

京都大学	博士（薬科学）	氏名	小村 英恵
論文題目	RNAを認識するToll様レセプターを標的としたナノ構造化RNAアジュバントの開発に関する研究		
<p>一本鎖 RNA (ssRNA) および二本鎖 RNA (dsRNA) は、それぞれ免疫細胞のエンドソームに発現している Toll-like receptor (TLR) 7/8 あるいは TLR3 のリガンドであり、これら TLR に認識されることで効率的に免疫活性を誘導することから、アジュバントとしての応用が期待されている。しかしながら、RNA の実用化には免疫細胞への低い移行性や、生体内での不安定性並びに低滞留性などの課題を解消する必要がある。申請者は、構造安定性や滞留性に優れ、高免疫活性誘導能を有する新規 RNA アジュバントの開発を目的に、核酸間の二本鎖形成を基盤とする DNA/RNA ナノテクノロジーを利用することで、構造的特徴の異なるナノ構造化 RNA アジュバントの開発を試みた。</p> <p>第 1 章 ssRNA レセプターである TLR7/8 を標的としたナノ構造化 RNA アジュバントの開発</p> <p>病態情報薬学分野ではこれまでに、DNA を多足型構造にすることで免疫細胞による取り込みが亢進すること、これにより搭載した CpG-DNA 等の機能性核酸の活性が増大することを見出している。そこで第 1 章では、TLR7/8 のリガンドである guanosine-uridine (GU) 配列を豊富に含む 40 塩基長の ssRNA (GU-rich ssRNA) と、免疫を活性化しない ssDNA とを組み合わせた 4 本足 RNA/DNA ナノ構造体を設計し、アジュバントとしての機能を評価した。RNA/DNA ナノ構造体は ssRNA と比較して、ウシ胎児血清 (FBS) 含有溶液中で有意に安定であった。FAM 標識 RNA を用いて蛍光顕微鏡観察ならびにフローサイトメトリー解析によりマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞への移行性を評価したところ、ナノ構造化することで ssRNA が細胞内へ効率的に移行することが示された。また、DC2.4 細胞への添加により、RNA/DNA ナノ構造体は効率的に TNF<math>\alpha</math> 産生を誘導し、同時添加した抗原の抗原提示を向上させることが明らかとなった。</p> <p>第 2 章 ssRNA の持続的活性化を可能にする RNA/DNA ハイドロゲルの開発</p> <p>第 1 章において、ssRNA をナノ構造化することにより、RNA を実用化する際の課題である血清存在下での安定性および樹状細胞への移行性の向上を達成した。そこで次に、投与時の RNA の滞留性向上を目的に、投与部位に長期間滞留し、RNA を持続的に放出可能な構造として RNA/DNA ハイドロゲルの開発を試みた。20 塩基長の GU-rich ssRNA を含む 2 種類の 6 本足 RNA/DNA ナノ構造体を設計し、それぞれの突出性末端配列を互いに相補的な塩基配列とすることで、混合によりゲル化するシステムを設計した。RNA/DNA ハイドロゲルの崩壊性をゲルに重層したリン酸緩衝液中の 260 nm における吸光度を測定することで評価したところ、24 時間ゲル構造が保持されることが示された。また、6-FAM 標識 RNA を用いたところ、RNA/DNA ハイドロゲルに組み込んだ RNA の持続的な放出が確認された。このときの RNA 放出速度は核酸濃度および金属イオン濃度に影響されることも示された。また、FBS 存在下においても非存在下と同様に RNA を徐放した。DC2.4 細胞またはマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞への添加により、RNA/DNA ハイドロゲルは、ssRNA または RNA/DNA ナノ構造体と比較して効率的に TNF-<math>\alpha</math> 産生を誘導した。また、RNA/DNA ハイドロゲルを添加した免疫細胞の馴らし培地が、マウス結腸癌細胞株 colon26 細胞の生細胞数を減少させる傾向が認められた。以上より、RNA/DNA ナノ構造体から形成される RNA/DNA ハイドロゲルはゲル構造を長時間保持し、RNA の徐放性に優れ、RNA/DNA ナノ構造体単体と比較して高い免疫活性誘導能を有することから、生体投与後の RNA の滞留性を向上可能</p>			

