

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

要約

2019

小村 英恵

目次

総論の部

緒言	-----	1
----	-------	---

第一章 ssRNA レセプターである TLR7/8 を標的としたナノ構造体化 RNA アジュバントの開発	-----	3
------------------------------------------------------	-------	---

- 1.1 4足型 RNA/DNA ナノ構造体 tetrapodRD3 の作製
- 1.2 RNA/DNA ナノ構造体の血清中における安定性
- 1.3 RNA/DNA ナノ構造体の TLR による認識
- 1.4 RNA/DNA ナノ構造体の細胞内移行性
- 1.5 RNA/DNA ナノ構造体の免疫活性化能
- 1.6 RNA/DNA ナノ構造体の抗原提示促進効果
- 1.7 考察

第二章 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	-----	15
-------------------------------------------	-------	----

第三章 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	-----	16
------------------------------------------------	-------	----

結論	-----	18
----	-------	----

謝辞	-----	20
----	-------	----

実験の部

第一章 実験の部	-----	21
----------	-------	----

引用文献	-----	24
------	-------	----

総論の部

緒言

ワクチンはがんや感染症等に対する抗原特異的免疫応答の誘導に有用である。ワクチンの開発において、アジュバントは効率的な抗原特異的免疫応答の誘導に必須である¹。しかしながら、臨床で用いられているアラム等の既存のアジュバントは発熱やアレルギー応答等の副反応を引き起こすことから²、これらに代わる高い有効性および安全性を有する新規アジュバントの開発が急務である。核酸を活性本体とするアジュバントは、既存アジュバントの問題点を解消し得る新たなアジュバントとして注目されている。核酸は抗原提示細胞のエンドソームに発現する Toll 様レセプター (TLR) に認識され、種々のサイトカイン産生を誘導する³。核酸をリガンドとする TLR は 4 種類あり、TLR3 は二本鎖 RNA (dsRNA)、TLR7 および TLR8 は一本鎖 RNA (ssRNA)、TLR9 は非メチル化シトシン-グアニン配列を有する DNA (CpG DNA) を認識する。2017 年には、安定化修飾を施した CpG DNA をアジュバントとして含む B 型肝炎ワクチンが米国で医薬品として承認されており⁴、核酸をアジュバントとして含む医薬品の開発も拡大しつつある。各 TLR が発現している細胞種は TLR ごとに異なっており、RNA をリガンドとする TLR3、TLR7、TLR8 は TLR9 と比較して、抗原提示細胞、特に樹状細胞や単球に豊富に発現している⁵⁻⁷。樹状細胞や単球は抗原特異的免疫応答を誘導する重要な細胞であり、TLR3/7/8 を介した樹状細胞や単球の活性化は抗原提示能を増大させることから、TLR3/7/8 のリガンドである RNA を用いた新規アジュバントの開発が期待されている。

RNA を主としたアジュバントの開発に際しては、TLR が局在する抗原提示細胞内のエンドソームへの効率的な RNA 送達が必要である。しかしながら、抗原提示細胞による RNA の取り込みは低く、また RNA は生体内環境下で RNase により速やかに分解される⁸⁻¹⁰。これらの問題はリポソームに代表される脂質ナノ粒子との複合体形成によって解消可能であるものの、脂質ナノ粒子の製造の煩雑さや製造コストの高さは臨床応用への大きな課題である¹¹⁻¹³。そこで、RNA アジュバントの可能性を拡大させるため、脂質ナノ粒子を用いる以外の新たな方法として RNA/DNA ナノテクノロジーに着目した¹¹。RNA/DNA ナノテクノロジーは、核酸の相補配列同士が結合し二重鎖形成する特性を利用して、様々な形状の構造体を形成する技術である。病態情報薬学分野ではこれまでに、配列の半分が互いに相補である 3 本以上の DNA から多足型構造が形成できることを報告している¹⁴。本研究では、構造的特徴の異なるナノ構造化 RNA アジュバントとして、生体内での構造安定性や細胞内移行性を向上させた TLR7/8 を標的とした 4 足型 RNA/DNA ナノ構造体 (第一章)、RNA の徐放が可能な RNA/DNA ハイドロゲル (第二章)、TLR7/8 に加え TLR3 も標的とする

RNA/DNA ナノ構造体（第三章）の開発を試みた。

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

ssRNA は抗原提示細胞のエンドソームに発現する TLR7 および TLR8 に認識され、サイトカイン産生を誘導する。TLR7/8 は他の TLR と比較して、抗原提示細胞特異的に発現していることから、ssRNA をアジュバントとして用いることで TLR7/8 を介して抗原特異的免疫応答を誘導することが期待される。

標的細胞への機能性核酸の送達効率を向上させる方法として、RNA/DNA ナノテクノロジーが注目されている。RNA/DNA ナノテクノロジーを用いて RNA/DNA ナノ構造体の形成を試みた例として、Afonin らによって開発された RNA cube が挙げられる¹⁵。RNA cube は、6本の長鎖 RNA/DNA と 6本の siRNA を組み合わせて設計されており、血清中での高い構造安定性と高い RNA 干渉能を有することが報告されている。しかしながら、TLR7/8 標的アジュバントとしての RNA/DNA ナノ構造体の開発に成功した例はない。

病態情報薬学分野ではこれまでに、天然型のホスホジエステル DNA からなる多足型 DNA ナノ構造体 (polypod-like nanstructured DNA : polypodna) が、マクロファージや樹状細胞に効率的に取り込まれることを報告している¹⁴。加えて、TLR9 のリガンドである CpG モチーフを含む DNA を用いて構築した polypodna が、高免疫活性を示すことも明らかにしている。また、polypodna は機能性核酸のデリバリーキャリアとしての応用も可能である。これまでに、抑制性オリゴヌクレオチド A151 を組み込んだ polypodna が CpG DNA による免疫細胞の活性化を抑制すること¹⁶、モルフォリノ核酸からなるアンチセンスオリゴヌクレオチドを polypodna に組み込むことで静脈内投与後の血中滞留性が向上すること¹⁷を報告している。これらの知見から、RNA と DNA からなる多足型構造は ssRNA を効率的に細胞内に移行させ、TLR7/8 を活性化するアジュバントとなり得ると考えた。

TLR7/8 はグアノシン (G) やウリジン (U) を多く含む RNA 配列 (GU rich 配列) を選択的に認識する。Heil らは HIV-1 U5 領域由来の GU rich 配列が樹状細胞やマクロファージを刺激し種々のサイトカインを分泌させることを報告している¹⁸。また、GU 配列を含む 4塩基長の ssRNA がヒト樹状細胞やヒト単球に発現する TLR7/8 に認識され、サイトカイン産生を誘導することが報告されている¹⁹。

以上より、第一章では TLR7/8 を標的とする多足型構造を有する新規 RNA アジュバントの開発を目的に、一種類の ssRNA と三種類の ssDNA からなる 4足型構造体 tetrapodRD3 を設計した。そして、tetrapodRD3 の血清中での構造安定性、TLR 発現細胞を用いたヒト TLR 認識性、細胞内移行性、免疫活性化能、抗原提示促進効果を評価し、アジュバントとしての可能性を検討した。

1.1 4足型 RNA/DNA ナノ構造体 tetrapodRD3 の作製

Fig. 1A に、今回設計した tetrapodRD3 の構造を示す。TetrapodRD3 を構成する ssRNA は、TLR7/8 に選択的に認識される GU rich 配列である 20 塩基長の HIV-1 U5 領域の配列 (GCCCGUCUGUUGUGUGACUC) から成る 40 塩基長のホスホロチオエート修飾 RNA (ORN-1) を設計した。また、ssDNA は TLR7/8 と同様にエンドソームに発現する TLR9 に認識されないように、CpG 配列を含まない 40 塩基長のホスホジエステル DNA (ODN-2、ODN-3、ODN-4) とした。各オリゴヌクレオチドの配列情報を Table 1 に示す。なお、ODN-1 は ORN-1 のウリジンをチミンに置換した同一配列の DNA、CpG2006 はヒト TLR9 (hTLR9) のリガンドである。

Table 1. Sequences of oligonucleotides used for preparing tetrapodRD3 and tetrapodna. Sequences in capital letters indicate phosphorothioate modifications of the internucleotide linkages. The asterisk (*) indicates the position of the 6-FAM modification. The italic *t* at the 5'-terminal of ODN-2 indicates a mismatch. All ODNs are phosphodiester linkages.

