

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860021

研究課題名(和文)多足型DNA構造体を基盤とする dendritic nano-sized DDSの開発

研究課題名(英文)Development of polypodna based dendritic nano-sized DDS

## 研究代表者

毛利 浩太 (Mohri, Kohta)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：30723697

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)：本研究では、免疫刺激性CpG DNA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)を基盤とした dendritic nano-sized DDSの創出を目指した。その結果、polypodna末端に接着性の突出末端を付与することで、酵素反応を用いずに dendritic nano-sized DNA(DL-DNA)を作製すること成功した。さらに、DL-DNAは免疫細胞に効率的に取り込まれ、CpG DNAによるサイトカイン産生を飛躍的に増大した。以上、本手法で開発したDL-DNAが有用な核酸 nano-sized DDSに成る可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：To increase the therapeutic potency of immunostimulatory CpG DNA, we tried to develop polypod-like structured DNA, or polypodna based dendritic nano-sized DDS. We succeeded in constructing dendritic-like DNA (DL-DNA) by connecting polypodnas through their adhesive terminal ends, but not ligating with enzymatic reaction. Furthermore, we found that DL-DNA was efficiently taken up by immune cells, which dramatically increased the cytokine release by CpG DNA. Thus, we have shown that the DL-DNA developed by this approach, can be an useful nano-sized DDS for increasing the potency of nucleic acid drugs.

研究分野：薬学

キーワード：核酸 ナノ粒子 DDS CpGモチーフ

## 1. 研究開始当初の背景

1991年に米国 Seeman 教授がキューブ状の DNA 構造体が構築可能であることを報告したのを契機に、様々な形状の DNA 構造体を構築する研究が行われるようになり、「DNA ナノテクノロジー」と呼ばれる新たな研究領域として発展してきた。DNA は遺伝情報の本体であるとともに、配列特異的な分子認識性や化学修飾の容易さ、生体適合性に優れた高分子である。DNA 構造体の構造は、ナノスケールで設計可能であり、これにより DNA の機能を飛躍的に増大可能であることから、多岐に渡る分野・領域においてその利用が期待されている。しかしながら、天然には存在しない構造の DNA 構造体と生体との相互作用に関する報告は少なく、ナノサイズ DNA 構造体を利用したドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発に関する更なる研究が期待されている。

申請者は、DNA ナノテクノロジーを利用することで構築可能な DNA 構造体を利用した DDS の開発を目的に、免疫刺激性核酸として広く知られる CpG DNA を機能性核酸として選択し、その立体化による免疫賦活化作用の増強に関する研究を行ってきた。その中で、CpG DNA を用いて Y 型 DNA (Y-DNA) や X 型 DNA (X-DNA) を構築したところ、これらが通常の 1 本鎖、2 本鎖 CpG 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、X-DNA を DNA リガーゼを用いて無数に連結することで免疫刺激性 DNA ハイドロゲルを開発し、これに抗癌剤を内包させることで非常に高い抗腫瘍効果が得られることも明らかにした。最近では、これらの研究成果を元に、複数の足を有する多足型構造体を形成する DNA ( polypod-like structured DNA; polypodna ) を新たに考案し、分岐数の多い polypodna が免疫細胞に効率的に取り込まれ、CpG DNA によるサイトカイン産生を有意に増大させることを明らかにしている。さらに、申請者が所属するグループは、tripodna ( Y-DNA ) を DNA リガーゼを用いて連結することで dendritic DNA ( DL-DNA ) を作製し、この多分岐型 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、免疫活性化にも非常に優れたシステムであることを明らかにしている。

以上、申請者自身によるこれらの成果は、免疫刺激性 CpG DNA のデリバリーに、polypodna および polypodna を連結することで構築可能な DL-DNA 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、核酸ナノ構造体を利用した CpG DNA のデリバリー技術の開発には、DNA 構造体の構造 - 活性相関の解明が必須であった。さらに、抗原性や安全性の観点から、酵素反応を必要としない DL-DNA の新規調製法の開発も望まれていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、多足型 DNA 構造体 ( polypodna ) の末端に接着性の突出末端を付与することで、接着末端を介して polypodna 同士を連結可能な酵素反応を必要としない dendritic DNA ( DL-DNA ) の新規調製方法を開発する。機能性核酸として CpG DNA を選択し、連結させる polypodna の足 ( pod ) 数や連結世代数を変更することで、DL-DNA の形成効率、融解温度 (  $T_m$  )、サイズ、細胞取り込み、サイトカイン産生などを指標に DL-DNA 構造の最適化を図る。以上の検討を通じ、疾患治療に有効な免疫活性型 dendritic DNA を利用した nano-DDS の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 酵素反応を必要としない DL-DNA の構築

