

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K04858

研究課題名(和文) 分子内/分子間Gカルテット構造形成による免疫活性化CpG ODNの機能制御

研究課題名(英文) Regulation of the immunostimulatory activity of CpG ODNs by G-quadruplex formation

研究代表者

山崎 智彦 (YAMAZAKI, Tomohiko)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・主幹研究員

研究者番号：50419264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞を活性化することができる核酸分子であるCpGオリゴデオキシヌクレオチドについて、核酸分子が形成する立体構造を改変することで、免疫活性化機能を改変することを達成した。申請者は細胞核内に存在するテロメアで形成する核酸の立体構造であるグアニン四重鎖構造に着目し、グアニン四重鎖構造配列にCpGオリゴデオキシヌクレオチド配列を導入することで、CpGオリゴデオキシヌクレオチドの安定性と細胞への取込を改善し、従来の分子よりも高い免疫活性化能を持たせることを達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ワクチンに添加されている免疫賦活化剤(アジュバント)として利用することができる分子の開発を進めた。アジュバントはワクチンの効果を高める機能を持つ。CpGオリゴデオキシヌクレオチドは現在までにアジュバントとして使用されている水酸化アルミニウムと比較して、安全性が高く副作用が低いと考えられているが、安定性と機能が劣っていた。本研究では、核酸の立体構造を制御することにより天然核酸由来のCpGオリゴデオキシヌクレオチドの安定性と機能を向上させることを達成しており、成果は安全かつ効果の高いワクチンアジュバントの実用化に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Toll-like receptor 9 activation by oligodeoxynucleotides (ODNs) containing unmethylated cytosine-phosphate-guanine (CpG) motifs triggers the innate immune system and establishes an adaptive immune response, and therefore these ODNs have been studied as vaccine adjuvants for infectious disease, or as therapeutic agents for allergies and cancer. In this study, we aim to enhance immunostimulatory activity of CpG ODNs by forming guanine quadruplex (G4) structure. CpG ODNs forming G4 structure, exhibited a higher DNase stability, intracellular uptake, and immunostimulatory effect than do natural linear CpG ODNs. Additionally, we demonstrated that efficacy of the G4 CpG ODNs in activating TLR9 is defined by the number of CpG motifs and the number of nucleotides between the CpG motif and G-tracts. These findings suggest some hints for the rational design of highly potent G4 CpG ODNs for vaccine adjuvant applications.

研究分野：生物学

キーワード： トール様受容体9 CpGオリゴデオキシヌクレオチド グアニン四重鎖構造 アジュバント I型インターロイキン オリゴ 免疫細胞 抗体産出

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トール様受容体9(TLR9)は自然免疫受容体の一つであり、エンドソーム内に局在し、ウイルスや病原体由来の非メチル化一本鎖DNAを認識する。DNAと結合したTLR9は構造変化を伴ってMyd88アダプタータンパク質と会合し、細胞からのサイトカイン産出を誘導し、結果として免疫細胞であるT細胞やB細胞を活性化させる。人工的に合成したシトシン-グアノシン配列を複数有するオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)がTLR9のリガンド分子として機能することが報告されており、CpG ODNは免疫賦活剤(アジュバンド)として開発が進められている。

CpG ODNには、パリンドローム配列とポリG配列を持ち複雑な高次構造を形成してナノ粒子化するクラスAと直鎖構造のクラスBの2種類が存在する。両クラスともTLR9に結合するにもかかわらず、クラスAのCpG ODNは樹状細胞から抗ウイルス応答誘導に関与するI型インターフェロン(IFN)の分泌を誘導するが、クラスBのCpG ODNは樹状細胞やB細胞からTh1細胞への分化亢進作用するインターロイキン12(IL-12)や抗体産出を促進するIL-6の分泌を誘導する。即ちCpG ODNはCpGモチーフのとり高次構造に依存して、細胞内で異なる機能を示すことが分かっている。

核酸分子は、体内にあるヌクレアーゼにより、迅速に分解されてしまう。そのため、現在までに研究されているCpG ODNは全体もしくは部分的にDNA鎖の骨格に硫酸基を導入したS化ODNであり、循環器や肝臓に対する副作用が懸念されている。