	Sequence (5'→3')
ORN-1	GCCCGUCUGUUGUGUGACUCCUCAGUGUGUUGUCUGCCCG
FAM-ORN-1	*GCCCGUCUGUUGUGUGACUCCUCAGUGUGUUGUCUGCCCG
ODN-1	gcccgtctgtgtgtgactcctcagtggtgtctgcccg
ODN-2	<i>t</i> gggcagacaacacactgagccagcagagctgccacagca
ODN-3	tgctgtggcagctctgctgggtgctctcaccaggaggtgg
ODN-4	ccacctctggtgagagcagcagtcacacaacagatgggc
CpG2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT

TetrapodRD3 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 (Fig. 1D、1E)。TetrapodRD3 に加え、ORN-1、ORN-1 と ODN-2 の混合溶液 (ORN-1+ODN-2、Fig. 1B)、ORN-1 と ODN-2、ORN-4 の混合溶液 (ORN-1+ODN-2+ODN-4、Fig. 1C) も併せて評価した。ORN-1 の 5'末端に 6-FAM を修飾した FAM-ORN-1 の 6-FAM の蛍光を検出した場合 (Fig. 1D)、核酸を SYBR GOLD で染色した場合 (Fig. 1E)、いずれの場合にも ORN-1、ORN-1+ODN-2、ORN-1+ODN-2+ODN-4、tetrapodRD3 のバンドの位置が異なっており、tetrapodRD3 のバンドは 350bp 付近に検出された。これより、tetrapodRD3 が形成されたと判断した。TetrapodRD3 の ORN-1 を ODN-1 に置換した DNA のみからなる tetrapodna と、tetrapodRD3 のサイズを PAGE にて評価したところ、ほぼ同じ位置に検出された (Fig. 2)。また、tetrapodRD3 の融解温度 (T_m) は 66.5°C であった。このことから、tetrapodRD3 は生体内において熱的に安定であることが示唆された。

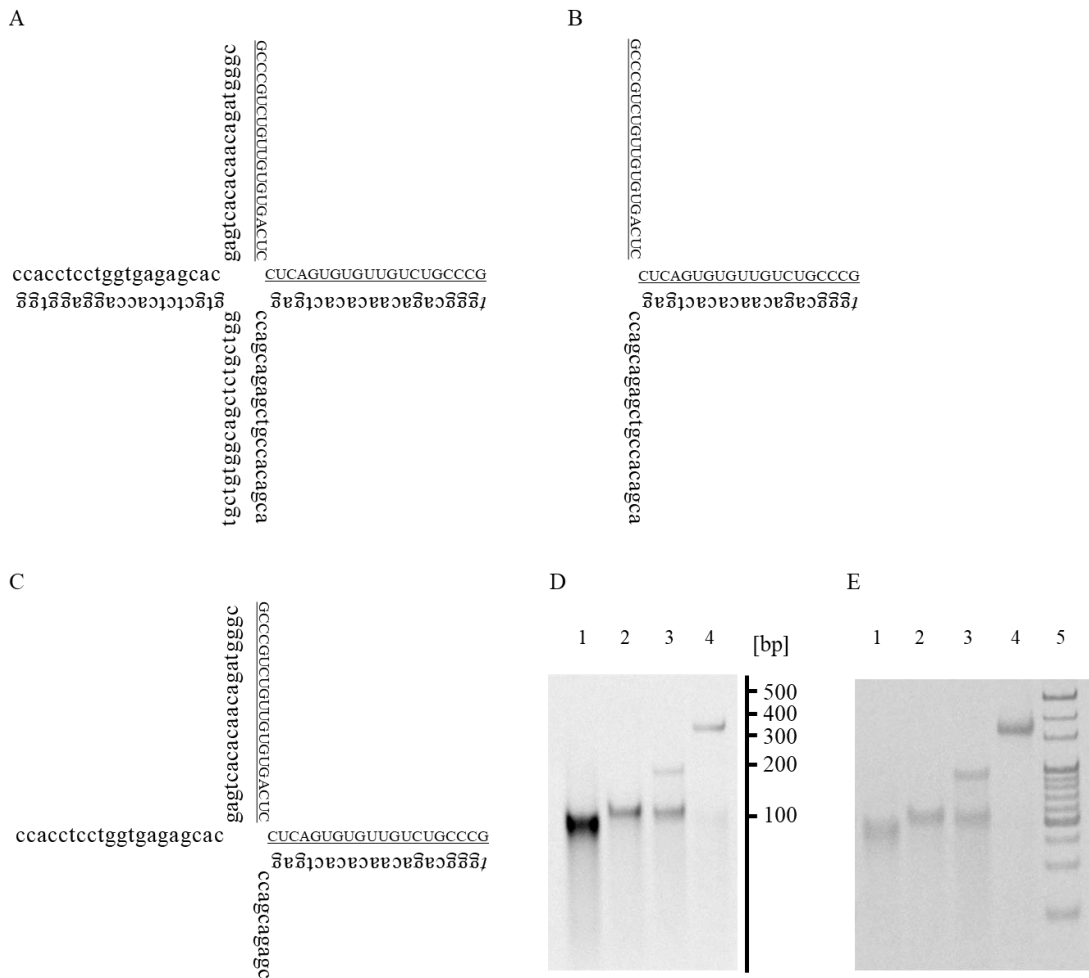
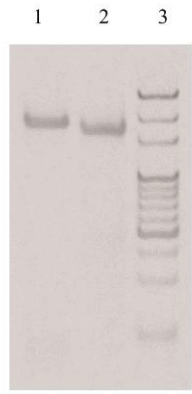


Figure 1. Preparation of tetrapodRD3. A, Putative structure of tetrapodRD3. Underlined sequences correspond to ORN-1. Capital letters indicate phosphorothioate modifications in the linkage site. The italic *t* at the 5'-terminal of ODN-2 indicates a mismatch. B, Putative structure of ORN-1 + ODN-2. C, Putative structure of ORN-1 + ODN-2 + ODN-4. D, PAGE analysis of FAM-ORN-1 and FAM-tetrapodRD3. Lane 1, FAM-ORN-1; lane 2, FAM-ORN-1 and ODN-2; lane 3, FAM-ORN-1, ODN-2 and ODN-4; lane 4, FAM-tetrapodRD3. E, PAGE analysis of ORN-1 and tetrapodRD3. Lane 1, ORN-1; lane 2, FAM-ORN-1 and ODN-2; lane 3, FAM-ORN-1, ODN-2 and ODN-4; lane 4, FAM-tetrapodRD3; lane 5, 20 bp DNA ladder (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan).

Figure 2. PAGE analysis of tetrapodRD3 and tetrapodna. Lane 1, tetrapodRD3; lane 2, tetrapodna; lane 3, 20 bp DNA ladder (Takara Bio Inc., Otsu, Japan).



1.2 RNA/DNA ナノ構造体の血清中における安定性

TetrapodRD3 の血清中での構造安定性を評価するため、10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有溶液に FAM-ORN-1 あるいは FAM-ORN-1 を組み込んだ tetrapodRD3 (FAM-tetrapodRD3) を添加し、37°C でインキュベートした。その後、経時的にサンプリングした溶液を PAGE に供し、FAM の蛍光を検出した (Fig. 3)。FAM-ORN-1 添加群では、インキュベート開始後速やかにバンドが消失した。一方で、FAM-tetrapodRD3 添加群はインキュベート開始後2時間までバンドが検出され、バンド密度より算出した RNA 量はほぼ維持されていた。これより、4 足型構造とすることで血清存在下においても ORN-1 が安定化することが示された。

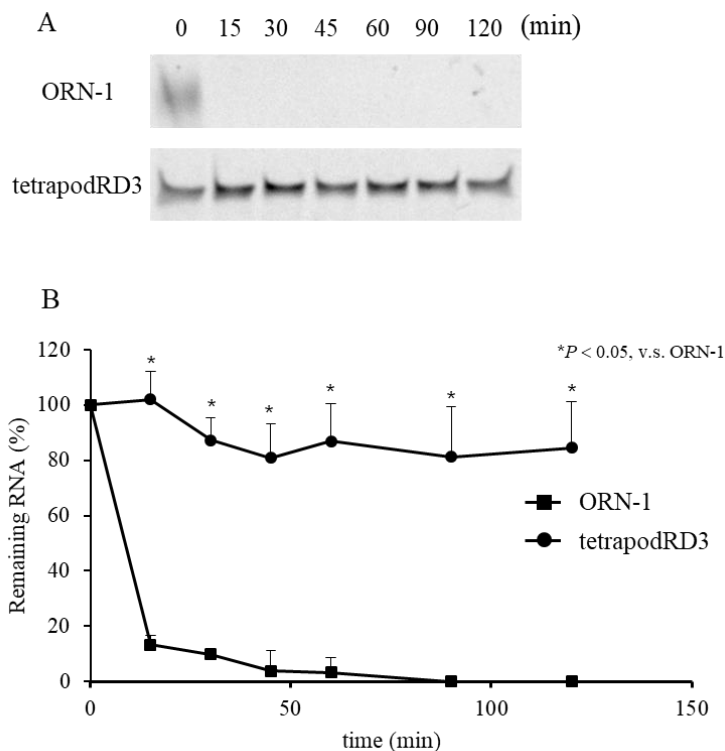


Figure 3. Hydrolysis of ORN-1 and tetrapodRD3 in 10% non-heat-inactivated FBS. A, PAGE analysis of FAM-ORN-1 and FAM-tetrapodRD3. B, Remaining RNA level after treatment. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with the ORN-1 group.

