

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659836

研究課題名(和文) DNAオリガミを用いた新規免疫アジュバントの開発

研究課題名(英文) Development of novel adjuvant which constructed by DNA origami technology

研究代表者

寺尾 豊 (Terao, Yutaka)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50397717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、DNAオリガミの技術を利用し、ウイルス由来の単鎖DNA配列に免疫アジュバントとして最適な二次元構造を付与することを目的とする。ウイルス由来DNA配列中には、Toll様受容体に認識されるCpGモチーフが高頻度に認められる。しかしながら、DNA鎖は生理的条件下では、主としてスーパーコイル状に折り畳まれており、外界に露出する配列は全長に比して極めて少ない。そこで、DNAオリガミ技術を利用して、多数のCpGモチーフを外界に露出させたDNAの二次元構造体を作製した。そして、細胞実験および小動物を用いた免疫実験から、免疫アジュバントとして最適なCpGモチーフの二次元構造を決定した。

研究成果の概要(英文)：Recently, pathogenic microorganisms acquired drug-resistance, and they are spreading throughout the world. Antibiotics were presented as "magic bullets" against infectious diseases in the 20th century, however, the heavy usage of antibiotics has led to the appearance of drug-resistant microorganisms. Thus, it has become difficult to treat most infantile diarrhea with basic antibiotics in the developing countries. Now, it is important to develop and improve the enteric and general immune activators on the basis of fundamental investigations. In this proposal, we focus on a CpG motif among the DNA sequence. The CpG motif is observed at high frequency in the genomes of pathogenic microorganisms. It works as an immune activator to boost production of antigen-specific immune responses. In this study, we constructed "DNA origami" immune activators being fixed the CpG motifs to the outside using M13 DNA, aiming to obtain the immunopotentiating effect.

研究分野：病態科学系歯学・歯科放射線学

科研費の分科・細目：免疫・感染・炎症

キーワード：アジュバント

1. 研究開始当初の背景

ヒトには微生物感染から普遍的に身体を防御する自然免疫系が備わっている。代表的な自然免疫分子として、微生物を構造パターンから認識する Toll 様受容体 (TLR) が知られている。その中の TLR9 は、感染ウイルスなどの DNA パターンを認識する。TLR9 は、全生物種に固有の構成物質である DNA から、微生物 DNA を鑑別するために「CpG モチーフ」を認識する。CpG モチーフは、TLR9 に先立ち同定され、動物に接種することで免疫機能を賦活化することが報告されている。申請者らも、M13 系プラスミド DNA の接種で細胞性免疫と抗体産生が増強することを示している (Kawabata, Terao, *et al*, *Infect Immun*, 1999)。しかしながら、M13 系プラスミド DNA を動物に接種しても、免疫増強 (= アジュバント) 効果は安定しにくい。その原因として、プラスミド DNA が スーパーコイル状、コイルの解けたリング状、一部に切断が生じた直鎖状の 3 形態を呈するため、外界に露出する CpG モチーフが DNA の取扱によって変化するのではないかと考えた。

そこで、近年報告された DNA に任意の二次元構造を安定的に付与できる「DNA オリガミ」の技法を用いて、CpG モチーフを外界に多数露出させた DNA 構造体を作製する着想を得た。

2. 研究の目的

本研究は、二ヶ年の研究期間で申請し、製品化されたウイルス由来の単鎖 DNA である M13mp18 を DNA オリガミ技術で加工し、シート状などの二次元構造体とする。その際には、配列中のアジュバント領域である CpG モチーフを外界に露出させ、新規の DNA アジュバントとして設計する。そして、構築した M13mp18DNA オリガミを細胞株やマウスに接種し、サイトカイン誘導能や抗体産生の増強効果の高い二次元構造体を選出する。中長期的には、市販のワクチンと組み合わせ投与した際

