

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

核酸をコアとするナノ微粒子による薬物・免疫治療システム
の開発に関する研究

平成 17 年度～19 年度 総合研究報告書

主任研究者 西川 元也

平成 20 (2008) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告	
核酸をコアとするナノ微粒子による薬物・免疫治療システムの開発に関する研究	
西川元也	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 11
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 14

研究要旨 核酸をコアとするナノ粒子を設計・構築し、これに免疫活性化構造と抗癌剤を組み込むことで癌を標的とした薬物・免疫治療システムの開発を試みた。DNA による免疫活性化に関する検討から、非メチル化 CpG 配列（CpG モチーフ）を含む DNA（CpG DNA）によりマウス脾臓マクロファージ及び肝非実質細胞、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞から抗腫瘍サイトカインが産生されることを確認した。また、CpG オリゴヌクレオチド（CpG ODN）をカチオン性リポソーム複合体としてマウス腹腔内に投与することで腹膜播種性癌転移の効率的な抑制に成功した。次いで、毒性が懸念されるカチオン性化合物を用いずに CpG ODN の免疫活性化能を増強するために、ODN の構造修飾による機能増強について検討した。その結果、それぞれ半分ずつ相補的な 3 種類の ODN を用いて調製した Y 型 2 本鎖 ODN（Y-ODN）が、通常構造の ODN と比較して有意に高いサイトカイン産生能を有することを新たに見出した。さらに、Y-ODN を順次連結することで腫瘍ターゲティングに適した約 20 nm のデンドリマー様 DNA の開発に成功し、これが RAW264.7 細胞への添加により Y-ODN よりもはるかに強力なサイトカイン産生能を有することを明らかにした。一方、抗癌剤のデリバリーに関して、プラスミド DNA-ドキシソルビシン（DXR）結合体を作製し、その有用性を評価した。共培養下の結腸癌細胞と RAW264.7 細胞に DNA-DXR を添加したところ、癌細胞増殖は CpG モチーフ依存的に効率よく抑制されることが示された。また、結腸癌転移モデルマウスへの CpG DNA-DXR の静脈内投与により、肝臓での癌細胞増殖は有意に抑制可能であった。以上より、DNA をコアとするナノ粒子を構築し、これに抗癌剤 DXR と免疫活性化のための CpG モチーフを組み込むことで、癌治療に利用可能な薬物・免疫治療システムの開発に成功した。

A. 研究目的

腫瘍組織では血管透過性が亢進し、通常血管壁を透過しないサイズの高分子・微粒子が集積することから、サブミクロン、特に直径 100 nm 以下のナノ粒子を利用することで腫瘍組織への薬物ターゲティングが可能である。これまでに、リポソームやナノスフェアなどをキャリアとした研究が精力的に行われた結果、臨床で利用可能な製剤が開発されるに至っている。しかしながら、依然として癌に対する薬物治療が十分に達成されてい

るとは言い難い。

一方、癌抗原を投与することで生体に備わる免疫機構を活性化する抗腫瘍免疫療法にも多大な関心が寄せられている。DNA ワクチンの場合には、免疫担当細胞で抗原が直接発現することに加えて、DNA 中の非メチル化 CpG 配列（CpG モチーフ）による免疫担当細胞の活性化が抗腫瘍免疫誘導を増強するとされる。そこで本研究では、DNA をコアとしたナノ粒子を新たに設計・構築し、これに抗癌剤と CpG モチーフとを組み込むこ

とで、化学療法及び免疫療法を同時に実現可能な治療システムの開発を試みる。近年、腫瘍組織に集積するマクロファージなどの免疫担当細胞は、腫瘍組織環境下において本来の癌細胞をはじめとする異物を排除する機能が低下し、各種メディエータを放出することで癌細胞の浸潤・転移、増殖を亢進することが報告されている。CpG モチーフは自然免疫を活性化することから、核酸をコアとする薬物キャリアを用いることで、腫瘍組織中に浸潤した免疫担当細胞の活性化による抗腫瘍免疫の誘導が期待される。また、DNA はドキシソルビシン (DXR) など DNA インターカレータとの結合力を有することから、核酸ナノ粒子を用いることで、抗癌剤を腫瘍組織へターゲティングすることも可能と考えられる。抗腫瘍免疫を活性化するとともに抗癌剤による殺細胞効果が期待される本ナノサイズ DDS は、メカニズムの異なる 2 つの癌治療戦略を融合した新規システムであり、リポソームなど生物学的に不活性なキャリアを利用した抗癌剤 DDS とは異なり、相乗的かつ高い抗腫瘍効果が期待される。

B. 研究方法

(1) マウスへの DNA 投与後の TNF- α 産生 : CpG DNA としてルシフェラーゼ発現プラスミド pCMV-Luc を、CpG モチーフが少ない DNA として牛胸腺 (CT) DNA またはメチル化 pCMV-Luc を用いた。検討には ICR マウスを用い、クロドロネート含有リポソームを静脈内投与したマウスをマクロファージ除去マウスとした。カチオン性リポソームには N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-n,n,n-trimethylammonium chloride (DOTMA) とコレステロールをモル比 1:1 で混合した DOTMA/Chol リポソームを作製し、DNA とリポソームを電荷比 1:2.24 (-:+) で混合することでカチオン性リポソーム複合体を調製した。各 DNA を、

単独またはカチオン性リポソーム複合体として静脈内投与し、経時的に血清中および各臓器中の腫瘍壊死因子 (TNF) - α 濃度を ELISA 法により測定した。

(2) DNA による培養細胞からの TNF- α 産生 : ICR マウスから常在性腹腔マクロファージ、脾臓マクロファージ、肝非実質細胞、腎メサンギウム細胞を単離した。対照にはマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を用いた。pCMV-Luc または CT DNA を単独あるいはカチオン性リポソーム複合体として細胞に添加し、一定時間培養後の上清中 TNF- α 濃度を ELISA 法により測定した。別途、各細胞群での Toll-like receptor-9 (TLR9) の発現を real-time PCR により評価した。

(3) CpG DNA 複合体による抗腫瘍効果 : 新たにフォスフォジエステル (PO) 型 CpG ODN を設計した (5'-TCGACGTTTTGACGT-TTTGACGTTTT-3')。対照には CpG モチーフを含まない ODN (random DNA、GpC DNA) を用いた。癌細胞の体内分布および増殖を定量的に評価するために、ルシフェラーゼを安定に発現する癌細胞株 B16-BL6/Luc 及び colon26/Luc を樹立した。腹腔内に癌細胞を移植することで腹膜播種モデルマウスを作製し、その腹腔内に各 DNA を単独または DOTMA/Chol リポソーム複合体として投与した。移植 7 日後に腹腔内臓器を摘出し、臓器中ルシフェラーゼ活性を指標に癌細胞数を評価した。また、担癌マウスでの腹腔中 TNF- α およびインターロイキン (IL) -12 濃度を ELISA 法により測定するとともに、マウスの延命効果についても検討した。

