

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790074

研究課題名 (和文) CpG-ODN のためのキャリアーデザイン法の確立

研究課題名 (英文) The design of liposomal carriers for CpG-ODN

研究代表者

四元 聡志 (YOTHUMOTO SATOSHI)

秋田大学・大学院医学系研究科・COE 研究員

研究者番号：30318191

研究成果の概要：CpG-ODN をより効果的なアジュバントとして用いるには、IL-10 および IL-12 産生のバランスの制御が重要であることが報告されている。そこで、CpG-ODN による IL-10 および IL-12 産生のバランスを制御するには、どのようなリポソームが効果的であるか検討したところ、IL-10 と IL-12 産生のバランスは、CpG-ODN と DOTAP リポソームの電荷比を変化させることによって制御可能であることを明らかにした。さらに、この制御機構に、細胞質内の DNA-PKcs による CpG-ODN の認識の回避および CpG-ODN のエンドソームへの移行性の促進が関与することを明らかにした。これら結果より CpG-ODN のキャリアーをデザインする上で CpG-ODN の細胞内動態の制御が最も重要な要因であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リポソーム、CpG-ODN、IL-12、IL-10、DNA-PKcs、キャリアー、マクロファージ、ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

CpG-motif を含む約 20 塩基の合成オリゴヌクレオチド (CpG-ODN: 塩基配列の例 5'-TCCATGACGTTTCCTGATGCT-3') は、マクロファージや樹状細胞 (Mφ/DC) などに直接作用し、抗原に対する液性および細胞性免疫を強力に賦活化できることから、腫瘍、感染症およびアレルギーに対するワクチンアジュバント (ワクチン効果を増強させる物質) として、すでに臨床試験が行われていた。また、CpG-ODN は単独で用いるよりもリポ

ソームなどのキャリアーと複合体にして投与することにより、ワクチン効果が著しく上昇することが実験動物レベルで多数報告されていた。この上昇は、Mφ/DC などへの CpG-ODN の取り込み量が増加することに起因していると考えられていたが、詳細な作用機構はまったく明らかではなく、このため、どのようなキャリアーが CpG-ODN に最適であるかコンセンサスはまったく得られていなかった。

Mφ/DC から産生される炎症性サイトカイ

ンである Interleukin-12 (IL-12) が、CpG-ODN のワクチンアジュバント効果に重要であることが報告されていた。一方で、抗炎症性サイトカインである IL-10 も CpG-ODN により誘導され、オートクライン的に IL-12 産生を阻害し、CpG-ODN によるワクチン効果を著しく抑制している。この抑制を回避するために抗 IL-10 受容体抗体を併用投与すると、CpG-ODN によるワクチン効果が著しく増強することが報告されていた。このように、IL-12 と IL-10 産生のバランスが CpG-ODN のアジュバント効果を決定づけると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究者は、CpG-ODN と正電荷リポソームを複合体 (CpG-ODN/リポソーム複合体) にしてマウス M $\phi$  に作用させると CpG-ODN 単独と比較して、IL-10 産生は減少し、IL-12 は増強するという面白い結果をすでに得ていた。一方で、これまで報告されているように M $\phi$  への CpG-ODN の取り込み量は、CpG-ODN をリポソーム化することにより 1.5 倍上昇することを確認した。このように、CpG-ODN をリポソーム化することによって取り込み量が増強しているにもかかわらず、産生量が減少または増強するサイトカインがあることを明らかにしていた。この結果、本研究者は、CpG-ODN の M $\phi$ /DC への取り込み量の増加だけではリポソームの効果を説明することはできないと考えた。

CpG-ODN は、M $\phi$ /DC にエンドサイトーシス経路により取り込まれ、エンドソーム内で酸性化されることにより、その受容体である Toll like receptor 9 (TLR9) に結合し、IL-12 産生を誘導する。しかしながら、当時、細胞質に局在する 2 本鎖 DNA を修復する酵素である DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) が、TLR9 非依存的に CpG-ODN による M $\phi$  の Akt (プロテインキナーゼ B) 活性化に関与しているとの報告がなされた。また、本研究者は、CpG-ODN による M $\phi$  からの IL-10 産生が、Akt/extracellular mitogen activated protein kinase (ERK) 経路によって正に制御されていることをすでに報告していた。これらの結果から、リポソームを用いて CpG-ODN のエンドソームと細胞質への移行のバランスを制御することによって、細胞内情報伝達系を改変し、IL-10 と IL-12 産生のバランスを調節できると予測した。

## 3. 研究の方法

リポソームを構成するリン脂質は、CpG-ODN のキャリアーとして報告のもっとも多い 1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propane (DOTAP) を基本として行った。

