

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390010

研究課題名(和文)多足型構造を形成する核酸を基盤とする核酸ナノDDS開発

研究課題名(英文)Development of nano-sized DDS for nucleic acid drugs based on polypod-like structure of nucleic acids

研究代表者

西川 元也(Nishikawa, Makiya)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40273437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核酸医薬の疾患治療効果の向上を目的に、多足型構造を形成する核酸(polypodna) - を設計・開発するとともに、これを連結することで新規デンドリマー型核酸ナノDDSの創出を目指した。その結果、pod数が3から8までは形成可能であること、pod数依存的に免疫細胞に効率よく取り込まれることを見出した。さらに、接着性末端を介してpolypodnaを連結することでDNAデンドリマーの開発にも成功した。免疫刺激性CpG DNAによる免疫細胞からのサイトカイン産生は、こうしたナノ構造体化することにより飛躍的に増大し、本手法が核酸医薬のDDSに有効な方法論になりうることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To increase the therapeutic potency of nucleic acid drugs, we tried to develop polypod-like structured nucleic acid, or polypodna, and dendritic nano-sized DDS by connecting them. We found that polypodna with 3 to 8 pods can be developed and these DNA nanostructures are efficiently taken up by immune cells depending on pod number. Furthermore, we succeeded in constructing DNA dendrimer by connecting polypodnas through their adhesive terminal ends. Cytokine release by immunostimulatory CpG DNA has been greatly increased by the development of such DNA nanostructures. Thus, we have shown that this approach can be useful for increasing the potency of nucleic acid drugs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：核酸 ナノ粒子 DDS CpG

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする地球上の生命体は、核酸である DNA・RNA の相補的な配列を持つ核酸と 2 重鎖を形成する性質を利用して緻密な情報伝達を実現している。この核酸、中でも DNA の 2 重鎖形成能を巧みに利用することで、キューブ状の構造体を構築可能であることが報告されたのを契機として、DNA を利用した様々な構造体構築に関する研究が進められてきた。これまでに、平面図柄や正多面体構造、さらにはハイドロゲルなどが開発されるに至っている。このような「DNA ナノテクノロジー」と総称される技術は、応用性の高さから様々な分野・領域での利用が検討されつつあるが、DNA ナノテクノロジーのドラッグデリバリーシステム (DDS) あるいは核酸医薬への応用は皆無であった。

申請者は、DNA を基盤とする癌治療システムの開発研究に取り組み、ほ乳類の免疫細胞に発現する Toll-like receptor 9 (TLR9) に認識され、免疫を賦活化する非メチル化 CpG 配列 - CpG モチーフ - を含む DNA (CpG DNA) を利用することで、自然免疫の活性化と抗癌剤ドキシソルピシンの組み合わせによる癌免疫・化学療法の可能性を示すことに成功した。研究当初は巨大環状 DNA であるプラスミド DNA での開発を行っていたが、このトップダウン型システムに代えて、オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を利用したボトムアップ型のナノ粒子化が実現できれば、非常に緻密かつ精巧な DDS 開発が可能になるものと考えに至った。そこで、DNA ナノテクノロジー技術を駆使した核酸 DDS 開発研究を開始するに当たり、設計可能な DNA 構造体の中で最も単純であり、またお互いを連結することで高次構造体の構成要素にもなる Y 型 DNA (Y-DNA) を選択した。CpG モチーフを含む 3 本の ODN を用いて Y-DNA を構築し、その特性を評価したところ、Y-DNA は通常の 1 本鎖、2 本鎖 DNA と比較して有意に高い免疫活性を示すことを見出した。さらに、Y-DNA を DNA リガーゼを用いて連結することでデンドリマー型 DNA の作製にも成功し、このナノサイズ DNA 構造体が免疫細胞への効率的なデリバリーシステムであるとともに、細胞活性化の誘導にも非常に優れた新規システムであることを見出した。さらに、CpG モチーフを挿入した X 型 DNA (X-DNA) を用いて免疫活性型 DNA ハイドロゲルを開発し、抗癌剤ドキシソルピシンを内包させた薬物・免疫治療システムが、担癌マウスにおいて非常に高い抗腫瘍効果を示すことも明らかにした。

以上、申請者自身によるこれらの成果は、免疫刺激性 CpG DNA をはじめとする核酸医薬のデリバリーに、多分岐型 DNA 構造体が有用であることを示すものである。しかしながら、その詳細については不明な点が多く、こうした技術を核酸医薬のデリバリーに利用するためには、DNA 構造体の構造活性相関の解明が必須であった。