1.3 RNA/DNA ナノ構造体の TLR による認識

ORN-1 および tetrapodRD3 の TLR による認識について、hTLR を発現する HEK-Blue hTLR 細胞を用いて、TLR の活性化により発現する分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) の酵素活性を測定することで評価した (Fig. 4)。検討には、hTLR7、hTLR8 の他に、dsRNA をリガンドとする hTLR3、CpG DNA をリガンドとする hTLR9 を発現する各 HEK-Blue hTLR

細胞を選択した。各種細胞に ORN-1 あるいは tetrapodRD3 と DOTAP リポソームとの複合体溶液を添加し、20 時間後の波長 620 nm での吸光度を測定することで SEAP 活性を評価し、DOTAP リポソーム単独 (DOTAP) 群と比較した。HEK-Blue hTLR3、hTLR7、hTLR9 細胞では ORN-1 ならびに tetrapodRD3 による SEAP 活性の増大は認められなかった。これに対し、HEK-Blue hTLR8 細胞では、ORN-1 または tetrapodRD3 添加群での SEAP 活性が DOTAP 群と比較して有意に高かった。また、tetrapodRD3 を構成する ODN-2、ODN-3、ODN-4 単独では、いずれの HEK-Blue hTLR 細胞の場合も SEAP 活性は増大しなかった (Fig. 5)。これより、ORN-1 および tetrapodRD3 は hTLR8 に選択的に認識されることが示された。

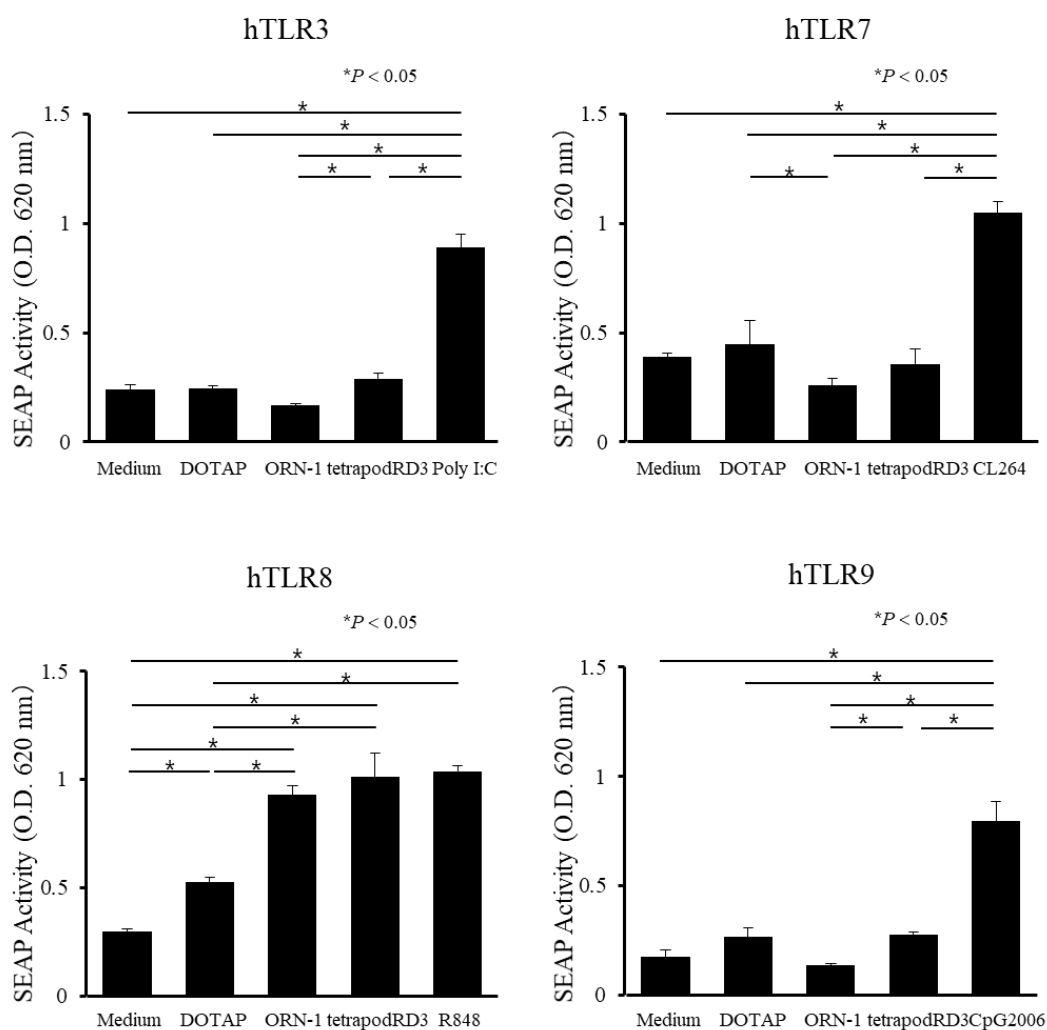


Figure 4. SEAP release from HEK-Blue hTLR3, hTLR7, hTLR8, and hTLR9 cells. Each TLR ligand was added to the cells at a final concentration of 1 μ g/mL. The results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Poly I:C, a TLR3 ligand; CL264, a TLR7 ligand; R848, a TLR7/8 ligand; CpG2006, a TLR9 ligand.

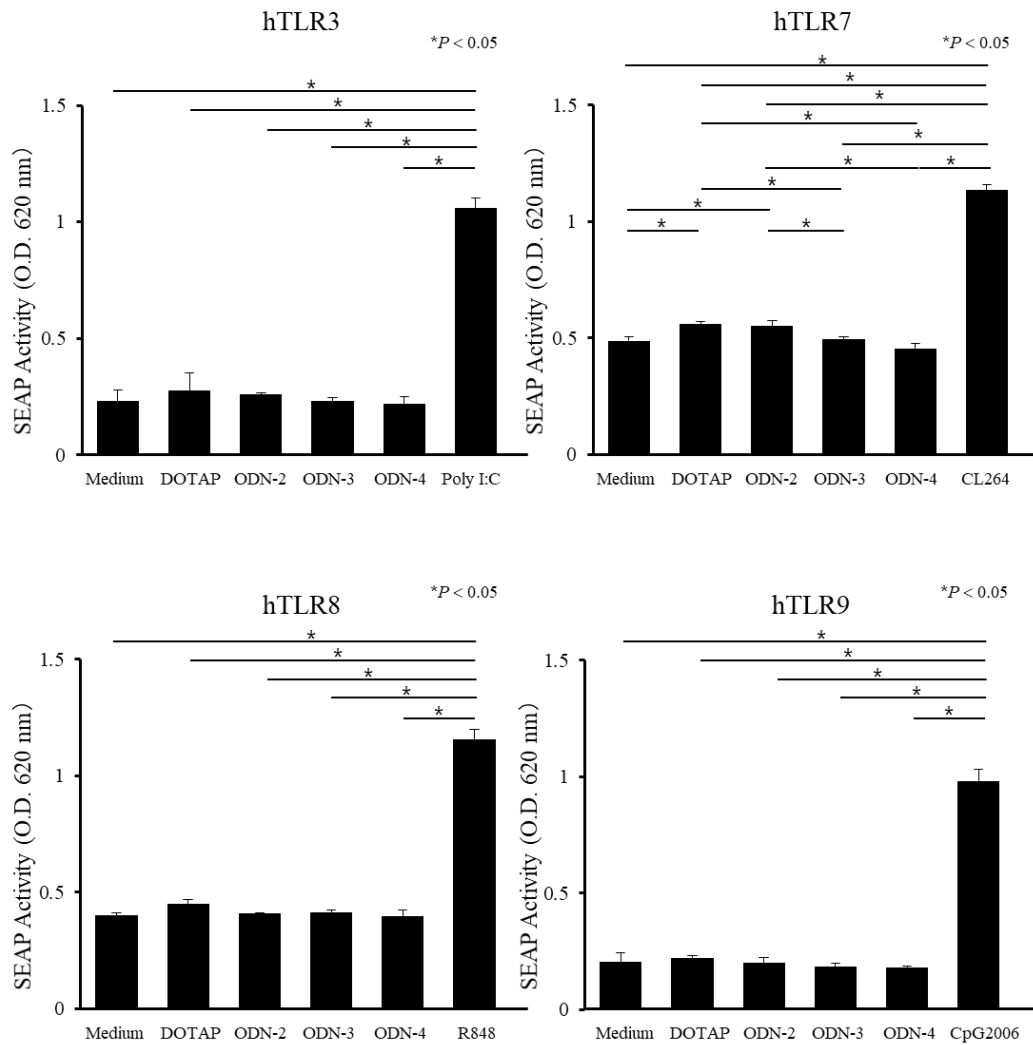


Figure 5. SEAP release from HEK-Blue hTLR3, hTLR7, hTLR8, and hTLR9 cells after addition of ODNs. Each TLR ligand was added to the cells at a final concentration of 1 μ g/mL. The results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Poly I:C, a TLR3 ligand; CL264, a TLR7 ligand; R848, a TLR7/8 ligand; CpG2006, a TLR9 ligand.

