

12. 核酸ナノ構造体を基盤とする疾患治療システムの開発

西川 元也

京都大学 大学院薬学研究科 病態情報薬学分野

Key words : DNA ナノテクノロジー, CpG モチーフ, 抗原, ワクチン, がん治療

緒言

癌や感染症に対して、抗原を投与することで抗原特異的な免疫応答を誘導する免疫療法が期待されている。抗原の投与に際しては、薬物体内動態の精密制御を目的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) の利用が必須と考えられ、高い治療効果を得るためには抗原を必要な時間、必要な場所に、必要な量だけ送り届けることが重要である。抗原を対象にこれまで様々な DDS が考案され、その有用性が報告されているものの、①抗原の標的への効率的な送達や②持続的な供給 (放出)、③生体適合性、④生分解性・安全性、⑤投与の簡便性など、有効な DDS に必要とされる条件を全て満たすシステムは開発されていない。また、最近の研究では、自然免疫を適度に活性化する免疫アジュバントが免疫療法の治療効果増強に重要であることが報告されており、抗原に加えてアジュバントのデリバリーをも可能にするシステムの開発が望まれる。

我々はこれまでに、Toll 様受容体 9 (TLR9) のリガンドである非メチル化 CG 配列を含む DNA (CpG DNA) を利用した免疫アジュバントの開発に取り組み、多足型構造を形成する核酸 (polypod-like structured nucleic acid: polypodna) が、免疫細胞への CpG DNA の効率的なデリバリーならびに高いサイトカイン産生を可能にする有用な核酸ナノ構造体であることを見出した¹⁻⁷⁾。さらに、自己会合可能な polypodna を設計することで自己ゲル化核酸を開発し、CpG DNA を用いて作製した CpG DNA ハイドロゲルが上記①-⑤の条件に加えて、免疫アジュバント活性をも有するシステムであり、卵白アルブミン (OVA) を内包することで OVA に対する特異的な免疫応答を増強できることを報告した⁸⁾。一方、DNA ハイドロゲルからの OVA の放出が比較的速やかなことも明らかとなった。そこで本研究では、抗原をカチオン化することで CpG DNA ハイドロゲルからの徐放化ならびにワクチン効果の増強を試みた⁹⁾。

方法

1. 動物実験：動物実験は京都大学大学院薬学研究科動物実験委員会の承認を得て実施した。
2. 細胞培養：検討には、マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞およびマウスリンパ腫 EL4 細胞の OVA 強制発現株 EG7-OVA 細胞、OVA のクラス I 抗原に対するマウス T 細胞ハイブリドーマ CD8OVA1.3 細胞を用いた。
3. OVA のカチオン化：OVA とエチレンジアミン (ED) を反応させることでカチオン化 OVA (ED-OVA) を合成した。必要に応じて、fluorescein isothiocyanate isomer 1 (FITC) で蛍光標識した。
4. ペプチド：OVA のクラス I ペプチド (pepI: SIINFEKL) および pepI にリンカーを介してオクタアルギニンを連結した R8-L2-pepI(RRRRRRRRFRKSIINFEKL)、ならびにこれらの FITC 標識体は GenScript 社から購入した。
5. Polypodna および DNA ハイドロゲルの作製：既報⁸⁾に従い、部分的に相補な 6 種類のオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) をアニーリングすることで 6 本足の polypodna である hexapodna を作製した。また、末端部分が相補的な 2 種類の hexapodna を混合することで DNA ハイドロゲルを得た。ここで、ODN 配列中に CpG 配列または GpC 配列を組み込むことで免疫刺激性 CpG DNA ハイドロゲルと非免疫刺激性 GpC DNA ハイドロゲルを作製した。
6. 抗原-DNA 複合体の形成：ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、OVA 誘導体と hexapodna との相互作用を評価した。
7. DNA ハイドロゲルからの抗原の放出：既報⁸⁾に従い、FITC-OVA 誘導体の放出挙動を評価した。
8. 抗原提示：既報⁸⁾に従い、CD8OVA1.3 細胞と DC2.4 細胞を用いて抗原提示を評価した。

9. 抗原の細胞取り込み：DC2.4 細胞に FITC-OVA 誘導体を添加し、細胞の蛍光強度を指標に細胞取り込みを評価した。

10. 投与部位からの抗原の消失：麻酔下、マウスに FITC-OVA 誘導体を単独あるいは DNA ハイドロゲルに内包して皮内投与した。投与一定時間後に投与部位を摘出し、ホモジネート上清中の蛍光強度を測定した。