2. 研究の目的

本研究では、3 本以上の ODN を用いて様々な立体構造を有する DNA ナノ構造体を設計・構築する。末端を介して連結することでデンドリマー構造を形成できるように、基本構造体として Y-DNA や X-DNA のような中心から足 (pod) を伸ばした分岐型構造の核酸をデザインする。ここでは、この核酸構造体のことを、多足型構造を形成する核酸 (polypod-like structured nucleic acid: polypodna) - と呼称する。まず、塩基配列及び立体構造を種々変化させた polypodna を設計し、その形成効率、融解温度 (T_m)、粒子サイズ、細胞取り込み等を指標に構造の最適化を図る。次いで、最適化した polypodna を順次連結することでデンドリマー型核酸ナノ粒子を作製する。ここでは、polypodna のサイズ・形状、連結世代数に関して比較検討する。機能性核酸として CpG DNA を選択し、活性の点からも構造を最適化する。以上の検討を通じ、疾患治療に有効な核酸ナノ DDS 開発に必要な理論的基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 各種 polypodna の設計と構造最適化

DNA を構成要素とする polypodna について、活性に関連すると考えられる種々のパラメータの影響を明らかにする。すなわち、基本構造として tripodna (Y-DNA)、tetrapodna (X-DNA) に加えて、pod 数が 5 以上の polypodna をデザインする。このとき、 T_m を指標に各 ODN 鎖長 (塩基数) ならびに塩基配列の影響について検討する。形成の確認はポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) により行い、形成されたものについては原子間力顕微鏡を用いて観察する。また、配列の一部を相補的でない配列に置換した polypodna も設計し、相同性の低下が形成効率や T_m にどのような影響を及ぼすかを解明する。

(2) Polypodna の細胞との相互作用解析

上記で開発した polypodna と細胞との相互作用について培養細胞を用いて評価する。検討には、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7、樹状細胞株 DC2.4、線維芽細胞株 NIH-3T3 等の細胞株に加えて、マウスから単離培養した骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を利用する。TLR9 ノックアウトマウスから単離した細胞も用いることで、polypodna により惹起される免疫応答における TLR9 の関与を明らかにする。各細胞に polypodna を添加し、培地中に分泌されるサイトカイン濃度を ELISA で測定する。別途、蛍光標識体を用い、細胞取り込みを評価する。

(3) デンドリマー型核酸ナノ粒子の開発

別途開発した自己ゲル化核酸技術を応用し、polypodna に長鎖の接着性突出末端を付与することで、デンドリマー型核酸ナノ粒子を開発する。内核および外殻に利用する polypodna を適宜変更することで、種々の内

部構造ならびに物性を有する核酸ナノ粒子を開発する。PAGE、光散乱光度計、原子間力顕微鏡観察等により構造的特徴を解析するとともに、細胞取り込みや応答性との相関解析を行う。

4. 研究成果

(1) Polypodna の設計と構造最適化

はじめに、効率的な polypodna 構築に必要な条件について検討した。3~12本の36塩基からなるODNを用いて、pod数が3から12までのpolypodnaを設計した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動により形成を評価したところ、tripodna (pod数3)からoctapodna (pod数8)までの形成は確認できたものの、pod数12のdodecapodnaは形成されなかった。熱安定性の指標として算出した T_m は、同じ長さのODNを用いたにも関わらず、pod数の増加に伴い低下した。一方、動的散乱法により測定した粒子サイズは、pod数が増加するにつれて徐々に増大するという結果が得られた。形成が確認されたtripodnaからoctapodnaまでについて、原子間力顕微鏡による観察を行った。36塩基のODNで形成したpolypodnaでは形状の評価が困難であったことから、90塩基のODNを用いて新たに各polypodnaを構築した。原子間力顕微鏡観察の結果、いずれの場合にも設計通りのpod数の多足型構造体が認められた。以上より、pod数が3から8までのpolypodnaは、設計した多足型構造体として効率よく形成可能であること、またその物性はpod数に依存して変動することが見出された。

Tetrapodnaについて、構造の中央部分に非相補的な配列を挿入した構造体を設計し、相溶性の低下が形成効率や T_m に及ぼす影響について検討した。36塩基からなるtetrapodnaの中央部分の8、12、16塩基を非相補的配列に置換したところ、8塩基置換体(tetrapodna(-8))は形成が確認されたものの、12、16塩基置換体は形成されなかった。そこで、形成が確認されたtetrapodna(-8)について、完全相補なtetrapodnaと比較したところ、低い T_m 値を示すことが確認された。一方、動的散乱法により測定した粒子サイズは若干増加する傾向が認められた。