1.4 RNADNA ナノ構造体の細胞内移行性

FAM-tetrapodRD3 をマウス樹状細胞株である DC2.4 細胞に添加し、一定時間後に共焦点レーザー顕微鏡により細胞を観察した。その結果、DC2.4 細胞における FAM-tetrapodRD3 の 6-FAM 由来の蛍光強度は経時的に増大していた (Fig. 6)。また、その 6-FAM 由来の蛍光はインキュベート開始後 1 時間で Lysotracker の赤色蛍光と共局在していることが観察された。Lysotracker は分解経路にある酸性小胞である後期エンドソームやその下流にあるリソソームを標識することから²⁰、細胞内に取り込まれた FAM-tetrapodRD3 は後期エンドソームやリソソームに局在することが示された。エンドソームに発現する TLR は物質分解を担う後期エンドソームやリソソームにてリガンドと結合することから²¹、細胞内にエンドサイトーシスにより取り込まれた FAM-tetrapodRD3 は、これらの細胞内コンパートメント

にて TLR に認識されることが示唆された。また、ナノ構造化による細胞内移行性への影響を評価するため、FAM-ORN-1 ならびに FAM-tetrapodRD3 を DC2.4 細胞に添加し、2 時間後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。FAM-tetrapodRD3 の蛍光強度は FAM-ORN-1 よりも強かったことから、FAM-tetrapodRD3 がより効率的に取り込まれることが示唆された (Fig. 7A)。さらに、フローサイトメトリー解析にて各細胞群の平均蛍光強度 (MFI) を算出したところ、共焦点レーザー顕微鏡観察と同様に FAM-tetrapodRD3 の蛍光強度が FAM-ORN-1 よりも高かった (Fig. 7B)。これより、ナノ構造化することで ORN-1 の DC2.4 細胞による取り込みおよび細胞内移行性が増大することが示された。

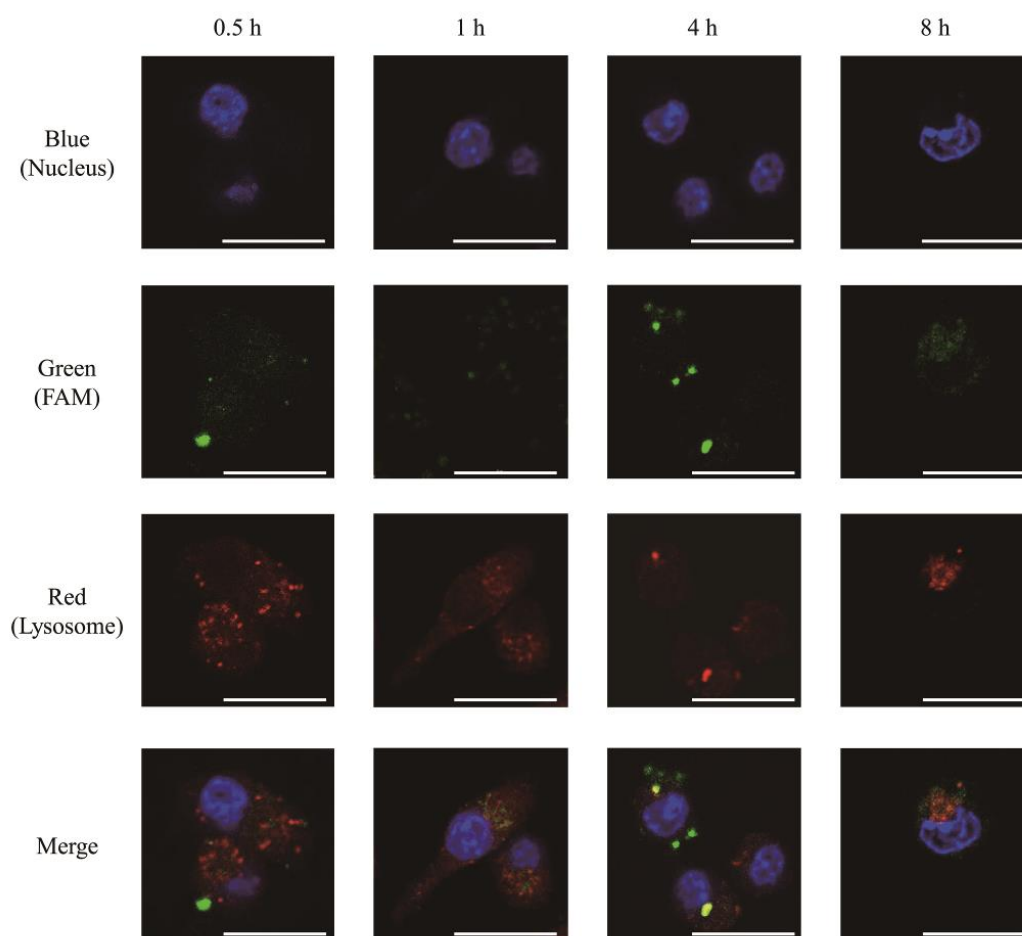


Figure 6. Time course of the uptake of FAM-tetrapodRD3 by DC2.4 cells. Confocal microscopy images of DC2.4 cells at 0.5, 1, 4 or 8 h after addition of FAM-tetrapodRD3. Scale bars, 20 μ m.

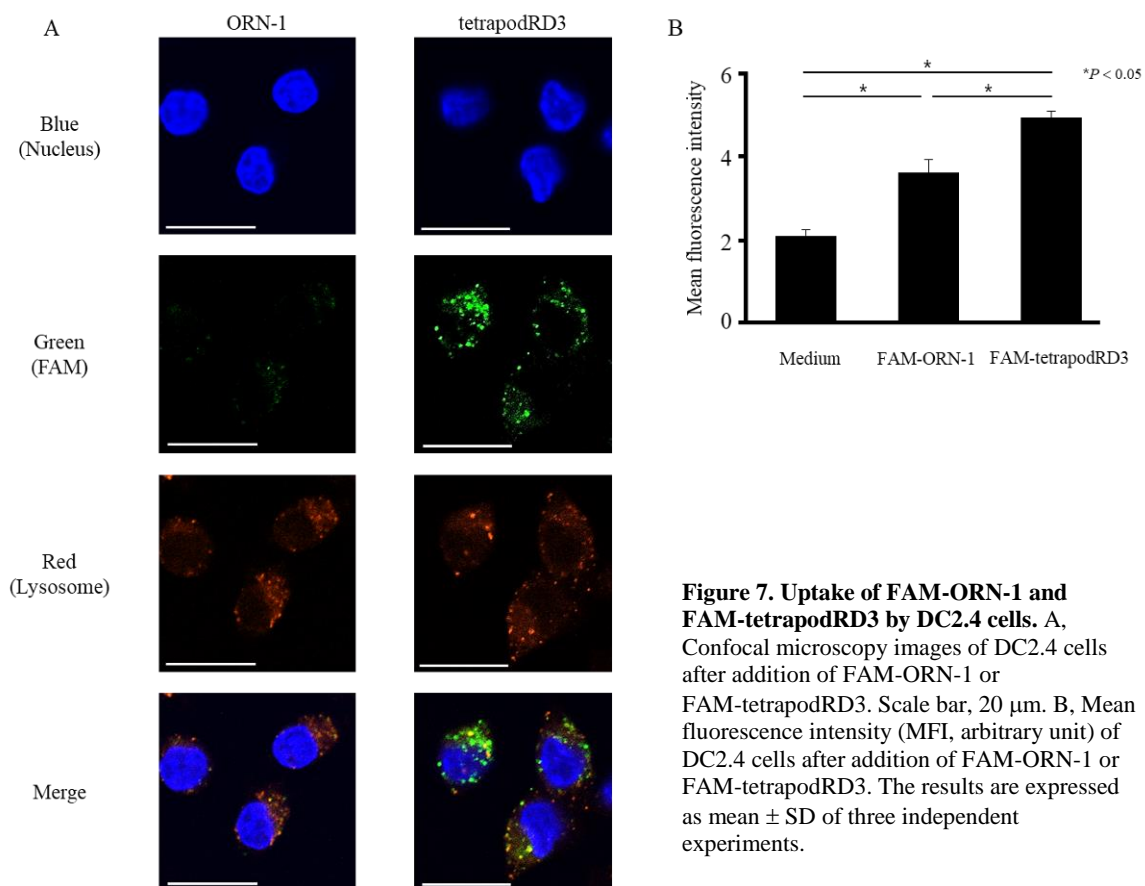


Figure 7. Uptake of FAM-ORN-1 and FAM-tetrapodRD3 by DC2.4 cells. A, Confocal microscopy images of DC2.4 cells after addition of FAM-ORN-1 or FAM-tetrapodRD3. Scale bar, 20 μm . B, Mean fluorescence intensity (MFI, arbitrary unit) of DC2.4 cells after addition of FAM-ORN-1 or FAM-tetrapodRD3. The results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments.

