

機関番号：82108

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22560777

研究課題名（和文）花粉症予防のための核酸医薬デリバリーシステム

研究課題名（英文） Delivery system of nucleic acid drug for protection of pollen allergy

研究代表者

花方 信孝（HANAGATA NOBUTAKA）

独立行政法人物質・材料研究機構・ナノテクノロジー融合ステーション・ステーション長

研究者番号：10302796

研究成果の概要（和文）：花粉症をはじめとするアレルギー疾患の治療薬として期待される CpG オリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)のデリバリーシステムを構築した。平均直径 3.4 nm のシリコンナノ粒子(Si NPs)を合成し、表面をアリルアミンで修飾した後に CpG ODN を静電的に結合させた場合と、Si NPs の表面をマレイミドで修飾し、CpG ODN の一端のみを結合させた場合では、異なる免疫活性化サイトカインが誘導された。これら結合方法の異なる CpG ODN を Si NPs でデリバリーすることによって、より高い免疫活性を誘導できることを見出した。

研究成果の概要（英文）： We constructed delivery system of CpG oligodeoxynucleotide (CpG ODN) that is one of the useful drugs for treatment of allergic diseases such as pollen allergy. For the delivery, silicon nanoparticles (Si NPs) with 3.4 nm in average diameter were synthesized. Different immune-mediator cytokines were induced by CpG ODN bound to Si NPs with different binding modes. Simultaneous application of CpG ODN bound to Si NPs with both binding modes induced higher immune response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス・化学工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物機能工学

1. 研究開始当初の背景

花粉症は季節性アレルギー鼻炎とも呼ばれスギやヒノキなどの植物の花粉が原因となって、くしゃみ・鼻水などのアレルギー症状を起こす病気である。現在、日本人の約20%が花粉症であり、今や国民病とも言われている。花粉が鼻孔に入り込むと、これを異物とみなした免疫細胞は IgE 抗体を産生し、鼻孔の表面にある肥満細胞上に IgE を並べる。このような状態で鼻孔に花粉が侵入すると、花粉は IgE と結合し、その刺激が肥満細胞内部に伝達し、肥満細胞はヒスタミンを放出する。ヒスタミンは血管を拡張し、血管の透過性を亢進するため体液が鼻水となって排出される。花粉症を発症しない人は、IgE よりも IgG が優勢となっている。したがって、IgG の産生量を増加させて IgE よりも優勢にすれば花粉症を予防することができる。近年、IgG 産生のための一連の反応の引き金が樹状細胞および B 細胞のエンドソーム/ライソソームに存在する Toll-like receptor 9 (TLR9) にシトシン-グアニン (CpG) を含むオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)が結合することによって誘導されることが明らかとなり、この相互作用を利用した花粉症予防あるいは花粉症治療が期待されている。しかしながら、ホスホジエステル結合を骨格にもつ天然型の CpG ODN を体内に投与しても細胞内へは取り込まれず、また体内のヌクレアーゼで分解されてしまうため、その効果は期待できない。天然型 CpG ODN を花粉症予防あるいは花粉症治療のための核酸医薬として利用するためにはナノ粒子によるデリバリーシステムの構築が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、天然型 CpG ODN を樹状細胞および B 細胞の TLR9 に送達し、B 細胞の成熟および IgG 抗体の産生を亢進するためのサイトカイン類を誘導するナノ粒子によるデリバリーシステムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)完全天然型 CpG ODN の開発

完全天然型 CpG ODN の開発は、NFκB レポーター遺伝子とともに形質転換した HEK293xl-TLR9 に合成した CpG ODN を作用させ、TLR9 を介した NFκB の活性化により最適な配列を選択した。

(2)シリコンナノ粒子の合成

完全天然型 CpG ODN のキャリアとして、シリコンナノ粒子をウェットプロセスで合成した。SiCl₂ を出発材料とし、相間移動触媒である tetrabutyl ammonium bromide (TOAB) を含むトルエン中に溶解した。さらに還元試薬である LiAlH₄ を作用させることによって、水素化シリコンナノ粒子を得た。しかしながら水素化シリコンナノ粒子は、水に不溶であるので、触媒としての chloroplatinic acid 存在下において表面にアリルアミンを導入することによって可溶化した。