(4) Y-ODN の構築および CpG モチーフを含む新規 Y 型 DNA の開発 : それぞれ半分ずつ相補的な 3 種類の 30 塩基の ODN を当モルずつ混合し、95 °C で加熱後徐々に冷却することで Y-ODN を調製した。このとき Y-ODN の 1 箇所を強力な CpG モチーフ GACGTT に

置換した Y-CpG ODN、3 箇所を置換した Y-3CpG ODN を新たに設計した。別途、対照として Y 型を構成する ODN のうちの 1 種を一本鎖 (ss) ODN、これに相補的な配列を加えた二本鎖 (ds) ODN、Y 型の構成成分すべてを 2 本鎖とした 3 種類の dsODN (dsODN×3) も併せて調製した。

(5) Y-ODN 連結による dendrimer 様 DNA の開発：4 種類の異なる Y-ODN (1 種類の Y-CpG ODN を含む) を作製し、DNA ligase を用いて順次結合することで、世代数 3 の dendrimer 様 DNA (G3-dendritic CpG DNA : G3) を構築した。

(6) PS 型 ODN を含む Y-ODN の調製：CpG モチーフを Y0a 鎖に 1 つ含む Y-CpG ODN を設計した。Y-CpG ODN を構成する ODN (Y0a、Y0b、Y0c) それぞれについて PS 結合に置換した ODN(S) を用意した。また、CpG モチーフを含む Y0a 鎖に関しては、両末端から 3 個の結合のみを置換した ODN(S₃) も設計した。PO 型及び PS 型 ODN を種々組み合わせで Y-CpG ODN を調製した。

(7) コレステロール修飾 CpG ODN (CpG ODN-Chol) の合成：CpG モチーフを含む 1 本鎖 ODN にアミンを導入し、cholesteryl chloroformate を反応させることで CpG ODN-Chol を合成した。

(8) 免疫活性化能の評価：RAW264.7 細胞を播種し、24 時間後に各 ODN を種々の濃度 (2、6、18 µg/ml) で添加した。活性化の指標として、上清中 TNF-α および IL-6、IL-12 濃度を ELISA 法により測定した。

(9) ODN の物性評価：Y-ODN および dsODN に DNase I (0.75 U/10 µg DNA) または 50 % fetal bovine serum (FBS) を添加し、37 °C でインキュベートした。EDTA の添加により反応を停止後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により各 ODN の分解を評価した。ODN の見かけのサイズは光散乱光度法により測定

した。また、サーマルサイクラーにより融解温度 (T_m) を測定した。

(10) ODN の細胞取り込み：FITC 標識した各 ODN を種々の濃度で RAW264.7 細胞に添加した。1 時間後に flow cytometry により測定した細胞の蛍光強度を指標に ODN の細胞取り込みを評価した。

(11) 癌細胞増殖抑制効果：RAW264.7 細胞に各 ODN (10 µg/ml) を添加 8 時間後の上清を conditioned medium (CM) として回収した。ホタルルシフェラーゼを安定に発現するマウスメラノーマ B16-BL6 細胞 (B16-BL6/Luc) をモデル癌細胞として用い、これに各 CM を添加した。48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定することで癌細胞増殖を評価し、各 ODN 処理による癌細胞増殖抑制効果を判定した。

(12) DNA-DXR の調製：CpG DNA として pcDNA3.1、含有しない DNA (non-CpG DNA) として pCpG-mcs を選択し、DXR と重量比 10:1 で混合し、室温で 1 時間静置することで結合体を調製した。DXR の結合は DXR の蛍光を測定することで評価した。

(13) DNA-DXR 結合体による癌細胞増殖抑制：トランズウェル上段に RAW264.7 細胞を、下段に colon26/Luc を播種した。培養 24 時間後に DXR または DNA、DNA-DXR を RAW 細胞側に添加し、48 時間培養後ルシフェラーゼ活性を指標に癌細胞数を測定した。

(14) 担癌マウスでの DNA に対する免疫応答：colon26/Luc を BALB/c 雄性マウスの背部皮下または腹腔内、門脈内に移植することで、皮下腫瘍、腹膜播種、肝転移モデルマウスを作製した。一定期間経過後、担癌マウスに pcDNA3.1 を 250 µg DNA/mouse の投与量で静脈内投与し、2 時間後の血清および肝臓、脾臓中 TNF-α 濃度を ELISA 法により測定した。別途、肝転移モデルマウスに DNA あるいは DXR、DNA-DXR 結合体を静脈内投与

し、6時間後の血清および肝臓中 IL-12 濃度を ELIZA 法により測定した。CpG DNA 及び non-CpG DNA を用いることでサイトカイン産生における CpG モチーフの関与について評価した。

(15) 肝転移抑制効果：colon26/Luc を門脈内に移植 8 日後に CpG DNA-DXR、DXR、DNA を単回静脈内投与した。移植 13 日後に転移臓器である肝臓を摘出し、ルシフェラーゼ活性を指標に肝転移を評価した。

(16) 抗腫瘍効果：マウス腹水癌 sarcoma-180 (S-180) を 5 週齢 ICR 雌性マウスに 1×10^6 cells/mouse で腹腔内移植することで腹水癌モデルマウスを作製した。移植 6 日および 13 日後に DNA-DXR を腹腔内投与し、経日的な体重変動と生存日数を評価した。

C. 研究結果

(1) DNA 静脈内投与後のマウス血漿中、臓器中 TNF- α 濃度：マウスに 250 μ g の CpG DNA を静脈内投与した場合、血清中ならびに脾臓、肝臓で高レベルの TNF- α が検出された。一方、CpG モチーフの少ない CT DNA では検出限界以下だった。カチオン性リポソーム複合体の場合には、25 μ g DNA の場合にも CpG モチーフ依存的な TNF- α の産生が認められた。このサイトカイン産生は、肝 Kupffer 細胞および脾臓マクロファージを機能的に除去することでほぼ完全に消失し、これら細胞の関与が示された。

(2) DNA による培養マクロファージからの TNF- α の産生：RAW264.7 及び脾臓マクロファージ、肝非実質細胞からは、CpG DNA の添加により TNF- α 産生が認められた。一方、腹腔マクロファージおよび腎メサンギウム細胞では検出されなかった。各細胞での TLR9 発現は、脾臓マクロファージで最も高く、次いで肝非実質細胞、腹腔マクロファージの順であり、CpG DNA 添加時のサイトカ