(2) Polypodna の細胞による取り込みおよびサイトカイン産生の誘導

蛍光標識ODNを用いてpolypodnaを構築し、DNAを効率よく取り込むRAW264.7細胞による取り込みを評価した。その結果、pod数が増加するにつれてpolypodnaの細胞取り込みは増大した。そこで、TLR9に認識されることで免疫細胞からサイトカイン産生を誘導するCpG DNAを核酸医薬として選択し、これを含むpolypodnaを用いてTLR9陽性のRAW264.7細胞からの腫瘍壊死因子(TNF-)およびインターロイキン6(IL-6)の産生を評価した。その結果、1本鎖CpG DNA(ssCpG DNA)、2本鎖CpG DNAでは微量のサイトカインしか

産生されなかったのに対し、polypodnaの添加により多量のTNF-およびIL-6産生が認められ、その産生量はpod数に依存した。

この多足型構造化によるCpG DNAのサイトカイン産生効率の増強が、TLR9を介する反応であるかを確認するために、野生型およびTLR9ノックアウトマウスから採取、分化したBMDCを用いて同様の評価を行った。その結果、野生型マウスのBMDCでは、RAW264.7細胞とほぼ同様の結果が得られ、pod数の増加に伴い細胞取り込みならびにサイトカイン産生は増大した。TLR9ノックアウトマウスのBMDCも、野生型同様のpod数依存的な細胞取り込みを示した。しかしながら、TLR9ノックアウトマウスのBMDCからのサイトカイン産生は検出限界以下であった。従って、多足型構造化とすることによりCpG DNAの活性が増強するが、これは全てTLR9を介する反応であることが明らかとなった。

DC2.4細胞も、RAW264.7細胞と同様、pod数の多いpolypodnaを効率よく取り込むことが示された。これに対し、NIH3T3細胞では細胞取り込みに顕著なpod数依存性は認められなかったことから、多足型構造化は免疫細胞への特異的な送達法として有用な可能性が示された。

(3) デンドリマー型核酸ナノ粒子の構築と活性評価

Tripodnaを用い、デンドリマー型核酸ナノ粒子の開発を試みた。接着性末端配列の長さを適宜変更して形成を試みたところ、12塩基以上の場合に効率的な形成が確認された。そこで、この条件で第一世代から第三世代までのDNAデンドリマーを設計し、その形成をPAGEならびに原子間力顕微鏡により確認した。その結果、設計通りのデンドリマーの形成も確認できたものの、その形成効率は世代が挙がるにつれて低下した。

そこで、世代数を一に固定し、tripodnaに加えてtetrapodnaおよびhexapodnaを用いてDNAデンドリマーを設計した。その結果、構造が複雑になるにつれて不完全なDNAデンドリマーの割合が増加する傾向が認められた。一方、RAW264.7細胞による取り込みならびにサイトカイン産生は、構造が複雑なものほど効率的であった。以上の結果から、12塩基の接着性突出末端を付与することでpolypodnaを連結可能であり、これにより構造がさらに複雑になることでCpG DNAの活性を大きく増強可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

- (1) Mohri K, Nishikawa M, Takahashi Y, Takakura Y. DNA nanotechnology-based development of delivery systems for bioactive compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014; 58:

- 26-33. doi:
10.1016/j.ejps.2014.03.002. 査読有
- (2) Nishikawa M, Ogawa K, Umeki Y, Mohri K, Kawasaki Y, Watanabe H, Takahashi N, Kusuki E, Takahashi R, Takahashi Y, Takakura Y. Injectable, self-gelling, biodegradable, and immunomodulatory DNA hydrogel for antigen delivery. *Journal of Controlled Release* 2014; 180: 25-32. doi:
10.1016/j.jconrel.2014.02.001. 査読有
- (3) Uno S, Nishikawa M, Mohri K, Umeki Y, Matsuzaki N, Takahashi Y, Fujita H, Kadowaki N, Takakura Y. Efficient delivery of immunostimulatory DNA to mouse and human immune cells through the construction of polypod-like structured DNA. *Nanomedicine* 2014; 10: 765-74. doi:
10.1016/j.nano.2013.11.017. 査読有
- (4) Mohri K, Nishikawa M, Takahashi N, Shiomi T, Matsuoka N, Ogawa K, Endo M, Hidaka K, Sugiyama H, Takahashi Y, Takakura Y. Design and development of nanosized DNA assemblies in polypod-like structures as efficient vehicles for immunostimulatory CpG motifs to immune cells. *ACS Nano* 2012; 6: 5931-5940. doi: 10.1021/nn300727j. 査読有
- (5) Mohri K, Takahashi N, Nishikawa M, Kusuki E, Shiomi T, Takahashi Y, Takakura Y. Increased immunostimulatory activity of polypod-like structured DNA by ligation of the terminal loop structures. *Journal of Controlled Release* 2012; 163: 285-292. doi:
10.1016/j.jconrel.2012.08.001. 査読有
- (6) Rattanakit S, Nishikawa M, Takakura Y. Self-assembling CpG DNA nanoparticles for efficient antigen delivery and immunostimulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 47: 352-358. doi:
10.1016/j.ejps.2012.06.015. 査読有
- (7) Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Toyota H, Kiyota T, Takahashi Y, Takakura Y. Fibronectin inhibits cytokine production induced by CpG DNA in macrophages without direct binding to DNA. *Cytokine* 2012; 60: 162-170. doi: 10.1016/j.cyto.2012.06.237. 査読有
- (8) 西川元也. 核酸医薬開発の鍵を握る薬物送達システム(DDS). *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス* 2012; 43: 778-785. 査読無
- (9) Yoshida H, Nishikawa M, Kiyota T, Toyota H, Takakura Y. Increase in CpG DNA-induced inflammatory responses by DNA oxidation in macrophages and mice. *Free Radical Biology & Medicine* 2011; 51: 424-431. doi:
10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.035. 査読有
- [学会発表](計 27 件)
- (1) 西川元也、高倉喜信. DNA ナノテクノロジーを基盤とする免疫アジュバント・抗原徐放システムの開発. 日本薬学会第 134 年会, 2014/3/27-30, 熊本
- (2) 梅木佑夏、西川元也、毛利浩太、高橋有己、高倉喜信. 静電的相互作用を利用した免疫刺激性 DNA ハイドロゲルからの抗原徐放化による抗腫瘍免疫の効率的誘導. 第 23 回アンチセンスシンポジウム, 2013/11/28-29, 徳島
- (3) 西田 優、西川元也、遠藤政幸、杉山 弘、高橋有己、高倉喜信. Takumi 型核酸ナノ構造体を利用した免疫細胞への免疫抑制性オリゴ核酸のデリバリー. 第 23 回アンチセンスシンポジウム, 2013/11/28-29, 徳島
- (4) 大槻昇三、西川元也、毛利浩太、松崎憲幸、高橋有己、高倉喜信. 免疫刺激性核酸の免疫細胞への効率的デリバリーを目的とした自己会合型 DNA ナノ構造体の構造活性相関. 第 23 回アンチセンスシンポジウム, 2013/11/28-29, 徳島
- (5) Nishikawa M, Kusuki E, Mohri K, Endo M, Hidaka K, Sugiyama H, Takahashi Y, Takakura Y. Development of self-assembling and immunostimulatory dendrimer-like DNA for stimulation of immune cells. 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2013/10/6-8, Naples, Italy
- (6) 西川元也. DNA ナノテクノロジーを基盤とする核酸医薬の高機能化とデリバリー. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会, 2013/7/4-5, 京都
- (7) 梅木佑夏、西川元也、小川耕平、毛利浩太、高橋有己、高倉喜信. DNA ハイドロゲルを基盤とした抗原デリバリーシステムの開発. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会, 2013/7/4-5, 京都
- (8) 西田 優、西川元也、高橋有己、高倉喜信. 核酸ナノ構造体を利用した免疫細胞への免疫抑制性オリゴヌクレオチドデリバリー. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会, 2013/7/4-5, 京都
- (9) 楠木絵理、西川元也、毛利浩太、高橋夏樹、遠藤政幸、日高久美、杉山 弘、高橋有己、高倉喜信. 自己組織化 dendrimer 型 DNA を基盤とする免疫細胞指向性核酸 DDS の開発. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会, 2013/7/4-5, 京都