なアジュバントである可能性が示された。

### 第3章 TLR3 および TLR7/8 を同時に標的とする RNA/DNA ナノ構造体の設計

1、2章にわたり、TLR7/8のリガンドである ssRNA を対象に、ナノ構造化による ssRNA の酵素存在下での安定性、免疫細胞への移行性並びに RNA 徐放性向上を達成し、RNA の実用化の課題を解消可能であることを示した。TLR7/8 と同様に免疫細胞内のエンドソームに発現する TLR3 は、dsRNA を認識し、TLR7/8 とは異なるシグナル経路を介して免疫活性を誘導する。したがって、TLR7/8 と同時に TLR3 を標的とすることで、免疫活性化能のさらなる増大が期待される。しかしながら、RNA/DNA ナノ構造体の TLR3 による認識機構については不明である。そこで第3章では、TLR3 および TLR7/8 を同時に標的とする RNA/DNA ナノ構造体の設計を試みた。配列の異なる 60 塩基長の dsRNA をヒト TLR3 発現 HEK-Blue 細胞に添加した際の SEAP 活性を評価したところ、GC 含量が 50%程度の dsRNA が、二本鎖を安定に形成し、TLR3 に認識されやすいことが示された。そこで次に、足の数が 3 から 6 で、二本鎖部分がそれぞれ 60 塩基長の多足型 RNA ナノ構造体を調製したところ、いずれも TLR3 に認識されることが示された。また、この RNA ナノ構造体は TLR8 発現 HEK-Blue 細胞に添加した場合にも認識された。さらに、RNA ナノ構造体の一部を DNA に置き換えた RNA/DNA ナノ構造体も、TLR3 に認識されることが示された。以上より、RNA/DNA ナノ構造体は、比較的長い RNA を用いて設計することで TLR7/8 に加えて TLR3 をも活性化可能なアジュバントとして利用できる可能性を明らかにした。

以上、申請者は、ナノ構造化RNAがRNA分解酵素を含む血清存在下においても安定的に構造を保持し、免疫細胞に効率的に取り込まれ、高い免疫活性を誘導可能であることを明らかにした。また、ナノ構造化RNAはssRNA、dsRNAを同時に搭載できることから、TLR3およびTLR7/8を同時に標的可能なアジュバントモデルとなり得ることを見出した。本研究で提示した新規ナノ構造化RNAは近年加速する核酸アジュバント開発を助長する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 )

一本鎖RNA (ssRNA) および二本鎖RNA (dsRNA) は、それぞれ免疫細胞のエンドソームに発現しているToll-like receptor (TLR) 7/8あるいはTLR3のリガンドであり、これらTLRに認識されることで効率的に免疫活性を誘導することから、アジュバントとしての応用が期待されている。申請者は、以下の3章に渡り構造安定性や滞留性に優れ、高免疫活性誘導能を有する新規RNAアジュバントの開発を目的に、核酸間の2本鎖形成を基盤とするDNA/RNAナノテクノロジーを利用することで、構造的特徴の異なるナノ構造化RNAアジュバントの開発を試みた。

第1章 ssRNA レセプターである TLR7/8 を標的としたナノ構造化 RNA アジュバントの開発

TLR7/8 のリガンドである guanosine-uridine (GU) 配列を豊富に含む 40 塩基長の ssRNA (GU-rich ssRNA) と、免疫を活性化しない ssDNA とを組み合わせた 4 本足 RNA/DNA ナノ構造体を設計し、アジュバントとしての機能を評価した。RNA/DNA ナノ構造体は ssRNA と比較して、ウシ胎児血清 (FBS) 含有溶液中で有意に安定であった。FAM 標識 RNA を用いて蛍光顕微鏡観察ならびにフローサイトメトリー解析によりマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞への移行性を評価したところ、ナノ構造化することで ssRNA が細胞内へ効率的に移行することが示された。また、DC2.4 細胞への添加により、RNA/DNA ナノ構造体は効率的に TNF $\alpha$  産生を誘導し、同時添加した抗原の抗原提示を向上させることが明らかとなった。

