HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	A study on the effect of guanine-quadruplex topology on immunostimulatory properties of CpG oligodeoxynucleotides [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Pathak, Soumitra
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16278号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95495
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Soumitra_Pathak_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　Soumitra Pathak

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	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

A study on the effect of guanine-quadruplex topology
on immunostimulatory properties of CpG oligodeoxynucleotides
（グアニン四重鎖構造のトポロジーが CpG オリゴ核酸の免疫活性化能に与える影響）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

近年、ワクチンのアジュバント（免疫反応を増強する分子）に関する研究が盛んに行われている。ワクチンには抗原分子と一緒に免疫を活性化す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されている。現在使用されているワクチンの多くにはアジュバントとしてアルミニウム塩やエマルジョンが用いられているが、抗原分子に対する IgG 抗体の産出を誘導するのと同時に副作用の原因となる IgE 抗体も誘導することから、IgG 抗体のみを誘導するアジュバントの開発が望まれている。CG ジヌクレオチドを含む一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)は免疫細胞内に発現する自然免疫受容体のトール様受容体 9(TLR9)と結合し、IgG 抗体のみを誘導し、また感染細胞を除去する細胞傷害性 T 細胞を誘導することから次世代アジュバントとして着目されている。しかしながら天然核酸は体内で速やかに分解されるため実用には適さない。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。筆者の所属する研究グループでは、核酸がテロメアで形成するグアニン四重鎖(G4)構造の安定性に着目した研究を展開しており、天然核酸を組み込む骨格構造として G4 構造を用いることで、CpG ODN を組み込んだ未修飾核酸アジュバントである G4-CpG ODN の開発を進めている。G4 構造には、核酸配列の向きからパラレル型、アンチパラレル型、ハイブリッド型の３種類のトポロジー構造を形成することが報告されている。トポロジーにより立体構造が異なることから、G4-CpG ODN の免疫活性化効果も変化すると考えられる。筆者は 3 種類のトポロジーを形成する G4-CpG ODN を構築し、ヌクレアーゼ耐性、細胞取込、また免疫活性化能などの各種特性を比較することで、CpG ODN の骨格構造としての G4 構造のトポロジーと免疫活性化効果への影響を解明するための研究を進めた。

G4-CpG ODN の配列を改変することにより、筆者らのグループで報告したハイブリッド型 G4-CpG ODN のトポロジーをパラレル型もしくはアンチパラレル型に改変した G4-CpG ODN を構築した。円偏光二色性（CD）による構造解析、電気泳動によるヌクレアーゼ耐性を解析した。また、マウスマクロファージ細胞株をもちいて、CpG ODN が TLR9 に結合することにより誘導されるインターロイキン(IL)-6 を ELISA により定量することで、免疫活性化効果を評価した。さらに、細胞への取り込み、細胞内を模倣した環境ではレセプターとの相互作用を解析した。その結果、3 種類のトポロジーの中で、パラレル型 G4-CpG ODN がマクロファージ細胞から IL-6 の高い発現を誘導することが示された。G4 構造形成により核酸のヌクレアーゼ耐性ならびに細胞取込が大きく増加する

ことが示された。3 種類のトポロジー構造の中でパラレル型 G4-CpG ODN は細胞取込が高いこと、またスカベンジャーレセプターを介して細胞内に取り込まれることを明らかとした。これらの結果から、細胞内への取り込みに適したパラレル型トポロジー形成により、G4-CpG ODN は高い免疫活性可能を獲得したことが示唆された。

また、G4 構造に結合するリガンド分子を用いることで、構造の安定化と抗原分子との複合化を試みた。パラレル型トポロジーに特異的に結合するリガンド分子をもちいることで、パラレル型 G4-CpG ODN の安定性を向上させ、また抗原分子と G4-CpG ODN との複合体を形成できることを示した。マウスを用いた in vivo での検討の結果、構築した複合体をワクチンとして投与することにより、抗原分子に対する IgG2 抗体の産出を優位に向上させることができた。すなわち、医薬品応用が困難であると考えられていた未修飾核酸アジュバントである G4-CpG ODN が in vivo でアジュバント効果を示すことを実証することができた。

これを要するに、著者はアジュバント機能を有する未修飾核酸である CpG ODN の体内輸送のための骨格構造として機能する G4 構造について、パラレル型トポロジー形成によりその効果が増強されることという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。