による TNF- α 誘導能と同程度であることより、CpG-hexapodna は CpG-SS より約 10-30 倍強力な TNF- α 誘導能を有すると考えられた。

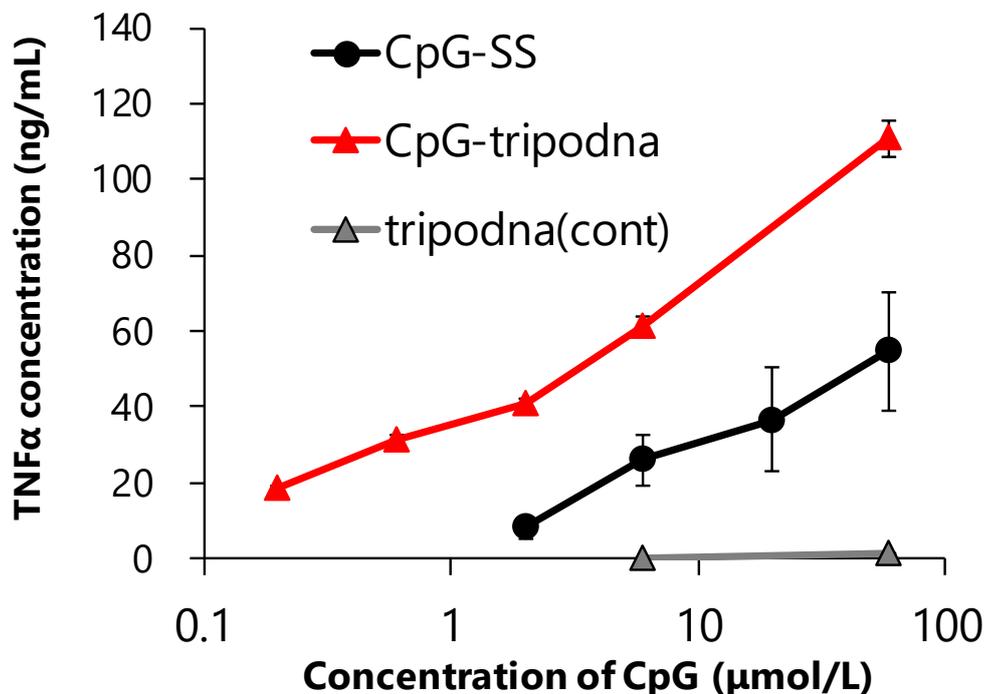


Figure 1-4 TNF- α production by RAW 264.7 cells after addition of CpG-SS, CpG-tripodna, and tripodna(cont) RAW 264.7 cells were incubated with CpG-SS, CpG-tripodna, and tripodna(cont). At 8 h after incubation at 37°C, the TNF- α concentrations in culture media were measured. Results are expressed as mean \pm SD of four samples.

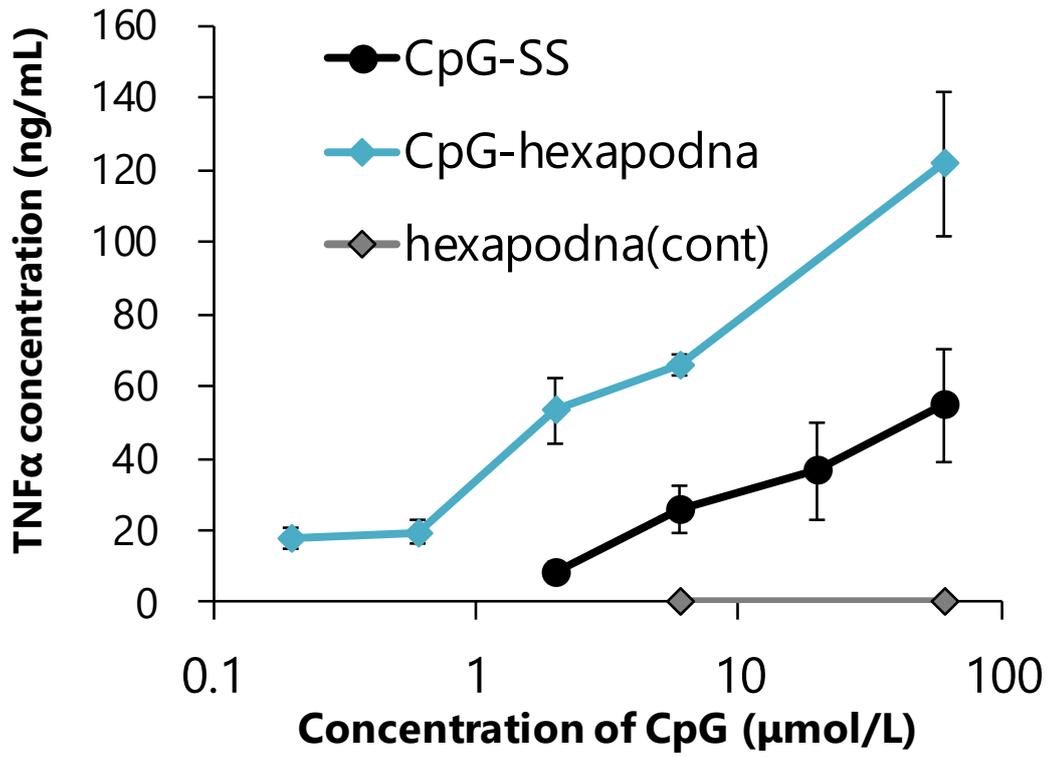


Figure 1-5 TNF- α production by RAW 264.7 cells after addition of CpG-SS, CpG-hexapodna, and hexapodna(cont) RAW 264.7 cells were incubated with CpG-SS, CpG-hexapodna, and hexapodna(cont). At 8 h after incubation at 37°C, TNF- α concentrations in culture media were measured. Results are expressed as mean \pm SD of four samples.

マウスに CpG DNA を静脈内投与した後の IL-12p40 産生

マウスに 1、10 及び 100 nmol/mouse の CpG-SS、0.2、1 及び 5 nmol/mouse の CpG-tripodna 並びに 0.2、1 及び 5 nmol/mouse の CpG-hexapodna を静脈内投与し、投与 1、2、4 及び 8 時間後に採血した。採血後の血液は速やかにヘパリン処理し、遠心分離して血漿を得た。血漿中の IL-12p40 濃度を ELISA 法にて測定し、測定結果を Figure 1-6 に示した。なお、血漿中の IL-12p40 のベースライン濃度は約 200~500 pg/mL であり、CpG-SS を 1 nmol/mouse 及び CpG-tripodna を 0.2 nmol/mouse で投与した時には血漿中の IL-12p40 濃度は、いずれの時間点においてもほぼベースラインに等しかったため、図には示さなかった。その他の場合には、各 CpG DNA 投与により用量依存的な IL-12p40 濃度の上昇が観察され、静脈内投与後 2~4 時間で最大血漿中濃度 (C_{max}) に達し、その後減少した。5 nmol/mouse の用量で CpG-hexapodna を投与した後の IL-12p40 濃度は、100 nmol/mouse の用量で CpG-SS を投与した時とほぼ同等であり、この結果から CpG-hexapodna が CpG-SS に比べて約 20 倍の効率で IL-12p40 産生を誘導すると考えられる。10 nmol/mouse の用量で CpG-SS を投与した後の IL-12p40 濃度は、1 nmol/mouse の用量で CpG-tripodna を投与した時よりもやや高く、また 5 nmol/mouse の用量で CpG-tripodna を投与した時よりも明らかに低かったことより、CpG-tripodna が CpG-SS に比べて約 5 倍の効率で IL-12p40 産生を誘導すると考えられる。

さらに IL-12p40 産生能を定量的に評価するために、血漿 IL-12p40 濃度の AUC を算出した (Table 1-2、Figure 1-7)。CpG-SS、CpG-tripodna 及び CpG-hexapodna を 1 nmol/mouse の用量で投与した場合を比較すると、CpG-hexapodna を投与した時に AUC は最も高い値を示し、次いで CpG-tripodna であった。マウスに投与された CpG1668 のモル数が各群において同量であることを考慮すると、hexapodna が CpG1668 を最も効率的に TLR9 発現細胞に送達できるキャリアであると考えられた。

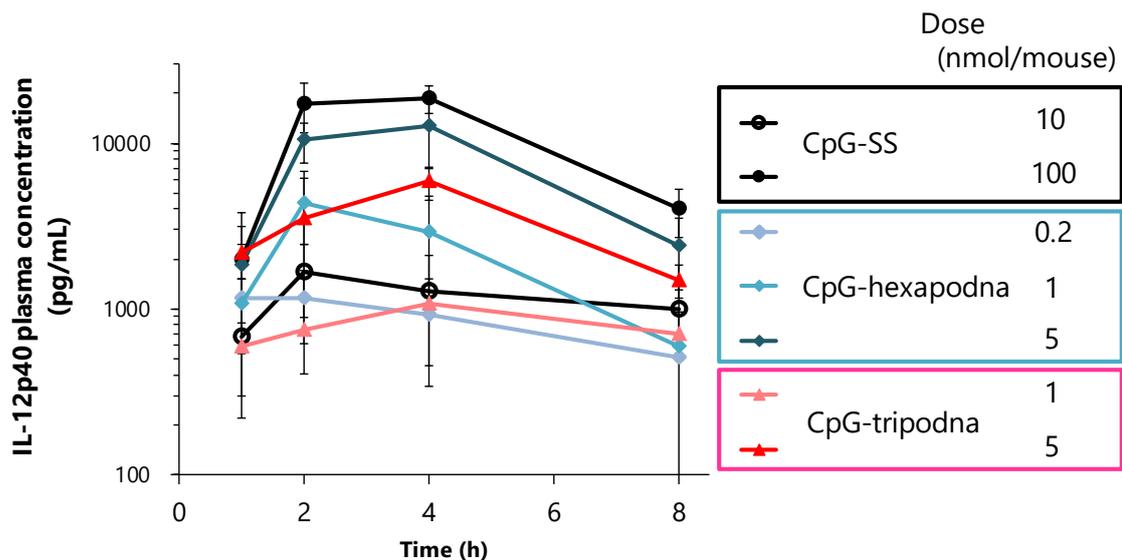


Figure 1-6 Plasma concentrations of IL-12p40 after intravenous injection of CpG-SS, CpG-tripodna, and CpG-hexapodna into mice

Mice received an intravenous injection of CpG-SS, CpG-tripodna, or CpG-hexapodna at indicated doses. At 1, 2, 4, and 8 h after injection, blood was collected and the concentrations of IL-12p40 in plasma were measured. Results are expressed as mean values \pm SD of 4–8 mice.

Table 1-2 AUC of IL-12p40 after intravenous injection of CpG-SS, CpG-tripodna, and CpG-hexapodna into mice

	CpG dose (nmol/mouse)	AUC₀₋₈ (ng·h/mL)
CpG-SS	10	9.0 \pm 3.3
	100	92.1 \pm 15.4
CpG-tripodna	1	6.4 \pm 1.4
	5	28.2 \pm 5.3
CpG-hexapodna	0.2	6.7 \pm 1.9
	1	17.5 \pm 5.1
	5	60.3 \pm 21.9

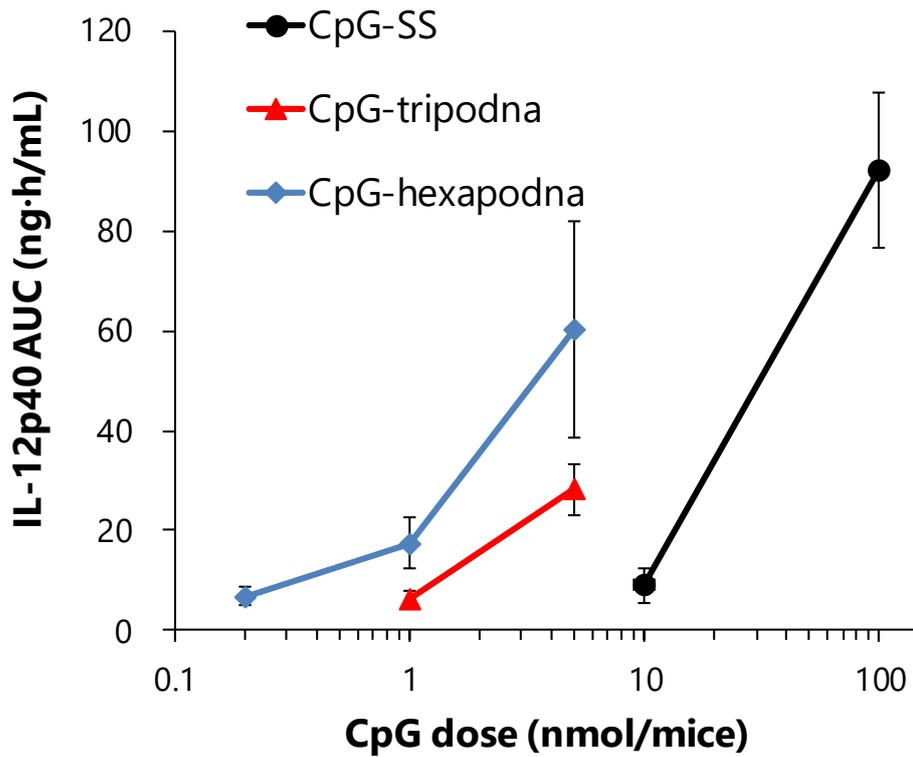


Figure 1-7 AUC of IL-12p40 after intravenous injection of CpG-SS, CpG-tripodna, and CpG-hexapodna into mice. Mice received an intravenous injection of CpG-SS, CpG-tripodna, or CpG-hexapodna. AUC was calculated from the plasma concentration-time curve of IL-12p40, and plotted against the administered dose of CpG-SS, CpG-tripodna, or CpG-hexapodna. Results are expressed as mean values \pm SD of 4–8 mice.