イン産生との間に正の相関が認められた。また、カチオン性リポソーム複合体を用いた場合には、リポソームの種類・脂質組成依存的なサイトカイン産生が認められた。

(3) CpG ODN 複合体投与による腹膜播種性癌転移抑制：CpG ODN 複合体投与により、腹腔内に高濃度の TNF- α 、IL-12 が検出された。そこで、B16-BL6/Luc または colon26/Luc 担癌マウスを用いて抗腫瘍効果を評価したところ、CpG ODN 複合体により腹腔内臓器における癌細胞数がコントロール群の約 0.1%にまで減少した。これに伴い、生存日数も著明に延長した。

(4) Y-ODN の物性評価：電気泳動の結果、Y-ODN は約 350 bp 付近に均一のバンドとして泳動された。1 ユニットあたりの塩基数は 90 base であることから、Y-ODN は dsODN と比較して嵩高い構造を持つことが示唆された。動的光散乱法により測定した見かけのサイズは約 7nm であり、Y-CpG ODN、Y-3CpG ODN の場合もほぼ同等の値が得られた。

(5) Y-ODN によるサイトカイン産生：配列中に強力な CpG モチーフを含まない ODN を RAW264.7 細胞に添加した場合、ODN 濃度の増大に伴い若干量の TNF- α 産生が認められた。一方、同じ配列の ODN で調製した Y-ODN を添加することで、有意に高い TNF- α の産生が認められた。IL-6 に関しても同様の結果が得られた。

(6) ODN の安定性および細胞取り込み：以上より、ODN を Y 型とすることでサイトカイン産生能が増大することが示された。そこで、この Y-ODN による高いサイトカイン産生が ODN の安定性の増大によるかについて DNase I または 50%未変性 FBS を用いて検討した。その結果、いずれの場合においても Y-ODN は dsODN と同様に分解された。一方、FITC 標識 ODN を用いて検討した RAW264.7 細胞への取り込みは、dsODN と比較して

Y-ODN で有意に高いことが示された。

(7) Y-CpG ODN によるサイトカイン産生：ODN に強力な CpG モチーフを挿入することで、RAW264.7 細胞への添加により産生される TNF- α はいずれの群においても顕著に増大した。CpG モチーフ数あたりの TNF- α 産生量で比較すると、Y-CpG ODN は ssCpG ODN をはじめ他の群と比較して有意に高い TNF- α 産生を示した。中でも、配列や CpG モチーフ数などが Y-CpG ODN とすべて同等である dsCpG ODN \times 3 との比較では、約 6 倍高い TNF- α および IL-6 の産生が得られた。構造中に強力な CpG モチーフを 3 個挿入した Y-3CpG ODN では、強力な CpG モチーフが 1 個のみの Y-CpG ODN よりも有意に高い TNF- α および IL-6、IL-12 産生が得られた。

(8) 癌細胞増殖抑制効果：各 ODN を添加した RAW264.7 細胞の馴らし培地を B16-BL6/Luc 細胞に添加したところ、サイトカイン産生を反映して Y-3CpG ODN の場合に最も高い癌細胞増殖抑制効果が得られた。

(9) G3 によるサイトカイン産生：電気泳動により、一部不完全ではあるもののデンドリマー様 DNA の形成が確認された。得られた G3 の見かけのサイズは約 23nm であり、腫瘍組織への受動ターゲティングに適したサイズであることが確認された。RAW264.7 細胞に添加により産生される TNF- α 濃度は、Y-CpG ODN と比較して有意に高く、特に低濃度 (2 μ g/ml) では約 5 倍高い TNF- α が検出された。

(10) PS 型 ODN 含有 Y-ODN によるサイトカイン産生：Y-CpG ODN による TNF- α 産生は、CpG モチーフを含む ODN の両末端から 3 個あるいは全てのリン酸結合を PS 型とすることで有意に増大した。CpG ODN(S) と CpG ODN(S₃) との間に顕著な違いは認められなかった。CpG ODN 鎖を PS 型 ODN とすることで、血清中での安定性が増大したことから、

活性化能の増強は安定性の増大によることが示唆された。また、PS 型 ssCpG ODN よりも高いレベルの TNF- α が得られたことから、PS 型 ODN の場合にも Y 型形成によりサイトカイン産生が増大することが示された。一方、CpG モチーフを含まない ODN を PS 型に置換した場合のサイトカイン産生は、全て PO 型 ODN で調製した Y-CpG ODN と同等であった。また、3 種類の ODN を PS 型とした場合には有意なサイトカイン産生低下が観察された。このとき、T_m 値は有意に低下したことから、全ての ODN 鎖を PS 型とすることで Y 型が形成されにくくなる可能性が示された。

(11) CpG ODN-Chol によるサイトカイン産生：CpG ODN-Chol は、コレステロール導入数及び導入部位依存的に自己会合体を形成することが明らかとなった。RAW264.7 細胞に添加することで産生される TNF- α は、コレステロール未修飾 CpG ODN よりも圧倒的に高いことが示された。アミン結合体や rhodamine 修飾体、あるいはコレステロールと CpG ODN との混合物では高いサイトカイン産生は認められなかったことから、CpG ODN-Chol による高いサイトカイン産生には ODN に対するコレステロール修飾が必須であることが示された。

(12) DNA-DXR による癌細胞増殖抑制：CpG DNA の RAW264.7 細胞への添加により、colon26/Luc 細胞の増殖は若干抑制されたが、non-CpG DNA 添加では増殖抑制効果は認められなかった。DXR 添加により colon26/Luc 細胞の増殖は顕著に抑制され、CpG DNA の併用によりその抑制効果は増大した。

(13) 担癌マウスでの DNA-DXR に対する応答性の評価：皮下腫瘍あるいは腹膜播種モデルマウスに CpG DNA を静脈内投与したところ、正常マウスとほぼ同等の TNF- α 産生が認められた。一方、肝転移モデルマウスにおい

ては、CpG DNA 投与により血中および肝臓で正常マウスよりも顕著に高い TNF- α 産生が得られた。そこで別途、colon26/Luc 細胞の肝転移モデルマウスに対し、CpG DNA あるいは non-CpG DNA を静脈内投与したところ、CpG DNA 投与の場合に限り投与量依存的に血中 IL-12 濃度の上昇が観察された。