平成 19 年度 : CpG-ODN/リポソーム複合体によるアジュバント効果増強機構の解明

DOTAP-リポソームは、内封した薬物をエンドソームに移行させやすく、一方、DOTAP に 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol-3-Phosphoethanolamine (DOPE) を含有させたリポソームは、細胞質へ移行させやすいことが報告されている。そこで、CpG-DOTAP-リポソームまたは CpG-DOTAP/DOPE-リポソームを用いて腹腔内 M $\phi$  からの IL-10 および IL-12 産生、または、ERK の活性化を ELISA 法または、Western blot 法を用いてそれぞれ検討した。

エンドソームへの CpG-ODN の移行が IL-12 産生の上昇につながっているか明らかにするため、エンドソームマーカーであるトランスフェリンまたは Lysotracker Green で染色し、ローダミン標識 CpG-ODN の細胞内局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

DNA-PKcs が M $\phi$  からの IL-10 および IL-12 産生に関与しているか明らかにするため、SCID マウス (DNA-PK 変異マウス) を用いて、CpG-ODN による腹腔内 M $\phi$  からの IL-10 および IL-12 産生について ELISA 法を用いて検討を行った。

平成 20 年度 : CpG-ODN のための最適なりポソームキャリアーの選択

リポソームの物理化学的性質として重要な電荷比の異なる CpG-DOTAP-リポソームを調整し、マウス由来の腹腔内 M $\phi$  または脾臓由来 DC に作用させ、ELISA 法を用いて IL-10 および IL-12 産生を定量した。

電荷比の異なるローダミン標識 CpG-DOTAP-リポソームの腹腔内 M $\phi$  または脾臓由来 DC への取り込みをフローサイトメトリーで、エンドソームマーカーであるトランスフェリンまたは Lysotracker Green で染色し、ローダミン標識 CpG-ODN の細胞内局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

## 4. 研究成果

平成 19 年度の研究では、CpG-ODN のための最適なりポソームキャリアーの選択および CpG-ODN/リポソーム複合体によるアジュバント効果増強機構の解明を主に *in vitro* 系で検討を行った。

① 腹腔内 M $\phi$  に CpG-DOTAP-リポソーム (CpG-ODN のエンドソーム移行性が高い) または CpG-DOTAP/DOPE-リポソーム (CpG-ODN の細胞質移行性が高い) を添加し、IL-10、IL-12 産生および ERK の活性化を検討したところ、CpG-ODN 単独処理と比

較し, CpG-DOTAP-リポソームでは IL-10 産生の減少, IL-12 産生の上昇および ERK 活性化の減弱が, 一方, CpG-DOTAP/DOPE-リポソームでは, IL-10 産生の上昇, IL-12 産生の減少および ERK 活性化の増強が観察された (図 1A,B).

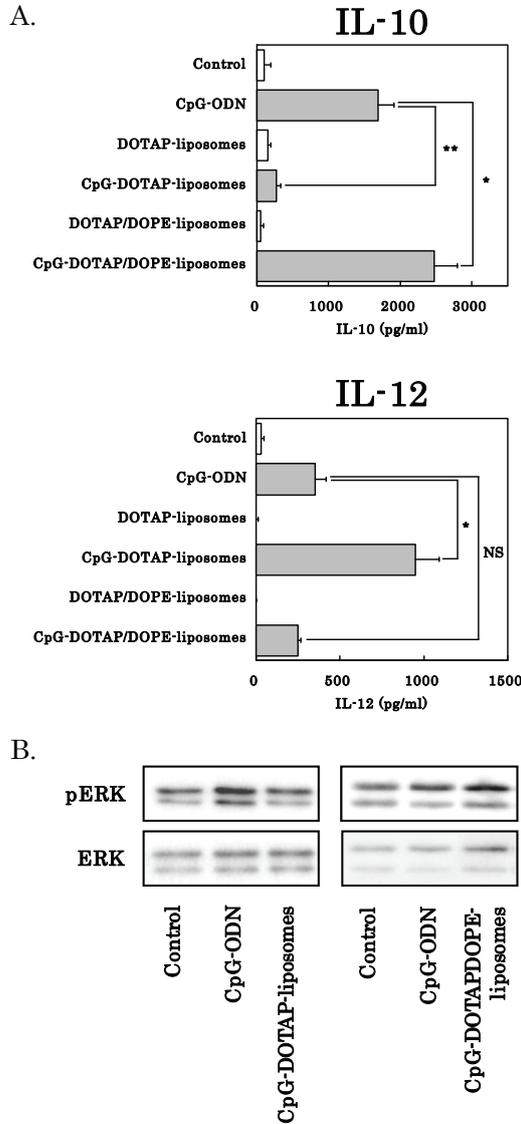


図 1. IL-10, IL-12 産生および ERK の活性化におよぼす CpG リポソームの影響

さらに M $\phi$  における CpG-DON の取り込み量について検討したところ, どちらのリポソームも CpG-DON 単独と比較して CpG-ODN の取り込み量を増加させた。