2. 研究の目的

申請者はDNAが核内で形成している高次構造の1つであるGカルテット構造に着目し、修飾されていない天然核酸骨格を持つCpG ODNの安定性と細胞内への取込を向上させ、免疫活性化能を向上させることを目指した研究を進めてきた。本研究では、Gカルテット構造を分子内形成もしくは分子間形成するCpG ODNを構築してCpG ODNの4次構造を制御することで、免疫活性化機能を改変することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Gカルテット構造のループ部分にCpG ODN配列を導入したG4-CpG ODNの調製

トポロジーが報告されているGカルテット構造配列のループ領域にCpG ODNユニットを導入したすることで、G4-CpG ODNを作成した。Gカルテット構造の3箇所のループにCpG ODNユニットを1, 2, 3ユニット導入し、220nm~320nmのCDスペクトルを測定することでトポロジー解析を行った。

(2) マウスマクロファージ細胞Raw264株を用いた免疫活性化能の評価

Raw264は96ウェルプレートに 1.0×10^5 個/ウェルで播種し、G4-CpG ODNを終濃度が2-8 μM となるように添加した。37、5% CO₂ 雰囲気下で24時間インキュベート後、mRNAを抽出し、cDNAを合成し、定量PCRにより、IL-6、IL-12およびIFN- γ の量を調べた。また、培地中に分泌されたサイトカインの量をReady-Set-Go! ELISA kitsを用いて測定した。

(3) ヌクレアーゼ耐性ならびに細胞への取込の検討

血清を加えて一定時間処理したG4-CpG ODNの分子状態をポリアクリルアミド電気泳動を用いて解析することで、血清中のヌクレアーゼによるG4-CpG ODNの分解を解析することで、ヌクレアーゼ耐性を評価した。また、蛍光標識G4-CpG ODNをRaw264株に添加したのちに、細胞を回収し、FACSを用いて細胞の蛍光強度を測定することで、細胞内に取り込まれたG4-CpG ODNの量を評価した。

4. 研究成果

(1) G4-CpG ODNの構築

トロンピンアプタマー-TBAのGカルテット平面の数を2から3に変更したTBA-G3(5'-GGGTTGGGTGTGGGTTGGG-3'の2番目のループ領域にCpG ODNモチーフを導入したG4-CpG ODNであるGD1, GD2, GD3(数字はCpG ODNのモチーフ数を示す。)は単量体のG4-CpG ODNを形成し、かつ免疫活性化能を示すことが本研究から明らかとなっ

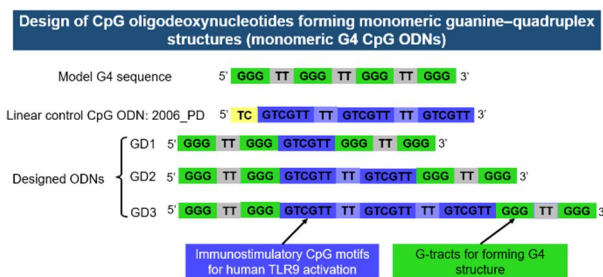


図1 Gカルテット構造にCpG ODNを導入したG4-CpG ODNの設計

た(図1)。差分UVスペクトルの結果からGD1, GD2, GD3は295nmに負のピークを示すことから、Gカルテット構造を形成することが示された。またCDスペクトルの結果から、GD1, GD2, GD3はハイブリッド型のトポロジーを有することが示された。さらに、電気泳動の結果から、GD1, GD2, GD3は同じ鎖長の直鎖ODNと比較して移動度が高かったことから、分子嵩が小さい高密度な状態であることが示された。これらの結果から、GD1, GD2, GD3は体液のカリウムならびにナトリウム濃度を再現したD-PBS溶液中でGカルテット構造を形成していることが明らかとなった(図2)。