(3)Si NPs による天然型 CpG ODN のデリバリー

アリルアミンで表面修飾した Si NPs は、+18 mV の表面電位を有していたので、負に荷電した CpG ODN を静電的に結合させた。また、結合様式を変換する m に、アリルアミンのアミノ基にマレイミド基を導入し、3' 末端をチオール化した CpG ODN をマレイミドとチオールの架橋反応によって結合させた。天然型 CpG ODN を結合させた Si NPs をヒトの末梢血単核細胞に与え、24 時間後に炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6) とインターフェロン α (IFN-α) を ELISA 法によって定量した。

4. 研究成果

(1)完全天然型 CpG ODN の開発

これまで開発された CpG ODN は核酸分解酵素に耐性なホスホロチオエート骨格を含む人工型 CpG ODN である。しかし、ホスホロチオエート化による様々な副作用が報告されているため、ホスホジエステル結合のみからなる完全天然型の CpG ODN の開発が望まれている。そこで、おもに B 細胞から炎症性サイトカイン類を誘導する class B のホスホロチオエート化 CpG ODN2006-PT を基本として、完全天然型の CpG ODN の開発を目指した。その結果、ホスホロチオエート化 CpG ODN2006-PT の糖骨格をすべてホスホジエステル骨格とし、この配列を3つつなげた72塩基からなる CpG ODN2006x3-PD は、核酸分解酵素に耐性で TLR9 活性化能を有することを見出した。ホスホロチオエート化 CpG ODN2006-PT は、CpG motif を3つ含むが、CpG motif の数を増やしても TLR9 活性化能は向上しなかった。これに対し、ホスホジエステル結合のみからなる CpG ODN2006-PD では、CpG motif の数を増やし、塩基サイズを大きくするにしたがって、TLR9 活性化能も向上した。このことから、ホスホロチオエ

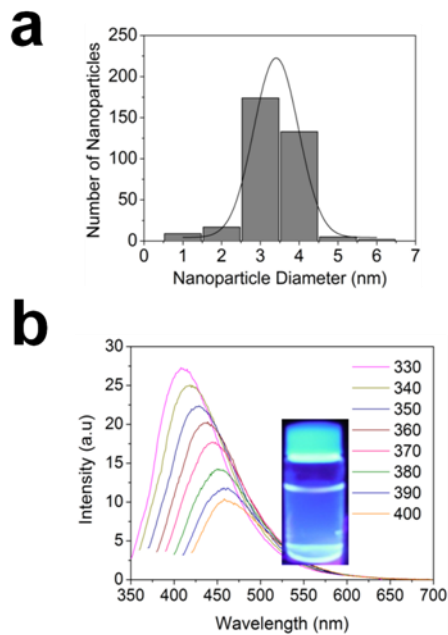


Figure 1. Si NPsのサイズ(a)および量子ドットとしての特性(b)

ート化 CpG ODN-PT と天然型 CpG ODN-PD では、TLR9 活性化機序に違いがあることが示唆された。

(2) Si NPs の CpG ODN デリバリーへの応用

アリルアミンで表面修飾した Si NPs の平均サイズは3.4 nmであり、量子ドットの性質を有していた(Figure 1)。すなわち、Si NPs に紫外領域の光で励起すると青色の蛍光を発した。この量子ドットの性質を利用して、Si NPs が細胞に取り込まれるのかどうか、取り込まれた場合の局在について検討した。その結果、Si NPs は細胞に取り込まれ、主にエンドライソソームに局在することが明らかとなった(Figure 2a)。CpG ODN の受容体であるTLR9 は、エンドソームおよびライソソームにあるので、Si NPs の局在は、CpG ODN のデリバリーのためのキャリアとしては非常に優れていると言える。

次に、アリルアミンの正電荷を利用して負

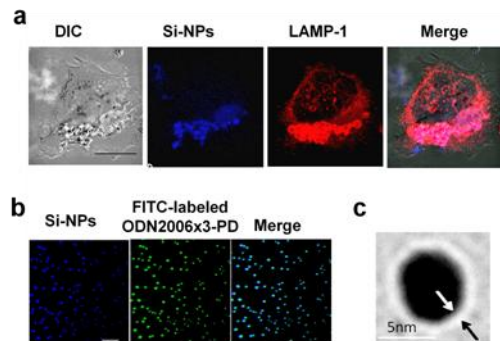


Figure 2. Si NPsの細胞内局在(a)とCpG ODN分子の結合(b,c)
(a) Si NPはLAMP-1を発現しているエンドライソソームに局在している。(b) FITCでラベルしたCpG ODNとSi NPが一致することからCpG ODNがSi NPに結合していることがわかる。(c) Si NP表面に結合しているCpG ODNのTEM像。