②DNA-PKcs 変異マウス由来腹腔内 M $\phi$  を用いて CpG-ODN による IL-10, IL-12 産生および ERK の活性化を検討したところ, 野生型 M $\phi$  と比較して, IL-10 産生の減少, IL-12 産生の増強および ERK 活性化の減弱が観察された (図 2A,B)。

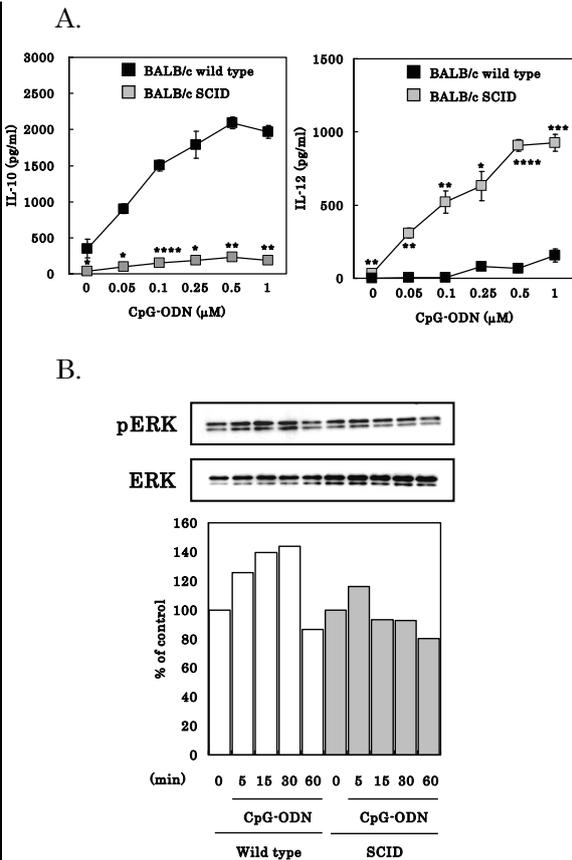


図 2. DNA-PKcs は CpG-ODN による IL-10 産生および ERK の活性化に必須である

この結果は, ①の CpG-DOTAP-リポソームで野生型 M $\phi$  を処理した場合と同様の結果であった。

以上, ①, ②の結果より, CpG-ODN による M $\phi$  からの IL-12 産生を効果的に誘導するためには, CpG-ODN の DNA-PKcs による認識を回避し, エンドソームへの移行性を高くするキャリアーが効果的であることが明らかになった。さらに, 従来, 重要であると考えられてきた CpG-ODN の取り込み量は, IL-12 産生とは直接関連しないことも明らかにした。この知見より, IL-12 産生を効果的に誘導する DOTAP-リポソームが CpG-ODN の最適なキャリアーの一つであることを明らかにした。

平成 20 年度は, さらに DOTAP リポソームをより効果的な CpG-ODN のキャリアーするため, CpG-ODN の負電荷と DOTAP リポソームの正電荷の混合比 (電荷比) に注目し検討を行い, 以下の成果を得た。

①CpG-ODN と DOTAP リポソームの電荷比 (-/+) を低くする (0.06 以下) ことによって M $\phi$ /DC からの IL-10 の生産が抑制され, IL-12 の生産が増加することを明らかにした (図 3)。

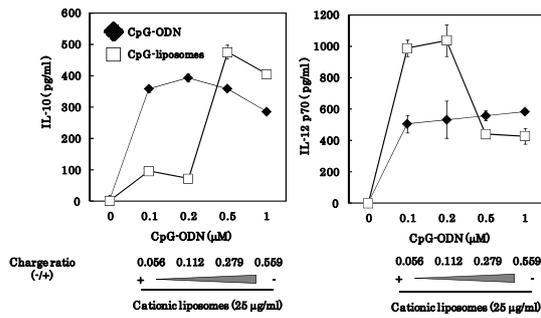
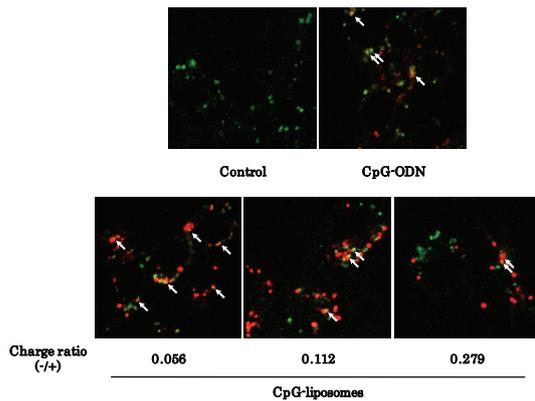