考察

培養細胞を用いた *in vitro* 実験において、CpG DNA をナノ構造体化することにより CpG DNA の TLR9 刺激能を強く増強することが可能であるという報告は多数存在している^{16,17}。しかしながら、DNA ナノ構造体の有用性について、動物を用いた *in vivo* 実験における情報は限られているのが実情である。*in vivo* 実験においては、様々な DNA 分解酵素が生体内に存在している点、または血清アルブミンに代表されるような DNA ナノ構造体と相互作用しうるタンパク質が存在しているという点で、*in vitro* 実験とは大きく条件が異なっている。これらが DNA ナノ構造体の薬物動態に影響を及ぼすことで *in vivo* での有効性が変化すると考えられるため、*in vitro* で認められる DNA ナノ構造体の有効性が *in vivo* でも反映するかどうかは不明であった。そこで本研究では、実際にナノ構造体化した CpG DNA をマウスに静脈内投与することで、*in vitro* 条件等同様に *in vivo* 条件においても CpG DNA の活性が増強されることを確認した。したがって、tripodna や hexapodna 等の DNA ナノ構造体は、*in vitro* 及び *in vivo* の両方で CpG DNA の TLR9 刺激能を増強するために有用であると考えられる。

これまでに、CpG モチーフを有する tripodna、hexapodna 及びその他の polypodna が、TLR9 を介した自然免疫を非常に効率的に誘導できることが明らかにされている¹⁶⁻¹⁸。この効率的な TLR9 刺激能の増強は、RAW264.7 細胞及びその他の免疫細胞における DNA ナノ構造体の細胞内取り込み量と正の相関が認められている。ところで、一本鎖 CpG DNA と比較して二本鎖 CpG DNA は TLR9 刺激能が弱いことが報告されており、このことから CpG-tripodna や CpG-hexapodna が TLR9 シグナルを刺激するためには、免疫細胞のエンドソーム内に取り込まれた後、一本鎖への解離することが必要であると考えられる^{19,20}。以前の研究において、polypodna の pod 数が増加することに伴い、高次構造の熱安定性が低下し一本鎖へと解離しやすくなることが示されている¹⁵。以上のことから、DNA ナノ構造体による TLR9 刺激能の増強においては、免疫細胞への取り込み量だけでなく、免疫細胞のエンドソーム内での一本鎖への解離しやすさが、非常に重要な因子と考えられる。

以前の研究で用いられた polypodna は、異なる配列の CpG モチーフを一つの DNA ナノ構造体の中に複数個含んでおり、またそれらの CpG モチーフは DNA ナノ構造体を構成する個々の ODN 上の異なる位置に存在しているものであった^{16,17}。CpG DNA による TLR9 刺激能は、CpG モチーフの配列や CpG モチーフの ODN 上の位置によって異なることが報告されており^{21,22}、これまでの研究で用いられた polypodna は、CpG DNA をナノ構造体化することによって得られる TLR9 刺激能の増強の程度に関して、構造-活性相関を正確に評価するには適していないと考えられる。したがって本研究では、CpG モチーフを一つだけ有する CpG1668 と同一の配列の CpG ODN (CpG-SS) を用い、CpG モチーフを含まない ODN のみから構成される tripodna 及び hexapodna で、かつ CpG-SS の結合部位を一つだけ有する DNA ナノ構造体を設計し、これらを CpG-SS のキャリアとした。なお CpG-SS の結合部位については、CpG-SS と完全な相補鎖とした場合には当該部位が CpG モチーフとなっ

まうため、これを避けるために 1 塩基のミスマッチを導入し、CpG モチーフが入らないような工夫を施した。CpG-SS を含まない tripodna 及び hexapodna は tripodna(cont)及び hexapodna(cont)と定義し、これらは対照群として評価に用いた。Tripodna(cont)及び hexapodna(cont)に対し、CpG-SS を結合させたものを CpG-tripodna 及び CpG-hexapodna と定義し、この DNA ナノ構造体と CpG-SS の TLR9 刺激能を評価した。本研究で用いた CpG-tripodna 及び CpG-hexapodna は CpG-SS 結合部は共通の塩基配列を有しており、すなわち CpG-tripodna 及び CpG-hexapodna から CpG-SS が解離する程度には差がないと考えられる。したがって、CpG-tripodna と CpG-hexapodna との間の TLR9 刺激能の差異は、標的細胞 (TLR9 発現細胞) に取り込まれた量の差異を反映していると推測することができる。

In vitro 実験ではマウスのマクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞を用いて、CpG-SS、CpG-tripodna 及び CpG-hexapodna によって誘導される TLR9 媒介性サイトカイン産生量を評価することにした。以前の研究において、TLR9 刺激に基づいて RAW264.7 細胞が産生するサイトカインは、TNF- α や IL-6 は高濃度であった一方で、IL-12p40 の産生量はわずかであった。また、IL-6 と TNF- α で比較した時、産生量の絶対値は異なっていたものの、様々な CpG 含有 DNA ナノ構造体に対する産生量の序列は同等であった。以上のことから、本研究では *in vitro* では TNF- α を選択して、各 DNA ナノ構造体の免疫賦活活性を評価することとした。

マウスへ CpG DNA を投与する *in vivo* 実験においては、*in vitro* 実験とは対照的に、投与量依存的に血漿中 IL-12p40 濃度を増加させた一方で、血漿中 TNF- α 濃度及び IL-6 濃度の増加の程度はわずかであった²³。したがって、本研究では *in vivo* では IL-12p40 を指標にして、各 DNA ナノ構造体の免疫賦活活性を評価することとした。

本検討において *in vitro* 実験と *in vivo* 実験において評価対象のサイトカインは異なるが、評価対象の細胞によって下流シグナルの応答が異なるため、各実験系における測定感度を考慮して測定対象のサイトカインを決定した。CpG DNA がレセプターである TLR9 に結合してシグナルは活性化されるが、細胞によって TLR9 シグナル活性化による応答は異なり、産生されるサイトカインの種類は異なる。評価対象の下流シグナルが異なっても、DNA ナノ構造体の TLR9 刺激能を評価する上で大きな問題はないと考えられる。なお、ヒトにおいては、形質細胞様樹状細胞及び B 細胞上で TLR9 が発現している一方で、マウスではマクロファージにおいても TLR9 を発現している。我々の以前の研究では、脾臓マクロファージ及び肝臓中のクッパー細胞を含む様々なタイプのマクロファージが、CpG DNA の添加により TNF- α を放出することを示している²⁴。マウスの生体内に存在するこれらの細胞数を考慮すると、マウスへの全身投与後に CpG DNA に応答する細胞は、主としてマクロファージであると考えられる。ヒトにおいては CpG DNA に応答する細胞の存在比がマウスとは異なるため、全身投与した際のサイトカイン放出には種差が認められるであろう。

PO 結合型の DNA、特に ODN のような短い DNA は酵素的に特に不安定であり、体内に存在するヌクレアーゼによって速やかに分解される。ODN の体内動態に関する文献報告に

においては、ODN はマウスへの静脈内投与後に速やかに分解され消失することが明らかとなっている²⁵。予備検討実験として、一本鎖の ODN(CpG-SS とは配列が異なる)及び tripodna に組み込んだ ODN の体内動態を、ODN をヨウ素-125 (¹²⁵I) で標識して評価した。¹²⁵I-ODN-SS 及び ¹²⁵I-ODN-tripodna をマウスに静脈内投与した際、放射能の組織分布に明らかな有意差は認められなかった。しかし、¹²⁵I-ODN-tripodna を投与した際に、投与直後においては脾臓中の放射能は ¹²⁵I-ODN-SS 投与時よりもやや高かった。これは、¹²⁵I-ODN-tripodna が脾臓細胞により効率的に取り込まれたことを示唆している。ただし、¹²⁵I-ODN-SS 投与時の結果とあまり相違がなかったという結果は、ODN もしくは ODN-tripodna の生体内における安定性 (¹²⁵I 標識部位の安定性を含む) が著しく低いとためと考えられる。Polypodna の実質的な組織分布を正確に評価するには、測定方法を改良するなどのさらなる研究が必要である。

以上、第一章での研究成果をまとめる。本研究では、CpG-tripodna または CpG-hexapodna が *in vivo* において CpG DNA に基づく TLR9 シグナルを有意に活性化することを明らかにした。また TLR9 シグナル活性化の程度は、RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* の実験系で観察されたものと同程度であった。したがって、polypodna は *in vitro* だけでなく *in vivo* 条件においても CpG DNA のキャリアとして利用可能であり、またその有効性については *in vitro* 実験の結果から *in vivo* の結果をある程度外挿可能であると考えられた。

第二章 多足型 DNA ナノ構造体を利用した免疫抑制性オリゴヌクレオチドの免疫細胞へのデリバリー

序論

異常かつ過剰な免疫応答は、炎症性疾患や自己免疫疾患の原因となる。先天性の免疫系、すなわち自然免疫は TLR シグナル経路の活性化により誘導され、これが自己免疫疾患の一因であると考えられている²⁶。第一章でも述べたように、ウイルスや細菌由来の非メチル化 CpG DNA は、TLR9 に認識され免疫応答を誘導しサイトカインやケモカインを放出するため、この免疫応答を抑制することができれば、炎症性疾患や自己免疫疾患を治療可能であると考えられる。

免疫抑制性オリゴデオキシヌクレオチド（免疫抑制性 ODN）は、自然免疫の活性化を抑制する作用を有する 20 mer 程度の核酸であり、その作用機序から炎症性疾患や自己免疫疾患の治療薬となることが期待されている^{27,28}。グアニンを豊富に含むような免疫抑制性 ODN は、TLR9 に対してリガンドの CpG DNA と競合的に結合し、CpG DNA によって活性化される免疫応答を抑制する^{29,30}。A151 は免疫抑制性 ODN の一つであり、PS 結合のみから構成されており、またその塩基配列は哺乳動物のテロメアに散見される TTAGGG の反復配列であるのが特徴である。A151 の免疫抑制活性は、反復的な TTAGGG 配列モチーフに由来する逆平行 G-quadruplex 構造に依存する³¹。A151 は TLR9 への CpG DNA の結合を阻害するだけでなく、STAT タンパク質に直接結合し、それらのリン酸化を妨げることにより JAK-STAT シグナル伝達を阻害するという機序でも免疫応答を抑制する^{31,32}。A151 は、TLR9 のアンタゴニストとして作用するだけでなく STAT1/4 への結合に代表されるような TLR 非依存的な免疫抑制作用も有しているために、マクロファージ、Th1 細胞、Treg 細胞を含む様々な免疫細胞に作用することが報告されている³²⁻³⁴。さらには、A151 は致死的なエンドトキシンショックモデルのマウスで治療効果を示し、自己免疫性肝炎及び炎症性肺癌を治療するのに有用であることも報告されている³⁵。これらの以前の研究では、A151 を単純に各モデルマウスに投与するのみであり、A151 の免疫抑制活性を増強させようとする試みは検討されていない。

様々な機能性核酸の生物活性を増強する上で、標的細胞へ送達を改善することは非常に効率的なアプローチである。標的細胞への送達を可能にする手法の一つとして、DNA ナノ構造体を用いる手法がある³⁶。DNA ナノ構造体は、相補的な DNA 鎖間の水素結合に基づく二本鎖形成によって形成可能なナノ粒子であり³⁷、1 章で述べた polypodna 以外にも、DNA origami³⁸、DNA tiles³⁹、DNA tetrahedra⁴⁰ など、様々な DNA ナノ構造体が報告されている。これら DNA ナノ構造体の中でも polypodna は、比較的シンプルな構造であるために A151 を効率よく搭載可能という点でキャリアとして利点があり、またこれまでの報告から免疫細胞へデリバリーする上で優位性があると考えられる^{16,17}。

以上のように、polypodna は A151 のような免疫抑制性 ODN のキャリアとしても有用であ

ると推察できるが、現状ではそのような検討はほとんどなされていない。本研究では、A151のキャリアとして hexapodna を選択してその有用性を評価した。すなわち、A151 を 6 分子搭載可能な hexapodna を設計し、それと A151 の複合体である supHexapodna を調製し評価に用いた。A151 単独と supHexapodna の免疫抑制活性を比較して、免疫抑制性 ODN のキャリアとしての polyodna の有用性を評価した。

結果

Hexapodna 及び supHexapodna の形成確認

Table 2-1 に本研究で用いた ODN の塩基配列を、Figure 2-1 に本研究で用いる構造体の模式図を示した。Hexapodna は各 pod の先端に A151 に対して相補的な配列を有しており、当該部位に A151 を搭載可能である。A151 を 6 分子搭載した hexapodna を supHexapodna とした。supHexapodna の形成は、PAGE 分析によって確認した。Figure 2-2 に示した通り、hexapodna のレーンではいずれの一本鎖とも異なる高分子側に主たるバンドが認められており、高効率で hexapodna が形成されていることを確認した。supHexapodna のレーンでは、hexapodna に該当するピークが消失し、さらに高分子側へシフトしたピークが確認された。また A151 に該当するバンドも確認されず、以上の結果より supHexapodna が高効率で形成されていると考えられた。

Table 2-1 Sequences of ODNs used in Chapter 2

ODN	Sequence (5' to 3')
A151	T*T*A*G*G*G* T*T*A*G*G*G* T*T*A*G*G*G* T*T*A*G*G*G* ^a
hexa1	TAGCAGCACATCAGGT TCTGAGCCTTGCTGCA <u>CCCTAA CCCTAA CCCTAA CCCTAA</u> ^b
hexa2	TGCAGCAAGGCTCAGA TCTGCTCAAGCCTGCA <u>CCCTAA CCCTAA CCCTAA CCCTAA</u>
hexa3	TGCAGGCTTGAGCAGA CAGAGCCTTGAGCCTA <u>CCCTAA CCCTAA CCCTAA CCCTAA</u>
hexa4	TAGGCTCAAGGCTCTG GAGGCTCTTAAGCTGC <u>CCCTAA CCCTAA CCCTAA CCCTAA</u>
hexa5	GCAGCTTAAGAGCCTC AGAGCTTGGCATAGCA <u>CCCTAA CCCTAA CCCTAA CCCTAA</u>
hexa6	TGCTATGCCAAGCTCT ACCTGATGTGCTGCTA <u>CCCTAA CCCTAA CCCTAA CCCTAA</u>
CpG 1668	TCCAT GACGT TCCTG ATGCT

^a Phosphorothioate linkages are shown as *. ^b The complementary sequences to A151 are underlined.

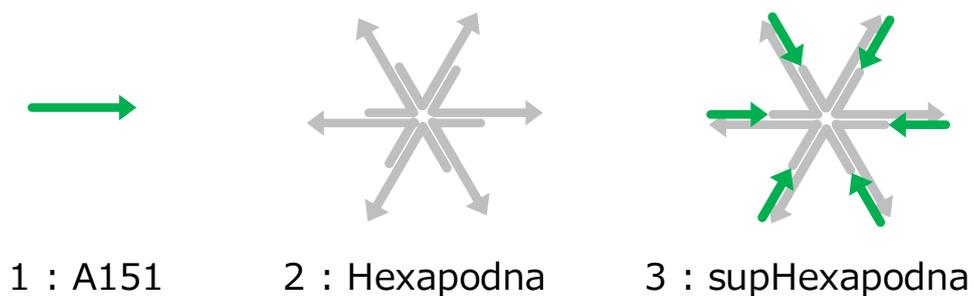


Figure 2-1 Two-dimensional representation of A151, hexapodna, and supHexapodna

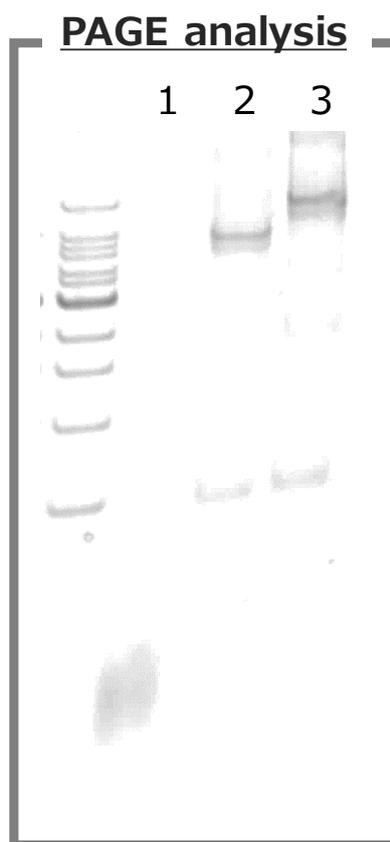


Figure 2-2 PAGE analysis of A151, hexapodna, and supHexapodna

Hexapodna was prepared by annealing six phosphodiester oligodeoxynucleotides. supHexapodna was prepared by annealing hexapodna with a six-fold molar excess of A151. DNA samples were subjected to 6% PAGE and then the gel was stained with SYBR® Gold. The image was obtained using an LAS-3000 imager. Lane 1, 20-bp DNA ladder; lane 2, 100-bp DNA ladder; lane 3, A151; lane 4, hexapodna; lane 5, supHexapodna.