Polypodna に 12 塩基の接着性の突出末端を付与する。この接着末端の配列を設計することで、接着末端を介して polypodna 同士を連結可能な DL-DNA を新たに設計した。DL-DNA の形成は、電気泳動法 ( PAGE ) および原子間力顕微鏡 ( AFM ) 観察により確認した。

### DL-DNA の物性評価

各種 polypodna および DL-DNA の温度上昇に伴う 260 nm における吸光度変化を測定することで、 $T_m$  を算出した。動的分散 ( DLS ) 法により、各種 polypodna および DL-DNA のサイズを測定した。

### DL-DNA の細胞相互作用の評価

Alexa Fluor 488 標識した DNA を用いて、各種 polypodna および DL-DNA を調製した。この蛍光修飾 DNA 構造体を、マクロファージ様細胞株 RAW264.7、樹状細胞株 DC2.4、繊維芽細胞株 NIH3T3、大動脈内皮細胞株 MAEC、卵黄嚢由来内皮細胞株 C166 に添加したときの細胞との相互作用をフローサイトメトリー法 ( FACS ) および共焦点レーザー顕微鏡観察を用いて評価した。

### DL-DNA の免疫活性化能の評価

機能性核酸として CpG DNA を選択し、CpG DNA を用いて各種 polypodna および DL-DNA を調製した。この免疫活性型 DNA 構造体を RAW264.7 細胞に添加したときの血清中 TNF- $\alpha$  濃度を ELISA 法を用いて測定した。

## 4. 研究成果

最も簡素な polypodna 構造である pod 数が 3 の tripodna に 12 塩基の接着性突出末端を付与した 5 種の tripodna を設計・構築した ( 図 1 )。この tripodna を用いて、酵素反応を必要としない第 1~3 世代の DL-DNA を新たに構築した。AFM の結果から、4 個の tripodna から構成される第 1 世代 DL-DNA および 10 個の tripodna から構成される第 2 世代 DL-DNA

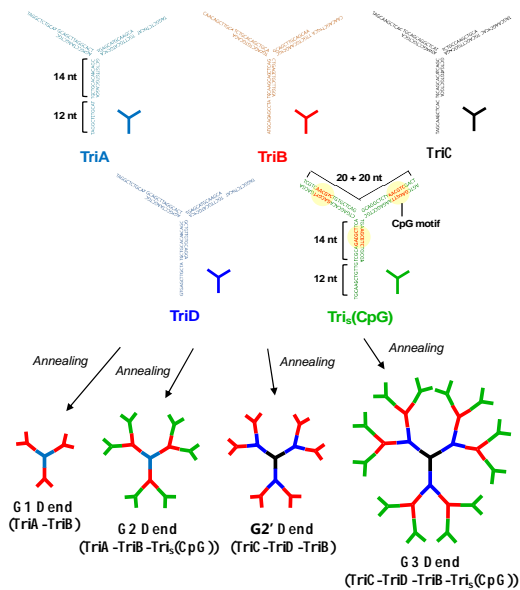


図1. 5種のtripodnaおよび第1～3世代DL-DNAの平面模式図。

は、設計通りの構造が確認された。一方、第3世代DL-DNAの形成は確認されなかった。PAGEの結果では、第1世代DL-DNAは単一のバンドが確認されたものの、第2世代DL-DNAは複数のバンドが確認された。さらに、第3世代DL-DNAのバンドはほとんど確認されず、連結する世代数依存的にDL-DNAの形成効率が低下したと考えられた。別途、非接着性の末端を付与した tripodna を用いて同様の検討を行ったところ、DL-DNAの形成は認められなかった。この結果から、接着末端を介して polypodna 同士が連結することでDL-DNAは構築され、酵素反応を必要としない新規DL-DNA調整法の開発に成功した。

CpGモチーフを組み込んだ tripodna を最外殻として第1～3世代の免疫活性化型DL-DNAを調製した。この免疫活性化型DL-DNAをマクロファージ様細胞株RAW264.7に添加したところ、いずれのDL-DNAも、tripodnaに比べて、多量のTNF- $\alpha$ 産生を誘導した。しかしながら、第1、2世代のDL-DNAによるTNF- $\alpha$ 産生量には、顕著な差は認められなかった。第3世代DL-DNAによるTNF- $\alpha$ 産生量は最も低かった。これらの結果から、DL-DNAの形

		Core polypodna		
		Y Tripodna	X Tetrapodna	* Hexapodna
Shell polypodna	Tripodna			
	Tetrapodna			
	Hexapodna			