1.5 RNA/DNA ナノ構造体の免疫活性化能

マウス TLR7 (mTLR7) を発現している DC2.4 細胞を用いて、tetrapodRD3 の免疫活性誘導能を評価した (Fig. 8)。ORN-1 あるいは tetrapodRD3 を添加し、20 時間後における上清中の TNF- α 量を ELISA 法にて測定したところ、tetrapodRD3 添加群において ORN-1 添加群と比較して約 15 倍高い TNF- α 産生が認められた。また、tetrapodRD3 の構成核酸である ODN-2、ODN-3、ODN-4 では TNF- α 産生が認められなかった (Fig. 9)。以上より、ORN-1 をナノ構造化することで免疫活性誘導能が顕著に増大することが示された。

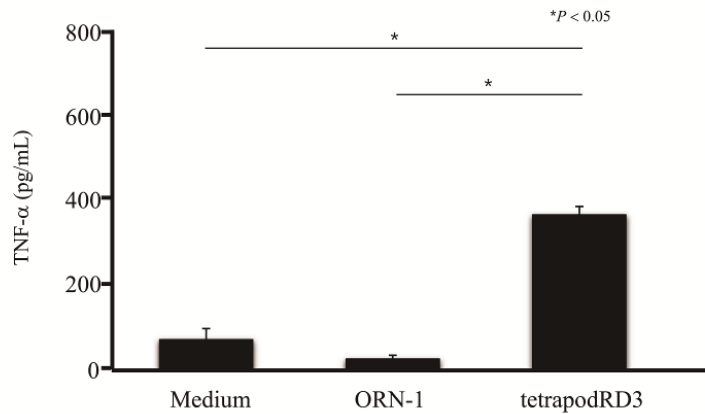


Figure 8. TNF- α release after addition of ORN-1 or tetrapodRD3 to DC2.4 cells. The results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments.

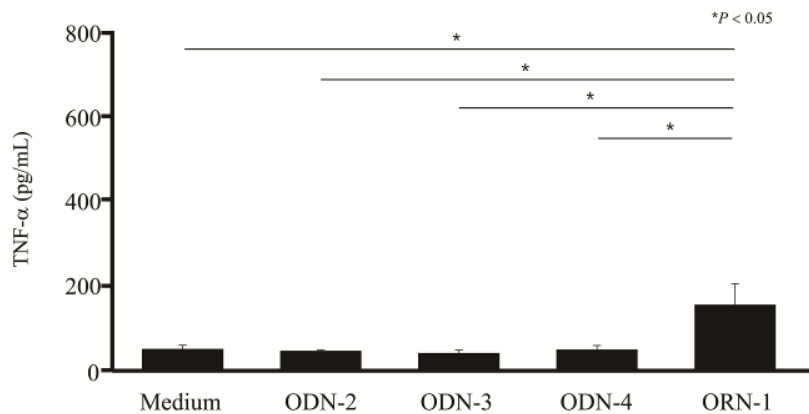


Figure 9. TNF- α release after addition of ODN-2, ODN-3, ODN-4 or ORN-1 to DC2.4 cells. The results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments.

1.6 RNA/DNA ナノ構造体の抗原提示促進効果

卵白アルブミン (ovalbumin) にエチレンジアミンを修飾したカチオン化 ovalbumin (以下OVA) をモデル抗原として選択し、OVA 単独、OVA と ORN-1、あるいはOVA と tetrapodRD3 を同時に添加した場合の樹状細胞の MHC class I による抗原提示を評価した。樹状細胞には、マウス骨髄より採取、樹状細胞に分化させた骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いた。各サンプルを BMDC に添加し、24 時間後に BMDC を MHC class I に結合した OVA ペプチド (SIINFEKL) に対する蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーにて解析した (Fig. 10)。その結果、tetrapodRD3 添加群では、ORN-1 添加群と比較して有意に高い蛍光強度が得られた。このことから、tetrapodRD3 は BMDC における MHC class I への抗原提示を促進することが示された。

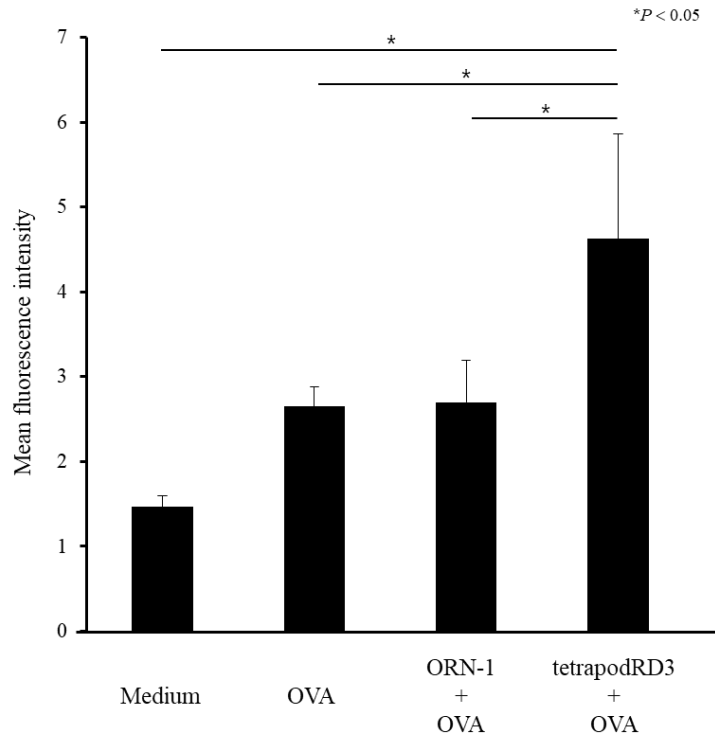


Figure 10. Antigen presenting induction ability of ORN-1 or tetrapodRD3 in BMDCs. Mean fluorescence intensity of BMDCs upon addition of the indicated samples and staining with antibodies against the OVA peptide (SIINFEKL) bound to MHC class I. The results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments.

1.7 考察

従来、抗原提示細胞への ssRNA の効率的な送達を達成するために、脂質ナノ粒子が利用されてきた。しかしながら、脂質ナノ粒子は製造が煩雑であり、また製造コストも高い。したがって、脂質ナノ粒子の利用に代表される従来法に代わる、簡便かつ汎用性の高いデリバリー方法の開発が求められている。第一章では、RNA/DNA ナノテクノロジーを用いて RNA を多足型ナノ構造化することでの ssRNA デリバリーの問題解消を目指し、4 足型 RNA/DNA ナノ構造体を設計した。その結果、ssRNA の抗原提示細胞への効率的な送達が達成できることが示され、RNA の治療応用の可能性を拡大できる有用な方法であることを明らかにした。

PAGE 解析からは、tetrapodRD3 が ORN-1 を ODN-1 に置換した DNA のみからなる tetrapodna と同程度のサイズであることが示された。病態情報薬学分野では、tetrapodna が設計通り 4 足型構造を形成していることを原子間力顕微鏡観察にて確認している¹⁴。従って、tetrapodna と配列が等しく、サイズが同程度である tetrapodRD3 もまた、tetrapodna と同様 4 足型構造であると推測される。

TetrapodRD3 は RNA/DNA あるいは DNA/DNA の二重鎖で構成される。ssRNA や RNA/RNA 二重鎖と比較して、RNA と DNA の二重鎖は RNase による分解に対する抵抗性が高いと考えられる²²。さらには、tetrapodRD3 の構造の複雑さは RNA への RNase の接近を妨げ、RNase

による分解を阻害することも想定される。Tetrapodna の場合には 50%未非働化 FBS 溶液中においても安定であることが示されていることから²³、DNA によるナノ構造化は DNase による分解に対する耐性も付与できると考えられる。以上より、tetrapodRD3 は ssRNA と比較して血清中で高い安定性を示したと推察した。

HEK-Blue hTLR 細胞を用いた SEAP アッセイにて、tetrapodRD3 と ORN-1 で同等であったことから、構造体化した RNA も hTLR8 によって特異的に認識されることが示された。TLR7/8 による ssRNA の認識は動物種ごとに異なり、ヒトでは TLR8 優位に、マウスでは TLR7 優位に認識されるという説が主である^{24,25}。従って、今回のマウス樹状細胞を用いた検討においては、ORN-1 ならびに tetrapodRD3 はマウス TLR7 に認識されていると考えられる。レミキモドなどの hTLR8 リガンドによる hTLR8 の活性化は、TNF- α や IL-6、IL-12 等の種々のサイトカインの産生を誘導することが報告されている^{26,27}。また、hTLR8 を介した免疫活性化はウイルス複製や腫瘍増殖の抑制を促進する。これらの報告は hTLR8 を標的としたアジュバントとしての tetrapodRD3 の有用性を示唆する。

