

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640084

研究課題名(和文)核酸アジュバントを用いた新しい誘導型局所自然免疫活性化機構の開発

研究課題名(英文) Establishment of local and switchable innate immune activation by novel nucleic acid adjuvant

研究代表者

高岡 晃教 (TAKAOKA, Akinori)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：30323611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アジュバントは、ワクチンや腫瘍免疫治療の重要な成分である。副作用を減らし効果的に自然免疫応答を活性化するためには、組織局所で活性調節可能なアジュバントを開発することが重要である。本研究はシトシン残基にCystamine修飾したC型CpG配列を作製し、X線照射によって効率は低いながらも構造変化を引き起こすことを示した。またこの核酸が自然免疫応答活性を有することを示した。これらの結果からこの核酸は、放射線照射部位局所に免疫応答を誘導できるswitchableな新しいアジュバントとなる可能性が示された。今後効率良く構造変化を誘導し自然免疫システムを活性化する核酸アジュバントの開発につなげたい。

研究成果の概要(英文)：Adjuvant is an important component for effective vaccination and antitumor therapy. Establishment of local and switchable adjuvant is considered to be an efficient strategy to reduce side effects and efficiently activate innate immune responses. The purpose of this study is the establishment of a novel nucleic acid adjuvant that can trigger the activation of innate immune system in response to X-ray irradiation. In this study, type-C CpG ligands contained with cystamine-modified cytosine were used and showed its structural change by X-ray irradiation, albeit their low efficiency. These results showed these ligands could be a switchable activator and further investigation will be needed to improve their efficiency.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 核酸 アジュバント

## 1. 研究開始当初の背景

これまで研究代表者は、自然免疫システムの中でも病原微生物を『認識』するというプロセス、特にウイルス感染において重要な「核酸認識センサー分子」に焦点を当てて、認識機構に着目した感染とがんに対する生体防御システムの分子機構の解明に取り組んでいる。これまでに細胞質 DNA センサーとして DAI (DNA-dependent activator of IRFs) を同定し、インターフェロン活性化機構に関する研究を報告した (Takaoka et al. Nature: 2007, 448, 501)。また細胞質 RNA センサー RIG-I を強力に活性化させる新たな調節因子として ZAPS (Zinc finger antiviral protein, short form) を見出し、I 型 IFN および炎症性サイトカインの産生を通じて、抗ウイルス作用を強力に増強することを報告した (Hayakawa et al. Nat. Immunol.: 2011, 12, 37)。さらにごく最近腫瘍に浸潤する樹状細胞での自己に由来する核酸リガンドの応答性に関する研究にも貢献した (Chiba et al. Nat. Immunol.: 2012, 13, 832)。このような申請者の研究を生かし、これまでにない形の有効な核酸アジュバントをデザインし開発したいと考えた。

自然免疫活性化を誘導することが可能な核酸は、ワクチンや抗腫瘍治療において、核酸アジュバントとして利用されており、その免疫誘導効果が期待されているが、局所での活性化が困難であったことや、免疫の活性化の制御が難しい等の理由から、副作用の問題があった。また、代表的な核酸アジュバントである CpG の受容体である TLR9 は、ヒトにおいては主に形質細胞様樹状細胞 (pDCs) といった特殊なサブセットに限られていることから、その効果が限られたものであった。

そこで研究代表者は、北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科 藤本健造教授らと共同研究し、局所でアジュバント活性の誘導を制御できるような新しい核酸アジュバントを開発することを考案した。

## 2. 研究の目的

有効なワクチンや抗腫瘍治療を実現するには、アジュバントの存在は大変重要である。しかし、従来のアジュバントは全身性に強い免疫応答を誘導するという副作用を起こすことなどの問題がある。そのため、局所に強力なアジュバント活性を誘導できる有効なアジュバントの開発が強く求められている。本研究では、これまでの自然免疫での核酸認識の研究を生かし、とくに強力に自然免疫応答を誘導する核酸に着目し、放射線照射部位局所に自然免疫応答を誘導できる switchable な新しいタイプの核酸アジュバントのデザイン開発を提案したい。本研究は、副作用の少ないかつ効率のよい腫瘍免疫の誘導を目指した、局所自然免疫誘導型の新しい

核酸アジュバントのデザインおよび開発につながる基礎的な研究を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 光核酸マニピュレーション技術を用いて新規核酸アジュバントの作製：

共同研究者の藤本先生の光化学による独自の光核酸マニピュレーション技術により、多種の新規構造を有する核酸分子を作製することが可能である。本研究で目指す局所自然免疫誘導型の新しい核酸アジュバントを作製するために、放射線照射により「不活性型核酸」から「活性型核酸」になるような、構造変化が可能な核酸をデザインし、これらの構造を有する核酸を合成する。

