

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	毛利 浩太
論文題目	多足型核酸構造体を基盤とする免疫賦活性 DNA ハイドロゲルの開発に関する研究		

天然の核酸分子である DNA や RNA は、相補鎖と二本鎖を形成する性質を有している。近年、この核酸の特性を巧みに利用することで、平面図柄や正多面体構造、さらにはハイドロゲルなど複雑な形状の構造体を構築する試みが盛んに行われるようになり、「DNA ナノテクノロジー」と呼ばれる新たな研究領域として発展しつつある。しかしながら、こうした新規 DNA 構造体と生体との相互作用に関する詳細やドラッグデリバリーシステムへの応用の可能性については明らかとされてこなかった。これまでに、病態情報薬学分野では、免疫アジュバントとしての応用が進められる CpG モチーフを含む DNA（CpG DNA）を用いた検討から、これを Y 型やデンドリマー型に組み上げることで免疫活性を増強可能であることを見出してきた。そこで申請者は、免疫活性化能を有する徐放型ドラッグデリバリーシステム（DDS）の開発を目的に、CpG DNA を用いて多足型核酸構造体を設計するとともに、新たに開発した DNA ハイドロゲルの DDS 応用を試みた。

第一章 免疫・化学療法を指向した DNA ハイドロゲルの開発

細菌由来 DNA に特徴的な CpG DNA は、樹状細胞に代表される免疫担当細胞に発現する Toll-like receptor 9 に認識され、種々のサイトカイン産生を誘導する。申請者は、CpG DNA を用いて DNA ハイドロゲルを開発し、DNA と親和性の高いドキシソルビシン（DXR）を内包する免疫賦活性 DDS の開発を試みた。CpG DNA を含む 4 本のオリゴヌクレオチド（ODN）を用いて接着性 5'末端を有する X 型 DNA（X-DNA）を構築し、DNA リガーゼを用いて無数の X-DNA を連結することで DNA ハイドロゲルを作製した。得られた DNA ハイドロゲルは、CpG モチーフに依存してマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞を活性化した。また、ハイドロゲルに DXR をインターカレートさせることで、その徐放化にも成功した。マウス結腸癌細胞株 colon26 担癌マウスでの検討において、DXR／DNA ハイドロゲルの投与が、DXR 単独あるいは DNA ハイドロゲル単独投与と比較して、高い腫瘍増殖抑制効果を示した。以上より、癌免疫・化学療法に利用可能な DXR 徐放型免疫賦活性 DNA ハイドロゲルの開発に成功した。

第二章 多足型構造を形成する DNA-polypodna の開発によるハイドロゲル構成 DNA ユニットの最適化検討

DNAハイドロゲルなどのDNA高次構造体の開発には、X-DNAに代表される比較的単純なDNAユニットが利用されてきた。DNAを利用することの利点として、より複雑な構造のユニットも容易に設計可能であることが挙げられる。これまでの検討において、構造の複雑さと抗原提示細胞による取り込み、細胞活性化には正の相関が認められることから、ハイドロゲルを構成するDNAユニット構造の最適化を検討した。すなわち、一連の多足型構造を形成するDNA（polypod-like structure forming nucleic acid; polypodna）を設計し、形成を確

認後、マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7 細胞との相互作用について評価した。36ヌクレオチドのODNを用いた場合、生理的条件下では足（pod）の数が 3～8 のpolypodnaの形成が確認されたものの、pod数が 12 のpolypodnaは形成されなかった。Pod数の増加に伴いpolypodnaの融解温度（Tm）が減少したことから、pod数増加時の形成不全には構造的安定性の関与が推察された。また、pod数の増加に伴い、RAW264.7 細胞からのサイトカイン産生が飛躍的に増大することも示された。以上の結果から、免疫担当細胞活性化の観点からは、hexapodnaやoctapodnaなどのpod数の多いpolypodnaが免疫賦活性DNAハイドロゲルの開発には適していることを見出した。

第三章 酵素反応を必要としない DNA ハイドロゲルの開発

第一章で開発した DNA ハイドロゲルは、DNA リガーゼを利用することから、最終産物への DNA リガーゼの混入や投与の不便さが臨床応用への障壁になることが懸念される。そこで第三章では、リガーゼを用いずに DNA ハイドロゲルを作製する新規方法論の開発を試みた。Polypodna に従来よりも長い接着性末端を付与したところ、リガーゼを用いなくても生理的塩濃度でゲル化する polypodna が設計可能であった。走査型電子顕微鏡による観察から、その内部構造は酵素反応で調製したハイドロゲル同様に網目状であった。また、種々の物質を内包可能であった。また、ゾル状態での投与が可能であり、投与部位でゲル化することも確認した。以上、酵素反応を必要としない DNA ハイドロゲルの開発に成功し、これが生体投与に適したゲル製剤であることを示した。

以上、申請者は、CpG DNA を含む DNA ハイドロゲルが、癌化学・免疫療法に有効であることを実証した。また、構成基本ユニットとしては pod 数の多い polypodna が適していることを見出すとともに、酵素反応を必要としない DNA ハイドロゲルの開発にも成功した。本研究で開発した DNA ハイドロゲルは、癌やアレルギー疾患などに対する疾患治療に利用可能な新規免疫賦活性 DDS になるものと期待する。

