

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19057

研究課題名（和文）iモチーフ構造を用いたI型インターフェロン誘導核酸の構築

研究課題名（英文）Construction of type I interferon-inducing oligodeoxynucleotide using i-motif DNA structures

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・高分子・バイオ材料研究センター・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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：シトシン同士が pH5.0以下の酸性条件において3位窒素プロトン化を介して塩基対をつくることで形成される構造であるiモチーフに人工的に合成したCG配列を有する非メチル化一本鎖核酸(CpG ODN)を導入することで、免疫細胞にI型インターフェロンを誘導させることを目指した。その結果、iモチーフのループ領域にCpG配列を導入した核酸(i-CpG ODN)は単独ではIL-6は誘導したものの、IFN- $\alpha$ は誘導しないこと、またカチオン性リポソームに静電的相互作用で結合させることでIFN- $\alpha$ は誘導される結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ウイルス増殖を抑制するI型インターフェロンの産出を誘導する核酸分子を構築した。I型インターフェロンは抗ウイルス活性の役割を担っていることから、ウイルス感染の予防や感染後の感染細胞を除去することができる。本研究の成果は、感染症の予防や治療に応用が見込まれ、人々のQOL(クオリティ オブ ライフ)を高めることに貢献する。

研究成果の概要（英文）：We aimed to induce type I interferon in immune cells by inserting an unmethylated single-stranded nucleic acid with a CG sequence (CpG ODN). The results showed that nucleic acid with a CpG sequence in the loop region of the i-motif (i-CpG ODN) alone induced interferon-6 but not interferon-alpha, whereas binding to cationic liposomes by electrostatic interaction induced interferon-alpha.

研究分野：核酸工学

キーワード：iモチーフ I型インターフェロン トール様受容体9 円二色性偏光 アジュバント グアニン四重鎖構造 CpG ODN

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 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

I 型インターフェロン(IFN)は自然免疫受容体であるトール様受容体(TLR)がウイルスやバクテリア由来の核酸を認識したときに誘導される。特に、病原体由来の DNA を認識する TLR9 については、2000 年以降多くの研究成果が報告され、人工的に合成した CG 配列を有する非メチル化一本鎖核酸(CpG ODN)がリガンド分子として機能することがわかっている。

しかしながら、TLR9 に CpG ODN が認識されると、I 型 IFN に加えて、インターロイキン 6(IL-6)などの炎症性サイトカインも誘導する。I 型 IFN のみを高く誘導する CpG ODN は存在しなかった。

申請者はこれまでに TLR9 を標的とした免疫活性化分子の開発を行ってきた。TLR9 のリガンドとなる一本鎖 DNA は不安定で有り細胞への取り込みが低い。この問題を解決するため、DNA 鎖のリン酸部位に硫酸原子を導入した S 化 ODN が国内外で多く研究されてきた。しかしながら S 化 ODN は非特異的にタンパク質に吸着し、循環器や肝臓に対する副作用があることから実用化が困難であった。そこで申請者は独自に、安定かつ細胞への取り込みが優れたグアニン四重鎖(G4)構造を持つ G4 CpG ODN を開発した。開発段階で、G4 構造のループ領域に導入する CpG 配列の位置によって誘導されるサイトカイン量が変化することが示され、この要因が G4 CpG ODN と TLR9 との結合力の差であることを明らかとした。

### 2. 研究の目的

本研究では、pH により構造を変化させる核酸である i モチーフ構造に着目し、i モチーフ構造に CpG ODN を導入することにより、I 型 IFN のみを高く誘導する核酸の設計を目指した。i モチーフ構造に CpG ODN を導入することにより TLR9 と CpG ODN との結合を阻害し、IL-6 を誘導しない分子設計を目指した。