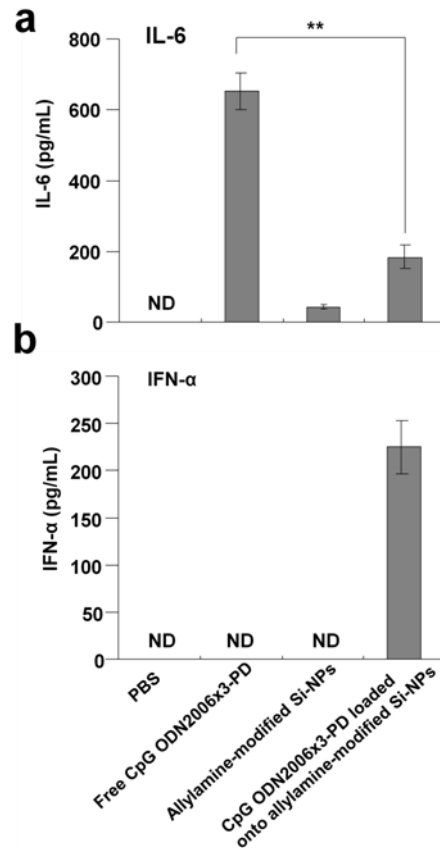


Figure 3. アリルアミンで表面修飾したSi NPsに静電的に結合させたCpG ODNによるサイトカイン誘導。

に荷電している完全天然型 CpG ODN2006x3-PD を静電的に結合させた。CpG ODN2006x3-PD の3'末端をFITCでラベルし、アリルアミンで修飾した Si NPs と混合した後、蛍光顕微鏡で観察すると、FITC と Si NP から青色光が完全に一致した。これは、CpG ODN が Si NP 上に結合していることを意味している(Figure 2b)。さらに、透過電子顕微鏡で観察すると、CpG ODN 分子が Si NP 上に約 1 nm の層として結合していることがわかった(Figure 2c)。また、CpG ODN2006x3-PD は Si NP 表面への結合量は、約 190 $\mu\text{g}/\text{mg}$ NPs であった。この高い結合量は、Si NPs の単位重量当たりの表面積の大きさに依存すると考えられる。

アリルアミンで表面修飾した Si NPs に静電的に結合させた CpG ODN2006x3-PD をヒトの末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) に与えると、Si NPs に結合していない遊離の CpG ODN2006x3-PD に比べて、炎症性サイトカインである IL-6 の誘導量は低下していた(Figure 3a)。IL-6 は、B 細胞の成熟と IgG 抗体の誘導を制御しているサイトカインである。遊離の CpG ODN2006x3-PD は、IFN- α の誘導能はないが、アリルアミンで表面修飾した Si NPs に静電的に結合させた CpG ODN2006x3-PD は、IFN- α を誘導するようになった(Figure 3b)。これは、ナノ粒子への結

合によって CpG ODN2006x3-PD の作用を変化させることができることを示している。しかし、これはナノ粒子によるデリバリーシステムでは炎症性サイトカインを誘導できないことも示唆している。そこで、ナノ粒子によるデリバリーによっても炎症性サイトカインを誘導するシステムの構築に取り組んだ。

Si NPs 表面のアリルアミンのアミノ基を利用してマレイミドを導入し、架橋反応によって3'末端をチオール化した CpG ODN の一端のみを Si NP 表面に結合させた。静電的結合では、CpG ODN 分子の全体が巻きつくように Si NP 表面に結合するが、架橋反応による結合では、CpG ODN 分子の一端のみが結合し、他端は遊離能状態、すなわち、髪の毛のような結合状態になっている。このような結合様式を有する CpG ODN2006x3-PD を PBMC に作用させると、遊離の CpG ODN2006x3-PD と同様に IFN- α の誘導能はないが、炎症性サイトカインである IL-6 を大量に誘導させることができた (Figure 4)。

これらの結果は、CpG ODN 分子のナノ粒子上への結合の方法によって、免疫活性化サイトカインの誘導を制御できることを意味している。従来のドラッグデリバリーシステムにおけるナノ粒子は、主に薬剤のキャリアおよび薬剤の放出制御のために利用されて

