

令和元年6月22日現在

機関番号：33903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07219

研究課題名(和文)免疫回避型PMO/DNAナノ構造体の創製とDDS応用

研究課題名(英文) Development of an immunity escaped pmo/dna nano structure and its drug delivery system application

研究代表者

宮本 寛子 (Miyamoto, Noriko)

愛知工業大学・工学部・助教

研究者番号：80803212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAナノテクノロジーからなる粒子は、医薬自身が薬効であり送達技術を担う送達技術となる一方で、DNAやRNAセンサーに認識され副作用を誘導することが懸念される。本研究では、人工核酸のモルフォリノ核酸(PMO)を利用して免疫回避型PMO/DNAナノ構造体の開発を行なった。CpG-ODNを有するDNAナノ構造体は免疫応答を誘導したのに対して、CpG-PMOを有する構造体では免疫応答を誘導しないことが明らかとなった。本成果は、新規PMO/DNAナノ構造体の創製と、その構造体によって免疫応答を制御可能であることを明らかにし、今後のDNAナノテクノロジーのDDS応用の発展に有用な成果となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAやRNAから構成される核酸医薬は、低分子医薬品やバイオ医薬品の次世代の新規創薬分野として開発が注目されている。核酸医薬の開発には2つのポイントが挙げられる。(1)核酸医薬がその薬効を示すための配列設計：配列設計によって様々な疾患を創薬対象とすることが可能となる。(2)送達技術の開発：細胞へ届けるためのドラッグデリバリーシステムの構築が必要である。本研究では、DNAナノテクノロジーからなる核酸医薬のDDS技術の発展のために、人工核酸を利用した免疫回避型ナノ構造体の開発し、その免疫回避を評価した。本成果は、今後のさらなる発展が見込まれるDNAナノテクノロジーのDDS応用の新たな知見となった。

研究成果の概要(英文)：DNA nanotechnology has attracted as a therapeutic oligo nucleotides delivery tool. There is a DNA nanostructure that can precisely control of particle size and shape with complementary sequences of base. According recent studies, a tetrahedral DNA nanoparticle was reported uptaking to immunocyte without being degraded by nuclease. This research demonstrated developing new concept DNA/PMO nanostructure for an immunity escape. The morpholino nucleotide (PMO) is new generation chemically modified oligonucleotide(ODN), neutral charge, higher serum resistance than DNA, and an escape of immunity. The DNA/PMO nanostructure escaped immunity and didn't induce a cytokine in spite of including CpG-motif sequence. On the other hand, CpG-ODN/DNA nanostructure induced 10-fold cytokine of a naked CpG-ODN. These results would be useful information for dna nanotechnology application as a therapeutic oligo nucleotides delivery.

研究分野：ゲノム創薬、DDS、生体高分子

キーワード：DNAナノテクノロジー 免疫 CpG-ODN 人工核酸 核酸医薬 DDS ナノテクノロジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA や RNA から構成される核酸医薬は、低分子医薬品やバイオ医薬品の次世代の新規創薬分野として開発が注目されている。

核酸医薬の開発には2つのポイントが挙げられる。(1)核酸医薬がその薬効を示すための配列設計：配列設計によって様々な疾患を創薬対象とすることが可能である。これまでに、AS-ODN や CpG-ODN や siRNA、miRNA などが開発されている。(2)血清耐性と標的への送達技術の開発：標的とする細胞へ分解することなく届けるためのドラッグデリバリーシステム(DDS)の構築が必要である。核酸は負電荷を帯びており、負電荷の細胞膜を透過することができないことから、カチオン性の脂質からなる遺伝子導入剤のリポソームやポリマーからなるミセルによる DDS が開発されている。これらの技術によって、血清耐性を付与し、細胞への送達が向上した。

Nadrian C. Seeman らが提唱した DNA ナノテクノロジーは、DNA の相補的二重鎖形成と自己組織化によりナノ構造体を形成する技術である。DNA ナノテクノロジーからなるナノ構造体は、医薬自身が構造を形成し、薬効を担うユニークな構造体の設計が可能である。DNA ナノ構造体に組み込まれた核酸医薬は、1本鎖の核酸より血中安定性に優れ、細胞へ取り込まれることが報告されており、今後の DDS 応用がさらに盛んになることが見込まれる。しかしながら、DNA ナノ構造体は配列に関係なく細胞内の DNA や RNA センサーに認識され想定外な免疫応答を誘導し副作用となることが懸念される。よって、本研究では、DNA ナノテクノロジーを利用した免疫回避型構造体の開発を目指した。近年、開発された電荷のないモルフォリノ核酸(PMO)は血中安定性と免疫回避、標的とする DNA との結合力の強さから高い薬理効果を示す第三世代の核酸医薬として注目されている。本申請は PMO の免疫回避に着目し、免疫回避型 PMO/DNA ナノ構造体の創製を目指す。本研究の成果は、2018 年アメリカのボストンで開催された 256th ACS National meeting(国際学会)で発表した。新規 PMO/DNA ナノ構造体は、免疫の誘導を抑えたことから人工核酸の導入によって免疫応答を制御可能であることを明らかにし、今後の DNA ナノテクノロジーに有用な成果となった。

