

# 京都大学教育研究振興財団助成事業 成 果 報 告 書

2021年4月16日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 薬学研究科

職 名 助教

氏 名 河本 佑介

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |         |  |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------|--|
| 助 成 の 種 類                       | <b>令和2年度 ・ 研究活動推進助成</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |               |         |  |
| 申請時の科研費<br>研究 課 題 名             | 多機能性DNAミセルを用いた薬物輸送システムの開発                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |               |         |  |
| 上記以外で助成金<br>を 充 当 した<br>研 究 内 容 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |         |  |
| 助成金充当に関<br>わる共同研究者              | (所属・職名・氏名)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |               |         |  |
| 発表学会文献等                         | (この研究成果を発表した学会・文献等) 日本薬学会 第141年会にて発表                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |               |         |  |
| 成 果 の 概 要                       | <b>研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                    |               |         |  |
| 会 計 報 告                         | 交付を受けた助成金額                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1,000,000 円   |         |  |
|                                 | 使用した助成金額                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1,000,000 円   |         |  |
|                                 | 返納すべき助成金額                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 0 円           |         |  |
|                                 | 助成金の使途内訳                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 費 目           | 金 額     |  |
|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 消耗品(器材、合成原料等) | 967,710 |  |
|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 学会参加費用        | 28,000  |  |
|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | その他           | 4,290   |  |
|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |         |  |
|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |               |         |  |
| 当財団の助成に<br>つ い て                | <p>(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)</p> <p>2020年度の科研費は、申請時期が着任直後でしたので準備期間が不足し不採択となり、また私のテーマが所属研究室の主流テーマと大きく異なるので研究資金を融通していただくことが難しく、研究の立ち上げが困難であると感じておりましたところ、貴財団のご支援をいただけ大変嬉しく存じます。研究テーマの見直しを行いましたので申請内容から一部変更することになりましたが、1年で有望な成果を上げることができ、2021年度の科研費若手研究に無事採択していただくことになりました。本助成事業により1人でも多くの研究者が研究を継続できるようになれば幸いです。</p> |               |         |  |

近年核酸医薬品が高選択性を有する新しい中分子医薬品として注目を集めつつある。核酸医薬品には遺伝子発現を制御するアンチセンス核酸 (ASO)、siRNA、免疫細胞に発現する Toll-like receptor 9 (TLR9) に結合して免疫応答を誘導する非メチル化 CpG DNA などがある。しかし臨床応用に向けて広く用いられてきた、リン酸結合の phosphorothioate 化及びカチオン性分子との複合体形成による細胞取り込みの促進と核酸分子安定化の技術には、細胞内の非特異的相互作用の増大による細胞毒性と副作用の問題が指摘されている。一方で、天然型 DNA 分子の二重鎖形成を利用して構築する核酸ナノ構造体に核酸医薬を導入することで、核酸医薬のヌクレアーゼ耐性と細胞取り込みが向上することが分かってきた。申請者の所属研究室ではこれまで、非メチル化 CpG 配列を含みドラッグキャリアとして機能する、核酸ナノ構造体の開発を行ってきた<sup>1</sup>。しかし治療効果を示す前に、血液中の陽イオン濃度、pH、体温等に依存して核酸ナノ構造体が崩れる可能性がある<sup>2</sup>。また核酸ナノ構造体のヌクレアーゼ耐性は構造依存的なため *in vivo* での応用が限られている。さらに核酸ナノ構造体の構築には数十種類ものオリゴヌクレオチドを用いた複雑な設計が必要なこともあり、形成効率やコストも実用化に向けて解決すべき課題である。必要な核酸分子の数を少なくすることで構造を単純化し、かつ安定性、安全性ともに高い、核酸医薬の開発が求められている。

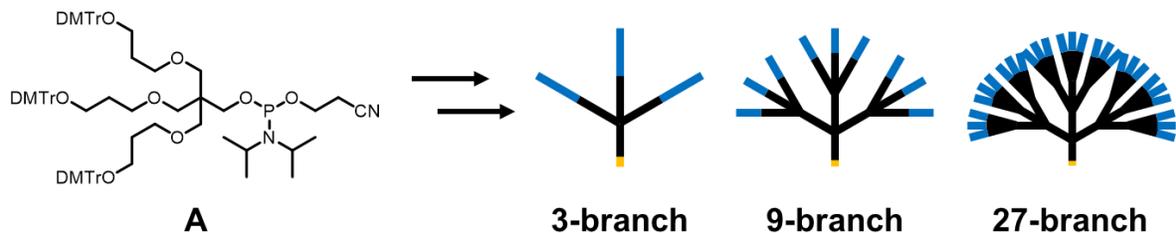
そこで申請者は、天然型の核酸をベースに複数の核酸分子を共有結合により一分子にした、デンドリマー型核酸に注目した。これは核酸ナノ構造体と同様に、複数種の機能性配列を同時に導入でき、多機能化、多価化による治療効果の向上を期待できる。また共有結合により複数の DNA 鎖を連結しているため、DNA ナノ構造体よりも必要な核酸分子の種類と量を減らせ、さらに導入した DNA 鎖が解離せずその機能を発揮できる。本研究で申請者は、デンドリマー型核酸の医薬品としての応用に向けて、非メチル化 CpG 配列を導入したデンドリマー型核酸を合成し、その免疫刺激能などの評価を行った。

まず申請者はデンドリマー構造を与えるホスホロアミダイト **A** を使用して、非メチル化 CpG を含む配列を 3 本、9 本、27 本ずつ含むデンドリマー型 DNA (それぞれ **3-branch**, **9-branch**, **27-branch**) を合成した。それぞれのデンドリマー型 DNA に加えて比較対象として非メチル化 CpG を 1 か所所有する通常の DNA を、系中の CpG 濃度が等しくなるようマウスマクロファージ細胞に処理し、8 時間経過後に培地を回収して ELISA 法により炎症性サイトカイン産生量を調べた。その結果、全てのデンドリマー型 DNA が通常の DNA より炎症性サイトカインの産生を促した。そして **9-branch** が最も高いサイトカイン産生を示した。**27-branch** が **9-branch** よりサイトカイン産生が少なかったのは、自身の混み合った構造により TLR9 の結合が妨げられたからだと考えられる。

次に申請者は血清中のヌクレアーゼ耐性に対する耐性を調べるため、通常の DNA と **3-branch**、**9-branch** を FBS で処理してその分解の時間経過を調べた。その結果、**3-branch**

と **9-branch** は通常の DNA より高い分解耐性を示した。これはデンドリマーの枝分かれ構造による立体障害により、血清中のヌクレアーゼによる分解が妨げられたからだと考えられる。

以上、申請者はデンドリマー型 DNA が免疫刺激性核酸医薬として有用性であることを示した。現在、それぞれの構造で細胞取り込みの差に違いが見られるか FACS で調べるため、蛍光基で標識した DNA の合成を進めている。また *in vivo* での応用に向けヌクレアーゼ耐性を高めるため、化学修飾を加えた DNA の合成も計画している。



## 参考文献

- 1, Mohri, K.; Nishikawa, M.; Takahashi, N.; Shiomi, T.; Matsuoka, N.; Ogawa, K.; Endo, M.; Hidaka, K.; Sugiyama, H.; Takahashi, Y.; Takakura, Y. *ACS Nano* **2012**, *6*, 5931–5940.
- 2, Bila, H.; Kurisinkal, E. E.; Bastings, M. M. C. *Biomater. Sci.* **2019**, *7*, 532–541.