11. マウスへの免疫：麻酔下、C57BL/6 マウスに OVA 誘導体を単独あるいは DNA ハイドロゲル、または Freund の完全アジュバント (CFA) に内包して、7 日間隔で 3 回皮内投与した。最終免疫 7 日後に血清と脾臓を回収し、脾臓重量および OVA 特異的抗体価、脾臓細胞からの interferon (IFN)- γ 産生を測定した。また、摘出皮膚をヘマトキシリン・エオジン染色し、投与部位の肥厚ならびに細胞浸潤を評価した。

12. 担癌マウスへの投与：各サンプルは、EG7-OVA 担癌マウスの腫瘍内に 5 日間隔で合計 3 回投与した。

13. 統計処理：実験結果は一元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法の多重比較を行い、P 値が 0.05 未満を有意と判定した。

結果および考察

1. 抗原内包 DNA ハイドロゲルの細胞との相互作用解析

電気泳動の結果、ED-OVA が hexapodna と複合体を形成することが確認された。DNA ハイドロゲルからの FITC-ED-OVA の放出は、FITC-OVA よりも遅く、DNA との複合体として放出されることが示された (図 1a)。FITC-ED-OVA は、FITC-OVA と比較して DC2.4 細胞に効率よく取り込まれた (図 1b)。また、この取り込みは DNA ハイドロゲルの添加により有意に増大し、これに伴い抗原提示も向上した (図 1c)。

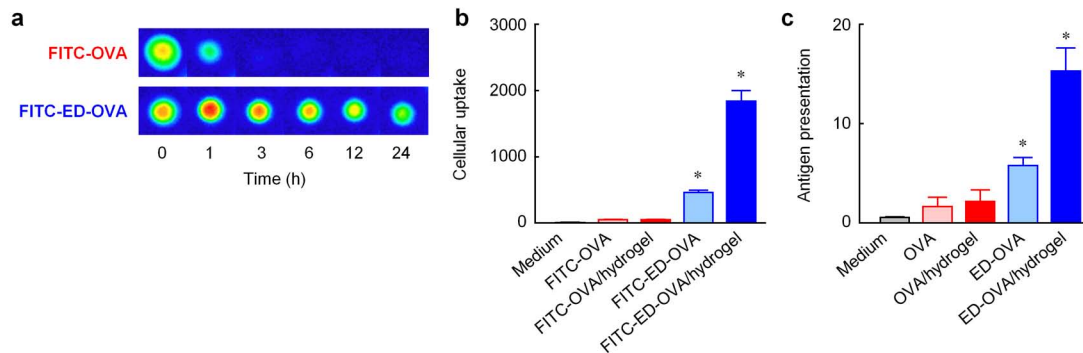


図 1. DNA ハイドロゲルからの抗原放出ならびに DC2.4 との相互作用

a) DNA ハイドロゲルからの FITC 標識 OVA および ED-OVA の放出を蛍光強度を経時的に測定することで評価した。b) FITC 標識 OVA または ED-OVA を DC2.4 細胞に添加し、細胞の蛍光強度を指標に細胞取り込みを評価した。* $P < 0.05$ (対 medium 群)。c) OVA または ED-OVA を DC2.4 細胞に添加し、細胞からの IL-2 産生を指標に抗原提示を評価した。* $P < 0.05$ (対 medium 群)。

2. 抗原内包 DNA ハイドロゲルの抗腫瘍効果

FITC-ED-OVA の投与部位からの消失は遅く、DNA ハイドロゲルへの内包によりさらに遅延した。ED-OVA で免疫したマウスは OVA 特異的抗体価が高く、CpG DNA ハイドロゲルへの内包によりさらに高くなった (図 2a)。脾臓細胞からの IFN- γ 産生でも同様の結果が得られた。TLR9^{-/-}マウスでは CpG DNA ハイドロゲルによる IFN- γ 産生増強作用は認められなかった。CFA 投与群を除き脾臓の肥大は認められず、投与部位局所の炎症反応も DNA ハイドロゲル投与群では軽微であった。