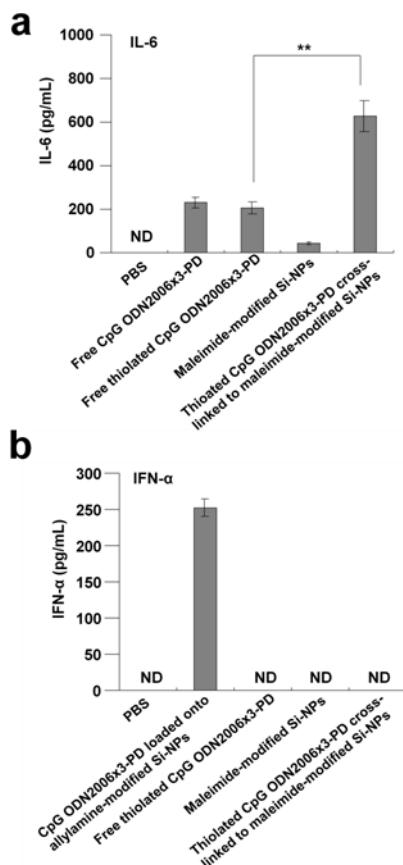


Figure 4. マレイミドで修飾したSi NPに架橋したCpG ODNによるサイトカイン誘導。

いる。本研究では、ナノ粒子が薬剤そのものの作用を制御する役割を演じることができると示した。さらに、この CpG ODN のナノ粒子による作用のスイッチングは、ナノ粒子の材質およびサイズ等には影響されず、結合方法のみによって決定されていることを明らかにした(data not shown、主な発表論文の2と4を参照)。

これまで開発された CpG ODN は、大きく2種類に分けることができる。Class A の CpG ODN は主に IFN- α を誘導し、class B の CpG ODN は主に炎症性サイトカインである IL-6 を誘導する。しかし、これら2種の CpG ODN

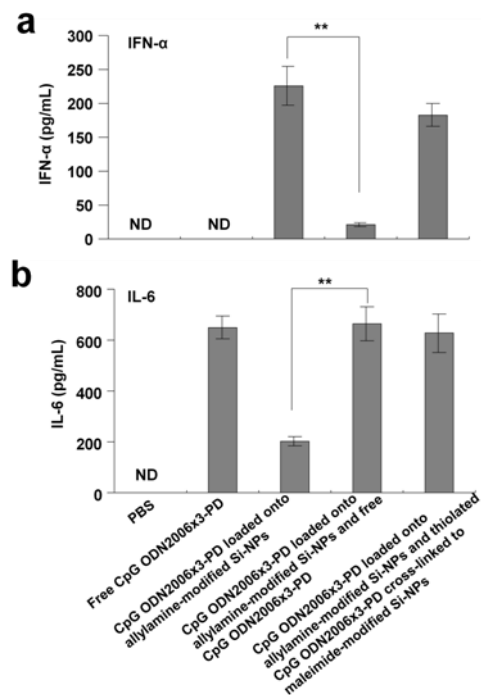


Figure 5. アリルアミンで表面修飾したSi NPsに静電的に結合させたCpG ODNとマレイミドで修飾したSi NPsに架橋したCpG ODNの同時作用によるサイトカイン誘導。

を同時に PBMC に作用させても IFN- α と IL-6 の両方を誘導させることはできず、IL-6 のみしか誘導されない。この理由は不明であるが、class B の CpG ODN が IFN- α 誘導のための転写因子である IRF1 と結合することが原因であることが示唆されている。CpG ODN2006x3-PD を静電的に結合させた Si NPs と、一端のみを結合させた Si NPs を同時に PBMC に作用させると、IFN- α と IL-6 の両方が誘導された(Figure 5)。したがって、これら2つの異なる結合を有する CpG ODN 分子を同時に用いることによって、高いアレルギー治療効果を得ることができると考えられる。

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 11 件)