図2. Core・shell構造にtripodna、tetrapodna、hexapodnaを有する第1世代DL-DNAの平面模式図。

成効率が免疫活性化能に影響したと推察した。

次に、DL-DNAを構成する polypodna 構造の影響について検討した。DL-DNAには、形成効率および免疫活性化能の高い第1世代DL-DNAを選択した。DL-DNAの中心の polypodna を core-polypodna、外側の polypodna を shell-polypodna とし、pod 数が3、4、6の tripodna、tetrapodna、hexapodna を用いて core-shell 構造の異なる9種の第1世代DL-DNAを調製した(図2)。PAGEの結果では、core構造が tripodna および tetrapodna のDL-DNAは、shell構造が tripodna、tetrapodna、hexapodna のいずれの場合にも単一のバンドが確認された。Core構造が hexapodna の場合には、shell構造が tripodna のときに単一のバンドが確認されたものの、tetrapodna、hexapodna の場合には複数のバンドが確認された。AFMの結果から、core構造が tripodna、tetrapodna、hexapodna、shell構造が tripodna のDL-DNAは、設計通りの構造が確認された(図3)。

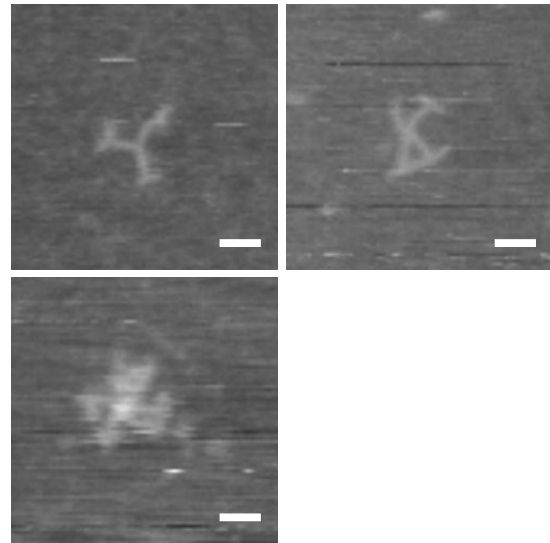


図3. Core構造にtripodna(左上)、tetrapodna(右上)、hexapodna(左下)、shell構造にtripodnaを有する第1世代DL-DNAの原子間力顕微鏡像。

DL-DNAを構成する各種 polypodna のサイズは、約10 nmであった。9種の第1世代DL-DNAは、いずれも構成する polypodna のサイズよりも大きかった。中でも、core構造に hexapodna、shell構造に tripodna を有するDL-DNAのサイズが最も大きく、約20 nmであった。PolypodnaのTm値は、pod数の増加に伴い低下した。DL-DNAにおいても、構成される polypodna の pod 数依存的にTm値は低下した。

Alexa Fluor 488 標識した tripodna を shell 構造とし、core構造が tripodna、tetrapodna、hexapodna の3種の蛍光標識DL-DNAを調製した。これら蛍光標識を施した shell-tripodna および各種DL-DNAをRAW264.7細胞に添加したところ、いずれのDL-DNAも、tripodna

に比べて、効率的に RAW264.7 細胞に取り込まれた。さらに、この取り込みは、core-polypodna の pod 数の増加に伴って増大した。別途、4 °C 温度条件において、同様の検討を行った。その結果、tripodna および DL-DNA と細胞との相互作用を認められず、RAW264.7 細胞による polypodna および DL-DNA の取り込みは温度依存性であることを明らかにした。

RAW264.7 細胞との相互作用に加えて、DL-DNA を構成する polypodna と、樹状細胞株 DC2.4、繊維芽細胞株 NIH3T3、大動脈内皮細胞株 MAEC、卵黄嚢由来内皮細胞株 C166 との相互作用についても検討した。その結果、polypodna は RAW264.7 細胞および DC2.4 細胞に効率的に取り込まれた。一方、繊維芽細胞や上皮細胞による細胞取り込みは僅かであった。この結果から、polyodna および DL-DNA は、貪食能・抗原提示能を有する免疫細胞に選択的かつ効率的に取り込まれたと推察した。

CpG モチーフを組み込んだ tripodna を shell 構造として、core 構造が tripodna、tetrapodna、hexapodna の免疫活性型 DL-DNA を調製した。これら免疫活性型 tripodna および各種 DL-DNA を RAW264.7 細胞に添加したところ、いずれの DL-DNA も、tripodna に比べて、多量の TNF- $\alpha$  産生を誘導した。さらに、この TNF- $\alpha$  産生は、core-polypodna の pod 数の増加に伴って増大した。一方、core 構造に非接着性の末端を付与した hexapodna を用いた場合には、TNF- $\alpha$  産生の増大を認められなかった。この結果から、DL-DNA 構造により CpG DNA のサイトカイン産生能を増強可能であることを見出した。