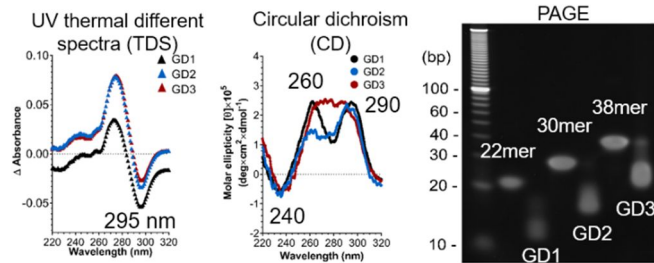


図2 G4-CpG ODNの差分UVスペクトル、CDスペクトルならびに電気泳動

(2) Raw264細胞を用いたGD1, GD2, GD3の免疫活性化能の評価

Raw264細胞はトール様受容体9(TLR9)を発現する細胞で有り、CpG ODNの添加により炎症性サイトカインのTNF- α 、IL-6、IL-12を誘導することが報告されている。本研究で開発したGD1, GD2, GD3の免疫活性化能を評価したところ、ループに導入したCpG ODNユニットの数に応じて、IL-6、IL-12ならびにI型インターフェロンであるIFN- β の発現量が増加することが示された(図3)。またCG配列のシトシンをメチル化したCpG ODNを導入したGD2-Met, GD3-Metはサイトカイン類を誘導しないことが示された。また、TLR9を発現していない293細胞に対しては、GD1, GD2, GD3は炎症性サイトカインの発現を誘導しないが、TLR9を発現するプラスミドを導入した293細胞では炎症性サイトカインの発現を誘導することが示された。これらの結果から、GD1, GD2, GD3による免疫活性化はTLR9がレセプターとなり引き起こされることが示された。

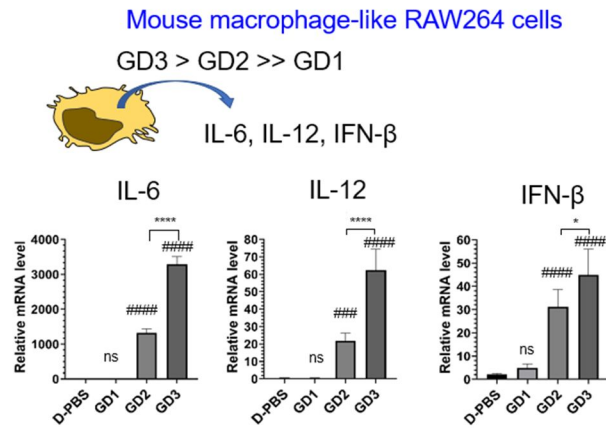


図3 G4-CpG ODNによるマクロファージ細胞の免疫活性化の評価

(3) Gカルテット構造によるヌクレアーゼ耐性と細胞への取込の増強

未修飾核酸のCpG ODNはヌクレアーゼ耐性と細胞への取込が修飾核酸より低く、そのために*in vitro*ならびに*in vivo*での免疫活性化能が低い。Gカルテット構造形成によるヌクレアーゼ耐性と細胞への取込への影響を調べた。その結果、未修飾の直鎖のCpG ODNが1時間以内にほとんど分解されてしまうのに対して、Gカルテット構造を形成することで分解が抑制されることが示された(図4)。この理由は、Gカルテット構造形成により、高密度な核酸構造を形成し、ヌクレアーゼの活性部位への親和性が低下したためであると考えられる。また、細胞への取込についても、Gカルテット構造形成により取込量が増加することが示された。即ち、

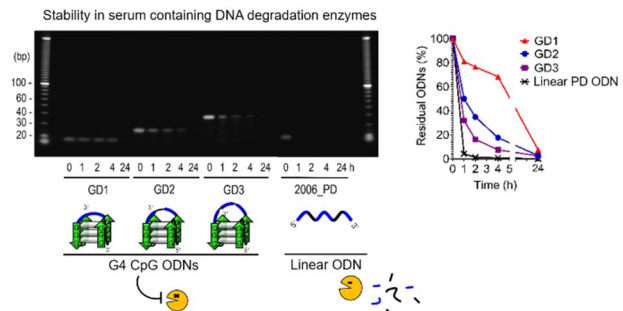


図4 G4-CpG ODNのヌクレアーゼ耐性の評価

(4) カチオン性リポソームとの複合化によるサイトカイン誘導のスイッチング

カチオン性リポソームに直鎖の CpG ODN を混合すると、リポソーム表面に CpG ODN が集積し、炎症性サイトカインの IL-6 や IL-12 に加えて、I 型 IFN の IFN- γ を誘導することが報告されている。このメカニズムについてはいくつかのメカニズムが報告されているが、確定していない。本研究で開発した GD2, GD3 をカチオン性リポソームに混合し、ヒト末梢血単核球細胞に対する免疫活性化能を調べた。その結果、GD3-DOTAP は IL-6 と IFN- γ の両方を誘導するが、GD2-DOTAP は予