図3. IL-10 および IL-12 産生におよぼす CpG リポソームの電荷比の影響

さらに、蛍光標識 CpG-ODN を用いて細胞内動態を検討したところ、CpG-ODN とエンドソームマーカーであるトランスフェリンおよび LysoTracker との共局在は、CpG-ODN と DOTAP リポソームの電荷比 (-/+ ) の上昇に依存して減少した (白矢印)。このことから、電荷比を変化させることによって CpG-ODN の細胞質あるいはエンドソームへ移行を制御できることが明らかになった (図4)。

A.



B.

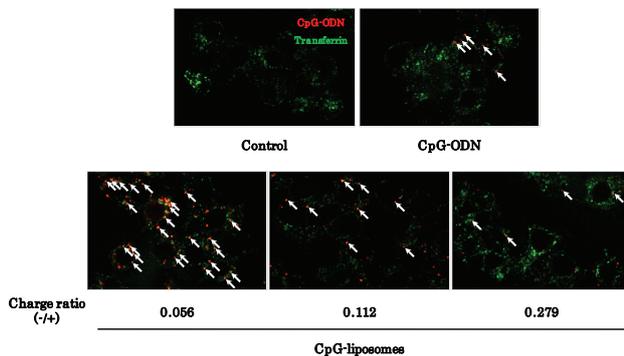


図4. CpG-ODN の細胞内動態におよぼすリポソームの電荷比の影響

②CpG-ODN をマウスに投与し、in vivo における IL-10 および IL-12 の産生を検討したところ、in vitro での検討と同様に電荷比

(-/+ ) を低くすることによって血清中の IL-10 の産生が抑制され、IL-12 の産生が増加することを明らかにした (図5)。

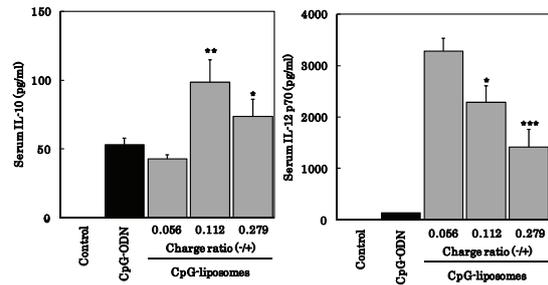


図5. CpG-ODN による血清 IL-10 および IL-12 産生におよぼすリポソームの電荷比の影響

以上の結果①および②から、CpG-ODN による IL-10 および IL-12 の産生バランスは、CpG-ODN と DOTAP リポソームの電荷比を変化させることによって制御可能であることを明らかにした。さらに、この作用機構には、DOTAP リポソームによる CpG-ODN の細胞内動態の改変が関与している可能性を明らかにした。

総括：IL-12 と IL-10 産生のバランスは、CpG-ODN と DOTAP リポソームの電荷比を変化させることによって制御可能であることを明らかにした。さらに、この制御機構に、細胞質内の DNA-PKcs による CpG-ODN の認識の回避および CpG-ODN のエンドソームへの移行性の促進が関与することを明らかにした。これらの結果より CpG-ODN のキャリアーをデザインする上で CpG-ODN の細胞内動態を制御することが最も重要な要因であることを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計1件)

- ① Yotsumoto, S., Saegusa, K. and Aramaki, Y. (2008) Endosomal translocation of CpG-oligodeoxynucleotides inhibits DNA-PKcs-dependent IL-10 production in macrophages. *J. Immunol.*, 180, 809-816. 査読有

〔学会発表〕 (計2件)

- ① Yotsumoto, S., Endosomal translocation of CpG-oligodeoxynucleotides inhibits DNA-PKcs-dependent IL-10 production. 第38日本免疫学会学術集会, 2008年12月1-3日, 京都

② 四元聡志、CpG-ODN による IL-10 および IL-12 生産における DNA-PK の関与、生体調節シグナルの統合的研究グローバル COE プログラム第 2 回若手研究者シンポジウム、2008 年 7 月 18-19 日、前橋

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.med.akita-u.ac.jp/~kisei/Default.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
四元 聡志 (YOTHUMOTO SATOSHI)  
秋田大学・大学院医学系研究科  
・COE 研究員  
研究者番号：30318191

(2)研究分担者

(3)連携研究者