のモデル動物における感染防御効果も検索する。

3. 研究の方法

二ヶ年計画の研究初年度は、ウイルス由来 M13mp18 一本鎖 DNA 分子を任意の二次元形状に折り畳み、アジュバント効果を有する DNA オリガミを作製する。すなわち、16 塩基の一本鎖合成 DNA を「留め金鎖」として設計する。そして、鋳型鎖の M13mp18 一本鎖 DNA の間を「留め金鎖」でホッチキスのようにとめ固定することで形態を保持させる。その際には、M13mp18 DNA 上の CpG モチーフを外界に露出させるように設計し、高いアジュバント効果が発揮できるように期す。計画二年目は、複数デザインした DNA オリガミを細胞およびマウス免疫実験に供し、高い免疫誘導能を有する DNA オリガミのデザインを決定する。最終的には、微生物の感染実験を行い、アジュバント効果を有する DNA オリガミの感染防御効果を評価する。

4. 研究成果

[平成 24 年度]

- (1) アジュバント効果を有する DNA オリガミの鋳型を作製した。簡便に入手できる唯一の一本鎖 DNA である M13mp18 を購入し、内在する 1 カ所のヘアピンループ (20 nt) を含む 73 nt の領域を *Bsr*BI で消化した。この操作で得られた 7,176 nt の DNA を鋳型鎖にすることで、鋳型 DNA の内部構造に左右されない DNA オリガミのデザインが可能とした。
- (2) DNA オリガミを任意の形態で安定的に保持する「留め金鎖」を設計した。二本鎖 DNA は、理論上、会合した時には 16 塩基で 1.5 回転、32 塩基で 3 回転となる。そこで、平面構造を保持するために、16 もしくは 32 塩基のオリゴヌクレオチドを鋳型と相補的にデザインした。約 7,000 nt の鋳型 DNA に対し、約 200 本の短鎖オリゴヌクレオチドの「留め金鎖」で安定することが、予備的演算から推

察された。

- (3) 両者を混合し、95 度に加熱後、20 度まで 2 時間～24 時間かけて緩やかに冷却した。得られた反応 DNA 鎖を原子間力顕微鏡で観察した。そして、至適の混合比と冷却時間を決定した。
- (4) 数度の再設計の後に、DNA オリガミ体を得られたので、単球細胞および好中球、マクロファージ由来細胞株に添加した。37 で培養した後に、産生される各種サイトカインを ELISA キットにて定量した。複数デザインした DNA オリガミ体から、免疫誘導能の高い構造体グループを選別した。

【平成 25 年度】

- (1) 前年度に選出した DNA オリガミ体を市販の 23 価肺炎球菌ワクチン(ニューモバックス)と混合した。各種の混合比で調整した「ワクチン = DNA オリガミ液」を準備し、マウス後脚に接種する。隔週ごとに採血を行い、肺炎球菌に対する抗体価の上昇を ELISA 法で測定した。
- (2) 抗肺炎球菌の抗体価が上昇した血清を肺胞上皮細胞株の培養上清に添加し、肺炎球菌の上皮細胞侵入に対する阻害能を検索した。また、同抗血清を用いて、23 価の肺炎球菌に対する抗体価の上昇パターンを Western blot 法で解析した。
- (3) 免疫増強を確認できる DNA オリガミが決定できたので、致死量の肺炎球菌をマウス口腔から感染させた。そして、経日的にマウスの生存数を記録し、感染防御効果を算出した。そして、免疫効果を増強する DNA オリガミ体を同定した。そして、得られた結果は、研究代表者自身が学会および学術誌で専門家を対象に報告した。そして、申請者が作成する研究室のホームページから、リアルタイ

ムで広く国民に発信した
(<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/microbio/microbio.html>)。

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 14 件)