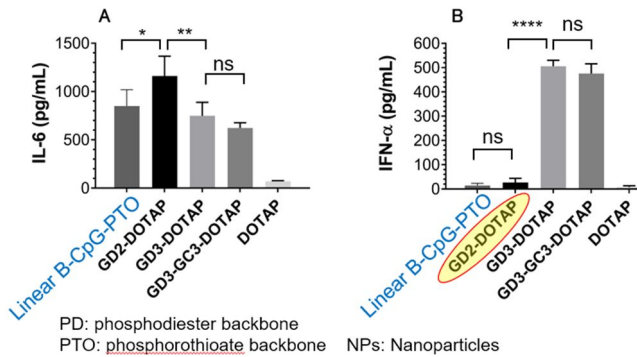


図 5 DOTAP 表面に吸着させた G4-CpG ODN によるヒト末梢血単核球細胞からの IL-6, IFN- γ の分泌誘導

想と異なり IL-6 しか誘導しなかった (図 5)。GD2 と GD3 の違いは 2 番目のループ領域に導入した CpG ODN ユニットの数である。そこで、GD3 の 3 つの CpG ODN の 1 つを GC 配列に置換した GD3_GC3 を作成して、サイトカイン発現を調べたところ GD3_GC3-DOTAP は GD3-DOTAP と同様に IL-6 と IFN- γ の両方を誘導した。即ち、G カルテット構造に導入したループ領域の長さにより、誘導されるサイトカインが変化するということが示された。カチオン性リポソームに結合した CpG ODN が IFN- γ を誘導せずに IL-6/IL-12 のみを誘導するという報告は今までに無く、CpG ODN と TLR9 の相互作用に関して新たな知見が得られた。