各 DNA ナノ構造体の立体構造解析

通常の本鎖及び二本鎖の B 型 DNA は、245nm で極小値及び 260~280 nm で広い極大値を呈するスペクトルを示す。また、これまでに tripodna が B 型 DNA と同様のスペクトルを呈することも報告されている¹⁶。対照的に、A151 は逆並行 G-quadruplex 構造を形成するために、210 及び 290 nm 付近に極大値を、260 nm 付近に極小値を呈する特徴的なスペクトルを示すことが報告されている⁴¹。

A151 が hexapodna に組み込まれた場合、その G-quadruplex 構造を維持していないと想定されるため、各 DNA ナノ構造体における DNA の立体構造を確認するべく円偏光二色性スペクトル (CD スペクトル) を測定した。Figure 2-3 には、A151、hexapodna 及び supHexapodna の CD スペクトルを示した。A151 は文献報告通り逆平行 G-quadruplex の特徴的なスペクトルを示しており、一方 hexapodna 及び supHexapodna は B 型 DNA と同様のスペクトルを示した。

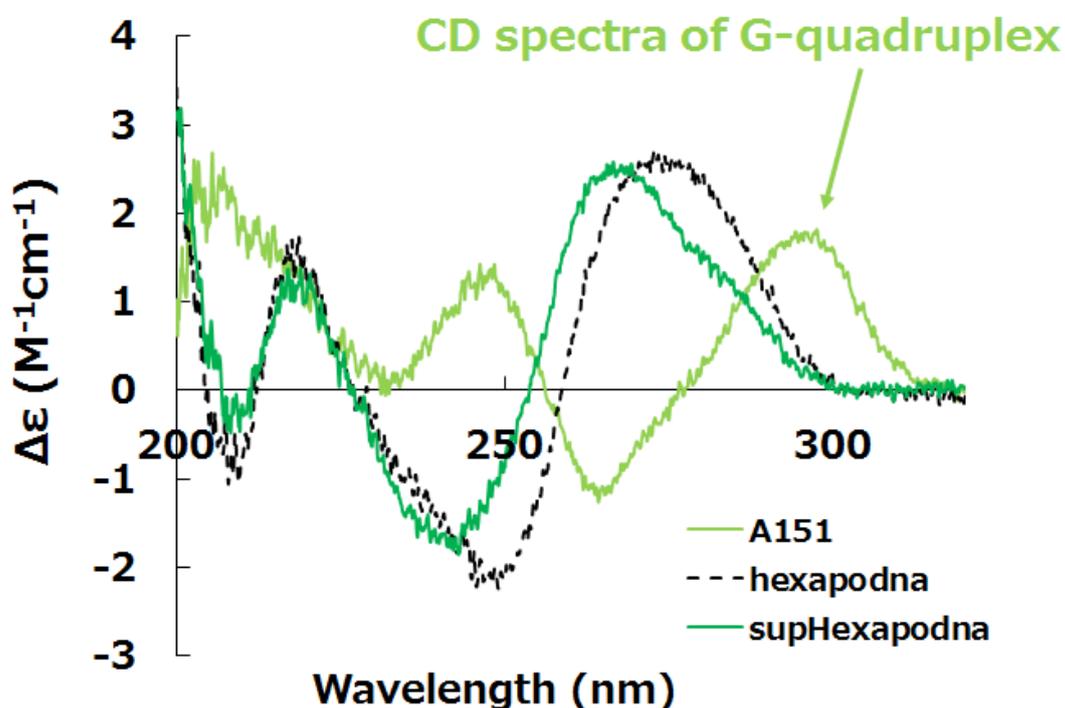


Figure 2-3 CD spectra of A151, hexapodna, and supHexapodna

CD spectra of A151, hexapodna, and supHexapodna were measured between 200–320 nm using a spectropolarimeter with a 0.1-cm path-length quartz cell in 150 mM sodium chloride containing TE buffer at 20°C.

RAW264.7 細胞の TNF- α 産生に対する A151 及び supHexapodna の阻害作用

RAW264.7 細胞を CpG1668 で刺激することによって放出される TNF- α 量を指標にして supHexapodna の免疫抑制活性を評価した。Figure 2-4 に培養上清中の TNF- α 濃度を示した。A151 は単独添加において TNF- α 産生量を抑制した。また、同モル数の A151 を含む supHexapodna は、A151 単独添加と比較して TNF- α 産生を有意に強く抑制した。一方で hexapodna 単独添加においては TNF- α 産生は抑制されなかった。以上の結果より、supHexapodna は A151 よりも強い免疫抑制活性を有していると考えられた。

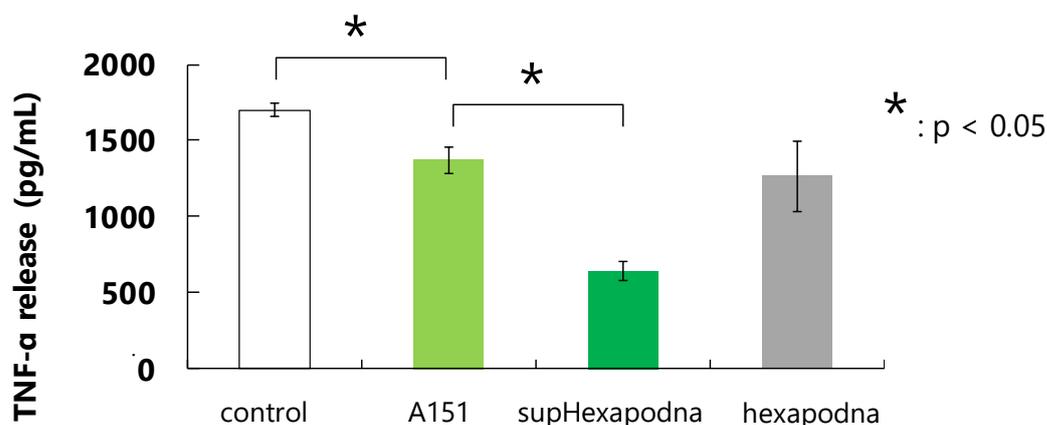


Figure 2-4 Suppression of CpG 1668-induced TNF- α release from RAW 264.7 cells

RAW264.7 cells were incubated with CpG1668 (control) with or without A151, supHexapodna, and hexapodna for 8 h at 37°C. The concentrations were 3 nM for A151 and 0.5 nM for supHexapodna and hexapodna, because 0.5 nM supHexapodna contained 0.5 nM hexapodna and 3 nM A151. The concentrations of TNF- α in the cell culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. The results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of four culture wells. Experiments were repeated three times and representative results are shown. *, $p < 0.05$.

RAW264.7 細胞による A151 及び CpG1668 の細胞取り込み

supHexapodna の高い阻害活性は、RAW264.7 細胞による A151 の細胞内取り込みの増大もしくは CpG1668 の細胞内取り込みの阻害の 2 つの可能性が考えられるため、それぞれについて検討した。第一に、TNF- α 産生阻害作用の評価の際と同じ条件で、RAW264.7 細胞へ Alexa Fluor-488 標識 A151 を添加後 2 時間での細胞内取り込み量を評価した。その結果、Figure 2-5 に示した通り、A151 を hexapodna に組み込んだ supHexapodna は A151 よりも高い MFI (mean fluorescence intensity) を示した。さらに、CpG1668 と A151 もしくは supHexapodna を同時にインキュベーションした場合においても、supHexapodna は A151 よりも高い MFI を示した。次に、Alexa Fluor-488 標識 CpG1668 の細胞内取り込みに与える影響を評価した。

Figure 2-6 に示した通り、A151、hexapodna 及び supHexapodna のいずれも、CpG1668 の細胞内取り込みに影響は与えなかった。

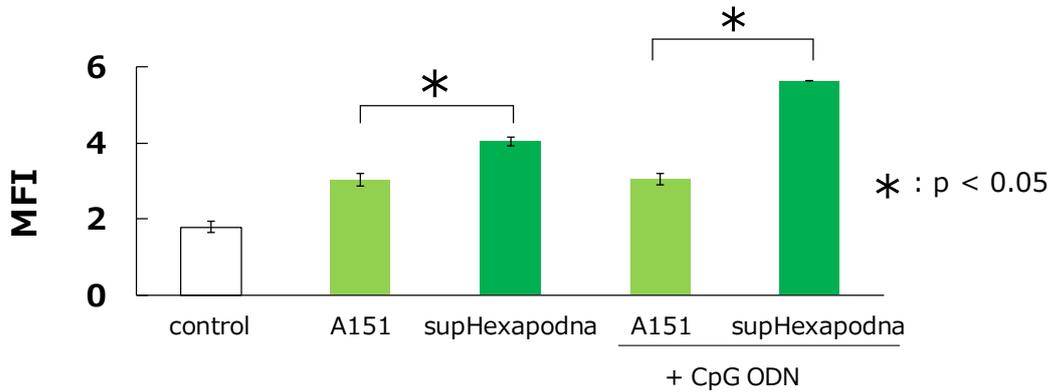


Figure 2-5 Uptake of Alexa Fluor 488-labelled A151 by RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were incubated with Alexa Fluor® 488-labelled A151 (AF-A151) or supHexapodna (AF-supHexapodna) with or without 5 µM CpG1668 for 2 h at 37°C.

The concentrations used were 3 nM for A151 and 0.5 nM for supHexapodna because 0.5 nM supHexapodna contained 0.5 nM hexapodna and 3 nM Alexa Fluor® 488-labelled A151. The mean fluorescence intensity of the cells was determined by flow cytometry. The results are shown as the mean ± SD of three culture wells. Experiments were repeated three times and representative results are shown. *, $p < 0.05$.

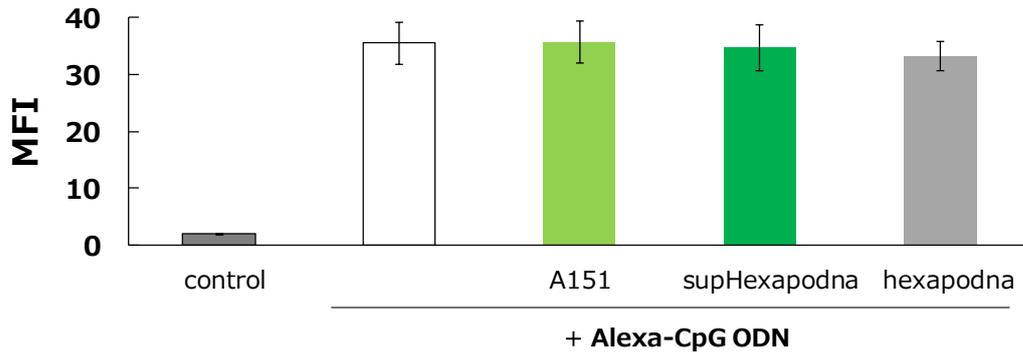


Figure 2-6 Uptake of Alexa Fluor 488-labelled DNA by RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were incubated with 5 µM Alexa Fluor® 488-labelled CpG1668 (AF-CpG1668) with or without A151, supHexapodna, or hexapodna for 2 h at 37°C. The concentrations used were 3 nM for A151, and 0.5 nM for supHexapodna and hexapodna, because 0.5 nM supHexapodna contained 0.5 nM hexapodna and 3 nM Alexa Fluor® 488-labelled A151. The mean fluorescence intensity of the cells was calculated by flow cytometry. The results are shown as the mean ± SD of four culture wells. Experiments were repeated three times and representative results are shown.

考察

第一章において述べたように、多足型 DNA ナノ構造体 (polypodna) は、免疫細胞に効率的に取り込まれるため、免疫刺激性核酸である CpG DNA を免疫細胞に送達可能である。本研究では、免疫抑制性核酸である A151 を用いて、A151 の標的細胞の 1 つであるマクロファージへ効果的に送達可能であるかを評価するとともに、その免疫抑制活性を増強することが可能であるかを検討した。以前の研究において hexapodna は免疫細胞に取り込まれやすい最も効率的な polypodna であったことから¹⁶、本研究では A151 のキャリアとして hexapodna を選択した。最近の研究成果として、hexapodna は線維芽細胞及び内皮細胞などの細胞と比較して、樹状細胞及びマクロファージなどの免疫細胞に効率的に取り込まれることが報告されている⁴²。この効率的な取り込みメカニズムの詳細については不明であるが、いわゆる「DNA 受容体」⁴³⁻⁴⁵ が免疫細胞による効率的な取り込みに関与していることが推察される。

CD スペクトル解析の結果では、A151 は文献報告されていた通りに G-quadruplex を形成したが⁴¹、hexapodna と混合することで supHexapodna を形成したと考えられる DNA 二本鎖構造の波形を呈した。また PAGE 解析の結果において、supHexapodna は hexapodna よりも高分子側に単一ピークで検出されていたことから、本研究で用いた supHexapodna は Figure 2-2 で示したデザイン通りの構造を形成していると考えられた。また、A151 は hexapodna をはじめとして、相補的配列を有する polypodna に効率よく組み込むことが可能であると推測できる。

A151 は CpG DNA の細胞内取り込みは阻害せず、CpG DNA の受容体である TLR9 と競合的に結合して、下流シグナルであるサイトカイン放出を阻害すると報告されている³¹。Figure 2-6 に示したとおり、A151、hexapodna、及び supHexapodna は、RAW264.7 細胞による CpG1668 の細胞内取り込みにはほとんど影響を与えず、この結果は、文献報告されている結果とも矛盾しなかった。また、Figure 2-5 で示したとおり、supHexapodna の方が A151 に比して RAW264.7 細胞による細胞内取り込み量が増大しており、これが A151 単独よりも supHexapodna の方が高い免疫抑制活性を発揮した主たる要因と考えられる。なお 3 nM 相当の A151 を含む supHexapodna の免疫抑制活性は 30 nM の A151 とほぼ同等であり、hexapodna を A151 のキャリアとして用いることで高価な PS 核酸である A151 の用量低減可能であるという点において有用性が見出された。