### 3. 研究の方法

既知の i モチーフ構造ならびに独自に設計した i モチーフのループ領域に CpG 配列を導入した核酸(i-CpG ODN)を構築した。i モチーフの形成の確認は円二色性偏光(CD)を用いて実施した。作成した i-CpG ODN のサイトカイン誘導の検討は、ヒト末梢血単核球細胞を用いて、誘導されるインターフェロン ならびにインターロイキン 6 の量を ELISA 方法により定量した。

### 4. 研究成果

既知の i モチーフ構造ならびに独自に設計した i モチーフのループ領域に CpG 配列を導入した核酸(i-CpG ODN)を 20 種類構築し、円二色性偏光(CD)を用いて i モチーフ構造の形成を確認した。その際、血清中ならびに細胞に取り込まれた後の初期エンドソーム、後期エンドソーム、またライソソームを模倣した緩衝液中における CD スペクトルを測定した。その結果、pH4.5 がかかりウムイオン濃度が高い後期エンドソームにおいて、設計した核酸が i モチーフを形成することが示された。

また、それぞれの核酸のサイトカイン誘導を調べるために、CpG ODN のレセプター分子であるトール様受容体 9 を発現している樹状細胞ならびに B 細胞を含むヒト末梢血単核球細胞に i-CpG ODN を添加し、サイトカインの誘導を評価した。その結果、i-CpG ODN は単独ではインターフェロン は誘導しなかった。一方、i-CpG ODN をカチオン性リポソームに静電的相互作用で結合させヒト末梢血単核球細胞に添加した。その結果、ランダム構造ならびにグアニン四重鎖構造形成する CpG ODN においては、カチオン性リポソームと混合することにより、炎症性サイトカインの分泌量を増加させるのに対して、i-CpG ODN は炎症性サイトカイン量は低いまま、インターフェロン を誘導する結果が得られた。

この結果から、i-CpG ODN は中性環境である初期エンドソームでは TLR9 と結合して I 型 IFN

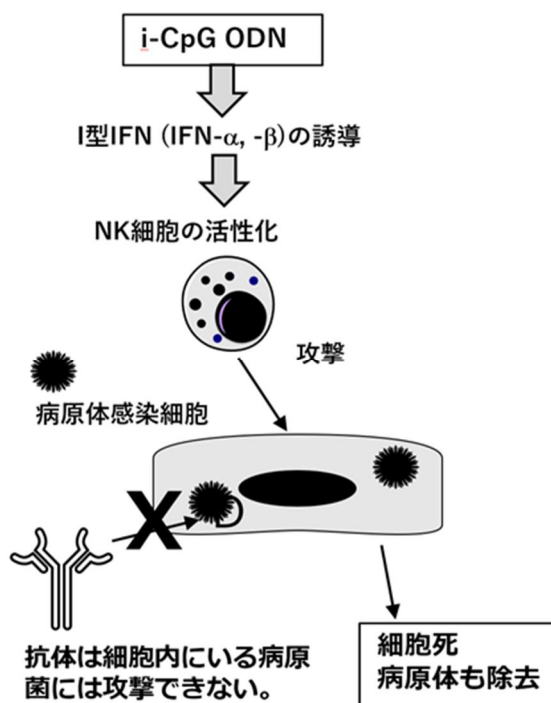


図 i モチーフ CpG ODN によるウイルス感染症の治療

を誘導し、酸性環境である後期エンドソーム/ライソソームでは i モチーフ構造を形成することで TLR9 と結合しない、即ち炎症性サイトカインを誘導しない核酸分子であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 5件）