本研究により、CpG ODN を G カルテット構造に導入することで、単量体でありながら高密度な核酸構造を形成させ、ヌクレアーゼ耐性と細胞への取込を向上させ、免疫活性化能を向上させることに成功した。また、カチオン性リポソームとの複合化により、直鎖の CpG ODN では予想できなかった IFN- γ を誘導せずに IL-6/IL-12 のみを誘導する複合体を作成することができた。CpG ODN はヒトでは樹状細胞、B 細胞に発現している TLR9 により認識し、それぞれ I 型インターフェロン、炎症性サイトカインを誘導する。本研究により、構造を制御することにより、誘導する因子を制御することができるという新しい知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tu Anh Thi Tram, Hoshi Kazuaki, Ikebukuro Kazunori, Hanagata Nobutaka, Yamazaki Tomohiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Monomeric G-Quadruplex-Based CpG Oligodeoxynucleotides as Potent Toll-Like Receptor 9 Agonists	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 3644 ~ 3657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.0c00679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hoshi Kazuaki, Yamazaki Tomohiko, Sugiyama Yuuki, Tsukakoshi Kaori, Tsugawa Wakako, Sode Koji, Ikebukuro Kazunori	4. 巻 29
2. 論文標題 G-Quadruplex Structure Improves the Immunostimulatory Effects of CpG Oligonucleotides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acid Therapeutics	6. 最初と最後の頁 224 ~ 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/nat.2018.0761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Iswanti Febriana Catur, Nurulita Indah, Djauzi Samsuridjal, Sadikin Mohamad, Witarto Arief Budi, Yamazaki Tomohiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Preparation, characterization, and evaluation of chitosan-based nanoparticles as CpG ODN carriers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology & Biotechnological Equipment	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13102818.2019.1578690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Safitri Fika Ayu, Tu Anh Thi Tram, Hoshi Kazuaki, Shobo Miwako, Zhao Dandan, Witarto Arief Budi, Sumarsono Sony Heru, Giri-Rachman Ernawati Arifin, Tsukakoshi Kaori, Ikebukuro Kazunori, Yamazaki Tomohiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Enhancement of the Immunostimulatory Effect of Phosphodiester CpG Oligodeoxynucleotides by an Antiparallel Guanine-Quadruplex Structural Scaffold	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1617 ~ 1617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11111617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tu Anh Thi Tram、Hoshi Kazuaki、Shobo Miwako、Yamazaki Tomohiko	4. 巻 40
2. 論文標題 G-quadruplex-based CpG oligodeoxynucleotide/DOTAP complex strongly stimulates immunity in CpG motif-specific and loop-length-dependent manners	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 102508 ~ 102508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nano.2021.102508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamazaki Tomohiko、TU Anh Ti Tram	4. 巻 36
2. 論文標題 Structural analysis of guanine quadruplex-forming oligonucleotides and their application to oligonucleotide therapeutics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 360 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2745/dds.36.360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Anh Thi Tram TU, Kazuaki Hoshi, Kazunori Ikebukuro, Nobutaka Hanagata, Tomohiko Yamazaki
2. 発表標題 Enhanced Immunostimulatory Activity of CpG Oligodeoxynucleotides by Forming Monomeric Guanine-Quadruplex Structure
3. 学会等名 16th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ツチトラム アン, 星 和明, 池袋 一典, 山崎 智彦
2. 発表標題 Forming Monomeric Guanine-Quadruplex Structure for enhancing CpG oligodeoxynucleotides-mediated immunostimulatory properties.
3. 学会等名 第15回ナノ・バイオメディカル学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Anh Thi Tram TU, Kazuaki Hoshi, Kazunori Ikebukuro, Tomohiko Yamazaki
2. 発表標題 Tuning of the immunostimulatory effect of G-quadruplex based CpG Oligodeoxynucleotides
3. 学会等名 MANA International Symposium 2020 jointly with ICYS
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuaki Hoshi, Anh Thi Tram TU, Kaori Tsukakoshi, Wakako Tsugawa, Koji Sode, Kazunori Ikebukuro, Tomohiko Yamazaki
2. 発表標題 Improvement of the immunostimulatory effects of CpG ODNs by forming G-quadruplex structure
3. 学会等名 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Anh Thi Tram TU, Kazuaki Hoshi, Kazunori Ikebukuro, Tomohiko Yamazaki
2. 発表標題 Immunostimulatory properties of CpG ODNs forming G-quadruplex structure
3. 学会等名 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 智彦、星 和明、ツチトラム アン、塚越かおり、津川若子、早出広司、池袋一典
2. 発表標題 Gカルテット構造によるCpG ODNの免疫活性化能の向上
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiko YAMAZAKI
2. 発表標題 Development of novel immunostimulators, as potent vaccine adjuvants
3. 学会等名 CSIRO-NIMS SYMPOSIUM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 智彦, TU Thi Tram Anh, 星 和明, Safitri Fika Ayu, 塚越かおり, 池袋一典
2. 発表標題 グアニン四重鎖構造を用いたDNAアジュバントの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚越かおり, 鈴木仁子, 大山泰史, 佐藤星, TU Thi Tram Anh, 堀口靖夫, 永森浩司, 山崎 智彦, 池袋一典
2. 発表標題 Development of functional oligonucleotides forming G-quadruplex structure by using topological structure evaluation based on CD spectrum analysis combined with principal component analysis
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 免疫刺激オリゴヌクレオチド	発明者 山崎智彦	権利者 物質・材料研究 機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-143071	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

物質・材料研究機構 研究者紹介
https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko
 北海道大学フロンティア生命材料科学研究室 研究室ホームページ
<https://life.sci.hokudai.ac.jp/tl/lab/frontier-biomaterials-science>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池袋 一典	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・卓越教授	
	(IKEBUKURO Kazunori) (70251494)	 (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スウェーデン	Lund大学			
米国	The University of North Carolina	North Carolina State University		
インドネシア	Universitas Indonesia	Institut Teknologi Bandung		
ベトナム	Vietnam National University			