A151 の免疫抑制活性にはその G-quadruplex 構造が重要であることが報告されている³¹。A151 が hexapodna に組み込まれると A151 の G-quadruplex 構造が失われたことから、A151 が組み込まれた supHexapodna 自体が免疫抑制活性を発揮するのではなく、細胞内で supHexapodna から解離した A151 が CpG1668 によるサイトカイン誘導を阻害したと考えられる。本研究では、supHexapodna からの A151 の解離を直接的には評価していない。しかしながら、CpG DNA を含む DNA ナノ構造体を用いた以前の検討において、各 DNA ナノ構造

体の構成成分である ODN は細胞内取り込み後にエンドソーム内で解離することが示唆されている¹⁶。A151 と hexapodna 上のその相補配列との間の融解温度 (T_m 値) は、A151 が PS 結合骨格を有することから以前の研究で使用していた DNA-DNA 間の T_m 値より低いと考えられ、このことから A151 は細胞取り込み後にエンドソーム内で hexapodna から解離していると推測できる。エンドソーム内で supHexapodna から解離した A151 は、G-quadruplex 構造を再形成して CpG1668 によるサイトカイン誘導を阻害していると考えられる。

以上の結果をまとめる。A151 を hexapodna に組み込み supHexapodna とすることで、免疫抑制活性が向上することが示された。したがって、hexapodna をキャリアとして用いることで、A151 の有効性の向上と臨床投与量の低減が期待できる。PS 核酸である mipomersen⁴⁶ や drisapersen⁴⁷ が臨床試験において肝毒性や腎毒性の所見が認められていることから、同様に PS 核酸である A151 を臨床応用する上では、これらの毒性が懸念される。したがって、A151 の用量を低減させることが可能になれば、hexapodna をはじめとした polypodna は非常に有用なキャリアと考えられる。

第三章 多足型 DNA ナノ構造体を利用したモルフォリノ核酸の体内動態制御

序論

核酸医薬品はその生物活性から様々な疾患の治療薬へと応用可能であると期待されてきたが、多くの医薬品候補化合物が、前臨床段階または臨床段階においてヒトでの有効性を見出せずに失敗している⁴⁸。近年になり立て続けに 3 剤 mipomersen (Kynamro)、eteplirsen (Exondys 51)、及び nusinersen (Spinraza) が承認されたが、それらを含め現在のところ承認されているのは fomivirsen (Vitravene)、pegaptanib (Macugen) を含めた 5 種類の薬剤のみである。かつて多くの核酸医薬品がドロップアウトしてきた背景には、標的分子選択の難しさ、細胞膜透過性の低さ、低分子薬や抗体医薬との差別化の困難さ、医薬品原薬のコストの高さなどいくつかの要因がある。中でも最も大きな要因は、生体内での不安定性を含む望ましくない薬物動態特性である。核酸医薬品の薬物動態特性の改善は、これらの薬物候補を上市する上で必要不可欠である。

この薬物動態特性の改善を意図して、核酸自体に様々な化学修飾を施す研究が進行中である。モルフォリノ核酸 (phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide、PMO) は、ASO として利用可能な核酸類似化合物の 1 つである。PMO は天然型のオリゴヌクレオチドとは異なり、負電荷を持たず、またヌクレアーゼ耐性を有し生体内で非常に安定である⁴⁹。PMO は標的 mRNA の翻訳阻害剤としての機能や、pre-mRNA のスプライシング制御薬として作用しエクソスキッピング作用を誘導する機能を有しており、この機能を医薬品として応用する研究が進行中である。PMO を用いた臨床試験が進んでいる代表例としては、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD)⁵⁰、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染⁵¹、及びマールブルグウイルス感染⁵²などの例が挙げられる。

Eteplirsen は PMO 骨格を有する最初の承認された核酸医薬品であり、ジストロフィンのプレ mRNA を標的とする DMD 治療薬である⁵³。DMD 患者では、筋細胞の裏打ちタンパク質であるジストロフィンが欠損しているため、細胞膜の構造が脆弱になっており、PMO やその他の核酸医薬品のような高分子化合物であっても細胞内に送達されると考えられている⁵⁴。しかし、Eteplirsen は血漿タンパク結合性が低く尿中に速やかに排泄されるため、投与量に対する筋細胞内への移行量はわずかである⁵⁵。また、DMD 患者の筋組織以外では、排泄臓器である腎臓を除く組織移行性は非常に低く、DMD 以外の疾患治療薬として PMO を応用することは困難である⁵⁶。つまり、PMO の薬物動態特性、特に細胞内取り込みを改善・向上させるようなアプローチは、DMD だけでなくその他の疾患の治療薬へと応用する上で欠かせないものである。

PMO の膜透過性を高めるため、様々なアプローチの研究が実施されている。代表的なものとしてオクタグアニジンエンドリマーを結合した PMO (Vivo-morpholino®) があり、様々な組織に効果的に分布すると報告されている^{57,58}。またカチオン性のアルギニンを豊富に含

んだ細胞膜透過性ペプチドを結合した PMO (Cell-penetrating peptides conjugated morpholino) も、PMO の膜透過性を改善する有望な技術と考えられている^{59,60}。現在臨床試験中である AVI-4065 (HCV 感染症治療薬) や AVI-7288 (マールブルクウイルス感染症治療薬) は、カチオン性ペプチドと結合した PPMO である^{51,52}。Bhadra らはテトラグアニジン結合型 PMO が非常に効率よく細胞膜を透過することを報告しており、この PMO は vivo-PMO や PPMO に比べて細胞毒性が大きく低減している点で優れていると考えられている⁶¹。腫瘍指向性のアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) ペプチドと結合した PMO (PMO-RGD) を、さらにヒト血清アルブミンに結合してナノ粒子を形成させることで、PMO-RGD 単独と比較して培養細胞への移行性が大きく増強したことが報告されている⁶²。また poly(amidoamine) (PAMAM) デンドリマーをコアにして、ジスルフィド結合により PMO を結合させた超小型のナノ粒子に関する報告があり、ナノ粒子化により癌細胞による PMO の細胞取り込みが著しく向上している⁶³。このように PMO の膜透過性を高めるために非常に多く研究がなされているが、これらアプローチの大半は PMO への化学的結合を必要とするため、原薬の純度や製剤の品質規格、医薬品原価の高コスト化など製造面において実際にヒトに適用可能な医薬品とする上で大きな問題点を含んでいる。PMO は負電荷を有しないため、通常細胞内への遺伝子導入などに汎用されるカチオニックリポソームに封入することは困難である。PMO をカチオニックリポソームに封入するために、PMO と負電化を有する相補鎖 DNA で二本鎖を形成させた後、その複合体をカチオニックリポソームに封入するという手法 (Leash 法) が知られている^{64,65}。Leash 法によって PMO の細胞膜透過性を向上させることができる一方、カチオニックリポソームの構成成分に基づく毒性懸念に関する報告もある。

第一章や第二章でも述べた通り、polypodna は CpG DNA や免疫抑制性 ODN をマクロファージや樹状細胞などの免疫細胞に効果的に送達可能である。これらの結果から、polypodna は多数のマクロファージを含む臓器に対して、PMO を効率的に送達可能なキャリアとなることが示唆された。さらに、PMO を polypodna に組み込むことで、分子量や分子の電荷の変化などの構造的変化を伴うため、マウスに静脈内投与した際には PMO の薬物動態特性が大きく変化する可能性がある。

そこで第三章では、polypodna の中から tripodna を選択し、PMO を tripodna に組み込むことによって PMO の薬物動態が制御可能であるかを検討した。Tripodna は、免疫細胞に対して高い親和性を有する最も単純な polypodna であるため、PMO のキャリアの評価対象として選択した。Graziewicz らはマウスの tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) pre-mRNA を標的とし、エキソン 7 の効率的なスキッピングを誘導する ASO である LNA SSO3274 を報告している⁶⁶。筆者は、今回の評価で用いる PMO のモデル配列として LNA SSO3274 と共通の配列を含む 20-mer PMO を選択し、これをヨウ素-125 (¹²⁵I) で標識することで ¹²⁵I-PMO を得た。次に、¹²⁵I-PMO 及び PMO に対する相補的配列を突出末端に含む tripodna 設計し、これらを混合することで ¹²⁵I-PMO/tripodna を得た。また、¹²⁵I-PMO/tripodna の対照として、PMO に対する相補的配列を有さない tripodna を設計し、¹²⁵I-PMO+tripodna(cont)を調製した。

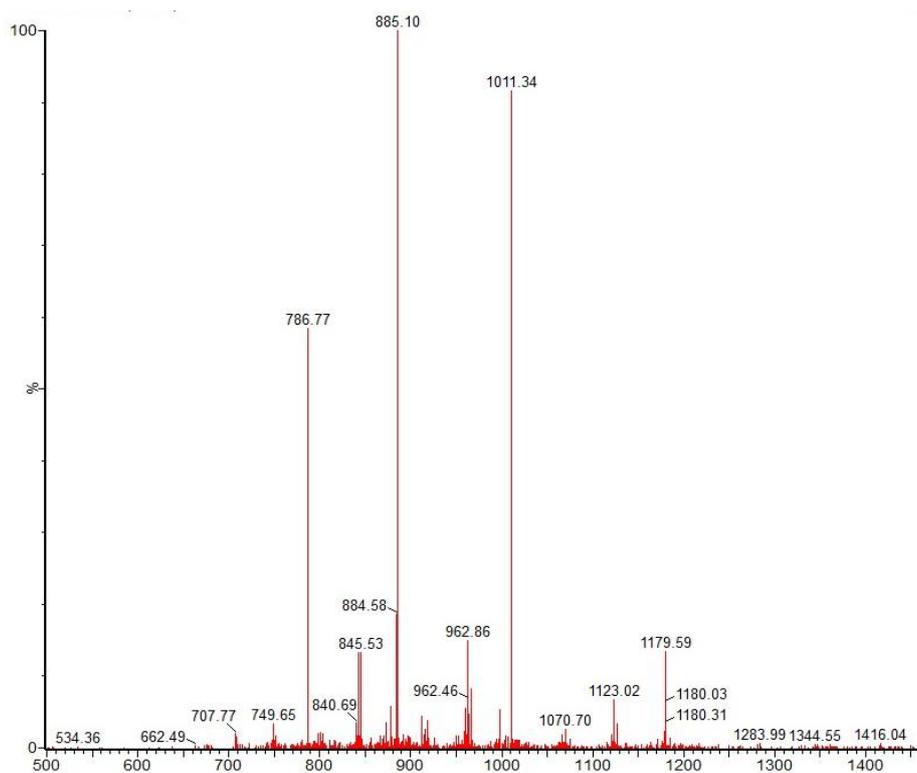


Figure 3-2 Mass chromatogram of ^{127}I -PMO

Table 3-1 Sequences of oligonucleotides used in Chapter 3

Oligonucleotides	Sequence (5' to 3')
ODN32-01	ACACTGTTATGCAGGC CCATAGAAAGGGCTCT
ODN32-02	AGAGCCCTTTCTATGG TTCACACAGTATGGTA
ODN52-01	TACCATACTGTGTGAA GCCTGCATAACAGTGT <u>AAAGTAAGGTTATGCTCTCG</u> ^a
ODN52-02	TACCATACTGTGTGAA GCCTGCATAACAGTGT GCTCTCGTATTGGAATGAAA
PMO-amine	CGAGAGCAGAACCTTACTTT-NH ₂

^a The complementary sequence to PMO-amine has been underlined.

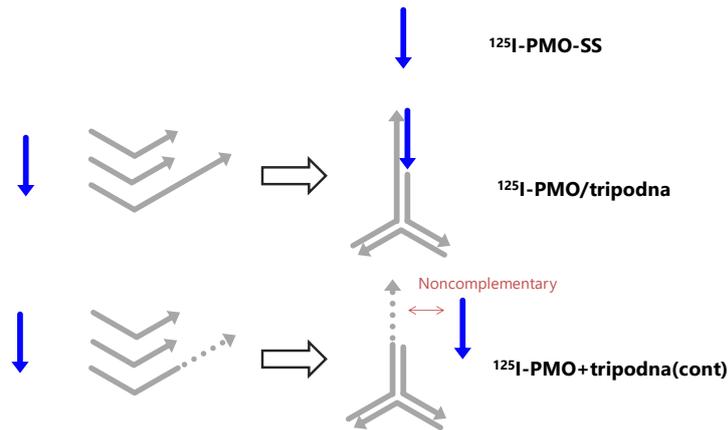


Figure 3-3 Two-dimensional representation of $^{125}\text{I-PMO-SS}$, $^{125}\text{I-PMO/tripodna}$, and $^{125}\text{I-PMO+tripodna(cont)}$. Each oligonucleotide is represented by an arrow, with the arrowhead corresponding to the 3' end of the oligonucleotide. The gray arrows represent phosphodiester oligonucleotides and the red arrow represents $^{125}\text{I-PMO-SS}$. The dotted part of the gray arrow in the control tripodna is not complementary to $^{125}\text{I-PMO-SS}$; therefore, it does not bind $^{125}\text{I-PMO}$. $^{125}\text{I-PMO/tripodna}$ is prepared by mixing equimolar amounts of $^{125}\text{I-PMO-SS}$, 32-01, 32-02, and 52-01. $^{125}\text{I-PMO+tripodna(cont)}$ is prepared by mixing equimolar amounts of $^{125}\text{I-PMO-SS}$, 32-01, 32-02, and 52-02.

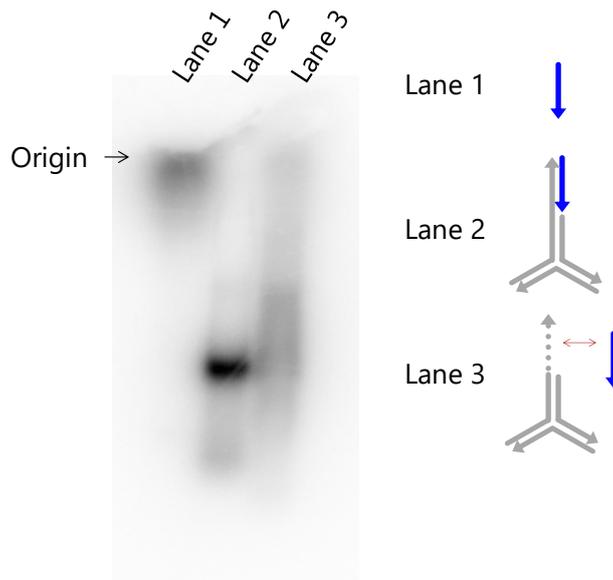


Figure 3-4 Electrophoresis of the samples containing $^{125}\text{I-PMO}$. $^{125}\text{I-PMO-SS}$, $^{125}\text{I-PMO/tripodna}$, and $^{125}\text{I-PMO+tripodna(cont)}$ were subjected to 6% PAGE and the image was visualized with a BAS 2500 bioimaging analyser. Lane 1, $^{125}\text{I-PMO-SS}$; lane 2, $^{125}\text{I-PMO/tripodna}$; lane 3, $^{125}\text{I-PMO+tripodna(cont)}$.