抗原提示細胞には種々の RNA レセプターが発現している^{2,28}。抗原提示細胞の細胞質に存在する RIG-I は、短鎖二本鎖であるステムループ配列を有する 5'-三リン酸 ssRNA および 5'-三リン酸 dsRNA を認識する²⁹。第一章で用いた ssRNA は上記特徴にあてはまらないため、RIG-I によって認識されないと考えられる。細胞外 RNA が RIG-I に認識されるためには、エンドサイトーシスによる取り込み後、膜を透過して細胞質に移行する必要がある。Polypodna の少なくとも一部は、マクロファージスカベンジャー受容体 (MSR1) を介して取り込まれることを報告している³⁰。MSR1 に結合したリガンドは、クラスリン介在性エンドサイトーシスによってエンドソームに移行する³¹。さらに、今回の共焦点レーザー顕微鏡画像からは、tetrapodRD3 が DC2.4 細胞に取り込まれた後、エンドソーム、リソソームに局在することが示唆された。これより、tetrapodRD3 が細胞質への直接的な移行は認められず、RIG-I による認識は起きていないと考えられる。

抗原提示細胞のエンドソームへの送達を達成するために、ssRNA は標的細胞に効率的に取り込まなければならない。tetrapodRD3 は三次元構造を有し、その物理化学的特性は ssRNA である ORN-1 と異なることから、この構造的特徴の違いが tetrapodRD3 の細胞内移行性を向上させたと考える。加えて、tetrapodRD3 は ORN-1 と比較して、ヌクレアーゼ存在下でより安定であり (Fig. 3)、エンドソームに送達する前に培地中で分解されることを避けることができる。RNA 添加後の樹状細胞からの TNF- α 産生は、細胞内移行性に優れ、エンドソームへの局在が示唆された tetrapodRD3 添加群で高かったことから、ナノ構造化による細胞内移行性の向上によってエンドソームに発現する hTLR8 による ssRNA の認識とサイトカイン産生が増大することが示された。

樹状細胞の抗原提示能は tetrapodRD3 の添加により促進された。一般的に、抗原提示細胞を活性化することで MHC class I を介した抗原提示の効率は上昇する³²。したがって、tetrapodRD3 の添加による樹状細胞による高い抗原提示は、ナノ構造化による ssRNA の細胞

内移行量の増大による樹状細胞の効率的な活性化によるものと考えられる。

病態情報薬学分野ではこれまでに、CpG DNA を含む polypodna が *in vitro* だけでなく *in vivo* においてもサイトカイン産生を効率的に誘導することを報告してきた³³。今回得られた結果から、tetrapodRD3 もまた *in vivo* 評価にて免疫刺激誘導能の増大を示すことが推測される。

以上、第一章では、ssRNA を組み込んだ4足型 RNA/DNA ナノ構造体 tetrapodRD3 が、生体内での構造安定性、効率的な細胞内移行性、高免疫刺激活性、高抗原提示促進効果を有することを明らかとした。これらの結果から、tetrapodRD3 は TLR7/8 を標的としたアジュバントとして有用であることが示された。

第二章 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

第一章において、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抗原提示細胞である樹状細胞への送達効率の向上を達成した。ワクチンは、接種回数が少なく、長期間にわたって効果が持続することが望まれる^{1,34}。このようなワクチンの実現には、持続的な免疫の賦活化が求められる。しかしながら、RNA を利用したアジュバントの場合、RNA が投与後生体内から速やかに消失するため頻回投与が必要である。そのため、接種回数が少なくてもよい RNA アジュバントの開発が望まれる。

病態情報薬学分野では、末端に互いに相補な配列を付与した 2 種類の polypodna を混合することで、自己会合により DNA ハイドロゲルが形成可能であることを報告してきた³⁵。この DNA ハイドロゲルは応力刺激によるゾルゲル転移能を有することから注射投与が可能である。また、ゲル化に化学物質が不要であり、短鎖 DNA と水、金属イオンのみで構成され、生体適合性に優れるという製剤的な利点も有する。DNA ハイドロゲル形成に CpG DNA を用いた場合、そのゲル構成単位である polypodna と比較して持続的な免疫活性を誘導できることも示されている。

そこで第二章では、RNA が徐放され、持続的な免疫活性化を可能にする RNA/DNA ハイドロゲルの開発を試みた。20 塩基長の GU 配列を豊富に含む ssRNA を組みこんだ 2 種類の 6 足型 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。トランズウェルチャンバーを用いて、RNA/DNA ハイドロゲルの崩壊性をゲルに重層した PBS 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、長時間ゲル構造が保持されることが示された。また、6-FAM で標識した ssRNA を組み込んだ FAM-RNA/DNA ハイドロゲルに重層した PBS の FAM 由来蛍光強度を測定したところ、RNA/DNA ナノ構造体と比較して RNA の放出が遅延した。RNA/DNA ハイドロゲル中の核酸濃度および金属イオン濃度依存的に RNA の放出が遅延すること、また PBS 存在下においても非存在下と同様に RNA を徐放することが示された。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 DC2.4 細胞またはマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞からの高い TNF- α 産生を誘導した。また、RNA/DNA ハイドロゲルを添加した RAW264.7 細胞から回収したコンディションドメディウムが、マウス結腸癌細胞株 colon26 細胞のアポトーシスを誘導することが示された。以上より、自己ゲル化可能な 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化能を有する、がん治療に有用な RNA アジュバントである可能性が示された。

第三章 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

第一章、第二章にわたり、TLR7/8 のリガンドである ssRNA を対象に、ナノ構造化による ssRNA のヌクレアーゼ存在下での安定性、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、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。TLR7/8 が MyD88 経路を活性化するのに対し、TLR3 は TRIF 経路を活性化する^{36,37}。したがって、TLR7/8 と同時に TLR3 を標的とすることで、MyD88 経路ならびに TRIF 経路を同時に活性化でき、免疫活性化能のさらなる増大が期待される。

TLR7/8 と TLR3 を同時に活性化するためには、各リガンドを同時に免疫細胞のエンドソームに送達させる必要がある。TLR7/8 と TLR3 ではリガンドが異なり、TLR7/8 は U、G が豊富な ssRNA を認識するのに対し、TLR3 は直鎖状の 40 塩基以上の dsRNA を認識する³⁸⁻⁴²。Leonard らが、レポーターアッセイにて最短塩基長 40 の dsRNA が TLR3 を活性化することを報告している⁴²。また、分子動力学シミュレーションにより 46 塩基長の dsRNA が TLR3 を二量体化させることが報告されている³⁸。第一章、第二章より TLR7/8 標的 RNA アジュバントとして有用であることが明らかとなった多足型構造に TLR3 に認識され得る構造を組み込むことで、TLR3 も同時に活性化可能になると考える。しかしながら、分岐鎖を有する RNA/DNA ナノ構造体が TLR3 に認識されるかは明らかではない。

そこで第三章では、RNA のみで構成された種々の多足型 RNA ナノ構造体を新たに設計し、hTLR3 および hTLR8 による認識性を評価した。次いで、多足型 RNA ナノ構造体の一部の RNA を DNA に置換した多足型 RNA/DNA ナノ構造体の hTLR3 による認識性を評価した。配列の異なる 60 塩基長の dsRNA を HEK-Blue hTLR3 細胞に添加した際の SEAP 活性を指標に hTLR3 による認識性を評価したところ、GC 含量が 50% 程度の安定した二本鎖構造を形成した dsRNA が、hTLR3 に効率的に認識されることが示された。hTLR3 認識性が高かった dsRNA 配列を基に設計した、二重鎖部分の塩基長が 60 の多足型 RNA ナノ構造体は、足の数に関わらず hTLR3 に認識された。また、多足型構造の二重鎖部分の塩基長が hTLR3 認識性に及ぼす影響を総 RNA 塩基長が 180 となるように設計した多足型 RNA ナノ構造体を用いて評価したところ、構造体の二重鎖部分の塩基長が 45 以上の構造体、特に 4 足型 RNA ナノ構造体で hTLR3 に効率的に認識されることが示された。4 足型ナノ構造体に着目し、二重鎖部分の塩基長が異なる構造体での hTLR3 認識性を評価したところ、45 塩基長以上の二重鎖部分を有する構造体が、hTLR3 に効率的に認識されることを明らかにした。HEK-Blue hTLR8 細胞を用いて、45 塩基長以上の二重鎖部分を有する 4 足型 RNA ナノ構造体が ssRNA をリガンドとする hTLR8 も同時に活性化可能であることを示した。4 足型 RNA ナノ構造体を構成する RNA のうち一本を DNA に置換した 4 足型 RNA/DNA ナノ構造体もまた、hTLR3