- (10) 塩見朋紀、西川元也、高橋夏樹、遠藤政幸、日高久美、杉山 弘、高橋有己、高倉喜信. 高速原子間力顕微鏡観察による polypodna 中の DNA 配向性の解明. 第 29 回日本 DDS 学会学術集会, 2013/7/4-5, 京都
- (11) 楠木絵理、西川元也、毛利浩太、高橋夏樹、遠藤政幸、日高久美、杉山 弘、高橋有己、高倉喜信. 核酸医薬の効率的な免疫細胞へのターゲティングを目的とした自己組織化デンドリマー型 DNA の開発. 日本薬剤学会第 28 年会, 2013/5/23-25, 名古屋
- (12) 西田 優、西川元也、高橋有己、高倉喜信. Takumi 型核酸ナノ構造体の開発と免疫抑制性オリゴヌクレオチドデリバリーへの応用. 日本薬剤学会第 28 年会, 2013/5/23-25, 名古屋
- (13) 西川元也. 高次構造化核酸と生体膜との促進的相互作用の解析と核酸医薬・抗原デリバリーへの応用. 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2012/11/15-16, 京都
- (14) Kusuki E, Nishikawa M, Mohri K, Takahashi N, Endo M, Hidaka K, Sugiyama H, Takahashi Y, Takakura Y. Self-assembling nano-sized dendrimer-like DNA for efficient delivery of immunostimulatory CpG DNA to immune cells. 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2012/11/23-24, 京都
- (15) Nishikawa M, Endo M, Sugiyama H, Takahashi Y, Takakura Y. Visualization of polypod-like structured DNA, polypodna, and its application as nano-sized immunomodulator and building block for versatile DNA hydrogel. OTS Meeting 2012, 2012/10/28-31, Boston, USA
- (16) 西川元也、毛利浩太、高橋夏樹、楠木絵理、塩見朋紀、小川耕平、梅木佑夏、遠藤政幸、杉山 弘、渡辺 宏、高橋有己、高倉喜信. 多足型核酸構造体 - ポリポドナ - の設計と構造・機能解析. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 2012/9/24-26, 仙台
- (17) 梅木佑夏、西川元也、小川耕平、毛利浩太、高橋夏樹、川崎洋志、渡辺 宏、高橋有己、高倉喜信. 注射投与可能な DNA ハイドロゲルのレオロジー解析と抗原デリバリー. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 2012/9/24-26, 仙台
- (18) 西川元也. 核酸による核酸医薬のデリバリー. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 2012/7/4-5, 札幌
- (19) 高橋夏樹、西川元也、毛利浩太、小川耕平、梅木佑夏、楠木絵理、高橋有己、高倉喜信. 注射投与可能な DNA ハイドロゲルを利用した抗原デリバリーシステムの開発. 日本薬剤学会第 27 年会, 2012/5/24-26, 神戸
- (20) 松崎憲幸、西川元也、宇野翔大、毛利浩太、日高久美、遠藤政幸、杉山 弘、高橋有己、高倉喜信. 多足型構造 DNA によるマウスおよびヒト免疫細胞の活性化. 日本薬剤学会第 27 年会, 2012/5/24-26, 神戸
- (21) 西川元也. DNA の立体化による核酸医薬の高機能化と DDS 開発. 創剤フォーラム 第 17 回若手研究会, 2011/11/19, 京都
- (22) Nishikawa M, Takahashi Y, Takakura Y. Development of anticancer DNA nanopods as immunostimulatory delivery systems for anticancer agents. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011/10/3-5, 名古屋
- (23) 高橋夏樹、西川元也、毛利浩太、楠木絵里、高橋有己、高倉喜信. 安定性改善を目的とした loop 構造を含む多足型 DNA - polypodna - の開発. 第 21 アンチセンスシンポジウム + 第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム合同シンポジウム, 2011/9/1-2, 大阪
- (24) 小川耕平、西川元也、毛利浩太、楠木絵里、高橋有己、高倉喜信. 注射可能な DNA ハイドロゲルを利用した抗原デリバリーシステムの開発. 第 21 アンチセンスシンポジウム + 第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム合同シンポジウム, 2011/9/1-2, 大阪
- (25) 毛利浩太、西川元也、小川耕平、高橋夏樹、楠木絵里、高橋有己、高倉喜信. 酵素反応を必要としない DNA ハイドロゲルの開発. 第 21 アンチセンスシンポジウム + 第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム合同シンポジウム, 2011/9/1-2, 大阪
- (26) Nishikawa M, Mohri K, Ogawa K, Takahashi N, Takahashi Y, Takakura Y. Development of DNA nanogels and hydrogels as injectable delivery systems for CpG DNA and other nucleic acid-based drugs. 7th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2011/9/8-10, Copenhagen, Denmark
- (27) 西川元也、高橋有己、高倉喜信. 免疫活性型核酸の立体化による活性増強と DDS 開発. 日本薬剤学会第 26 年会, 2011/5/29-31, 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 元也 (NISHIKAWA, MAKIYA)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 40273437

(2) 研究分担者

高倉 喜信 (TAKAKURA, YOSHINOBU)

京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30171432

高橋 有己 (TAKAHASHI, YUKI)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：00547870