マウス血清中での ^{125}I -PMO/tripodna の安定性

^{125}I -PMO/tripodna のマウス血清中における安定性を、 37°C で5、30、60及び180分間インキュベートした後にPAGE解析することで評価した。Figure 3-5にはPAGE解析の結果を示し、また画像解析によって算出した各時間インキュベーション後の残存率をTable 3-2に示した。インキュベーションの5分後に、 ^{125}I -PMO/tripodnaの約89.7%が分解されずに残存していた。インタクトな ^{125}I -PMO/tripodnaの量は、インキュベーション時間とともにわずかに減少したが、180分間のインキュベーション後においても ^{125}I -PMO/tripodnaの83%以上が残存した。

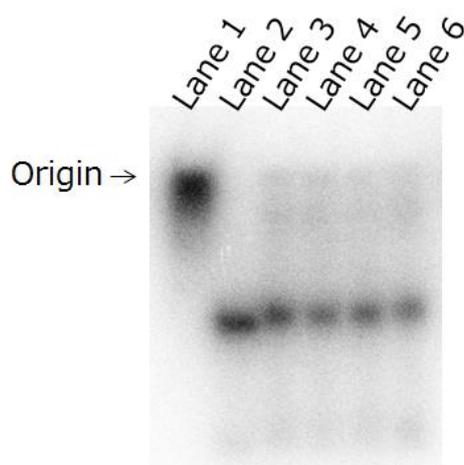


Figure 3-5 Stability of ^{125}I -PMO/tripodna in fresh mouse serum

^{125}I -PMO/tripodna was incubated in 90% fresh mouse serum at various time periods and subjected to 6% PAGE. The image was visualized with a BAS 2500 bioimaging analyser. Lane 1, ^{125}I -PMO-SS; lane 2, ^{125}I -PMO/tripodna diluted with saline (0 min incubation); lanes 3 to 6, ^{125}I -PMO/tripodna incubated in serum for 5, 30, 60, and 180 min, respectively. The remaining ratios of ^{125}I -PMO/tripodna after 5, 30, 60, and 180 min of incubation were 89.7%, 85.9%, 88.4%, and 83.7%, respectively.

Table 3-2 Remaining percentage of ^{125}I -PMO/tripodna after the incubation in fresh mouse serum

Time (min)	0	5	30	60	180
Remaining (%)	100	89.7	85.9	88.4	83.7

RAW264.7 細胞における ^{125}I -PMO の細胞内取り込みと毒性の評価

RAW264.7 細胞を ^{125}I -PMO-SS、 ^{125}I -PMO/tripodna、もしくは ^{125}I -PMO+tripodna(cont) を含有する培地と 37°C でインキュベーションした時の細胞内放射量の時間推移を Figure 3-6 に示した。 ^{125}I -PMO/tripodna を添加した場合には、細胞内放射量は時間とともに増加した。対照的に、 ^{125}I -PMO-SS または ^{125}I -PMO+tripodna(cont) を添加した場合、細胞内放射量は時間と共に顕著には増加しなかった。 4°C で各サンプルとインキュベートした場合には、細胞内放射量の量は、 37°C でインキュベートした場合に比して有意に低かった (Figure 3-7)。また、RAW264.7 細胞に対して PMO-SS、PMO/tripodna 及び PMO+tripodna(cont) が細胞障害性を示すかを評価するために LDH アッセイを行った。その結果、 $30\ \mu\text{M}$ の PMO-SS、PMO/tripodna、または PMO/tripodna の添加した場合においても LDH 放出に有意な変化は認められず、細胞毒性は低いと考えられた (data not shown)。

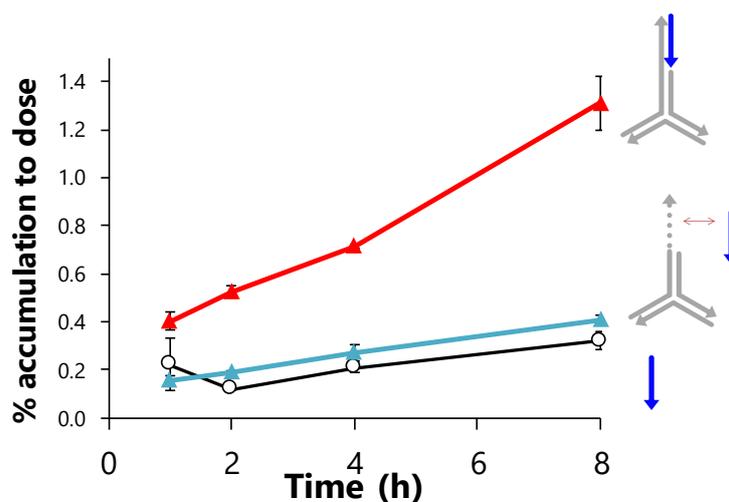


Figure 3-6 Percent accumulation to dose at 37°C

RAW264.7 cells were incubated with ^{125}I -PMO-SS, ^{125}I -PMO/tripodna, or ^{125}I -PMO+tripodna(cont) (all $20\ \text{nmol/L}$ ^{125}I -PMO) for 1, 2, 4, and 8 h at 37°C or for 8 h at 4°C .

Black line, ^{125}I -PMO-SS; red line, ^{125}I -PMO/tripodna; blue line, ^{125}I -PMO+tripodna(cont). Results are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ by Dunnett's test, $N = 3$.

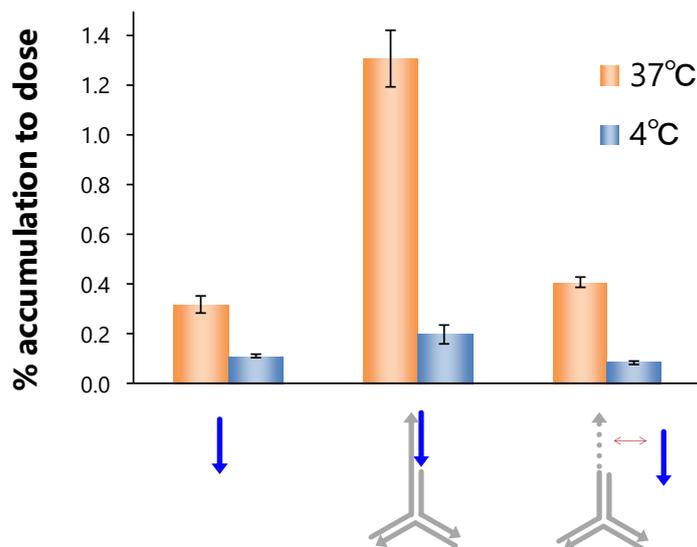


Figure 3-7 Percent accumulation to dose after 8 h of incubation at 37°C and 4°C

Percent accumulation to dose after 8 h of incubation at 37°C (orange bars) and 4°C (blue bars) are indicated. Results are expressed as mean \pm SD, and the data are representative of three independent experiments with similar results.

* $p < 0.05$ by Tukey test, $N = 3$

^{125}I -PMO の血漿クリアランス及び薬物動態パラメータ

^{125}I -PMO-SS、 ^{125}I -PMO/tripodna、または ^{125}I -PMO+tripodna(cont)をマウスに静脈内投与し、薬物動態特性を評価した。Figure 3-8 に、各 DNA ナノ構造体投与後の血漿中濃度-時間曲線を示した。 ^{125}I -PMO-SS と ^{125}I -PMO+tripodna(cont)を投与したマウスでは、血漿中の放射能は速やかに消失した。一方で、 ^{125}I -PMO/tripodna を投与した場合には、 ^{125}I -PMO-SS 及び ^{125}I -PMO+tripodna(cont)を投与した場合と比較して、投与後初期の血漿中の放射能は著しく高値であり、 ^{125}I -PMO-SS、 ^{125}I -PMO/tripodna 及び ^{125}I -PMO+tripodna(cont)投与時の $C_{10\text{min}}$ (plasma concentration at 10 min) はそれぞれ 56.7 ± 2.3 、 353 ± 155 及び 65.6 ± 6.0 pmol/mL であった。Table 3-3 に、各サンプル投与後の血漿中濃度推移から算出した薬物動態パラメータを示した。 C_0 (initial plasma concentration) は投与後初期の血漿中濃度を外挿することで推定し、 AUC_{0-24} と CL_{tot} (total clearance) はモーメント解析により算出した。 ^{125}I -PMO-SS、 ^{125}I -PMO/tripodna 及び ^{125}I -PMO+tripodna(cont)を投与した場合、 C_0 (initial plasma concentration) は 115.7、1368.5、及び 139.3 pmol/mL、 AUC_{0-24} は、41.7、225 及び 47.3 h·pmol/mL であり、 CL_{tot} (total clearance) は 899、167 及び 793 mL/h/kg であった。 ^{125}I -PMO/tripodna を投与したマウスでは、 CL_{tot} は ^{125}I -PMO-SS 投与時よりも明らかに小さく、 ^{125}I -PMO+tripodna(cont)を投与したマウスでは CL_{tot} は ^{125}I -PMO-SS 投与時と同程度の値であった。

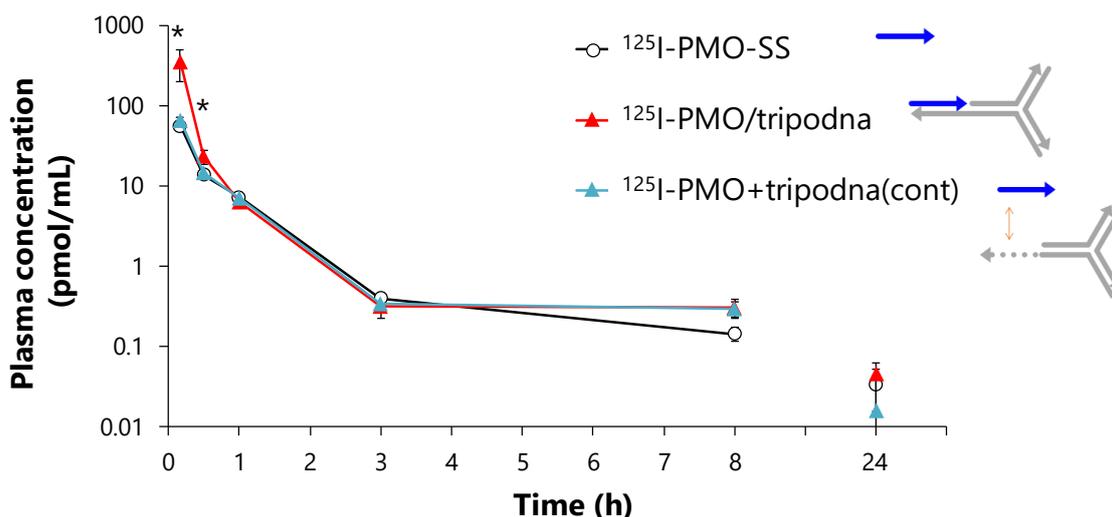


Figure 3-8 Plasma concentrations of ^{125}I -radioactivity after intravenous administration in mice

Mice were administered ^{125}I -PMO-SS, ^{125}I -PMO/tripodna, or ^{125}I -PMO+tripodna(cont). At 0.16, 0.5, 1, 3, 8, and 24 h after administration, blood (plasma) was collected and the radioactivity was counted. Mean plasma concentrations are shown as ^{125}I -PMO mole concentration. Results are expressed as mean \pm SD of 3 mice, and the data are representative of three independent experiments with similar results.

Table 3-3 Pharmacokinetic parameters of ^{125}I -PMO-SS, ^{125}I -PMO/tripodna, and ^{125}I -PMO+tripodna(cont) in mice

	^{125}I -PMO SS	^{125}I -PMO/tripodna	^{125}I -PMO+tripodna(cont)
C_0 (pmol/mL)	115.7	1368.5	139.3
AUC_{0-24} (pmol·h/mL)	41.7	224.8	44.8
CL_{tot} (mL/h/kg)	893.4	166.5	828.3

^{125}I -PMO のマウスにおける組織分布

Figure 3-9 に、 ^{125}I -PMO-SS、 ^{125}I -PMO/tripodna 及び ^{125}I -PMO+tripodna(cont)を投与した場合の各組織における ^{125}I の放射能濃度を示した。 ^{125}I -PMO-SS を投与したマウスでは、腎臓及び肝臓中の放射能濃度は血漿中の濃度より高かった。 ^{125}I -PMO/tripodna を投与したマウスでは、 ^{125}I -PMO-SS を投与したマウスと比較して肝臓、脾臓、心臓及び肺における放射能濃度は高かったが、腎臓では同程度の放射能濃度であった。

^{125}I -PMO+tripodna(cont)を投与したマウスでは、各組織における放射能濃度は ^{125}I -PMO-SS を投与したマウスと比較してわずかに高かったが、 ^{125}I -PMO/tripodna を投与したマウスと比較すると有意に低値であった。 ^{125}I -PMO/tripodna 投与時と ^{125}I -PMO-SS 投与時の、投与 24 時間後での組織中放射能濃度比を Table 3-4 に示した。組織中放射能濃度比は、肝臓、脾臓、心臓、肺、脳、及び上腕二頭筋でそれぞれ 32.0、50.7、17.4、6.0、2.8 及び 3.4 倍であり、対照

的に腎臓の組織中放射能濃度比はほぼ同程度（1.1倍）であった。肝臓への高濃度の集積が認められたため、肝臓中の細胞を分画しどの細胞に取り込まれているかを検討した結果、実質細胞（肝細胞）に比して非実質細胞（クッパー細胞等）において ^{125}I -PMO がより高濃度で集積していた（data not shown）。