1. Hanagata, N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *International Journal of Nanomedicine* 7:2181-2195 (2012) 査読有
2. Manoharan Y., Ji Q., Yamazaki T., Shanmugavel C., Chen S., Ganesan S., Hill JP., Ariga K., Hanagata N. Effect of molecular weight of polyethyleneimine on loading of CpG oligodeoxynucleotides onto flake-shell silica nanoparticles for enhanced TLR9-mediated induction of interferon- α *International Journal of Nanomedicine* 7:3625-3635(2012) 査読有
3. Chinnathambi S., Chen S., Ganesan S., Hanagata N. Binding mode of CpG oligodeoxynucleotides to nanoparticles regulates bifurcated cytokine induction via Toll-like receptor 9. *Scientific Reports* 2: 534 (2012) 査読有
4. Zhang H., Yamazaki T., Zhi C., Hanagata N. Identification of a boron nitride nanosphere-binding peptide for the intracellular delivery of CpG oligodeoxynucleotides. *Nanoscale* 4: 6343-6350 (2012) 査読有
5. Hanagata N.「TLR9を介したCpG誘導サイトカインのナノ粒子によるスイッチング」アレルギーの臨床 32: 83-87 (2012) 査読無
6. Zhu, Y., Meng, W., Li, X., Gao, H., Hanagata, N. Design of mesoporous silica/CpG oligonucleotides complexes for enhancement of delivery efficiency. *The Journal of Physical Chemistry* 115: 447-452 (2011) 査読有
7. Zhi, C., Meng, W., Golberg, D., Tang, C., Hanagata, N. BN nanospheres as CpG ODN carrier for activation of toll-like receptor 9. *Journal of Materials Chemistry* 21:5219-5222(2011) 査読有
8. Zhi, C., Hanagata, N., Bando, Y., Golberg D. Dispersible shortened boron nitride nanotubes with improved molecular-loading capacity. *Chemistry an Asian Journal* 6: 2530-2535 (2011) 査読有
9. Zhu, Y., Meng, W., Gao, H., Hanagata, N. Hollow mesoporous silica/poly(L-lysine) particles for codelivery of drug and gene with enzyme-triggered release property. *The Journal of Physical Chemistry C* 115: 13630-13636 (2011) 査読有
10. Zhu, Y., Meng, W., Hanagata, N. Cytosine-phosphodiester-guanine oligodeoxynucleotide (CpG ODN)-capped hollow mesoporous silica particles for enzyme-triggered drug delivery. *Dalton Transaction* 40: 10203-10208 (2011) 査読有
11. Meng, W., Yamazaki, T., Nishida, Y., Hanagata, N. Nuclease-resistant immunostimulatory phosphodiester CpG oligodeoxynucleotides as human Toll-like receptor 9 agonists. *BMC Biotechnology* 11: 88 (2011) 査読有

[学会発表] (計 21 件)

1. Yamazaki, T., Meng W., Hanagata, N. New Nuclease-Resistant Immunostimulatory Phosphodiester-based Oligonucleotides for Immune Therapies. The 9th World Biomaterials Congress (WBC), Sichuan University, Sichuan China. June 1-5 (2012)
2. Shanmugavel, C., Ganesan S., Hanagata, N. Preparation and characterization of silicon quantum dots for delivery of nucleic acid drugs. 4th International Conference on Advanced Nanomaterials (ANM2012), Indian Institute of Technology Madras (IIT Madras), Chennai, India. October 17-19 (2012)
3. Hanagata, N. Regulation of Toll-like Receptor 9 mediated Cytokine Profile by Binding Mode of CpG Oligodeoxynucleotides to Nanoparticles. 1st International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (ICEAN 2012). Mercure Hotel, Brisbane, Australia. October 22-25 (2012)
4. Shanmugavel, C., Hanagata, N. Synthesis and characterization of positively charged silicon quantum dots for delivery of nucleic acid drugs. 第6回 ナノバイオメディカル学会大会 独立行政法人産業技術総合研究所 7月9、10日(2012)
5. Shanmugavel, C., Hanagata, N. Effect of interaction mode of CpG oligodeoxynucleotides with TLR9 on bifurcated cytokine induction. 第6回 ナノバイオメディカル学会大会 独立行政法人産業技術総合研究所 7月9、10日(2012)
6. Zhang, H., Yamazaki, T., Zhi, C., Hanagata, N. Identification of a specific binding peptide to boron nitride nanospheres for delivery of CpG oligodeoxynucleotides. 第6回 ナノバイオメディカル学会大会 独立行政法人産業技術総合研究所 7月9、10日(2012)
7. Zhuang, F., Hanagata, N. Response of human lung epithelial cells to the toxicity of zinc oxide nanoparticles. 第6回 ナノバイオメディカル学会大会 独立行政法人産業技術総合研究所 7月9、10日(2012)