2. 研究の目的

本研究では、DNA ナノテクノロジーを用いた DDS 分野のさらなる発展を想定し、免疫回避型構造体の開発を目指した。免疫回避型構造体の創製は、免疫回避の人工核酸の PMO を利用した。PMO/DNA ナノ構造体の創製と、その免疫の誘導を評価し、免疫回避型ナノ構造体の開発を行うことを目的とした。

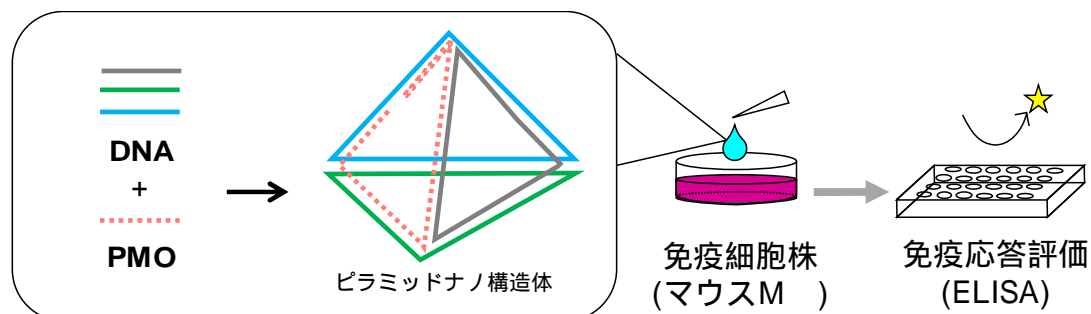


図1. 本研究で創製したピラミッドナノ構造体の創製とその免疫応答評価概略図

3. 研究の方法

本研究では、DNA ナノテクノロジーを基盤として DNA と PMO からなる新規ナノ構造体の創製を行なった。PMO は、pH7.4 の生体条件下で電荷を持たず血清安定性と免疫回避、DNA との高い結合能力を持つ人工核酸として知られている。本研究では、核酸4本からなるナノピラミッド構造体を形成する配列を設計した。核酸の1本の配列はピラミッド構造体の3辺を構成する相補鎖配列を設計した。免疫活性を示す核酸医薬の CpG-motif は、エンドソームに存在するトル様受容体9(TLR9)に認識されるとサイトカインを産生し免疫応答を示す。4本の核酸のうち1本の核酸に CpG モチーフを導入した CpG-ODN と CpG-PMO を設計した。DNA ナノ構造体は4本の DNA をアニーリングし、相補的な塩基配列による構造体を形成させた。PMO/DNA ナノ構造体は1本の PMO と3本の DNA の4本の核酸をアニーリングして形成した。構造体の形成評価は、動的光散乱測定とゲル電気泳動測定にて行なった。免疫応答評価は、マウスマクロファージ細胞株を用いてサイトカインの産生を評価した。

4. 研究成果

ゲル電気泳動測定より、4本の核酸のアニーリング後に新たな位置にバンドが検出され新規構造体が得られた。PMO/DNA ナノ構造体のバンドは DNA ナノ構造体のバンドより高分子側に検出された。本結果は、構造体の電荷に由来し、4本の DNA から形成された DNA ナノ構造体は、電荷を持たない PMO を1本含む PMO/DNA ナノ構造体より負電荷を帯びているからであった。動的光散乱測定によって DNA ナノ構造体や PMO/DNA ナノ構造体は1本鎖より大きな粒径を示し、その粒径は、約 2 nm であった。免疫応答評価では、CpG-ODN の1本鎖核酸を

細胞に添加した時サイトカインの産生は 0.1 ng/mL 以下のごく少量であった。CpG-ODN を有する DNA ナノ構造体は CpG-ODN の 1 本鎖と比較してサイトカインを 1.0 ng/mL 産生し約 10 倍の免疫応答を誘導したことが明らかとなった。本結果は、これまでに報告された DNA ナノ構造体の特徴の、血清耐性の向上と、細胞に取り込みの向上に由来する結果であり、DNA ナノテクノロジーを用いたナノ構造体の DDS 応用の有用性を再確認した。一方で、CpG-PMO や PMO/DNA ナノ構造体ではコントロール(培地のみ)と同じくサイトカインが産生されなかった。本結果は、CpG-PMO 単体だけでは、細胞内に取り込まれずにサイトカインを誘導ししないこと、PMO/DNA ナノ構造体の CpG-PMO と DNA の二本鎖は結合力が強く TLR9 に認識されず免疫を回避したことが推測された。本成果は、世界で初めて次世代の人工核酸の PMO を用いた新規ナノ構造体を創製を行い、その免疫応答を評価し免疫回避型 PMO/DNA ナノ構造体となることを明らかにした。今後も様々な機能性人工核酸が開発され、その核酸医薬や DDS 応用の発展が期待されることから本成果は有用な知見となった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Noriko Miyamoto, Yukio Kitade

Programmable DNA nanoparticle: Self-assembly of pH-triggered nucleic acid ion complex
256th ACS National Meeting in Boston 2018 (国際学会)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。