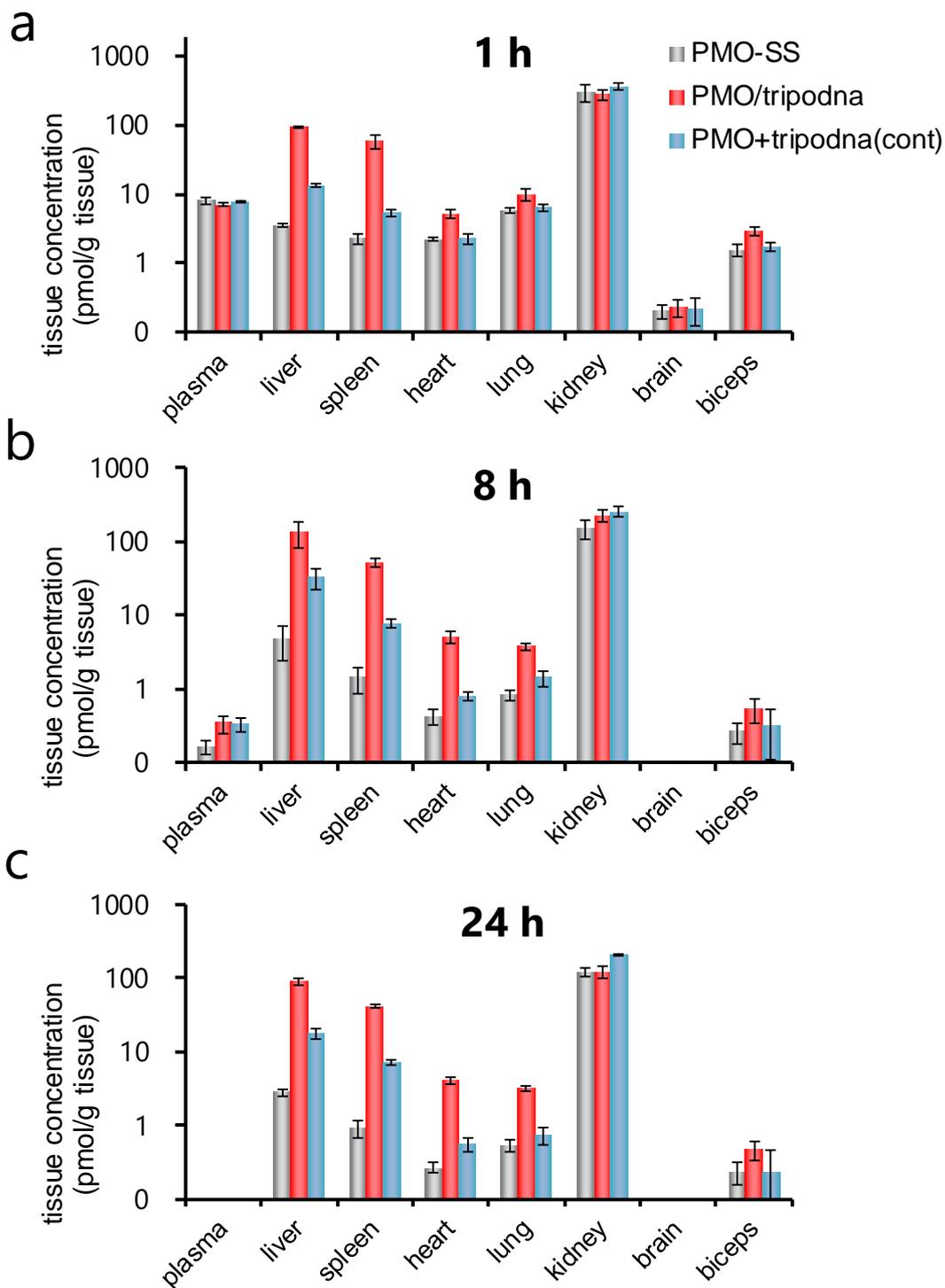


Figure 3-9

a. Concentration of ^{125}I -PMO in each tissue at 1 h after administration

Tissue concentration of ^{125}I -PMO at 1 h was measured after administration of ^{125}I -PMO-SS, ^{125}I -PMO/tripodna, or ^{125}I -PMO+tripodna(cont) in mice. Results are expressed as mean \pm SD of 3 mice, and the data are representative of three independent experiments with similar results.

b. Concentration of ^{125}I -PMO in each tissue at 8 h after administration

Tissue concentration of ^{125}I -PMO at 8 h was measured after administration of ^{125}I -PMO-SS, ^{125}I -PMO/tripodna, or ^{125}I -PMO+tripodna(cont) in mice. Results are expressed as mean \pm SD of 3 mice, and the data are representative of three independent experiments with similar results.

c. Concentration of ^{125}I -PMO in each tissue at 24 h after administration

Tissue concentration of ^{125}I -PMO at 24 h was measured after administration of ^{125}I -PMO-SS, ^{125}I -PMO/tripodna, or ^{125}I -PMO+tripodna(cont) in mice. Results are expressed as mean \pm SD of 3 mice, and the data are representative of three independent experiments with similar results.

Table 3-4 Tissue distribution ratio of ^{125}I -PMO/tripodna to ^{125}I -PMO-SS at 24 h after administration to mice.

Tissue	Ratio of ^{125}I -PMO/tripodna to ^{125}I -PMO-SS
Liver	32.0
Spleen	50.7
Heart	17.4
Lung	6.0
Kidney	1.1
Brain	2.8
Biceps	3.4

考察

第三章では、最も単純な DNA ナノ構造体の 1 つである tripodna をキャリアとして用いることで、PMO の体内動態並びに組織分布を顕著に変化させることが可能であることを示した。特に、肝臓及び脾臓への PMO の移行性は、tripodna に組み込むことによって劇的に増加した。したがって、tripodna やその他の DNA ナノ構造は、PMO の組織分布を制御可能とする有用なキャリアであると考えられた。

放射性同位体でオリゴヌクレオチドを標識する手法として、 ^{32}P -ATP を標識原料に T4 polynucleotide kinase を用いて DNA の 5'末端を標識する方法が繁用される。この方法は簡便であり、しばしばサザンブロットハイブリダイゼーションまたは RFLP (restriction fragment length polymorphism、制限酵素断片長多型) 分析におけるプローブ合成に使用される。しかしながら、この方法に基づく DNA の 5'末端の標識部位は生体内の環境では非常に不安定であり、また核酸から解離した ^{32}P 原子は様々な細胞へと取り込まれることも想定され、ASO などに代表される核酸医薬品の生体内における組織分布を定量的に評価するには不向きである^{67,68}。 ^{32}P 標識核酸をマウスに静脈内投与した後の組織中の ^{32}P 放射能が非常に速やかに減少するのに対して、今回用いた核酸の ^{125}I 標識方法では、組織中の ^{125}I 放射能の消失は緩やかであり (Figure 3-7)、核酸から放射性標識部位 (元素) が解離 (または分解) するという不安定性を考慮した場合においても、トレーサーとして核酸を ^{125}I 標識する有用性は高いと考えられる^{67,68}。以上のことから、 ^{125}I 放射能によって組織中の PMO 量を評価することが妥当であると考えられる。

以前の研究において、tripodna は PAGE 分析において単一バンドとして検出され、tripodna のバンドは tripodna を構成するいずれの一本鎖オリゴヌクレオチドとも異なり、高分子側にシフトすることが報告されている¹⁶。PMO は負の電荷を有さない核酸であるので、PAGE では泳動せず、 ^{125}I -PMO 由来の放射能は起点から検出された。Figure 3-3 のレーン 2 では、 ^{125}I -PMO 由来の放射能は起点から移動した箇所検出されていることより、 ^{125}I -PMO が負に荷電した状態であることが示された。すなわち、 ^{125}I -PMO が tripodna に効率的に組み込まれたことを確認できた。 ^{125}I -PMO+tripodna(cont)においては、 ^{125}I -PMO 由来の放射能は起点から検出されず、また ^{125}I -PMO/tripodna と同様の明確なバンドも観察されなかった。このことから ^{125}I -PMO は tripodna(cont)と何らかの相互作用をしていると考えられるが、DNA ナノ構造体を形成していないことは確認できた。

Figure 3-4 のレーン 2 は、 ^{125}I -PMO/tripodna が形成されたことを示している。 ^{125}I -PMO/tripodna をマウス血清中で 5、30、60 及び 180 分間インキュベートした場合においても、 ^{125}I -PMO/tripodna のバンドは有意に減少せず、180 分間のインキュベーション後においても ^{125}I -PMO/tripodna の約 83% が残存しているという結果であったことより、 ^{125}I -PMO/tripodna が新鮮マウス血清において比較的安定であることが明らかになった。血清中の安定性試験は、DNA ナノ構造体の立体構造の安定性を調べることを目的とした。三本のオリゴヌクレオチドから構成される tripodna においては、血清中で 2 時間及び 8 時間のイ

ンキュベーション後の安定性はそれぞれ 80-90%及び 20-30%と報告されている¹⁶。今回の結果から、¹²⁵I-PMO/tripodna の安定性は、以前の研究結果と比べても概ね同程度であると考えられた。

¹²⁵I-PMO/tripodna 投与時の AUC は、¹²⁵I-PMO-SS 投与時の AUC よりも約 5 倍大きかった。この大きな差を生んだ要因は、投与 10 分後及び 30 分後の血漿中濃度に著しい差があったからである。¹²⁵I-PMO/tripodna はマウス血清中である程度安定であったことから、投与直後においては ¹²⁵I-PMO は ¹²⁵I-PMO/tripodna の構造体を維持したまま、言い換えれば tripodna から解離することなく血液中を循環していると考えられる。このことが、¹²⁵I-PMO-SS と ¹²⁵I-PMO/tripodna の投与直後の血漿中濃度に大きな差を生んだ主たる要因と推察できる。PMO は血漿タンパク結合が極めて低く、また組織移行性も乏しい。また今回用いた ¹²⁵I-PMO-SS の分子量は約 7,000 で糸球体濾過の閾値 (約 60,000) よりも小さく⁶⁹、さらに PMO は腎臓の尿細管での再吸収もほぼされないため、腎臓で速やかに濾過され尿中へと排泄される薬物動態特性を有している。今回の結果においては、¹²⁵I-PMO-SS の全身クリアランス CL_{tot} (899 mL/h/kg) は、体重 20 g のマウスの糸球体濾過速度 (840 mL/h/kg) と同等であった⁷⁰。対照的に、今回の実験で用いた ¹²⁵I-PMO/tripodna の分子量は約 42,000 であり、これは糸球体濾過の閾値に近いサイズになるように設計し、糸球体濾過を回避することで薬物動態特性を改善することを目的としたものである。¹²⁵I-PMO/tripodna は投与直後の高い血漿中濃度を示していたことから、そのサイズが糸球体濾過を回避するのに十分な大きさであることが確認できた。今回の評価で用いた tripodna に対して、さらに各 pod の塩基数や pod 数を増やすなどして分子量を増大させる改良も可能であるため、さらなる PMO の動態改善を達成できる可能性がある。

組織分布実験の結果では、その他の器官と比較して、¹²⁵I-PMO/tripodna が肝臓及び脾臓に選択的に送達されたことが示された。この結果には、マクロファージによる ¹²⁵I-PMO/tripodna の取り込みが寄与していると考えられる。これまで報告されている結果や今回実施した *in vitro* 実験において、tripodna をはじめとする polypodna 等の DNA ナノ構造体は、マクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞、樹状細胞株である DC2.4 細胞、マウス骨髄由来の樹状細胞及びマウス脾臓マクロファージによって効率的に取り込まれることが示されている。これらの細胞は、scavenger 受容体などを介して、DNA を含むポリアニオンを効率的に取り込むことが知られている⁷¹。肝臓及び脾臓には、クッパー細胞や赤色パルプマクロファージなどのマクロファージが多量に存在するため、¹²⁵I-PMO/tripodna の肝臓や脾臓への移行性が高いと考えられる。PMO の腎臓への移行率に着目すると、今回評価したすべての群において同程度の移行率であった。¹²⁵I-PMO-SS 投与時の結果は、これまで報告されているその他の PMO 投与時の結果とほぼ同等であった⁴⁹。また腎臓へ移行しやすいという性質は、PMO だけに限らず 2'-O-(2-メトキシエチル)修飾オリゴヌクレオチドやペプチド修飾オリゴヌクレオチドなど、その他の核酸医薬品においても共通の性質である^{72,73}。¹²⁵I-PMO/tripodna 投与時においては、血漿中での AUC は増大したにも関わらず腎臓中濃度

に変化はなかったことより、腎臓への取り込みクリアランスは減少していた。腎臓は、PMOの主たる毒性標的の臓器であることを考慮すると⁷⁴、tripodnaは腎毒性を増悪させる懸念のない、有望なPMOのキャリアとなると期待される。

今回の実験で用いたPMOと塩基配列が同一であるPO核酸を¹²⁵I標識(¹²⁵I-ODN)し、同様に同配列のtripodnaに組み込んで(¹²⁵I-ODN/tripodna)マウスにおける組織分布実験も予備的に実施した。その結果、¹²⁵Iに基づく組織中の放射能濃度は、¹²⁵I-ODN/tripodna投与直後に脾臓でやや高値であったことを除けば、肝臓を含むいずれの主要臓器においても¹²⁵I-ODNを単独で投与した際と比較してほぼ同等であった。¹²⁵I-PMO/tripodna及び¹²⁵I-ODN/tripodnaを用いた両実験結果より、tripodnaはPMOやODNのような核酸の組織分布を変化させることが可能である一方で、¹²⁵I放射能を組織中濃度のトレーサーとして用いる妥当性については、核酸自体tripodnaに搭載する核酸の安定性に応じて変動すると考えられる。ODNはDNase等により生体内で速やかに分解されるため、トレーサーとして¹²⁵I-ODNを用いることは不向きであるが、一方でPMOは生体内で極めて安定であるために、¹²⁵I-PMOにより生体内での動きを捉えることが可能である。

PMOの薬物動態特性を改善するために、Vivo-morpholino[®]やCell-penetrating peptides conjugated morpholinoなどの化学修飾核酸が開発されている^{57,59}。しかしながら、化学修飾核酸には一般的に原薬合成のコスト面や品質規格設定の面でハードルが高く、医薬品として開発するのは容易ではない。一方で、本研究で用いた手法では、PMOを直接化学修飾することなく、すでにGMPスケールでの合成法も確立しているODNを混合するだけであるという利点が存在する。またFergusonらの報告によると、Vivo-morpholino[®]はそのカチオン電荷に由来する細胞毒性を有しているとのことである⁷⁴。本研究での手法では、RAW264.7細胞を用いた実験において細胞障害性がほとんど見られないことを確認している。またこれまでのDNAナノ構造体やDNAハイドロゲルを用いた研究において、マウスに投与した際においても有害作用をほとんど引き起こさないことを示している^{18,75}。したがって、tripodnaなどのDNAナノ構造体をPMOのキャリアとして用いる手法は、PMOの薬物動態を改善する上で、簡便、安価かつ低毒性の有用な手法であると考えられる。

本研究では、tripodnaを用いてPMOの薬物動態特性を制御可能であることを明らかとした。以前の研究では、polypodnaのpod数や分子サイズを大きくすると、マクロファージによる取り込み量が増大することが示されている。また、polypodnaの分子サイズを大きくすることは、糸球体濾過を効果的に回避可能になると考えられる。これらの情報を踏まえると、今回の実験で用いたtripodnaをより複雑な構造に変換することで、PMOの薬物動態特性をより精密に制御できることが示唆される。また、polypodnaの構成成分であるDNAはコレステロールやポリエチレングリコールなどの機能性分子と化学的に結合させることが可能であり、このような改良を加えることでpolypodnaのPMOキャリアとしての機能を改変できる可能性も秘めている。今後、さらに詳細な最適化研究を推進することによって、対象疾

患や標的臓器に応じて適切な **polypodna** を選択することが可能となり、**PMO** のキャリアとして臨床応用可能になることが期待される。

結論

著者は三章にわたり、免疫賦活化作用も持つ CpG DNA、免疫抑制性核酸である A151 及びモルフォリノ核酸からなる ASO を用いて、これらに対する polypodna のキャリアとしての有用性について検討を行い、以下の結論を得た。