CpG DNA-DXR に関しても同様の検討を行ったところ、CpG DNA の場合と比較すると低いものの有意な IL-12 産生が認められた。

(14) DNA-DXR による肝転移抑制: CpG DNA (250 μ g/mouse) の単独投与により、肝臓中癌細胞数は若干減少する傾向が認められたが、依然として 10^7 個程度の癌細胞が検出された。一方、DXR の投与によっても用量依存的な増殖抑制効果が認められた。一定量 (250 μ g/mouse) の CpG DNA に DXR を結合させた場合には未処置群の 1/10 以下にまで癌細胞数が減少した。

(15) S-180 腹水癌モデルマウスでの延命効果: CpG DNA-DXR の腹腔内投与群では、腹水癌増殖に伴う体重増加が抑制されるとともに、若干の延命効果が認められた。

D. 考察

CpG DNA により産生されるサイトカインは、Th1 型に分類される抗腫瘍サイトカインが中心であることからその癌治療への応用が期待されている。しかしながら、Toll-like receptor-9 (TLR9) を介する CpG DNA 認識、さらにはサイトカイン産生に関しては、おもに PS 型オリゴヌクレオチドを用いた検討が行われており、その結果が必ずしもプラスミド DNA などの PO 型 DNA には当てはまらないことも指摘されている。さらには、カチオン性化合物との複合体化により CpG DNA によるサイトカイン産生能は増大する傾向にあるが、最近の報告では必ずしも一義的に規定されないことも証明されつつある。さらに

最近の研究から、CpG モチーフがない DNA を認識してインターフェロン β 産生を誘導する機構の存在も明らかとされてきた。これらの情報は、DNA が免疫活性化剤として利用可能であることを意味すると同時に、その臨床応用にはまだまだ基礎情報集積の必要性を示唆するものである。本研究では、核酸 (DNA) をコアとすることによる免疫担当細胞からの抗腫瘍サイトカイン誘導と、抗癌剤による殺細胞効果との相乗的抑制効果を発揮する薬物・免疫治療システムの開発を試みた。

DNA をマウス尾静脈内に投与したところ、CpG モチーフ依存的なサイトカイン産生が誘導され、その産生レベルはカチオン性リポソームとの複合体とすることで顕著に増大することも確認された。クロドロネート含有リポソームを用いた検討から、肝 Kupffer 細胞、脾臓マクロファージなどの貪食細胞が、CpG DNA を認識して TNF- α などを産生することが示された。このことは、マウスから単離した初代培養マクロファージを用いた検討からも支持された。CpG DNA により誘導されるサイトカインによる抗腫瘍効果を判定するために、マウス腹膜播種モデルを用いて評価した。その結果、CpG ODN 複合体を腹腔内投与することで有意な抗腫瘍効果が得られ、一部のマウスにおいては癌を拒絶可能なレベルの抗腫瘍免疫が誘導可能であった。しかしながら、カチオン性リポソームに起因すると考えられる毒性が懸念され、安全な治療システムを構築するためにはカチオン性化合物を利用せずに CpG ODN の有効性を増大することが重要と考えられた。

そこでまず、 dendritic 様 DNA の構成要素である Y-ODN について、免疫活性化能を評価した。その結果、ODN を Y 型とすることで ssODN や dsODN と比較して有意に高いサイトカイン産生が得られた。この活性増

大について、安定性あるいは細胞取り込みに関して検討したところ、Y型化によりRAW264.7細胞への取り込みが増大する傾向が認められた。一方、Y型化によりODNは若干不安定になることが示された。末端数が多いことが低い安定性の理由と考えられる。最終年度には、Y-ODNを順次連結することで、世代数3の dendritic DNA (G3)の開発に成功した。G3は、Y-CpG ODNと比較して有意に高いサイトカイン産生を示した。設計上の理由により、今回開発したG3には最外殻の12個のY-ODNにのみ各2個のCpGモチーフが含まれている。従って、1 CpGモチーフ当たりの活性は、 dendritic 構造とすることで飛躍的に高まることが示唆された。この活性増大がY-ODNの場合に認められた細胞による取り込み増大に起因するかについては今後の検討が必要である。今回開発したG3は、腫瘍組織へのデリバリーに適したサイズ(約20 nm)であることから、G3を基本骨格としてナノ粒子を開発することで、効率的な腫瘍ターゲティングが実現可能と考える。

dsDNAと比較するとY-ODNは若干不安定であることが示されたため、PS型ODNの利用による安定化についても検討した。その結果、1種類のODNをPS型としたY-ODNの場合にはT_m値の有意な低下は認められず、血清中での安定性は増大する傾向が認められた。一方、2あるいは3種類のODNをPS型とした場合には、T_mの有意な低下が認められた。CpG ODNを部分的あるいは完全にPS型とすることで有意なサイトカイン産生の増大が認められた反面、T_m値の低下が認められたODNではサイトカイン産生量も低いことが示された。以上の結果は、Y-ODNによる免疫活性化においてODNの安定性は重要であるものの、それ以上にY-ODNの構造安定性が重要であることを示すものと考え

えられる。コレステロール修飾 CpG ODNを用いた検討からは、適当な化学修飾を施すことによる活性増強の可能性が示された。 dendritic DNAには修飾可能なDNA末端が数多く存在し、G3ではその数は24個である。従って、化学修飾を利用して種々の構造を導入することで、DNA構造体の高機能化が期待される。腫瘍デリバリーにおいては、ポリエチレングリコール修飾など動態制御のための構造付加による活性増強も考えられることから、こうした末端修飾の可能性も含めて、このボトムアップ型DNAナノ粒子の設計・開発をさらに進める予定である。

DNAへの抗癌剤の結合ならびに腫瘍組織へのターゲティングに関しては、1970年代に先駆的な報告が数報ある。しかしながら、CTDNAが用いられていることもあり、CpGモチーフによる免疫活性化は考慮されていない。癌細胞とRAW264.7細胞とを共培養した系において、RAW264.7細胞にCpG DNAを添加することで、若干の癌細胞増殖抑制効果が認められた。この効果はnon-CpG DNAでは認められなかったことから、CpGモチーフによるサイトカイン産生の影響と考えられる。このCpG DNAによる細胞増殖抑制効果はDXRとの併用時にも認められたことから、免疫活性化のためのCpGモチーフと抗癌剤DXRを同時に腫瘍組織にターゲティングすることで、効果的な癌細胞増殖抑制効果が得られることが推察される。実際、結腸癌肝転移モデルマウスに対する投与では、DXR単独あるいはCpG DNA単独と比較してCpG DNA-DXR投与により肝臓中癌細胞数が有意に減少することが示された。この増殖抑制に、CpGモチーフによる免疫活性化が関与するかについて検討したところ、CpG DNA投与により高い血中IL-12濃度が検出された。CpG DNA-DXR投与時には、IL-12濃度は若干低くなる傾向が認められたが、これは免疫