1. Nohara, F., Nagaya, K., Asai, H., Tsuchida, E., Okamoto, T., Hayashi, T., Sakata, H., Terao, Y., and Azuma, H.: Neonatal pleural empyema caused by *emm* type 6 group A streptococcus, *Pediatrics International*, in press. 査読有
2. Wakamatsu, R., Takenaka, S., Ohsumi, T., Terao, Y., Ohshima, H., and Okiji, T.: Penetration kinetics of four mouthrinses into *Streptococcus mutans* biofilms analyzed by direct time-lapse visualization. *Clin. Oral Invest.*, 8: 625-34, 2014. 査読有
3. Murakami, T., Saitoh, I., Inada, E., Kurosawa, M., Iwase, Y., Noguchi, H., Terao, Y., Yamasaki, Y., Hayasaki, H., and Sato, M.: STO feeder cells are useful for propagation of primarily cultured human deciduous dental pulp cells in view of elimination of contaminated bacteria and promotion of cellular outgrowth. *Cell Medicine*, 6: 75-81, 2013. 査読有
4. Yamaguchi, M., Terao, Y., Mori-Yamaguchi, M., Domon, H., Sakaue, Y., Yagi, T., Nishino, K., Yamaguchi, A., Nizet, V., and Kawabata, S.: *Streptococcus pneumoniae* invades erythrocytes and utilizes them to evade human innate immunity. *PLoS one*, 8: e77282, 2013. 査読有
5. Honda-Ogawa, M., Ogawa, T., Terao, Y., Sumitomo, T., Nakata, M., Ikebe, K., Maeda, Y., and Kawabata, S.: Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables to evade innate immunity via degradation of complement factors. *J. Biol. Chem.*, 288: 15854-15864, 2013. 査読有

6. Sumitomo, T., Nakata, M., Higashino, M., Terao, Y., and Kawabata, S.: Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J. Biol. Chem.*, **288**: 13317-24, 2013. 査読有
7. Yamaguchi, M., Terao, Y., and Kawabata, S.: The virulence factors and pathogenic mechanisms on *Streptococcus pyogenes*. *Cell. Microbiol.*, **15**: 503-511, 2013. 査読有
8. Okahashi, N., Nakata, M., Sumitomo, T., Terao, Y., and Kawabata, S.: Hydrogen peroxide produced by oral streptococci induces macrophage cell death. *PLoS one*, **8**: e62563, 2013. 査読有
9. Ogawa T., Terao Y., Honda-Ogawa M., Hashimoto S., Ikebe K., Maeda Y., and Kawabata S.: MicroRNA fragments derived from *Streptococcus pyogenes* enable activation of neutrophil phagocytosis: in vitro study. *Microb. Infect.*, **15**: 212-218, 2013. 査読有
10. Murakami, J., Terao, Y., Morisaki, I., Hamada, S., and Kawabata, S.: Group A streptococcus adheres to pharyngeal epithelial cells with salivary proline-rich proteins via GrpE chaperone protein. *J. Biol. Chem.*, **287**: 22266-22275, 2012. 査読有
11. Mori, Y., Yamaguchi, M., Terao, Y., Hamada, S., Ooshima, T., and Kawabata, S.: -enolase of *Streptococcus pneumoniae* induces formation of neutrophil extracellular traps. *J. Biol. Chem.*, **287**: 10472-10481, 2012. 査読有
12. Ogawa, T., Yamasaki, S., Honda, M., Terao, Y., Kawabata, S., and Maeda, Y.: Long-term survival of salivary streptococci on dental devices made of EVA.: *Int. J. Oral Science*, **4**: 14-8, 2012. 査読有
13. Kimura, K. R., Nakata, M., Sumitomo, T., Kreikemeyer, B., Podbielski, A., Terao, Y., and Kawabata, S.: Involvement of T6 pili in biofilm formation by serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, **194**: 804-812, 2012. 査読有
14. Sumitomo, T., Nakata, M., Yamaguchi, M., Terao, Y., and Kawabata S.: S-carboxymethylcysteine inhibits adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human alveolar epithelial cells. *J. Med. Microbiol.*, **61**: 101-108, 2012. 査読有
- (学会発表) (計 11 件)
1. 寺尾 豊, Lion Award 受賞講演, 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 岡山市, 平成 25 年 9 月 20~22 日.
 2. 寺尾 豊, バイオイメージング研究から始まる感染制御, 金沢医科大学大学院医学研究セミナー講演, 石川市, 平成 25 年 5 月 22 日.
 3. 本多 真理子, 寺尾 豊, 住友 倫子, 中田 匡宣, 川端 重忠, Molecular mechanisms of complement evasion by *Streptococcus pyogenes* cysteine protease SpeB, 第 86 回日本細菌学会総会, 平成 25 年 3 月 18~20 日, 千葉市
 4. Tomoko Sumitomo, Miharu Higashino, Akari Kominami, Masanobu Nakata, Yutaka Terao, and Shigetada Kawabata, Group A streptococcal cysteine proteases, SpeB and Sib35, cleave epithelial junctions, 第 86 回日本細菌学会総会, 平成 25 年 3 月 18~20 日, 千葉市
 5. Masanobu Nakata, Tomoko Sumitomo, Yutaka Terao, Shigeyuki Hamada, and Shigetada Kawabata, Cell wall anchoring mechanism of FCT region type 3 pili in *Streptococcus pyogenes*, 第 86 回日本細菌学会総会, 平成 25 年 3 月 18~20 日, 千葉市.
 6. N. Okahashi, T. Okinaga, A. Sakurai, Y. Terao, M. Nakata, S. Kawabata, T. Nishihara, *Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death of macrophages, 第 86 回日本細菌学会総会, 平成 25 年 3 月 18