を活性化することが示された。以上より、多足型 RNA/DNA ナノ構造体、特に 4 足型 RNA/DNA ナノ構造体は TLR3 と TLR7/8 を同時に標的可能な RNA アジュバントとなり得ることが示された。

結論

著者は三章にわたり、構造的特徴の異なるナノ構造化 RNA アジュバントの開発について検討し、以下の結論を得た。

第一章 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 40 塩基長の GU 配列を豊富に含む ssRNA (ORN-1) を組み込んだ 4 足型 RNA/DNA ナノ構造体 tetrapodRD3 は、効率よく形成され、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、tetrapodRD3 は効率的に DC2.4 細胞からの TNF- α 産生を誘導した。TetrapodRD3 と同時に抗原を添加することでマウス初代骨髄由来樹状細胞 (BMDC) からの抗原提示を向上させることが明らかとなった。以上より、ssRNA をナノ構造化することにより、血清存在下での安定性、樹状細胞への移行性、免疫活性化能、および抗原提示促進効果の向上を達成可能な TLR7/8 標的 RNA アジュバントであることが示された。

第二章 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

20 塩基長の GU 配列を豊富に含む ssRNA を組みこんだ 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。トランズウェルチャンバーを用いて、RNA/DNA ハイドロゲルの崩壊性をゲルに重層した PBS 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、長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 ORN-2 を組み込んだ FAM-RNA/DNA ハイドロゲルに重層した PBS の FAM 由来蛍光強度を測定したところ、RNA/DNA ナノ構造体と比較して RNA の放出の遅延が確認された。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、濃度依存的に RNA の放出が遅延することも示された。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- α 産生を誘導した。また、RNA/DNA ハイドロゲルを添加した RAW264.7 細胞から回収したコンディションドメディウムが、マウス結腸癌細胞株 colon26 細胞のアポトーシスを誘導することが認められた。以上より、自己ゲル

化可能な 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化能を有する、がん治療に有用な RNA アジュバントである可能性が示された。

第三章 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

HEK Blue hTLR3 細胞を用いた SEAP アッセイにより、配列の異なる 60 塩基長の dsRNA を HEK-Blue hTLR3 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% 程度の安定した二本鎖構造を形成した dsRNA が、hTLR3 に認識されやすいことが示された。高い hTLR3 認識性が確認された dsRNA 配列を基に設計した、60 塩基長の二重鎖部分を有する多足型 RNA ナノ構造体は、足の数に関わらず hTLR3 に認識されることを明らかにした。また、多足型構造の二重鎖部分である足の塩基長が hTLR3 認識性に及ぼす影響を総 RNA 塩基長が 180 となるように設計した多足型 RNA ナノ構造体を用いて評価したところ、構造体の二重鎖部分の塩基長が 45 以上の構造体、特に 4 足型 RNA ナノ構造体で hTLR3 に効率的に認識されることが示された。4 足型ナノ構造体に着目し、二重鎖部分の塩基長が異なる構造体での hTLR3 認識性を評価したところ、45 塩基長以上の二重鎖部分を有する構造体が hTLR3 に効率的に認識されることを明らかにした。HEK-Blue hTLR8 細胞を用いて、45 塩基長以上の二重鎖部分を有する構造体が ssRNA をリガンドとする hTLR8 も同時に活性化可能であることを示した。塩基長 45 以上の二重鎖 RNA 部分を有する 4 足型 RNA/DNA ナノ構造体は、4 足型 RNA ナノ構造体と同様に hTLR3 に認識されることが明らかとなった。以上より、多足型 RNA/DNA ナノ構造体、特に 4 足型 RNA/DNA ナノ構造体は TLR3 と TLR7/8 を同時に標的可能な RNA アジュバントとなり得ることが示された。

以上、著者は、ナノ構造化 RNA は、TLR7/8 のリガンドである ssRNA、TLR3 のリガンドである dsRNA を同時に搭載可能であること、ナノ構造化 RNA が構造安定性、RNA 徐放性、細胞内移行性、さらには免疫活性化能に優れていることを明らかにした。以上の研究成果は、ナノ構造化 RNA が有用な RNA アジュバントモデルであることを実証したものである。

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東京理科大学薬学部 西川元也教授、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国立医薬品食品衛生研究所 井上貴雄博士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奥隅佳奈氏に深謝します。

実験の部

第一章 実験の部

【1】 試薬

RPMI1640 培地、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は日水製薬株式会社より購入した。Opti-modified Eagle's medium (Opti-MEM)、FBS は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。塩化ナトリウム、炭酸ナトリウム、塩化カリウム、Tris-HCl、EDTA、塩化アンモニウム、グルコースは和光純薬株式会社より購入した。PolyI:C は Invitrogen より購入した。Blasticidin、zeocin、normocin、CL264、HEK-Blue detection reagents は InvivoGen から購入した。Monothioglycerol、MEM 非必須アミノ酸、penicillin-streptomycin-glutamine mixed solution はナカライテスク株式会社より購入した。20 bp ladder はタカラバイオ株式会社から購入した。R848、ovalbumin は Merck KgaA 社より購入した。DOTAP は Avanti Polar lipids, Inc 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、0.2% 炭酸水素ナトリウム、50 μ 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% CO₂、加湿条件下で培養した。HEK-Blue human TLR (hTLR)3、HEK-Blue hTLR7、HEK-Blue hTLR8、HEK-Blue hTLR9 細胞は Invivogen 社より購入した。HEK-Blue human TLR 細胞は 10% FBS、4.5 g/L グルコース、0.2% 炭酸水素ナトリウム、100 units/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、2 mM/L-グルタミン、100 μ g/mL normocin、30 μ g/mL blasticidin、100 μ g/mL zeocin を添加した DMEM 培地で、37°C、5% CO₂、加湿条件下で培養した。

【3】 実験動物

6 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。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

ホスホロチオエート修飾 ORN である ORN-1 および 5'末端に FAM を修飾した FAM-ORN-1

は FASAMC 社より購入した。ホスホジエステル型 ODN (ODN-1、ODN-2、ODN-3、ODN-4、CpG2006) は、Integrated DNA Technologies 社より購入した。ODN-1 はチミジンをウラシルに置換した ORN-1 と同配列である。ORN-1、ODN-2、ODN-3、ODN-4 は tetrapodRD3 を形成するために設計され、ODN-1、ODN-2、ODN-3、ODN-4 は tetrapodD4 (tetrapodna) を形成するために用意された。配列情報は Table. 1 に示す。

【5】 RNA/DNA ナノ構造体の調製

各オリゴヌクレオチドは TE バッファーにより溶解した。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 tetrapodRD3 を得た。また、tetrapodRD3 の形成は 9 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) により SYBR GOLD 染色で確認した。FAM 標識オリゴヌクレオチドは SYBR GOLD 染色せずに解析した。すべてのサンプルは、150 mM NaCl 条件下で調製した。

【6】 RNA/DNA ナノ構造体の T_m 値測定

融解温度 (T_m) は TMSPC-8 temperature controller を接続した分光光度計 (Shimazu UV-1600 PC spectrometer) を用いて、セル温度を変化させた際の波長 260 nm での吸光度の変化を測定することで得た。tetrapodRD3 は 150 mM NaCl 存在下で測定した。

【7】 10%FBS 中での RNA/DNA ナノ構造体の安定性評価

FAM-ORN-1 および FAM-tetrapodRD3 を最終濃度 10%となるよう調整した FBS 溶液に添加し、37°C でインキュベートした。インキュベート開始後 0、15、30、45、60、90、120 分に EDTA を添加し、4°C 下で 9%PAGE に供した。LAS3000 にて FAM の蛍光を検出し、Multi Gauge software (Fujifilm 社製)を用いてバンドのシグナル強度から定量的評価を行った。

【8】 SEAP アッセイ

96 ウェルプレートに HEK-Blue hTLR cells を 5×10^4 細胞/ウェルで播種し、37°C で 24 時間培養した。DOTAP と複合体形成した ORN-1、ODN-2、ODN-3、ODN-4 あるいは tetrapodRD3 を含む HEK-Blue detection solution を RNA 濃度が 0.2 μ M となるように添加し、37°C で 20 時間培養した。マイクロプレートリーダーにて波長 620 nm での吸光度を測定した。

【9】 DC2.4 細胞による細胞取り込み評価

チャンバースライド(WATSON 社製)に DC2.4 細胞を 3×10^4 細胞/ウェルで播種し、37°C で 24 時間培養した。100 nM LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes 社製)を含む新しい培地に交換し、1 時間培養する。培地を除去後、Opti-MEM で最終 RNA 濃度 0.2 μ M となるよう調製した FAM-ORN-1 あるいは FAM-tetrapodRD3 を細胞に添加し、37°C で 0.5、1、2、4、8 時間培養した。4%パラホルムアルデヒドで固定後、DAPI で染色し、共焦点蛍光顕微鏡(A1R