担当細胞に対する DXR の影響が出たものと推察される。プラスミド DNA と比較すると dendri-mer-like DNA は嵩高いこと、そのため内部に空間が存在することが推定される。従って、DNA からの DXR 放出は dendri-mer-like DNA のほうが緩徐であることが想定される。今後、dendri-mer-like DNA を利用したシステム開発を行う予定である。

E. 結論

CpG モチーフを含む DNA を用いることで TNF- α や IL-12 などの Th-1 型サイトカインを誘導可能であり、ODN の Y 型化、さらには dendri-mer-like 構造体の構築により免疫活性化能の増大が得られた。また、DXR を DNA に結合することで高い抗腫瘍効果を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sakai M, Nishikawa M, Thanaketpaisarn O, Yamashita F, Hashida M. Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and in vivo electroporation. *Gene Ther.*, **12**: 607-616 (2005).
- (2) Yasuda K, Ogawa Y, Yamane I, Nishikawa M, Takakura Y. Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways. *J. Leukoc. Biol.*, **77**: 71-79 (2005).
- (3) Kuramoto T, Nishikawa M, Thanaketpaisarn O, Okabe T, Yamashita F, Hashida M. Use of lipoplex-induced nuclear factor- κ B activation to enhance transgene expression by lipoplex in mouse lung. *J. Gene Med.*, **8**: 53-62 (2006).
- (4) Kuramoto Y, Nishikawa M, Hyoudou K, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by single dosing of

phosphodiester CpG oligonucleotide/cationic liposome complex. *J. Control. Release*, **115**: 226-233 (2006).

(5) Fukuhara Y, Naoi T, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y. Plasmid DNA uptake and subsequent cellular activation characteristics in human monocyte-derived cells in primary culture. *J. Pharm. Sci.*, **96**: 1576-1584 (2007).

(6) Yoshinaga T, Yasuda K, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y. DNA and its cationic lipid complexes induce CpG motif-dependent activation of murine dendritic cells. *Immunology*, **120**: 295-302 (2007).

(7) Nishikawa M, Matono M, Rattanakit S, Matsuoka N, Takakura Y. Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation. *Immunology*, in press.

(8) Kako K, Nishikawa M, Yoshida H, Takakura Y. Effects of inflammatory response on in vivo transgene expression by plasmid DNA in mice. *J. Pharm. Sci.*, in press.

(9) Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Takakura Y. Cellular activation by plasmid DNA in various macrophages in primary culture. *J. Pharm. Sci.*, in press.

(10) Hirata K, Nishikawa M, Kobayashi K, Takahashi Y, Takakura Y. Design of PCR-amplified DNA fragments for in vivo gene delivery: size-dependency on stability and transgene expression. *J. Pharm. Sci.*, **96**: 2251-2261 (2007).

2. 学会発表

- (1) 梅山夕香里、西川元也、兵頭健治、高倉喜信、橋田 充、腫瘍ターゲティングを目的としたポリエチレングリコール修飾プラスミド DNA-doxorubicin 結合ナノ粒子の創出、第 64 回日本癌学会学術総会、2005 年 9 月 14 ~16 日
- (2) 直井智幸、西川元也、浜口伸子、梅山夕香里、橋田 充、高倉喜信、ポリエチレングリコール修飾プラスミド DNA の開発と抗癌剤 DDS への応用、日本薬剤学会第 21 年会、

- 2006年3月16～18日
- (3) 的野光洋、西川元也、高倉喜信、ユニークな構造体形成による CpG オリゴヌクレオチドの免疫活性化能増強、日本薬剤学会第21年会、2006年3月16～18日
- (4) 吉田寛幸、西川元也、安田幸代、高倉喜信、プラスミド DNA による初代培養マクロファージの免疫活性化に関する検討、日本薬学会第126年会、2006年3月28～30日
- (5) 西川元也、ベクターに対する生体反応の制御に基づく *in vivo* 遺伝子発現の最適化(招待講演)、日本薬学会第126年会、2006年3月28～30日
- (6) 梅山夕香里、西川元也、山下富義、橋田充、免疫賦活型 CpG オリゴヌクレオチド複合体を用いた腹膜播種性癌転移抑制、第10回がん分子標的治療研究会総会、2006年6月15～16日
- (7) 西川元也、核酸をコアとするナノサイズ DDS の開発(招待講演)、第22回日本 DDS 学会学術集会、2006年7月7～8日
- (8) 安田幸代、吉田寛幸、西川元也、高倉喜信、プラスミド DNA による各種初代培養マクロファージの活性化、第2回創剤フォーラム若手研究発表討論会、2006年10月13～14日
- (9) Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Takakura Y, Cytokine secretion profiles in primary cultured cells and in mice stimulated with plasmid DNA, GPEN2006, 2006年10月25～27日
- (10) 的野光洋、西川元也、高倉喜信、Y型形成によるオリゴヌクレオチドの免疫活性化能の増強、第16回アンチセンスシンポジウム、2006年11月27～28日
- (11) 西川元也、核酸をコアとするナノ粒子による薬物・免疫治療システムの開発(招待講演)、第12回創剤フォーラム若手シンポジウム、2006年12月2日
- (12) 安田幸代、吉田寛幸、西川元也、高倉喜信、リポプレックスの脂質組成依存的・CpG モチーフ非依存的な免疫細胞活性化現象の解析、日本薬学会第127年会、2007年3月28～30日
- (13) Rattanakiat S, Matono M, Nishikawa M, Takakura Y, Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation, 第23回日本 DDS 学会学術集会、2007年6月14～15日
- (14) Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Takakura Y, Formulation-dependent characteristics of cytokine secretion in primary cultured cells and in mice stimulated with plasmid DNA, Young Pharmaceutical Scientists Meet in Amsterdam, 2007年4月20～21日
- (15) Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Takakura Y, Contributions of macrophage-like cells to cytokine secretion after intravenous injection of naked or complexed plasmid DNA, Young Pharmaceutical Scientists Meet in Amsterdam, 2007年4月20～21日
- (16) 吉田寛幸、西川元也、安田幸代、水野友美子、光井 優、高倉喜信、プラスミド DNA に対する炎症応答の評価とその制御、日本薬剤学会第22年会、2007年5月21～23日
- (17) 西川元也、DNA をコアとするナノサイズ DDS の開発(招待講演)、BioJapan2007、2007年9月19～21日
- (18) Rattanakiat S, Nishikawa M, Takakura Y, Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by cholesterol conjugation, 日本薬学会第128年会、2008年3月26～28日
- (19) 水野友美子、西川元也、直井智幸、高倉喜信、DNA を基盤とする抗癌剤デリバリー・免疫活性化システムの開発、日本薬学会第128年会、2008年3月26～28日
- (20) 吉田寛幸、西川元也、安田幸代、水野友美子、豊田敬康、高倉喜信、マウスにおける DNA に対する免疫応答プロファイルの評価、

