



HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---------------------|---|
| Title | The impact of complex formation and size of guanine quadruplex structure-based CpG oligodeoxynucleotides on immunomodulatory responses [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | LE, Bui Thao Nguyen |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(生命科学) |
| Dissertation Number | 甲第15777号 |
| Issue Date | 2024-03-25 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/92496 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | LE_Bui_Thao_Nguyen_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 LE BUI THAO NGUYEN

| | | | | |
|-------|----|-------|----|----|
| 審査担当者 | 主査 | 客員准教授 | 山崎 | 智彦 |
| | 副査 | 教授 | 相沢 | 智康 |
| | 副査 | 教授 | 中村 | 公則 |
| | 副査 | 客員教授 | 中西 | 尚志 |
| | 副査 | 客員准教授 | 吉川 | 千晶 |

学位論文題名

The impact of complex formation and size of
guanine quadruplex structure-based CpG oligodeoxynucleotides on immunomodulatory responses
(グアニン四重鎖構造形成 CpG オリゴデオキシヌクレオチドの免疫活性化機能に対する
複合体の構成とサイズの影響に関する研究)

博士學位論文審査等の結果について（報告）

ワクチンには抗原分子に加えて免疫を賦活化する分子であるアジュバントが添加されており、アジュバントによりワクチン接種の効果を増強できる。アジュバントとしてはアラムと呼ばれる水酸化アルミニウム結晶が多く用いられているが、アラム由来の副作用が問題視され新しいアジュバントが開発されてきた。その中でも、自然免疫受容体であるツール様受容体9（以下TLR9）のアゴニストであるCG配列を含む一本鎖核酸（以下、CpGオリゴデオキシヌクレオチド）は、新規ワクチンアジュバントとして今後の発展が期待されている状況にある。天然核酸は、体内において核酸分解酵素により短時間で分解されるため、現在ではリン酸骨格を硫黄に置換したホスホロチオエート化核酸が核酸医薬品として研究されているが、ホスホロチオエート化による非特異的な蛋白質吸着に起因する長期的な副作用が未だ懸念されている。申請者のグループでは、ホスホロチオエート化核酸の問題点を解決するために、核酸がテロメアで形成する構造であるグアニン四重鎖(G4)構造の安定性に着目し、未修飾核酸を用いたアジュバント開発を進めてきた。本研究においては、G4構造形成CpGオリゴデオキシヌクレオチドの免疫活性化効果を最大限に高めることを目的として、免疫細胞に効率的に輸送するための核酸-材料の複合体における複合体の構成とサイズの影響に関する研究を進めた。

G4構造形成CpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)の輸送担体としてN-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate（以下DOTAP）をベースに作製したカチオン性リポソームを用い、G4-CpG ODNと複合体を作製し、動的光散乱法による粒子解析、ゼーター電位解析、円偏光二色性(CD)解析、電気泳動による安定性の解析を行った。その結果、G4-CpG ODNは複合体の粒子径を安定に保つこと、また表面電荷をマイナスに保つことが示された。多く報告されているランダム構造を有するCpG ODNはカリオン性リポソーム・粒子と結合することで、マイクロメーターオーダーの凝集体を容易に形成することから、G4構造が複合体の粒子径制御に寄与していることが示唆された。粒子径の制御は、免疫細胞への複合体の取込に関与しており、DOTAPとG4-CpG ODNの量比を検討することにより粒子径を細胞に取り込まれやすい500nm以下のサイズに保つことができる。その結果として、G4-CpG ODNとDOTAPリポソーム複合体は、細胞への取込が増強し、初期エンドソームとライソソームに存在するTLR9に認識されてI型インターフェロンと炎症性サイトカインを高く誘導することを明らかとした。

また、複合体の粒子径と細胞内局在部位と誘導する因子の関係を明らかとするために、5, 20, 100nm の金粒子を用いて表面に G4-CpG ODN を導入した粒子を作製した。その結果、G4-CpG ODN を固定化した 20, 100nm の金粒子は I 型インターフェロンを誘導し、5nm の金粒子は誘導しない結果が得られた。さらに、蛍光分子を修飾した G4-CpG ODN を導入した金粒子の細胞内局在を共焦点顕微鏡観察により解析した結果、5nm の金粒子はライソソーム、20, 100nm の金粒子は初期エンドソームに局在している結果が得られた。即ち、20nm 以上の粒子を形成した G4-CpG ODN は細胞に取り込まれた後に初期エンドソームに滞留することで、I 型インターフェロンを誘導することが明らかとなった。この現象は、G4-CpG ODN 単独では起こらないことから、20nm を境界として細胞内局在が異なり、その結果として誘導されるサイトカインが変化することが明らかとなった。

これを要するに、著者は、グアニン四重鎖構造形成 CpG オリゴデオキシヌクレオチドと材料との複合体が細胞内で機能するための複合体の構成とサイズの影響についての新知見を得たものであり、ワクチンアジュバント研究に対して免疫制御を設計できる方法を提供し、今後の核酸アジュバント開発への貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、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。