MP, Nikon Instech 社製)にて観察した。

96 ウェルプレートに DC2.4 細胞を 5×10^4 細胞/ウェルで播種し、37°C で 24 時間培養した。Opti-MEM で最終 RNA 濃度 0.2 μM となるよう調製した FAM-ORN-1 あるいは FAM-tetrapodRD3 溶液を細胞に添加し、37°C で 2 時間培養した。細胞を回収し、PBS で洗浄後、フローサイトメトリー(Beckman Coulter 社製)に供した。ヒストグラムを Kaluza software (Beckman Coulter 社製)で解析し、mean fluorescence intensity (MFI) を算出した。

【10】 DC2.4 細胞からの TNF- α 産生

96 ウェルプレートに DC2.4 細胞を 5×10^4 細胞/ウェルで播種し、37°C で 24 時間培養した。Opti-MEM で最終 RNA 濃度 0.2 μM となるよう調製した ORN-1 あるいは tetrapodRD3 溶液を細胞に添加し、37°C で 20 時間培養した。上清を回収し、-80 °C で保存した。上清中の TNF- α 濃度は ELISA 法を用いて測定した。

【11】 BMDC の調製

7-9 週齢のオスの C57BL/6J マウス をイソフルランで麻酔後、安楽死させた。大腿骨および脛骨を回収し、骨髄を 27G 針を用いて RPMI1640 培地で洗い流した。骨髄懸濁液を 0.4 μm ポアフィルターを用いて濾過した。遠心分離した後、赤血球溶解緩衝液を用いて血液赤血球を枯渇させた。骨髄細胞を 20 ng/mL マウス GM-CSF 含有樹状細胞培養用 RPMI 培地で培養し、培地を 2 日ごとに交換した。6 日後、非接着細胞を採取し、BMDC として使用した。

【12】 BMDC による抗原提示

96 ウェルプレートに【11】で調製した BMDC を 5×10^4 細胞/ウェルで播種し、37°C で 24 時間培養した。DC 培養培地に RNA とカチオン化 ovalbumin (OVA) を細胞に添加し、37°C で 24 時間培養した。細胞を回収し、PBS で洗浄後、OVA257-264 peptide bound to phycoerythrin (PE)-labeled H-2Kb antibody (Invitrogen 社製)で染色した。フローサイトメトリー(Beckman Coulter 社製)に供し、得られたヒストグラムを Kaluza software (Beckman Coulter 社製)で解析し、mean fluorescence intensity (MFI) を算出した。

引用文献

1. Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M. & Rappuoli, R. New adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 411–416 (2010).
2. Fujita, T., Onoguchi, K., Onomoto, K., Hirai, R. & Yoneyama, M. Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie* **89**, 754–760 (2007).
3. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
4. Splawn, L. M., Bailey, C. A., Medina, J. P. & Cho, J. C. Hepsivax-B vaccination for the prevention of hepatitis B virus infection in adults in the United States. *Drugs of Today* **54**, 399 (2018).
5. Kadowaki, N. *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* **194**, 863–9 (2001).
6. Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3388–3393 (2001).
7. Hornung, V. *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **168**, 4531–7 (2002).
8. Yi Xue, H., Guo, P., Wen, W. & Lun Wong, H. Lipid-Based Nanocarriers for RNA Delivery. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 3140–3147 (2015).
9. Sayour, E. J. *et al.* Systemic activation of antigen-presenting cells via RNA-loaded nanoparticles. *Oncoimmunology* **6**, e1256527 (2017).
10. Guan, C. *et al.* RNA-Based Immunostimulatory Liposomal Spherical Nucleic Acids as Potent TLR7/8 Modulators. *Small* **14**, 1803284 (2018).
11. Li, J., Fan, C., Pei, H., Shi, J. & Huang, Q. Smart Drug Delivery Nanocarriers with Self-Assembled DNA Nanostructures. *Adv. Mater.* **25**, 4386–4396 (2013).
12. Guo, P. The emerging field of RNA nanotechnology. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 833–842 (2010).
13. Grabow, W. W. & Jaeger, L. RNA Self-Assembly and RNA Nanotechnology. *Acc. Chem. Res* **47**, 31 (2014).
14. Mohri, K. *et al.* Design and Development of Nanosized DNA Assemblies in Polyod-like Structures as Efficient Vehicles for Immunostimulatory CpG Motifs to Immune Cells. *ACS Nano* **6**, 5931–5940 (2012).
15. Afonin, K. A. *et al.* Triggering of RNA interference with RNA-RNA, RNA-DNA, and DNA-RNA nanoparticles. *ACS Nano* **9**, 251–259 (2015).

16. Araie, Y., Takahashi, Y., Takahashi, Y., Takakura, Y. & Nishikawa, M. Enhanced Activity of Immunosuppressive Oligodeoxynucleotides by Incorporating Them into Hexapod-Like Nanostructured DNA. *Biol. Pharm. Bull.* **41**, 564–569 (2018).
17. Takahashi, Y. *et al.* Construction of nanostructured DNA harbouring phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide for controlled tissue distribution in mice. *J. Drug Target.* **26**, 373–381 (2018).
18. Heil, F. *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526–9 (2004).
19. Forsbach, A. *et al.* Identification of RNA sequence motifs stimulating sequence-specific TLR8-dependent immune responses. *J. Immunol.* **180**, 3729–38 (2008).
20. Potokar, M. *et al.* Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes. *Glia* **58**, 1208–1219 (2010).
21. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Semin. Immunol.* **19**, 24–32 (2007).
22. Stazic, D., Lindell, D. & Steglich, C. Antisense RNA protects mRNA from RNase E degradation by RNA–RNA duplex formation during phage infection. *Nucleic Acids Res.* **39**, 4890–4899 (2011).
23. Ohtsuki, S. *et al.* Optimal Arrangement of Four Short DNA Strands for Delivery of Immunostimulatory Nucleic Acids to Immune Cells. *Nucleic Acid Ther.* **25**, 245–253 (2015).
24. Cervantes, J. L., Weinerman, B., Basole, C. & Salazar, J. C. TLR8: the forgotten relative revindicated. *Cell. Mol. Immunol.* **9**, 434–438 (2012).
25. Schön, M. P. & Schön, M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* **27**, 190–199 (2008).
26. Hackstein, H. *et al.* The TLR7/8 ligand resiquimod targets monocyte-derived dendritic cell differentiation via TLR8 and augments functional dendritic cell generation. *Cell. Immunol.* **271**, 401–412 (2011).
27. Levy, O., Suter, E. E., Miller, R. L. & Wessels, M. R. Unique efficacy of Toll-like receptor 8 agonists in activating human neonatal antigen-presenting cells. *Blood* **108**, 1284–90 (2006).
28. Yoneyama, M. & Fujita, T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol. Rev.* **227**, 54–65 (2009).
29. Kell, A. M., Gale, M. & Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* **479–480**, 110–21 (2015).
30. Ohtsuki, S., Takahashi, Y., Inoue, T., Takakura, Y. & Nishikawa, M. Reconstruction of Toll-like receptor 9-mediated responses in HEK-Blue hTLR9 cells by transfection of human macrophage scavenger receptor 1 gene. *Sci. Rep.* **7**, 13661 (2017).
31. Zani, I. *et al.* Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells* **4**, 178–201 (2015).
32. Ho, N. I., Huis In 't Veld, L. G. M., Raaijmakers, T. K. & Adema, G. J. Adjuvants Enhancing

- Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines? *Front. Immunol.* **9**, 2874 (2018).
33. 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.* **10**, 765–774 (2014).
 34. Traggiari, E., Puzone, R. & Lanzavecchia, A. Antigen dependent and independent mechanisms that sustain serum antibody levels. *Vaccine* **21**, S35–S37 (2003).
 35. Nishikawa, M. *et al.* Injectable, self-gelling, biodegradable, and immunomodulatory DNA hydrogel for antigen delivery. *J. Control. Release* **180**, 25–32 (2014).
 36. Thwaites, R., Chamberlain, G. & Sacre, S. Emerging Role of Endosomal Toll-Like Receptors in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **5**, 1 (2014).
 37. Chow, K. T., Gale, M. & Loo, Y.-M. RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 667–694 (2018).
 38. Gosu, V., Son, S., Shin, D. & Song, K.-D. Insights into the dynamic nature of the dsRNA-bound TLR3 complex. *Sci. Rep.* **9**, 3652 (2019).
 39. Zhang, S.-Y. *et al.* TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* **317**, 1522–7 (2007).
 40. Vierbuchen, T., Stein, K. & Heine, H. RNA is taking its Toll: Impact of RNA-specific Toll-like receptors on health and disease. *Allergy* **74**, all.13680 (2018).
 41. Jelinek, I. *et al.* TLR3-specific double-stranded RNA oligonucleotide adjuvants induce dendritic cell cross-presentation, CTL responses, and antiviral protection. *J. Immunol.* **186**, 2422–9 (2011).
 42. Leonard, J. N. *et al.* The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 258–263 (2008).