日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26～28 日

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishikawa M, Matono M, Rattanakit S, Matsuoka N, Takakura Y.	Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation.	Immunology			2008
Kako K, Nishikawa M, Yoshida H, Takakura Y.	Effects of inflammatory response on in vivo transgene expression by plasmid DNA in mice.	J. Pharm. Sci.			2008
Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Takakura Y.	Cellular activation by plasmid DNA in various macrophages in primary culture.	J. Pharm. Sci.			2008
Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y.	Inhibition of tumor cell growth in the liver by RNA interference-mediated suppression of HIF-1 α expression in tumor cells and hepatocytes.	Gene Ther.			2008
Thanaketsaisarn O, Nishikawa M, Okabe T, Yamashita F, Hashida M.	Insertion of NF- κ B binding sequence to plasmid DNA for increased transgene expression in colon carcinoma cells.	J. Biotechnol.	133 (1)	36-41	2008
Kawano H, Nishikawa M, Mitsui M, Takahashi Y, Kako K, Yamaoka K, Watanabe Y, Takakura Y.	Improved anti-cancer effect of interferon gene transfer by sustained expression using CpG-reduced plasmid DNA.	Int. J. Cancer	121 (2)	401-406	2007
Yoshinaga T, Yasuda K, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y.	DNA and its cationic lipid complexes induce CpG motif-dependent activation of murine dendritic cells.	Immunology	120 (3)	295-302	2007
Hirata K, Nishikawa M, Kobayashi K, Takahashi Y, Takakura Y.	Design of PCR-amplified DNA fragments for in vivo gene delivery: size-dependency on stability and transgene expression.	J. Pharm. Sci.	96 (9)	2251-2261	2007
Fukuhara Y, Naoi T, Ogawa Y, Nishikawa M, Takakura Y.	Plasmid DNA uptake and subsequent cellular activation characteristics in human monocyte-derived cells in primary culture.	J. Pharm. Sci.	96 (6)	1576-1584	2007
Kuramoto Y, Nishikawa M, Hyoudou K, Yamashita F, Hashida M.	Inhibition of peritoneal dissemination of tumor cells by single dosing of phosphodiester CpG oligonucleotide/cationic liposome complex.	J. Control. Release	115 (2)	226-233	2006

Takahashi Y, Yamaoka K, Nishikawa M, Takakura Y	Moment analysis for kinetics of gene silencing by RNA interference.	Biotechnol. Bioeng.	93 (4)	816-819	2006
Kuramoto T, Nishikawa M, Thanaketpaisarn O, Okabe T, Yamashita F, Hashida M	Use of lipoplex-induced nuclear factor- κ B activation to enhance transgene expression by lipoplex in mouse lung.	J. Gene Med.	8(1)	53-62	2006
Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y.	Suppression of tumor growth by intratumoral injection of short hairpin RNA-expressing plasmid DNA targeting beta-catenin or hypoxia-inducible factor 1 α .	J. Control. Release	116 (1)	90-95	2006
Kawase A, Isaji K, Yamaoka A, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y.	Enhanced antigen-specific antibody production following polyplex-based DNA vaccination via the intradermal route in mice.	Vaccine	24 (27-28)	5535-5545	2006
Sakai M, Nishikawa M, Thanaketpaisarn O, Yamashita F, Hashida M	Hepatocyte-targeted gene transfer by combination of vascularly delivered plasmid DNA and in vivo electroporation.	Gene Ther.	12 (7)	607-616	2005
Thanaketpaisarn O, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M	Tissue-specific characteristics of in vivo electric gene transfer by tissue and intravenous injection of plasmid DNA.	Pharm. Res.	22 (6)	883-891	2005
Yasuda K, Ogawa Y, Yamane I, Nishikawa M, Takakura Y	Macrophage activation by a DNA/cationic liposome complex requires endosomal acidification and TLR9-dependent and -independent pathways.	J. Leukoc. Biol.	77 (1)	71-79	2005
Ogawa Y, Yoshinaga T, Yasuda K, Nishikawa M, Takakura Y	The uptake and degradation of DNA is impaired in macrophages and dendritic cells from NZB/W F ₁ mice.	Immunol. Lett.	101 (1)	32-40	2005
Yamane I, Nishikawa M, Takakura Y	Cellular uptake and activation characteristics of naked plasmid DNA and its cationic liposome complex in human macrophages.	Int. J. Pharm.	305 (1-2)	145-153	2005
Takahashi Y, Nishikawa M, Kobayashi N, Takakura Y	Gene silencing in primary and metastatic tumors by small interfering RNA delivery in mice: quantitative analysis using melanoma cells expressing firefly and sea pansy luciferases.	J. Control. Release	105 (3)	332-343	2005
Matsui Y, Kobayashi	Sequence-specific suppression of	Pharm. Res.	22	2091-	2005

N, Nishikawa M, Takakura Y	mdr1a/1b expression in mice via RNA interference.		(12)	2098	
Nishikawa M, Takakura Y, Hashida M	Theoretical considerations involving the pharmacokinetics of plasmid DNA.	Adv. Drug Deliv. Rev.	57 (5)	675- 688	2005
Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y	The hydrodynamics-based procedure for controlling the pharmacokinetics of gene medicines at whole body, organ and cellular levels.	Adv. Drug Deliv. Rev.	57 (5)	713- 731	2005
Nishikawa M	Development of cell-specific targeting systems for drugs and genes.	Biol. Pharm. Bull.	28 (2)	195- 200	2005
高橋有己, 西川元也, 高倉喜信	がん細胞への siRNA デリバリ ーとがん遺伝子治療への適用.	薬学雑誌	127 (10)	1525- 1531	2007
西川元也	ベクターに対する生体反応の 制御に基づく in vivo 遺伝子発 現の最適化.	薬学雑誌	126 (11)	1029- 1037	2006

Enhanced immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotides by Y-shape formation

Makiya Nishikawa, Mitsuhiro Matono, Sakurat Rattanakit, Nao Matsuoka and Yoshinobu Takakura

Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02762.x

Received 20 August 2007; revised 14 October 2007; 16 October 2007; accepted 22 October 2007.