第2章 ssRNA の持続的活性化を可能にする RNA/DNA ハイドロゲルの開発

投与時の RNA の滞留性向上を目的に、投与部位に長期間滞留し、RNA を持続的に放出可能な構造として RNA/DNA ハイドロゲルの開発を試みた。20 塩基長の GU-rich ssRNA を含む 2 種類の 6 本足 RNA/DNA ナノ構造体を設計し、それぞれの突出性末端配列を互いに相補的な塩基配列とすることで、混合によりゲル化するシステムを設計した。RNA/DNA ハイドロゲルの崩壊性をゲルに重層したリン酸緩衝液中の 260 nm における吸光度を測定することで評価したところ、24 時間ゲル構造が保持されることが示された。また、6-FAM 標識 RNA を用いたところ、RNA/DNA ハイドロゲルに組み込んだ RNA の持続的な放出が確認された。このときの RNA 放出速度は核酸濃度および金属イオン濃度に影響されることも示された。また、FBS 存在下においても非存在下と同様に RNA を徐放した。DC2.4 細胞またはマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞への添加により、RNA/DNA ハイドロゲルは、ssRNA または RNA/DNA ナノ構造体と比較して効率的に TNF- $\alpha$  産生を誘導した。また、RNA/DNA ハイドロゲルを添加した免疫細胞の馴らし培地が、マウス結腸癌細胞株 colon26 細胞の生細胞数を減少させる傾向が認められた。以上より、RNA/DNA ナノ構造体から形成される RNA/DNA ハイドロゲルはゲル構造を長時間保持し、RNA の徐放性に優れ、RNA/DNA ナノ構造体単体と比較して高い免疫活性誘導能を有することから、生体投与後の RNA の滞留性を向上可能なアジュバントである可能性が示された。

第3章 TLR3 および TLR7/8 を同時に標的とする RNA/DNA ナノ構造体の設計

TLR3 および TLR7/8 を同時に標的とする RNA/DNA ナノ構造体の設計を試みた。配列の異なる 60 塩基長の dsRNA をヒト TLR3 発現 HEK-Blue 細胞に添加した際の SEAP 活性を評価したと

ころ、GC 含量が 50%程度の dsRNA が、二本鎖を安定に形成し、TLR3 に認識されやすいことが示された。そこで次に、足の数が 3 から 6 で、二本鎖部分がそれぞれ 60 塩基長の多足型 RNA ナノ構造体を調製したところ、いずれも TLR3 に認識されることが示された。また、この RNA ナノ構造体は TLR8 発現 HEK-Blue 細胞に添加した場合にも認識された。さらに、RNA ナノ構造体の一部を DNA に置き換えた RNA/DNA ナノ構造体も、TLR3 に認識されることが示された。以上より、RNA/DNA ナノ構造体は、比較的長い RNA を用いて設計することで TLR7/8 に加えて TLR3 をも活性化可能なアジュバントとして利用できる可能性を明らかにした。

以上、申請者はナノ構造化 RNA が RNA 分解酵素を含む血清存在下においても安定的に構造を保持し、免疫細胞に効率的に取り込まれ、高い免疫活性を誘導可能であることを明らかにした。また、ナノ構造化 RNA は ssRNA、dsRNA を同時に搭載できることから、TLR3 および TLR7/8 を同時に標的可能なアジュバントモデルとなり得ることを見出した。本研究で提示した新規ナノ構造化 RNA は近年加速する核酸アジュバント開発を助長する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（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和元年 8 月 22 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。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降