



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Enhancement of immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotide by using boron nitride nanospheres [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	張, 慧傑
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11110号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53776
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Huijie_Zhang_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 張 慧傑

審査担当者	主 査	客員教授	花 方 信 孝
	副 査	教 授	幸 田 敏 明
	副 査	教 授	出 村 誠
	副 査	客員准教授	山 崎 智 彦

学 位 論 文 題 名

Enhancement of immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotide by
using boron nitride nanospheres
(窒化ホウ素ナノ粒子を用いた CpG オリゴデオキシヌクレオチドの免疫活性化能の向上)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

自然免疫において重要な役割を果たしているトール様受容体 9 (TLR9) のリガンド分子である非メチル化 CpG モチーフを有する合成オリゴデオキシリボヌクレオチド (CpG ODN) は、免疫活性化剤として感染症、アレルギー、喘息の治療、あるいはがんの免疫治療への応用が進められている。しかしながら、CpG ODN 単独では、体内での滞留時間が短く、また血中の核酸分解酵素により分解されやすい。そのために、体内での CpG デリバリーを目的として、様々なナノ粒子が開発されてきた。これらの粒子の多くはナノ粒子内に CpG ODN をカプセル化することで、CpG ODN を TLR9 が存在する細胞内のエンドソームにデリバリーし、徐放した CpG が TLR9 に結合するものである。本学位論文において張慧傑氏はカプセル化ではなくナノ粒子表面に結合させることにより CpG ODN を細胞内に取り込ませ、粒子に結合した CpG ODN が TLR9 を介して免疫活性化に関与しているサイトカインを誘導することができることを証明した。また、CpG の結合方法、結合に用いるポリマー種によりサイトカイン誘導を制御できることを示した。

本研究で用いた窒化ホウ素ナノ粒子 (BN NPs) は直径約 150nm で表面が負に荷電しており、同じく負に荷電している CpG ODN は結合できない。張慧傑氏はファージディスプレイ方法を用いて BN NPs に結合するペプチドを同定した。現在まで BN に結合するペプチドは 1 種類しか報告されておらず、このペプチドはカーボンナノチューブにも結合する。本研究で同定した VDAQSKSYTLHD の配列を持つ BP7 ペプチドは、BN に対して特異的に結合し、その結合はアミノ末端から 8 番目に位置するチロシン残基に依存する特性を有している新規のペプチドであった。BP7 のアミノ基末端にマレイミド基を導入し、3' 末端にチオール基を導入した筆者らのグループで開発したクラス B の直鎖 CpG ODN である CpG-B 2006x3-PD を架橋反応により結合させた。この複合体を BN NPs に添加することで、CpG ODN を BN NPs の表面に導入できた。この粒子を末梢血単核細胞に与えると、IL-6 ならびに TNF- α の炎症性サイトカインが誘導され、細胞からの分泌量は CpG-B 2006x3-PD 単独と比較して有意に高い値を示し、BN NPs の CpG デリバリーキャリアとしての有用性を示した。

一方で、CpG ODN には複雑な高次構造を形成するクラス A と直鎖構造を有するクラス B が存在し、クラス A の CpG ODN は樹状細胞の TLR9 を活性化し IFN- α を誘導し、クラス B の CpG ODN は B 細胞の TLR9 を活性化し炎症性サイトカイン (IL-6, IFN- γ) を誘導する。正に荷電しているポリマーで粒子を覆うことにより、クラス B の CpG ODN は粒子表面で複雑な凝集構造を形成し、クラス A にスイッチングして IFN- α を誘導をするということは報告されている。本論文で、張慧傑氏はポリマーの種類によって誘導する分子種をコントロールできることを示した。ポリエチレンイミン (PEI) 修飾 BN NPs に CpG-B 2006x3-PD を静電的に結合させると CpG-B 2006x3-PD 単独では誘導できない IFN- α を誘導した。一方で同じく正に荷電しているキトサンを修飾した BN NPs を用いると、炎症性サイトカインのみを誘導することが示された。ポリマーの種類によって誘導するサイトカインが異なることは新しい知見であり、その原因としてキトサンがクラス A の CpG ODN の IFN- α 誘導を阻害することを明らかにした。

これを要するに、張慧傑氏は CpG ODN をナノ粒子表面に導入する手法を開発し、その導入方法ならびに粒子表面に導入したポリマーの種類によって、末梢血単核細胞でのサイトカイン誘導を制御できることを明らかにした。張慧傑氏の得た知見は、TLR9 とリガンド分子との相互作用の研究においてに貢献するところ大なるものがある。

よって張慧傑氏は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。