Correspondence: M. Nishikawa, Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. Email: makiya@pharm.kyoto-u.ac.jp
Senior author: Y. Takakura, email: takakura@pharm.kyoto-u.ac.jp

Introduction

Bacterial DNA contains unmethylated CpG dinucleotides (CpG motifs) that induce a potent immunostimulatory response upon recognition by the Toll-like receptor 9 (TLR9) expressed on dendritic cells, B cells and macrophages.^{1,2} Synthetic oligodeoxynucleotides (ODNs) containing CpG motifs (CpG ODNs) can mimic the immunostimulatory activity of bacterial DNA and exhibit similar immune responses.^{3,4} Once activated by bacterial DNA or CpG ODN, i.e. CpG DNA, immune cells secrete various cytokines, including interleukin-6 (IL-6), IL-12, interferon- α/β (IFN- α/β), IFN- γ and tumour necrosis factor- α (TNF- α), and increase the expression of various costimulatory molecules.^{5,6} Thus, CpG DNA can induce T helper type 1 cytokine production; this promotes a cytotoxic T-lymphocyte response with enhanced immunoglobulin production, which has been used in the treatment of a broad spectrum of diseases, including cancer, viral and bacterial infections, allergic diseases and inflammatory disorders.^{1,7-9}

The immunostimulatory activity of DNA has been extensively investigated using ODNs with varying base

Summary

DNA containing unmethylated CpG dinucleotides (CpG DNA) is a potent activator of innate and acquired immune responses. Although the sequence-specific immunostimulatory activity of CpG DNA has been extensively explored, little information is available about the importance of the stereochemical properties of CpG DNA. In this study, Y-shaped oligodeoxynucleotides (Y-ODNs) were prepared using three ODNs with the halves of each ODN being partially complementary to a half of the other two ODNs. Y-ODN induced greater amounts of tumour necrosis factor- α and interleukin-6 from RAW264.7 macrophage-like cells than did conventional single-stranded ODN (ssODN) or double-stranded ODN (dsODN). The Y-ODN was less stable in serum than dsODN, but greater amounts of Y-ODN were taken up by macrophage-like cells compared with dsODN. A newly designed Y-ODN containing three potent CpG motifs generated significantly higher levels of cytokines compared with dsODN containing the identical sequences. These results indicate that the Y-shaped form of ODN is a novel, reproducible and reliable approach to enhancing the immunostimulatory activity of ODNs.

Keywords: CpG motif; immunostimulatory activity; oligodeoxynucleotides; Toll-like receptor 9; Y-shape formation

combinations, and several rules have been proposed. The activity of CpG DNA depends on the flanking sequences, and an ODN containing a GACGTT hexameric nucleotide motif strongly stimulates the immune system in rodents.^{10,11} Other parameters have also been reported to be important for immunostimulatory activity of DNA, e.g. TpC dinucleotide on the 5' end, pyrimidine-rich on the 3' side of the motif and the presence of two or three CpG motifs in a sequence.¹ Thus, the optimal sequence of CpG ODN for activating mouse or human immune cells was elucidated by examining many possible base combinations. Although a few reports have shown that aggregation of ODNs increases their immunostimulatory activity,^{12,13} the stereochemical effects of CpG ODN on immunostimulatory activity have hardly been explored.

DNA possesses many desirable chemical and physical properties as a polymeric material and much progress has been made in DNA computing^{14,15} and DNA nanotechnology.¹⁶⁻¹⁹ Recently, Li *et al.* established a reproducible method for constructing dendrimer-like DNA, by connecting Y-shaped DNA (Y-DNA) composed of three ODNs.²⁰ This unique-structured DNA has been applied

to various experimental settings, including nanobar-codes.²¹ However, the biological and immunological characteristics of such structured DNA preparations have not been examined. Their unique structure may be recognized differently by immune cells.

In the present study, Y-ODN was prepared using three ODNs with the halves of each ODN being partially complementary to a half of the other two ODNs. Then, the immunostimulatory activity of Y-ODN was examined using RAW264.7, a mouse macrophage-like cell line. Here, we show that newly designed Y-ODN containing three potent CpG motifs can be a powerful immunostimulatory compound through increased uptake by immune cells.

Materials and methods

Chemicals

Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM), RPMI-1640 medium and phosphate-buffered saline (PBS) were obtained from Nissui Pharmaceutical (Tokyo, Japan). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from MP Biomedicals (Eschwege, Germany). Opti-modified Eagle's medium (Opti-MEM) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). DNase I and 20-base-pair (bp) DNA ladder were purchased from Takara Bio (Otsu, Japan). Polymyxin B sulphate salt was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). All other chemicals were of the highest grade available and were used without further purification.

Cell cultures

RAW264.7 macrophage-like cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.15% NaHCO₃, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine at 37° in humidified air containing 5% CO₂. Cells were then plated on 24-well culture plates at a density of 5 × 10⁵ cells/ml and cultured for 24 hr. B16-BL6/Luc, a clone of murine melanoma B16-BL6²² that stably expresses the firefly luciferase gene,²³ was grown in 5% CO₂ in humidified air at 37° with DMEM supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine. They were then plated on 24-well culture plates at a density of 2 × 10⁴ cells/ml and cultured for 8 hr.

Oligodeoxynucleotides

Phosphodiester ODNs (Table 1) were purchased from Invitrogen. For cellular uptake studies, Y0a labelled with fluorescein at the 5' end was used for all fluorescein-labelled ODN preparations.

Table 1. Oligodeoxynucleotide (ODN) sequences used for preparation of single stranded-, double stranded- and Y-shaped ODNs

Name	Sequence (5'→3')
Y0a	TGACTGGATCCGCATGACATTCGCCGTAAG
Y0b	TGACCTTACGGCGAATGACCGAATCAGCCT
Y0c	TGACAGGCTGATTCGGTTCATGCGGATCCA
r.Y0a	TGACCTTACGGCGAATGTCATGCGGATCCA
r.Y0b	TGACAGGCTGATTCGGTTCATTCGCCGTAAG
r.Y0c	TGACTGGATCCGCATGAACCGAATCAGCCT
Y0a(CpG)	TGACGACGTTCCGCATGACATTCGCCGTAAG
Y0b(CpG)	TGACCTTACGGCGAATGACCGAATCAGCCT
Y0c(CpG)	TGACAGGCTGATTCGGTTCATGCGAACGTC
Y0a(CpG) ₃	<u>TGACGACGTT</u> CCGCATGACATTCGCCGAACG
Y0b(CpG) ₃	<u>TGACGACGTT</u> CCGGCGAATGACCGAATCAAACG
Y0c(CpG) ₃	<u>TGACGACGTT</u> TGATTCGGTTCATGCGGAAACG
r.Y0a(CpG) ₃	<u>TGACGACGTT</u> CCGGCGAATGTCATGCGGAAACG
r.Y0b(CpG) ₃	<u>TGACGACGTT</u> TGATTCGGTTCATTCGCCGAACG
r.Y0c(CpG) ₃	<u>TGACGACGTT</u> CCGCATGAACCGAATCAAACG

All ODNs have a phosphodiester backbone. The 'r.' indicates that the sequence is complementary to the ODN with four base overhangs at both 5' ends, and each of these complementary ODNs was used to obtain double-stranded ODN. The potent immunostimulatory CpG motif (GACGTT) is underlined.