最後に、上記の CpG モチーフを組み込んだ tripodna を shell 構造に有する免疫活性型 DL-DNA に加えて、shell 構造に CpG モチーフを組み込んだ tetrapodna および hexapodna も用いて、9 種の免疫活性型 DL-DNA を調製した。調製した免疫活性型 polypodna および DL-DNA の RAW264.7 細胞による細胞取り込みおよび TNF- $\alpha$  産生について検討した。その結果、細胞取り込みとサイトカイン産生の間に正の相関関係が認められた。この結果から、免疫活性型 DL-DNA によるサイトカイン産生の増強には、細胞取り込みの亢進が大きく寄与することを明らかにした。さらに、core 構造に hexapodna、shell 構造に tripodna を有する免疫活性型 DL-DNA は、多量のサイトカイン産生を誘導したことから、この DL-DNA 構造が CpG DNA による免疫活性を最も効率的に増強可能な DL-DNA 構造であることを見出した。

以上、本研究で開発した酵素反応を必要としない DL-DNA は、CpG DNA の免疫活性化能を増強可能であることを見出し、疾患治療に有用なアジュバントに成る可能性を有することが明らかとなった。

## 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2件)

(1) Shozo Ohtsuki, Noriyuki Matsuzaki, Kohta Mohri, Masayuki Endo, Kumi Hidaka, Hiroshi Sugiyama, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura, Makiya Nishikawa. Optimal arrangement of four short DNA strands for delivery of nucleic acid drugs to immune cells. *Nucleic Acid Therapeutics*, 25(5) (2015) 245-253. doi: 10.1089/nat.2014.0524. 査読有.

(2) Kohta Mohri, Eri Kusuki, Shozo Ohtsuki, Natsuki Takahashi, Masayuki Endo, Kumi Hidaka, Hiroshi Sugiyama, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura, Makiya Nishikawa. Self-assembling DNA dendrimer for effective delivery of immunostimulatory CpG DNA to immune cells. *Biomacromolecules*, 16(4) (2015) 1095-1101. doi: 10.1021/bm501731f. 査読有.

[学会発表](計8件)

(1) 松下奈央, 毛利浩太, 林英美, 西野真名仁, 西川元也, 佐久間信至. グアニンを豊富に含むオリゴヌクレオチドを付与した多足型 DNA 構造体のがん細胞指向性の評価. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25 日, 仙台.

(2) 野々村茉緒, 毛利浩太, 西川元也, 佐久間信至. Kissing-loop 相互作用を介して多足型 DNA 構造体を連結した DNA ハイドロゲルの開発. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25 日, 仙台.

(3) 林英美, 毛利浩太, 西川元也, 西野真名仁, 谷下宗平, 佐久間信至. がん指向性の向上を目的とした guanine-rich オリゴヌクレオチドを付与した多足型 DNA 構造体の開発. 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 2016 年 7 月 1 日, 静岡.

(4) 永田健吾, 毛利浩太, 外山詩菜, 高橋有己, 高倉喜信, 西川元也, 佐久間信至. Polypodna 構造による CpG DNA の免疫活性増強メカニズムの解明. 日本薬剤学会第 31 年会, 2016 年 5 月 21 日, 岐阜.

(5) 外山詩菜, 永田健悟, 毛利浩太, 西川元也, 高橋有己, 高倉喜信, 佐久間信至. 多足型構造体による CpG DNA の免疫活性増強メカニズムの解析. 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2015 年 10 月 17 日, 富田林.

(6) 谷下宗平, 林英美, 毛利浩太, 西川元也, 佐久間信至. がん指向性 DNA 構造体の開発を目的とした G-rich DNA アプタマーの基礎検討. 第 31 回日本 DDS 学会, 2015 年 7 月 2 日, 東京.

(7) Kohta Mohri, Makiya Nishikawa, Shiori Toyama, Kengo Nagata, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura, Shinji Sakuma. Elucidation of the Mechanism of Increased Activity of Immunostimulatory DNA by Formation of

Polypod-like Structure. The 42nd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, July 28, 2015, Edinburgh (Scotland).

(8) 毛利浩太 . 免疫刺激性 CpG DNA デリバリーのための自己組織型 DNA デンドリマーの開発 . 日本薬剤学会英語セミナー , 2015 年 3 月 13 日 , 東京 .

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

毛利 浩太 ( MOHRI KOHTA )

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号 : 30723697