第一章 多足型 DNA ナノ構造体を利用した CpG DNA の自然免疫活性増強に関する *in vitro/in vivo* 関連の解明

CpG DNA を tripodna または hexapodna に組み込むことで、*in vivo* 条件においても TLR9 シグナルを有意に活性化することを明らかにした。また TLR9 シグナル活性化の程度は、*in vitro* の実験系での結果と同程度であった。したがって、polypodna は *in vitro* だけでなく *in vivo* 条件においても CpG DNA のキャリアとして利用可能であり、またその有効性については *in vitro* 実験の結果から *in vivo* の結果を外挿可能であると考えられた。

第二章 多足型 DNA ナノ構造体を利用した免疫抑制性オリゴヌクレオチドの免疫細胞へのデリバリー

免疫抑制性核酸である A151 を hexapodna に組み込むことで、その免疫抑制活性を高めることが可能であった。この作用機序は、hexapodna をキャリアとして用いることで、A151 の細胞内移行性が増大したことに起因していた。したがって、今後 A151 を臨床応用するための最適化研究を遂行する上で、hexapodna をキャリアとして用いることにより、A151 の有効性の向上や、臨床での必要投与量の低減すなわち PS 核酸に基づく肝毒性・腎毒性を低減できる可能性があり、hexapodna は A151 のキャリアとしても非常に有用であると考えられた。

第三章 多足型 DNA ナノ構造体を利用したモルフォリノ核酸の体内動態制御

マウスを用いた *in vivo* 実験において、キャリアとして tripodna を用いることにより PMO の undruggable な薬物動態特性を改善可能であり、様々な組織中の PMO 濃度を上昇させることに成功した。今後さらに詳細な最適化研究を推進することによって情報が蓄積されれば、将来的には対象疾患や標的臓器に応じて適切な polypodna を選択することが可能になり、PMO のキャリアとして臨床応用されることが期待される。

以上、著者は、polypodna が様々な機能性核酸のキャリアとして有用であることを見出した。これらの知見は、様々な核酸医薬品が臨床応用されていく際に、有益な情報を提供するものと考えられる。

謝辞

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

また、終始御懇篤なる御助言と御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科、西川元也准教授（現・東京理科大学薬学部教授）、及び京都大学大学院薬学研究科、高橋有己准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

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大学院薬学研究科、佐治英郎教授（現・京都大学 学術研究支援室）、京都大学大学院薬学研究科、佐野紘平講師（現神戸薬科大学 薬学部）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野村大貴様、荒家由季様、前澤辰興様に深謝します。

実験の部

第一章 実験の部

Chemicals

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium was obtained from Nissui Pharmaceutical (Tokyo, Japan). Opti-modified Eagle's medium (Opti-MEM) was purchased from Thermo Fisher Scientific, fetal bovine serum (FBS) from GE Healthcare Life Sciences, heparin sodium salt from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan), and 100 bp DNA ladder from Takara Bio, Inc. (Shiga, Japan). All the other chemicals were of the highest grade available and were used without further purification.

Oligodeoxynucleotides

Phosphodiester oligodeoxynucleotides (ODNs) were purchased from Integrated DNA Technologies. The oligonucleotide sequences are shown in Table 1. The complementary sequence to the CpG motif (GACGTT) in Hexa-1 to -6 and Tri-1 to -3 was designed to have a single base mismatch (AACTTC) to avoid TLR9 stimulation by these ODNs.

Preparation of Polypodna

Each ODN was dissolved in TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4). Appropriate molar ratios of the ODNs involved in polypodna formation were mixed, heated to 95°C, and then gently cooled to 4°C. Details of the preparation method have been described by Mohri et al.¹⁶ In the present study, the molar concentration of CpG-SS was used to adjust the concentrations of CpG-tripodna and CpG-hexapodna. Figure 1-1 shows the DNA nanostructures used in the study. In all the experiments, the amount of CpG1668 was used to adjust the concentration or dose for CpG-SS, CpG-tripodna, and CpG-hexapodna. Samples without CpG1668, i.e., the controls tripodna(cont) and hexapodna(cont), were adjusted to the same molar amount as CpG-tripodna and CpG-hexapodna, respectively. The formation of DNA nanostructures was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). PAGE analysis was performed with a 6% polyacrylamide gel at 150 V for 30 min. DNA was stained with ethidium bromide, and observed using a LAS3000 imaging system (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Cell Culture

Murine macrophage-like RAW 264.7 cells were grown at 37°C in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.15% sodium bicarbonate, 100 units/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine, in humidified air containing 5% CO₂. Cells were then seeded on to a 96-well culture plate at a density of 5×10⁴ cells/well and cultured for 24 h prior to use.

Cytokine Release from RAW 264.7 Cells

RAW 264.7 cells were seeded onto a 96-well culture plate at a density of 5×10^5 cells/mL and cultured for 24 h. Then, CpG-SS, tripodna(cont), hexapodna(cont), CpG-tripodna, and CpG-hexapodna diluted in 0.1 mL of Opti-MEM were added to the cells. After an incubation of 1, 2, 4, and 8 h, the supernatants were collected and stored at -20°C until use. The TNF- α levels in the supernatants were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences).

Animals

Five-week-old male C57BL/6J mice were purchased from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan). All animal experiments were conducted in accordance with the principles and procedures outlined in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocols for animal experiments were approved by the Animal Experimentation Committee of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University.

IL-12p40 production in mice

Mice were injected with CpG-SS, CpG-tripodna, and CpG-hexapodna diluted with saline into the caudal vein. Based on the preliminary experiments, doses were set at 1, 10, and 100 nmol CpG1668 per mouse for CpG-SS, and at 0.2, 1 and 5 nmol CpG1668 per mouse for CpG-tripodna and CpG-hexapodna. At 1, 2, 4, and 8 h after injection, the blood samples were collected from the tail of the mice and plasma was isolated by centrifuging for 5 min at 12000 g at 4°C . The isolated plasma was stored at -20°C until analysis. The plasma IL-12p40 concentration was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences). The area under the plasma concentration-time curve (AUC) of IL-12p40 was calculated using the trapezoidal rule, and concentration at 0 h was assumed to be zero.

第二章 実験の部

Chemicals

Roswell Park Memorial Institute medium was obtained from Nissui Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Opti-modified Eagle's medium (Opti-MEM) and fetal bovine serum were purchased from Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA). The 20-bp and 100-bp DNA ladders were purchased from Takara Bio, Inc. (Shiga, Japan). All other chemicals were of the highest grade available and used without further purification.

Oligodeoxynucleotides

All unlabelled phosphodiester and phosphorothioate ODNs were purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). These ODNs were dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8) and then stored at -20°C . The sequences of the ODNs used in this study are shown in Table 1. CpG 1668 was used as a ligand for TLR9. A151 and CpG 1668 labelled with Alexa Fluor 488 at the 5' end were purchased from Japan BioService Co., Ltd. (Saitama, Japan).

Cell culture

Mouse macrophage-like RAW 264.7 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.15% sodium bicarbonate, 100 IU/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, and 2 mL glutamine at 37°C in humidified air containing 5% CO_2 . The cells were seeded in 96-well culture plates at a density of 5×10^4 cells/well and cultured for 24 h prior to use. Before applying DNA samples to the cells, the supernatant was removed and the cells were washed once with phosphate-buffered saline.

Preparation of hexapodna and supHexapodna

Hexapodna and supHexapodna were prepared as previously described.¹⁶ In brief, hexapodna was prepared by mixing equimolar amounts of six phosphodiester ODNs, i.e., hexa1–6. supHexapodna was prepared by mixing the six ODNs together with a six-fold molar excess of A151. The ODNs were annealed in TE buffer containing 150 mM sodium chloride in a thermal cycler. Fluorescently labelled supHexapodna was also prepared using Alexa Fluor 488-labelled A151.

Polyacrylamide gel electrophoresis of hexapodna and supHexapodna

The formation of hexapodna and supHexapodna was analysed by 6% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) at 150 V for 30 min. DNA was stained with SYBR® Gold (Thermo Fisher Scientific, Inc.) and the polyacrylamide gel was observed under an LAS-3000 imager (Fujifilm, Tokyo,

Japan).

Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectroscopy was conducted to analyse the conformations of A151, hexapodna, and supHexapodna. CD spectra of the DNA samples were obtained and recorded using a JASCO-820 type spectropolarimeter (JASCO, Tokyo, Japan) at 20°C with a 0.1-cm path-length quartz cell. The DNA samples were diluted with TE buffer containing 150 mM sodium chloride to a final DNA concentration of 68 µg/mL. The CD spectra were measured in the range of 200–320 nm.

CpG-ODN-induced tumour necrosis factor- α release from RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were incubated with 5 µM CpG1668 with or without other DNA samples. The concentrations used were 3 nM for A151, and 0.5 nM for hexapodna and supHexapodna, because 0.5 nM supHexapodna contained 0.5 nM hexapodna and 3 nM A151 (1 to 6 molar ratio). After 8 h incubation at 37 °C, the supernatant was removed, and the concentration of tumour necrosis factor- α (TNF- α) in the supernatant was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an OptEIA mouse TNF (Mono/Mono) ELISA set (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) in accordance with the manufacturer's protocol.

Uptake by RAW 264.7 cells

RAW 264.7 cells were incubated for 2 h at 37°C in Opti-MEM with Alexa Fluor 488-labelled A151 or Alexa Fluor 488-labelled CpG 1668 with or without unlabelled DNA. The concentrations of the DNA samples were the same as those used for the cytokine release experiment. The cells were washed thrice with phosphate-buffered saline at 4°C to remove labelled DNA and then harvested. Then, the fluorescence was measured by flow cytometry (Gallios flow cytometer; BD Biosciences) and the mean fluorescence intensity (MFI) of the cells was calculated using Kaluza software (BD Biosciences).

Statistical analysis

Differences were statistically evaluated by one-way analysis of variance followed by the Tukey–Kramer test for multiple comparisons. p values less than 0.05 were considered statistically significant.

第三章 実験の部

Chemicals

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium, phosphate-buffered saline (PBS), and Hank's solution were obtained from Nissui Pharmaceutical (Tokyo, Japan). Opti-modified Eagle's medium (Opti-MEM) was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), fetal bovine serum (FBS) from GE Healthcare Life Sciences (Logan, UT, USA), heparin sodium salt and HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid) from Nacalai tesque (Kyoto, Japan), and collagenase of *Clostridium histolyticum* from Merck Millipore (Darmstadt, Germany).

Oligonucleotides

Phosphodiester oligodeoxynucleotides (ODNs) were purchased from Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA). PMO with a 3' primary amine linker (PMO-amine) was purchased from Gene Tools (Philomath, OR, USA). Oligonucleotides sequences are shown in Table 3-1.

Synthesis of ¹²⁵I-PMO

N-succinimidyl 3-[¹²⁵I]iodobenzoate (¹²⁵I-SIB) was synthesized according to the method described by Zalutsky et al.⁷⁶. An aliquot of a solution of PMO-amine was mixed with ¹²⁵I-SIB or non-radioactive ¹²⁷I-SIB, and the mixture was incubated for 3 h at 20-25°C. After incubation, the reaction mixture was subjected to high performance liquid chromatography (HPLC) for purification of the desired compound. The molecular weight of the ¹²⁷I-labelled PMO was confirmed by mass spectrometry and its retention time was measured. ¹²⁵I-labelled PMO was obtained from the corresponding HPLC fraction with ¹²⁷I-labelled PMO and evaporated to dryness by nitrogen gas flow, and the product was dissolved in saline.

Preparation of nanostructured DNA

PMO/tripodna and PMO+tripodna(cont) used in this study were prepared immediately before use during each experiment by mixing equimolar amounts of the single-stranded components, according to the method described by Mohri et al.¹⁶. In brief, ¹²⁵I-PMO/tripodna was prepared by mixing ¹²⁵I-PMO, ODN32-01, ODN32-02, and ODN52-01, and ¹²⁵I-PMO+tripodna(cont) was prepared by mixing ¹²⁵I-PMO, ODN32-01, ODN32-02, and ODN52-02. A mismatch was inserted in ODN 52-01, which could make the PMO more strongly bind to its fully-matched target sequence. PMO and phosphodiester oligodeoxynucleotides were dissolved in saline and the saline solutions were diluted to obtain the desired final concentration of each component. The hybridization of PMO and ODNs was analysed by 6% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) at room temperature at 200 V for 20 min, followed by visualization with a BAS 2500 bioimaging analyser (Fujifilm, Tokyo, Japan) for the

detection of radioactivity.

Uptake of ^{125}I -PMO by RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were seeded on 12-well culture plates at a density of 5×10^5 cells/well and cultured for 24 h in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.15% NaHCO_3 , 100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and 2 mM L-glutamine. The cells were washed twice with 1 ml of PBS and then incubated with ^{125}I -PMO-SS, ^{125}I -PMO/tripodna, or ^{125}I -PMO+tripodna(cont) in Opti-MEM at 37°C for 1, 2, 4, and 8 h or at 4°C for 8 h. The concentration of DNA samples was adjusted to 20 nmol ^{125}I -PMO/L. After incubation, the cells were washed twice with 1 ml of PBS and harvested by the addition of 1 mL of 5% SDS. The radioactivity of the sample was measured using a Wizard 1470 automatic gamma counter (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, USA).

Evaluation of the toxicity of PMO/tripodna on RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were seeded on a 96-well culture plate at a density of 7×10^4 cells/well and cultured for 24 h. PMO-SS, PMO/tripodna, and PMO+tripodna(cont) were prepared as described above, diluted with Opti-MEM to the final concentration of 30 μM , added on each well, and incubated for 8 h. After the incubation, lactate dehydrogenase (LDH) concentrations in the cell medium were measured by Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan).

Animal experiments

Male C57BL/6 mice were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan) and used when they were 6-7 weeks old. All animal experiments were conducted in accordance with the principles and procedures outlined in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocols for animal experiments were approved by the Animal Experimentation Committee of the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University.

Tissue distribution of ^{125}I -PMO in mice

For the evaluation of pharmacokinetic properties, ^{125}I -PMO-SS, ^{125}I -PMO/tripodna, and ^{125}I -PMO+tripodna(cont) were intravenously administered to the mice through the tail vein under isoflurane anaesthesia at a dose of 37.5 nmol ^{125}I -PMO/kg (about 2×10^6 cpm/mouse). Blood was collected from the tail vein at 0.167, 0.5, 1, 3, 8, and 24 h after administration. Blood samples were collected in tubes containing sodium heparin anticoagulant and centrifuged at 4°C for 5 min at $2,000 \times g$ to separate the plasma. After blood sampling at 1, 8, and 24 h, mice were killed, and the liver, spleen, heart, lungs, kidneys, brain, and a sample of skeletal muscle (biceps) were collected, weighed,

and washed with PBS. The radioactivity of tissue samples was measured using the Wizard 1470 automatic gamma counter. The pharmacokinetic parameters were calculated as follows: the plasma concentration at 0 min (C_{0min}) was extrapolated using the concentrations at 10 min (C_{10min}) and 30 min (C_{30min}) assuming a first order kinetics and used for the calculation of area under the curve from 0 h to 24 h (AUC_{0-24}). AUC_{0-24} was calculated using the trapezoidal rule, and total body clearance (CL_{tot}) was calculated by dividing the administered dose by AUC_{0-24} .