(2) 局所自然免疫誘導型の新しい核酸アジュバントの自然免疫応答活性化作用の検討：

はじめに、*in vitro* で調整された「不活性型核酸」と「活性型核酸」を用いて、実際に期待されるような免疫応答性を有しているのかについて解析する。自然免疫応答性の確認方法としては、これらの核酸で刺激し I 型インターフェロンや炎症性サイトカインあの発現を、定量的 RT-PCR、または ELISA 法により検証する。また同時に、*in vitro* で新規核酸アジュバントに放射線照射を行い、構造が変化するかについて、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた解析により検証する。

次に *in vivo* (細胞内)において、免疫応答の調節が可能かどうかについて、腫瘍細胞に「不活性型核酸」を用いて刺激したのちに、放射線照射を行い、放射線照射によって自然免疫応答の誘導が可能かどうかについて、同様にサイトカインを定量することで検討する。

(3) 局所自然免疫誘導型の新しい核酸アジュバントの自然免疫応答活性化機構の分子メカニズムの解明：

上記(2)により同定された「活性型核酸」による自然免疫応答の活性化メカニズムを明らかにする。つまり、核酸認識センサー分子を、siRNA や shRNA を用いたノックダウン、あるいはノックアウトの細胞を用いて活性化メカニズムを特定する。

## 4. 研究成果

(1) 本研究で目指す局所自然免疫誘導型の新しい核酸アジュバントを作製するために、今回我々は細胞外 DNA センサー分子 Toll-like receptor 9 (TLR9) のリガンドである C 型 CpG 配列を改良した。CpG 配列による自然免疫活性化機構についてその詳細がよく知られており、一本鎖 DNA (ssDNA) がその応答性に重要であることから、放射線

照射により ssDNA になるようにデザインした。そこで、Cystamine 修飾シトシン(図 1)を CpG 配列に、組み込んだ後、酸化させジスルフィド結合形成によりこれらの核酸を 2 量体化しジスルフィドクロスリンク体を合成した。Cystamine 修飾シトシンを中央部に組みこんだもの(図 2)と、3'側に組みこんだものの 2 種類を作製した。

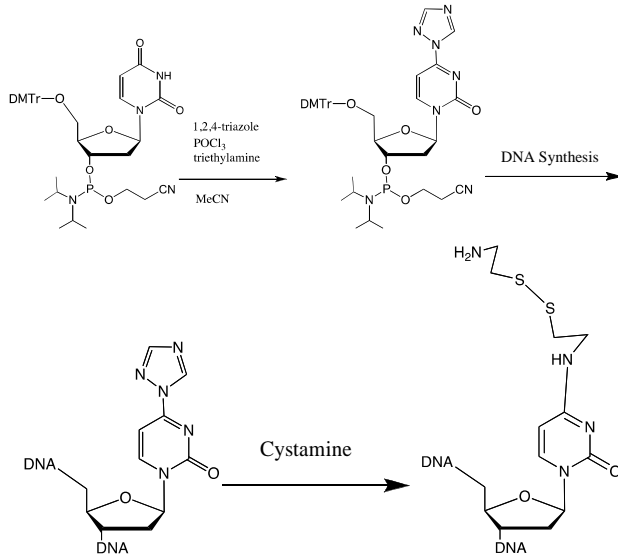


図 1 Cystamine 修飾 DNA の合成

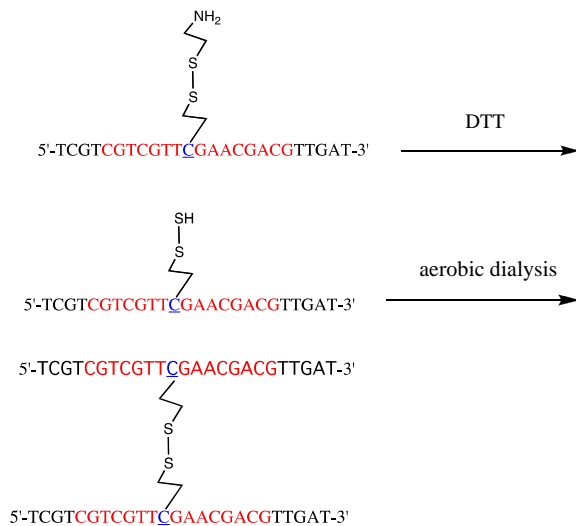


図 2 Cystamine 修飾シトシンを中央部に組みこんだジスルフィドクロスリンク体

(2) 作製した新規核酸アジュバントが、放射線照射前の構造は、実際に「不活性型」であるかについて、Raw264.7 細胞を用いて検証した。Raw264.7 細胞に、2 量化したジスルフィドクロスリンク体で刺激し、刺激後 3 時間後の *Ifnb1* および *Tnf* mRNA を定量的 RT-PCR 法にて測定したところ、Cystamine 修飾シトシンを中央部に組みこんだジスルフィドクロスリンク体(図 2: 下の最終産物)においては、*Ifnb1* および *Tnf* mRNA の発現