～20日, 千葉市.

7. 本多 真理子, 寺尾 豊, 住友 倫子, 中田 匡宣, 川端 重忠, ヒト補体免疫系回避機構における *Streptococcus pyogenes* 分泌型プロテアーゼ SpeB の機能解析, 第5回口腔環境制御「カテゴリー集会, 平成25年2月1日, 長崎市.
8. 寺尾 豊, 細菌の感染制御に向けた次世代の基礎的研究展開, 「第60回日本化学療法西日本支部総会」, 「第55回日本感染症学会中日本地方会学術集会」, 「第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会」, 三学会合同集会, 平成24年11月6日, 福岡市.
9. 4. 本多 真理子, 寺尾 豊, 川端 重忠, *Streptococcus pyogenes* のシステインプロテアーゼ SpeB が補体免疫機構に及ぼす影響, 第65回日本細菌学会関西支部総会, 平成24年11月17日, 神戸市.
10. 本多 真理子, 橋本 栄, 寺尾 豊, 川端 重忠, *Streptococcus pyogenes* のシステインプロテアーゼ SpeB による補体免疫回避機構の解析, 第21回Lancefieldレンサ球菌研究会平成24年6月8日, 吹田市.
11. 森田 知里, 中田 匡宣, 木村 敬次Richard, 住友 倫子, 寺尾 豊, 川端 重忠, T6線毛のバイオフィルム形成と菌体凝集への関与, 第21回Lancefieldレンサ球菌研究会, 平成24年6月8日, 吹田市.

(図書) (計2件)

1. 寺尾 豊. ナノスケールの研究を歯科医学に, 日本歯科評論, ヒョーロン・パブリッシャーズ社, 74: 9-11 2014.
2. 寺尾 豊. レンサ球菌感染症の予防・治療法の確立に向けた展望, 化学療法の領域, 医薬ジャーナル社, 29:1447-1453, 2013.

(産業財産権)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

(その他)

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/microbio/microbio.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺尾 豊 (TERAO Yutaka)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 50397717

(2)研究分担者

川端 重忠 (KAWABATA Shigetada)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 50273694

(3)研究分担者

中田 匡宣 (NAKATA Masanobu)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 90444497

(4)研究分担者

住友 倫子 (SUMITOMO Tomoko)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 50423421