Fractionation of liver cells

Liver cells were harvested by a collagenase perfusion method as previously described⁷⁷. In brief, ^{125}I -PMO/tripodna was intravenously administered to the mice. An hour after the injection, dispersed liver cells from each mouse were obtained. A part of dispersed cells were removed and the radioactivity was measured for calculating the recovery. The remaining dispersed cells were separated into liver parenchymal cells (PCs) and non-parenchymal cells (NPCs) through a series of centrifugation steps. The PC and NPC fractions were resuspended in Hanks' -HEPES buffer and the total radioactivity of the both samples was determined.

Stability of ^{125}I -PMO in mouse serum

The dosing solution of ^{125}I -PMO/tripodna was mixed with 9 volumes of fresh mouse serum and incubated at 37 °C for 5, 30, 60, and 180 min. Immediately after the incubation, the samples were subjected to PAGE as described above, and followed by visualization with Fujifilm BAS 2500 system. A ratio of the region of interest (ROI) of the band of ^{125}I -PMO/tripodna to all ROIs was calculated for each lane, and the value was divided by that of the control sample (0 min incubation) to calculate the remaining ratio of ^{125}I -PMO/tripodna.

Description and handling of radioactivity data

In the present study, ^{125}I -radioactivity measured was considered to be the mixture of intact ^{125}I -PMO/tripodna, its degraded products, and ^{125}I -PMO-SS released from ^{125}I -PMO/tripodna. It was difficult to distinguish them from one another; therefore, the concentration or amount of ^{125}I -radioactivity detected was expressed as the concentration or amount of ^{125}I -PMO, respectively.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statview v. 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Statistical differences between pairs of groups were analysed by Student's t test and among three groups by Dunnett's test.

引用文献

1. Janeway, C. A. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
2. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
3. Krieg, A. M. *et al.* CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546–549 (1995).
4. Murad, Y. M. & Clay, T. M. CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic applications in cancer. *BioDrugs* **23**, 361–375 (2009).
5. Scheiermann, J. & Klinman, D. M. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine* **32**, 6377–6389 (2014).
6. Shirota, H. & Klinman, D. M. Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines* **13**, 299–312 (2014).
7. Behrens, E. M. *et al.* Repeated TLR9 stimulation results in macrophage activation syndrome: Like disease in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 2264–2277 (2011).
8. Vollmer, J. & Krieg, A. M. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 195–204 (2009).
9. Vollmer, J. *et al.* Modulation of CpG oligodeoxynucleotide-mediated immune stimulation by locked nucleic acid (LNA). *Oligonucleotides* **14**, 23–31 (2004).
10. Kobiyama, K. *et al.* Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 3086–3091 (2014).
11. Zhang, C. *et al.* Conformational flexibility facilitates self-assembly of complex DNA nanostructures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 10665–10669 (2008).
12. Nishikawa, M., Rattanakit, S. & Takakura, Y. DNA-based nano-sized systems for pharmaceutical and biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 626–632 (2010).
13. Geary, R. S., Norris, D., Yu, R. & Bennett, C. F. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews* **87**, 46–51 (2015).
14. Laxton, C. *et al.* Selection, optimization, and pharmacokinetic properties of a novel, potent antiviral locked nucleic acid-based antisense oligomer targeting hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3105–3114 (2011).
15. Mohri, K. *et al.* Increased immunostimulatory activity of polypod-like structured DNA by ligation of the terminal loop structures. *J. Control. Release* **163**, 285–292 (2012).

16. Mohri, K. *et al.* Design and development of nanosized DNA assemblies in polypod-like structures as efficient vehicles for immunostimulatory cpg motifs to immune cells. *ACS Nano* (2012). doi:10.1021/nn300727j
17. Uno, S. *et al.* Efficient delivery of immunostimulatory DNA to mouse and human immune cells through the construction of polypod-like structured DNA. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2014). doi:10.1016/j.nano.2013.11.017
18. Nishikawa, M. *et al.* Injectable, self-gelling, biodegradable, and immunomodulatory DNA hydrogel for antigen delivery. *J. Control. Release* (2014). doi:10.1016/j.jconrel.2014.02.001
19. Zelenay, S., Elías, F. & Fló, J. Immunostimulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1382–1392 (2003).
20. Rutz, M. *et al.* Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* **34**, 2541–2550 (2004).
21. Kandimalla, E. R. *et al.* Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 948–953 (2003).
22. Klinman, D. M. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. *Expert Opin. Biol. Ther.* **4**, 937–46 (2004).
23. Zuo, D. *et al.* Molecular chaperoning by glucose-regulated protein 170 in the extracellular milieu promotes macrophage-mediated pathogen sensing and innate immunity. *FASEB J.* **26**, 1493–1505 (2012).
24. Yoshida, H., Nishikawa, M., Yasuda, S., Mizuno, Y. & Takakura, Y. Cellular activation by plasmid dna in various macrophages in primary culture. *J. Pharm. Sci.* (2008). doi:10.1002/jps.21302
25. Miyao, T. *et al.* Stability and pharmacokinetic characteristics of oligonucleotides modified at terminal linkages in mice. *Antisense Res. Dev.* **5**, 115–21 (1995).
26. Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M. & Bryant, C. E. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat. Publ. Gr.* **14**, (2014).
27. Bayik, D., Gursel, I. & Klinman, D. M. Structure, mechanism and therapeutic utility of immunosuppressive oligonucleotides. *Pharmacol. Res.* (2016). doi:10.1016/j.phrs.2015.11.010
28. Klinman, D. M. *et al.* Regulation of CpG-Induced Immune Activation by Suppressive Oligodeoxynucleotides. in *Annals of the New York Academy of Sciences* (2003). doi:10.1196/annals.1281.023
29. Yamada, H. *et al.* Effect of Suppressive DNA on CpG-Induced Immune Activation Materials and Methods.
30. Lenert, P. S. Classification, mechanisms of action, and therapeutic applications of inhibitory oligonucleotides for toll-like receptors (TLR) 7 and 9. *Mediators of Inflammation* (2010). doi:10.1155/2010/986596

31. Takeshita, F. *et al.* Activation Suppress Bacterial DNA-Induced Immune Repetitive Elements in Mammalian Telomeres Repetitive Elements in Mammalian Telomeres Suppress Bacterial DNA-Induced Immune Activation. *J Immunol Ref. J. Immunol. KYOTO Univ.* **171**, 1393–1400 (2015).
32. Shirota, H., Gursel, I., Gursel, M. & Klinman, D. M. Suppressive oligodeoxynucleotides protect mice from lethal endotoxic shock. *J. Immunol.* **174**, 4579–83 (2005).
33. Shirota, H., Gursel, M. & Klinman, D. M. IL-12-Mediated Signaling -and γ Th1 Differentiation by Blocking IFN- Suppressive Oligodeoxynucleotides Inhibit Suppressive Oligodeoxynucleotides Inhibit Th1 Differentiation by Blocking IFN- \square -and IL-12-Mediated Signaling. *J Immunol Ref.* **17385002**, 5002–5007 (2004).
34. Bode, C., Wang, J. & Klinman, D. M. Suppressive oligodeoxynucleotides promote the generation of regulatory T cells by inhibiting STAT1 phosphorylation. *Int. Immunopharmacol.* (2014). doi:10.1016/j.intimp.2014.09.027
35. Bode, C., Kinjo, T., Alvord, W. G. & Klinman, D. M. Suppressive oligodeoxynucleotides reduce lung cancer susceptibility in mice with silicosis. *Carcinogenesis* (2014). doi:10.1093/carcin/bgu005
36. Li, J., Fan, C., Pei, H., Shi, J. & Huang, Q. Smart drug delivery nanocarriers with self-assembled DNA nanostructures. *Adv. Mater.* (2013). doi:10.1002/adma.201300875
37. Jones, M. R., Seeman, N. C. & Mirkin, C. A. Programmable materials and the nature of the DNA bond. doi:10.1126/science.1260901
38. Rothmund, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. doi:10.1038/nature04586
39. Wei, B., Dai, M. & Yin, P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles. *Nature* **485**, (2012).
40. Goodman, R. P., Berry, R. M. & Turberfield, A. J. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron. doi:10.1039/b402293a
41. Kypr, J., Kejnovská, I., Renčičuk, D. & Vorlíčková, M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research* (2009). doi:10.1093/nar/gkp026
42. Mohri, K. *et al.* Elucidation of the Mechanism of Increased Activity of Immunostimulatory DNA by the Formation of Polypod-like Structure. *Pharm. Res.* **34**, 2362–2370 (2017).
43. Kimura, Y. *et al.* Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN. *J. Biochem.* **116**, 991–4 (1994).
44. Sirois, C. M. *et al.* RAGE is a nucleic acid receptor that promotes inflammatory responses to DNA. *J. Exp. Med.* **210**, 2447–63 (2013).
45. Benimetskaya, L. *et al.* Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein. *Nat. Med.* **3**, 414–20 (1997).

46. Santos, R. D. *et al.* Long-term efficacy and safety of mipomersen in patients with familial hypercholesterolaemia: 2-year interim results of an open-label extension. *Eur. Heart J.* **36**, 566–75 (2015).
47. Flanigan, K. M. *et al.* Pharmacokinetics and safety of single doses of drisapersen in non-ambulant subjects with Duchenne muscular dystrophy: results of a double-blind randomized clinical trial. *Neuromuscul. Disord.* **24**, 16–24 (2014).
48. Dirin, M. & Winkler, J. Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides. *Expert Opin. Biol. Ther.* **13**, 875–888 (2013).
49. Amantana, A. & Iversen, P. L. Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers. *Current Opinion in Pharmacology* (2005). doi:10.1016/j.coph.2005.07.001
50. Lim, K. R. Q., Maruyama, R. & Yokota, T. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 533–545 (2017).
51. Borgia, G., Maraolo, A. E., Buonomo, A. R., Scotto, R. & Gentile, I. The therapeutic potential of new investigational hepatitis C virus translation inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs* **25**, 1209–1214 (2016).
52. Heald, A. E. *et al.* AVI-7288 for Marburg Virus in Nonhuman Primates and Humans. *N. Engl. J. Med.* **373**, 339–348 (2015).
53. U.S. Food and Drug Administration. FDA grants accelerated approval to first drug for Duchenne muscular dystrophy.
54. Heemskerk, H. *et al.* Preclinical PK and PD studies on 2'-O-methyl-phosphorothioate RNA antisense oligonucleotides in the mdx mouse model. *Mol. Ther.* **18**, 1210–7 (2010).
55. Cirak, S. *et al.* Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: An open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* (2011). doi:10.1016/S0140-6736(11)60756-3
56. U.S. Food and Drug Administration. Drug Approval Package: Exondys 51 Injection (eteplirsen).
57. Morcos, P. A., Li, Y. & Jiang, S. Vivo-Morpholinos: A non-peptide transporter delivers Morpholinos into a wide array of mouse tissues. *Biotechniques* (2008). doi:10.2144/000113005
58. Li, Y.-F. & Morcos, P. A. Design and synthesis of dendritic molecular transporter that achieves efficient in vivo delivery of morpholino antisense oligo. *Bioconjug. Chem.* **19**, 1464–70 (2008).
59. Lehto, T., Ezzat, K., Wood, M. J. A. & El Andaloussi, S. Peptides for nucleic acid delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **106**, 172–182 (2016).
60. Abes, R. *et al.* Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview.
61. Bhadra, J., Pattanayak, S., Khan, P. P., Kundu, J. & Sinha, S. Internal Oligoguanidinium-Based Cellular Transporter Enhances Antisense Efficacy of Morpholinos in In Vitro and Zebrafish Model. *Bioconjug. Chem.* **27**, 2254–2259 (2016).

62. Ming, X., Carver, K. & Wu, L. Albumin-based nanoconjugates for targeted delivery of therapeutic oligonucleotides. *Biomaterials* (2013). doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.066
63. Ming, X., Wu, L., Carver, K., Yuan, A. & Min, Y. Dendritic nanoconjugates for intracellular delivery of neutral oligonucleotides. *Nanoscale* **7**, (2015).
64. Gebiski, B. L., Mann, C. J., Fletcher, S. & Wilton, S. D. Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1801–1811 (2003).
65. Popplewell, L. J. *et al.* Novel cationic carotenoid lipids as delivery vectors of antisense oligonucleotides for exon skipping in Duchenne muscular dystrophy. *Molecules* **17**, 1138–48 (2012).
66. Graziewicz, M. A. *et al.* An endogenous TNF-alpha antagonist induced by splice-switching oligonucleotides reduces inflammation in hepatitis and arthritis mouse models. *Mol. Ther.* **16**, 1316–22 (2008).
67. Kawabata, K., Takakura, Y. & Hashida, M. The Fate of Plasmid DNA After Intravenous Injection in Mice: Involvement of Scavenger Receptors in Its Hepatic Uptake. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* **12**, 825–830 (1995).
68. Nishikawa, M. *et al.* Residualizing indium-111-radiolabel for plasmid DNA and its application to tissue distribution study. *Bioconjug. Chem.* **14**, 955–61 (2003).
69. Christensen, E. I., Birn, H., Storm, T., Weyer, K. & Nielsen, R. Endocytic Receptors in the Renal Proximal Tubule. *Physiology* **27**, 223–236 (2012).
70. King, F. G. & Dedrick, R. L. Pharmacokinetic model for 2-amino-1,3,4-thiadiazole in mouse, dog, and monkey. *Cancer Treat. Rep.* **63**, 1939–47 (1979).
71. Takagi, T. *et al.* Involvement of specific mechanism in plasmid DNA uptake by mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 729–733 (1998).
72. Geary, R. S. *et al.* Pharmacokinetic Properties of 2J-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotide Analogs in Rats.
73. McMahon, B. M. *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of a peptide nucleic acid after intravenous administration. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **12**, 65–70 (2002).
74. Carver, M. P. *et al.* Toxicological Characterization of Exon Skipping Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (PMOs) in Non-human Primates. doi:10.3233/JND-160157
75. Takahashi, Y. *et al.* In Vitro and In Vivo Stimulation of Toll-Like Receptor 9 by CpG Oligodeoxynucleotides Incorporated Into Polypod-Like DNA Nanostructures. *J. Pharm. Sci.* **106**, 2457–2462 (2017).

76. Zalutsky, M. R. & Narula, A. S. A method for the radiohalogenation of proteins resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part* (1987). doi:10.1016/0883-2889(87)90069-4
77. Nishikawa, M., Takemura, S., Takakura, Y. & Hashida, M. Targeted Delivery of Plasmid DNA to Hepatocytes In Vivo: Optimization of the Pharmacokinetics of Plasmid DNA/Galactosylated Poly(L-Lysine) Complexes by Controlling their Physicochemical Properties.