誘導が認められなかったが、3'側に組みこんだジスルフィドクロスリンク体において *Ifnb1* の発現誘導が認められた。3'側に組みこんだジスルフィドクロスリンク体においては、2 量化したものでも自然免疫応答性を有していることから、本研究の要件を満たさないことが明らかになった。

次に、放射線照射後の構造となる単量体のオリゴを用いて、同様に検討した。Cystamine 修飾シトシンを中央部に組みこんだオリゴ(図 2: 右上の中間産物)においては、*Ifnb1* および *Tnf* mRNA の発現誘導が認められたことから、本研究の目指すリガンドとなり得ることが示唆された。

次に、放射線照射によってこれらの 2 量化したオリゴが構造変化し、単量体になるかについて検証した。1mM の 2 量化したジスルフィドクロスリンク体に X 線照射を行った後、変性アクリルアミドゲルにて電気泳動し、単量体のバンドが認められるかについて調べた。Cystamine 修飾シトシンを中央部に組みこんだジスルフィドクロスリンク体および 3'側に組みこんだもの、いずれのジスルフィドクロスリンク体も X 線照射による構造変化(開裂)は、約 7% 程度と非常に低かった。300Gy の X 線を照射すると、その開裂性は若干増強した。一方で、*in vivo* で 2 量化したジスルフィドクロスリンク体に X 線照射をすることで、自然免疫応答性が誘導出来るかについて検証した。Raw264.7 細胞に、ジスルフィドクロスリンク体を刺激し、同時に 30Gy の X 線照射を行い、3 時間後の *Ifnb1* および *Il6* mRNA の発現を測定した。その結果、これらのサイトカインの発現は、X 線照射により上昇しなかった。

以上の結果から、現在作製したジスルフィドクロスリンク体は、X 線照射による開裂反応性が低く、効果的な自然免疫系の活性化を誘導出来ないことが予想された。現在より効率の良いデザインにするべく、Cystamine 修飾シトシンの場所を変えたりリガンドを作製しさらなる研究を続けている。

(3) Cystamine 修飾シトシンを中央部に組みこんだジスルフィドクロスリンク体による自然免疫応答のシグナル経路について検討した。CpG オリゴは TLR9 を介することが知られているため、作製した Cystamine 修飾シトシンを含む CpG オリゴが TLR9 を介した自然免疫応答を引き起こすかについて検証した。TLR9 ノックアウトマウスから脾臓を摘出し、splenocyte を調整した。Splenocyte に同様に CpG 刺激を行い、刺激 3 時間後に誘導される *Ifnb1* および *Il6* mRNA の発現量について定量的 RT-PCR 法にて測定した。その結果、Littermate の TLR9 野生型由来の splenocyte において認められた *Ifnb1* mRNA の誘導が、TLR9 ノックアウトマウス由来 splenocyte においては認められなかった。従って、Cystamine 修飾シトシン

ンを含む CpG オリゴによる自然免疫応答は、TLR9 を介した応答性であることを明らかにした。

今後、効率の良い局所自然免疫誘導型の新しい核酸アジュバントを開発していくことで、放射線照射部位局所に自然免疫応答を誘導できる switchable な新しいタイプの核酸アジュバントのデザイン開発を提案していきたい。このことは、単に副作用の少ないアジュバント作製のみならず、放射線照射を行うことで腫瘍抗原の顕在化も狙ったものであり、より効率のよいがん免疫の活性化を目指し、従来のアジュバントには提案されなかったことのないアプローチからの抗がん治療につなげていきたい。

#### 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0件)  
(現在投稿準備中)

〔学会発表〕(計1件)

中村重孝, 藤本健造, 亀山武志, 高岡晃教. 免疫活性化機構解析を指向した光核酸類操作法による非天然核酸構造の構築. 第79回インターフェロン・サイトカイン学会. 2014年6月19日-20日 北海道大学医学部フラテホール(北海道 札幌市)

〔図書〕(計1件)

Kameyama, T., Takaoka, A. Humana Press. Methods in molecular biology. Characterization of innate immune signalings stimulated by nucleic acid sensors. 2014,19-32.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/sci/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

高岡 晃教 (TAKAOKA, Akinori)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授  
研究者番号：30323611

##### (3)連携研究者

佐藤 精一 (SATO, Seiichi)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：60459724

亀山 武志 (KAMEYAMA, Takeshi)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：40569505