(論文審査の結果の要旨)

天然の核酸分子である DNA や RNA は、相補鎖と二本鎖を形成する性質を有している。近年、この核酸の特性を巧みに利用することで、平面図柄や正多面体構造、さらにはハイドロゲルなど複雑な形状の構造体を構築する試みが盛んに行われるようになり、「DNA ナノテクノロジー」と呼ばれる新たな研究領域として発展しつつある。しかしながら、こうした新規 DNA 構造体と生体との相互作用に関する詳細やドラッグデリバリーシステムへの応用の可能性については明らかとされてこなかった。これまでに、病態情報薬学分野では、免疫アジュバントとしての応用が進められる CpG モチーフを含む DNA (CpG DNA) を用いた検討から、これを Y 型やデンドリマー型に組み上げることで免疫活性を増強可能であることを見出してきた。そこで申請者は、免疫活性化能を有する徐放型ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発を目的に、CpG DNA を用いて多足型核酸構造体を設計するとともに、新たに開発した DNA ハイドロゲルの DDS 応用を試みた。

第一章 免疫・化学療法を指向した DNA ハイドロゲルの開発

細菌由来 DNA に特徴的な CpG DNA は、樹状細胞に代表される免疫担当細胞に発現する Toll-like receptor 9 に認識され、種々のサイトカイン産生を誘導する。申請者は、CpG DNA を用いて DNA ハイドロゲルを開発し、DNA と親和性の高いドキシソルビシン (DXR) を内包する免疫賦活性 DDS の開発を試みた。CpG DNA を含む 4 本のオリゴヌクレオチド (ODN) を用いて接着性 5'末端を有する X 型 DNA (X-DNA) を構築し、DNA リガーゼを用いて無数の X-DNA を連結することで DNA ハイドロゲルを作製した。得られた DNA ハイドロゲルは、CpG モチーフに依存してマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞を活性化した。また、ハイドロゲルに DXR をインターカレートさせることで、その徐放化にも成功した。マウス結腸癌細胞株 colon26 担癌マウスでの検討において、DXR/DNA ハイドロゲルの投与が、DXR 単独あるいは DNA ハイドロゲル単独投与と比較して、高い腫瘍増殖抑制効果を示した。以上より、癌免疫・化学療法に利用可能な DXR 徐放型免疫賦活性 DNA ハイドロゲルの開発に成功した。

第二章 多足型構造を形成する DNA-polypodna-の開発によるハイドロゲル構成 DNA ユニットの最適化検討

DNA ハイドロゲルなどの DNA 高次構造体の開発には、X-DNA に代表される比較的単純な DNA ユニットが利用されてきた。DNA を利用することの利点として、より複雑な構造のユニットも容易に設計可能であることが挙げられる。これまでの検討において、構造の複雑さと抗原提示細胞による取り込み、細胞活性化には正の相関が認められることから、ハイドロゲルを構成する DNA ユニット構造の最適化を検討した。すなわち、一連の多足型構造を形成する DNA (polypod-like structure forming nucleic acid; polypodna) を設計し、形成を確認後、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞との相互作用について評価した。36

ヌクレオチドのODNを用いた場合、生理的条件下では足（pod）の数が 3～8 のpolypodnaの形成が確認されたものの、pod数が 12 のpolypodnaは形成されなかった。Pod数の増加に伴い polypodnaの融解温度（Tm）が減少したことから、pod数増加時の形成不全には構造的安定性の関与が推察された。また、pod数の増加に伴い、RAW264.7 細胞からのサイトカイン産生が飛躍的に増大することも示された。以上の結果から、免疫担当細胞活性化の観点からは、hexapodnaやoctapodnaなどのpod数の多いpolypodnaが免疫賦活性DNAハイドロゲルの開発には適していることを見出した。

第三章 酵素反応を必要としない DNA ハイドロゲルの開発

第一章で開発した DNA ハイドロゲルは、DNA リガーゼを利用することから、最終産物への DNA リガーゼの混入や投与の不便さが臨床応用への障壁になることが懸念される。そこで第三章では、リガーゼを用いずに DNA ハイドロゲルを作製する新規方法論の開発を試みた。Polypodna に従来よりも長い接着性末端を付与したところ、リガーゼを用いなくても生理的塩濃度でゲル化する polypodna が設計可能であった。走査型電子顕微鏡による観察から、その内部構造は酵素反応で調製したハイドロゲル同様に網目状であった。また、種々の物質を内包可能であった。また、ゾル状態での投与が可能であり、投与部位でゲル化することも確認した。以上、酵素反応を必要としない DNA ハイドロゲルの開発に成功し、これが生体投与に適したゲル製剤であることを示した。

以上、申請者は、CpG DNA を含む DNA ハイドロゲルが、癌化学・免疫療法に有効であることを実証した。また、構成基本ユニットとしては pod 数の多い polypodna が適していることを見出すとともに、酵素反応を必要としない DNA ハイドロゲルの開発にも成功した。本研究で開発した DNA ハイドロゲルは、癌やアレルギー疾患などに対する疾患治療に利用可能な新規免疫賦活性 DDS になるものと期待する。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 24 年 2 月 21 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降