1. 著者名 Tu Anh Thi Tram, Hoshi Kazuaki, Yamazaki Tomohiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Influence of loop permutation on immunostimulatory activities of CpG oligodeoxynucleotides forming monomeric guanine-quadruplex structures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Research and Therapy	6. 最初と最後の頁 5410 ~ 5417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15419/bmrat.v9i11.780	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, Ma Yue, Oyama Taiji, Suzuki Satoko, Tsukakoshi Kaori, Nagasawa Kazuo, Ikebukuro Kazunori, Yamazaki Tomohiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Effects of G-Quadruplex Ligands on the Topology, Stability, and Immunostimulatory Properties of G-Quadruplex-Based CpG Oligodeoxynucleotides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1703 ~ 1713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.1c00904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhao Dandan, Tu Anh Thi Tram, Shobo Miwako, Le Nguyen Bui Thao, Yoshikawa Chiaki, Sugai Kazuhisa, Hakamata Yoji, Yamazaki Tomohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Non-Modified CpG Oligodeoxynucleotide Forming Guanine-Quadruplex Structure Complexes with Poly-L-Lysine Induce Antibody Production as Vaccine Adjuvants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1868 ~ 1868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12121868	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 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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Le Nguyen Bui Thao、Tu Anh Thi Tram、Zhao Dandan、Yoshikawa Chiaki、Kawakami Kohsaku、Kaizuka Yoshihisa、Yamazaki Tomohiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Influence of the Charge Ratio of Guanine-Quadruplex Structure-Based CpG Oligodeoxynucleotides and Cationic DOTAP Liposomes on Cytokine Induction Profiles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1639 ~ 1639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13111639	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 無
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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山崎 智彦、Fika Ayu Safitri、TU Thi Tram Anh、LE Bui Thao Nguyen、PATHAK Soumitra、塚越かおり、池袋一典
2. 発表標題 逆平行グアニン四重鎖構造をスキャフォールドとして用いた未修飾CpGオリゴデオキシヌクレオチドの免疫活性化効果
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 LE, Bui Thao Nguyen, YAMAZAKI, Tomohiko
2. 発表標題 Influence of CpG oligodeoxynucleotides/cationic liposome ratio on cytokine induction in immune cells.
3. 学会等名 8TH INTERNATIONAL LIFE-SCIENCE SYMPOSIUM (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soumitra Pathak, Tomohiko Yamazaki
2. 発表標題 Parallel guanine-quadruplex structure improves the immunostimulatory effects of phosphodiester-based CpG oligodeoxynucleotides
3. 学会等名 8TH INTERNATIONAL LIFE-SCIENCE SYMPOSIUM (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎智彦, TU Thi Tram Anh, LE Bui Thao Nguyen, PATHAK Soumitra, 塚越かおり, 池袋一典
2. 発表標題 CpGオリゴデオキシヌクレオチドをループに導入したグアニン四重鎖構造形成核酸の構築とその免疫活性化効果
3. 学会等名 第17回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 LE, Bui Thao Nguyen, YAMAZAKI, Tomohiko
2. 発表標題 Regulation of bifurcated cytokine induction by CpG oligodeoxynucleotides/cationic liposome ratio in immune cells
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Soumitra Pathak, Tomohiko Yamazaki
2. 発表標題 Parallel guanine-quadruplex structure improves the immunostimulatory effects of phosphodiester-based CpG oligodeoxynucleotides
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山崎 智彦, ツチトラム アン, 星 和明, サフィットリ フィーカ アユ, 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 Le Nguyen, 山崎 智彦
2. 発表標題 Gold nanoparticle-delivered guanine-quadruplex-based CpG oligodeoxynucleotides promote IFN- secretion by size-dependent
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2024
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究者総覧SAMURAI  <a href="https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko">https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko</a>          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  <a href="https://life.sci.hokudai.ac.jp/tl/lab/frontier-biomaterials-science">https://life.sci.hokudai.ac.jp/tl/lab/frontier-biomaterials-science</a>          研究者総覧SAMURAI  <a href="https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko">https://samurai.nims.go.jp/profiles/yamazaki_tomohiko</a>          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  <a href="https://life.sci.hokudai.ac.jp/tl/lab/frontier-biomaterials-science">https://life.sci.hokudai.ac.jp/tl/lab/frontier-biomaterials-science</a></p>
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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 university			
ベトナム	Vietnam National University			