ED-OVA を CpG DNA hydrogel に内包した群で最も腫瘍増殖が抑制され、一部マウスでは完全退縮が認められた。OVA に代えて OVA の MHC クラス I ペプチド pepI を用いて同様の検討を行ったところ、FITC-R8-L2-pepI は FITC-pepI と比較して DNA ハイドロゲルから徐放された。また、R8-L2-pepI 内包 CpG DNA hydrogel を腫瘍内投与することで EG7-OVA 腫瘍の増殖は有意に遅延し (図 2b)、担癌マウスの生存期間も有意に延長した。

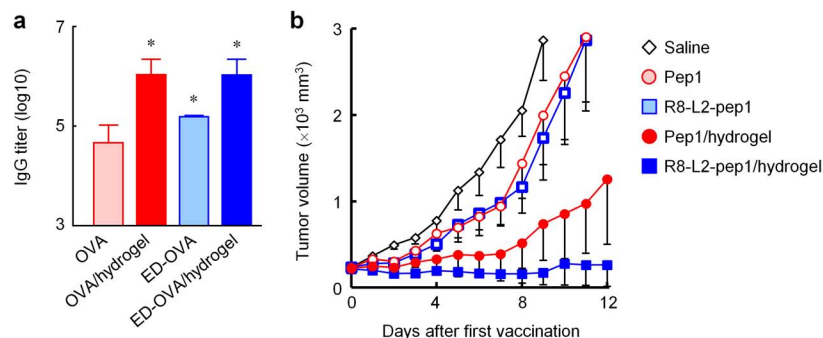


図2. マウスへの投与による免疫応答および抗腫瘍効果

- a) マウスに OVA または ED-OVA を免疫し、血中 OVA 特異的 IgG を測定した。*P < 0.05 (対 OVA 群)。
 b) EG7-OVA 担癌マウスに OVA または ED-OVA を腫瘍内投与し、経日的に腫瘍体積を測定した。

抗原をカチオン化することで CpG DNA ハイドロゲルからの徐放化が可能であり、これによりワクチン効果が著しく向上した。また、このワクチン効果には CpG DNA による自然免疫の活性化も重要であることが明らかとなったことから、CpG DNA ハイドロゲルが、投与が簡便かつ徐放性に優れるという製剤的な特長に加えて、アジュバント機能をも具備する有効な抗原デリバリーシステムになりうる可能性を見出した。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学大学院薬学研究科の梅木佑夏および高橋有己、高倉喜信である。

文献

- 1) Nishikawa M, Matono M, Rattanakiat S, Matsuoka N, Takakura Y. Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation. *Immunology*. 2008;124(2):247-55. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02762.x. PMID: 18217956
- 2) Rattanakiat S, Nishikawa M, Funabashi H, Luo D, Takakura Y. The assembly of a short linear natural cytosine-phosphate-guanine DNA into dendritic structures and its effect on immunostimulatory activity. *Biomaterials*. 2009;30(29):5701-6. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.053. PMID: 19604576
- 3) Matsuoka N, Nishikawa M, Mohri K, Rattanakiat S, Takakura Y. Structural and immunostimulatory properties of Y-shaped DNA consisting of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J Control Release*. 2010;148(3):311-6. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.09.019. PMID: 20887761
- 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(7):5931-40. doi: 10.1021/nn300727j. PMID: 22721419
- 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. *J Control Release*. 2012;163(3):285-92. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.08.001. PMID: 22902518
- 6) 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(4):765-74. doi: 10.1016/j.nano.2013.11.017. PMID: 24333587
- 7) Ohtsuki S, Matsuzaki N, Mohri K, Endo M, Emura T, Hidaka K, Sugiyama H, Takahashi Y, Ishiyama K, Kadowaki N, Takakura Y, Nishikawa M. Optimal arrangement of four short DNA strands for delivery of immunostimulatory nucleic acids to immune cells. *Nucleic Acid Ther*. 2015;25(5):245-53. doi: 10.1089/nat.2014.0524. PMID: 26222130
- 8) 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. *J Control Release*. 2014;180:25-32. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.02.001. PMID: 24530618

- 9) Umeki Y, Mohri K, Kawasaki Y, Watanabe H, Takahashi R, Takahashi Y, Takakura Y, Nishikawa M. Induction of potent antitumor immunity by sustained release of cationic antigen from a DNA-based hydrogel with adjuvant activity. *Adv Funct Mater.* 2015;25:5758-67. doi: 10.1002/adfm.201502139.