8. Chechetka, S., Yamazaki, T., Hanagata, N. Characterization of interleukin-6 induction by natural CpG oligodeoxynucleotide. 第6回 ナノバイオメディカル学会大会 独立行政法人産業技術総合研究所 7月9、10日 (2012)
9. Zhu, Y., Hanagata, N. Design of mesoporous silica/CpG ODN complexes to enhance delivery efficiency. International Conference on Materials for Advanced technologies. Suntec Singapore Hotel, Singapore, Jun 26-July 1 (2011)
10. Yamazaki, T. Hanagata, N. Enhancement of the therapeutic efficiency of a human toll-like receptor 9 agonist via bio- and nano-technology. International Workshop on Biomedical Sciences and Technologies, Anna University, Chennai, India, March 2-4(2011)
11. Yamazaki, Y., Meng, W., Zhi, C., Zhu, Y., Hanagata, N. Novel CpG oligodeoxynucleotide and its delivery system. 9th annual Bio Nanotech Conference, Boston, US., 13-16 June (2011)
12. Chinnathambi S., Krishnan, V., Ariga, K., Hanagata, N. Water soluble silicon quantum dots as fluorescent probes for bio-applications. The Symposium on Micro/Nano Aspects of Biomaterials, Kyoto, Japan, 19 July (2011)
13. Suwarti, Yamazaki, T., Hanagata, N. C-terminal ligand binding analysis of human Toll-like receptor 9. The Symposium on Micro/Nano Aspects of Biomaterials, Kyoto, Japan, 19 July (2011)
14. Zhang, H., Yamazaki, T., Zhi, C., Hanagata, N. Identification of Boron Nitride Nanospheres Binding Peptides. The Symposium on Micro/Nano Aspects of Biomaterials, Kyoto, Japan, 19 July (2011)
15. Meng, W., Yamazaki, T., Hanagata, N. Novel Phosphodiester CpG Oligodeoxynucleotides with High Stimulatory Effects on Human Toll-like Receptor 9. The Symposium on Micro/Nano Aspects of Biomaterials, Kyoto, Japan, 19 July (2011)
16. Suwarti, Yamazaki, T., Hanagata, N. Analysis of CpG ODN binding of human toll like receptor 9. Infection and Immunity (Cold Spring Harbor Asia), Suzhou Dushu Lake Conference Center, Shuzou, China, Sep. 8-12 (2011)
17. Yamazaki, T., Meng, W., Hanagata, N. Novel CpG phosphodiester oligodeoxynucleotides as human toll-like receptor 9 agonists. Infection and Immunity (Cold Spring Harbor Asia), Suzhou Dushu Lake Conference Center, Shuzou, China, Sep. 8-12 (2011)
18. Meng, W., Yamazaki, T., Hanagata, N. Construction of nuclear-resistant phosphodiester CpG oligonucleotides for pollinosis therapy. ナノ・バイオメディカル学会 2月21、22日 名古屋大学野依記念学術交流会館 (2011)
19. Zhang, L., Kaizuka, Y., Hanagata, N. Molecular organization at the live cell-biomembrane interface. ナノ・バイオメディカル学会 2月21、22日 名古屋大学野依記念学術交流会館 (2011)
20. Zhu, Y., Hanagata, N. Fe₃O₄@SiO₂ hollow mesoporous spheres as potential carrier for anticancer drug delivery. ナノ・バイオメディカル学会 2月21、22日 名古屋大学野依記念学術交流会館 (2011)
21. Zhi, C., Meng, W., Yamazaki, T., Bando, Y., Golberg, D., Tang, C., Hanagata, N. BN nanospheres as CpG ODN carrier for activation of toll-like receptor 9. ナノ・バイオメディカル学会 2月21、22日 名古屋大学野依記念学術交流会館 (2011)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計1件)

名称:「免疫刺激オリゴヌクレオチドおよび前記免疫刺激オリゴヌクレオチドを含む治療剤」

発明者: 山崎智彦、花方信孝

権利者: 独立行政法人物質・材料研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2011-070049

出願年月日: 2011/03/28

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花方 信孝 (HANAGATA

NOBUTAKA)

独立行政法人物質・材料研究機構・ナノテ

クノロジー融合ステーション・ステーション長

ン長

研究者番号: 10302796

(2) 研究分担者 (なし)

(3) 連携研究者 (なし)