Preparation of Y-ODN and double-stranded ODN

Y-ODN was prepared by mixing equimolar amounts of three 30-base ODNs as reported previously.²⁰ In brief, three ODNs dissolved in an annealing buffer [10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 50 mM NaCl] were mixed in sterile Milli-Q water at a final concentration of 0.5 mM for each ODN. Mixtures were incubated at 95° for 5 min, 65° for 2 min, 62° for 1 min, then slowly cooled to 4°. Formation of Y-ODN was confirmed by 21% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) at 200 V for 1.5–2 hr. Double-stranded ODN (dsODN) with four base overhangs at both 5' ends was prepared by addition of a complementary ODN (r.Y0a, Table 1) to Y0a ODN.

Dynamic light-scattering analysis

The apparent hydrodynamic sizes of Y-ODN, Y-ODN (CpG), Y-ODN(CpG)₃, single-stranded ODN (ssODN; Y0a) and dsODN were measured by laser light scattering using a Malvern Zetasizer 3000HS (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a helium-neon laser (633 nm).

Cytokine release from RAW264.7 cells

RAW264.7 cells were washed three times with 0.5 ml PBS before use. Then, ssODN, one of three kinds of dsODN, Y-ODN, Y-ODN(CpG) or Y-ODN(CpG)₃

diluted in 0.5 ml Opti-MEM was added to cells. The cells were incubated for 8 hr (TNF- α) or 24 hr (IL-6), and the supernatants were collected and stored at -80° until use. To exclude the effect of contaminated lipopolysaccharide (LPS) on cytokine release, polymyxin B, an inhibitor of LPS, was added to samples at a final concentration of 50 μ g/ml. The levels of TNF- α and IL-6 in supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay using OptEIA™ sets (Pharmingen, San Diego, CA).

Stability of Y-ODN and dsODN in serum

The Y-ODN and dsODN (10 μ g/100 μ l) were incubated with 50% non-heat inactivated FBS at 37°. After 0, 2, 4, 8, or 24 hr of incubation, the reaction was terminated by adding 2 μ l 0.5 M EDTA solution per 10 μ l of samples. ODNs were extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol, and the extracts were run on a 21% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. Before the extraction, a fixed amount of dsODN of 45 bp was added to each sample, and the intensity of the band on gels was used to validate the efficiency of the extraction step. The amount of remaining ODNs was estimated by a Cool Saver (ATTO, Tokyo, Japan).

Uptake of ODNs in RAW264.7 cells

Fluorescein-labelled Y0a ODN was used for the preparation of fluorescein-labelled (F-) ssODN, dsODN and Y-ODN. RAW264.7 cells were plated on 96-well culture plates at a density of 5 \times 10⁵ cells/ml and cultured for 24 hr. Cells were washed three times with 100 μ l PBS, incubated with F-ODN for 1 hr at 37° or 4°, harvested, and washed three times with 100 μ l PBS. Then, the intensity of fluorescence of the cells was analysed by flow cytometry (FACSCalibur; BD Biosciences, San Jose, CA) using CELLQUEST software (version 3.1; BD Biosciences).

Growth inhibition of B16-BL6/Luc cells

RAW264.7 cells (5 \times 10⁵ cells/ml) were mixed with each ODN (10 or 20 μ g/ml) and incubated for 8 hr. Then, the conditioned medium was added to B16-BL6/Luc cells, and the cells were cultured for 48 hr. The number of B16-BL6/Luc cells was determined by measuring the luciferase activity of cell lysates in a luminometer (Lumat LB 9507, EG & G Berthold, Bad Wildbad, Germany) as previously reported.²³

Statistical analysis

Differences were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Fisher's protected least significant difference (PLSD) test for multiple

comparisons. A P-value of < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Physicochemical properties of Y-ODN

Equimolar amounts of three ODNs (Y0a, Y0b and Y0c) were hybridized to obtain Y-ODN, the putative structure of which is shown in Fig. 1(a). Figure 1(b) shows the gel electrophoresis of the DNA preparations. As reported in a previous study,²⁰ Y-ODN showed a single band, the mobility of which was less than that of ssODN or dsODN, supporting the assembly of all three ODNs to form Y-ODN. Similarly, newly designed Y-ODN containing a potent CpG motif, Y-ODN(CpG), was prepared with Y0a(CpG), Y0b(CpG) (identical to Y0b) and Y0c(CpG). The Y-ODN containing three potent CpG

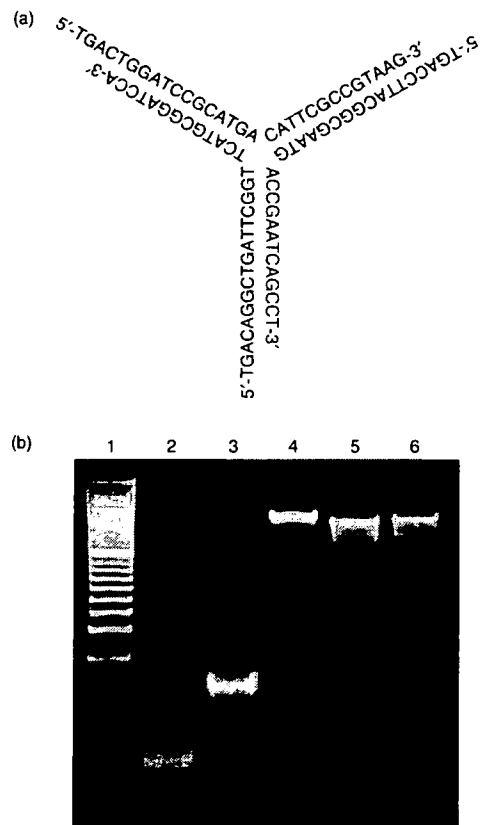


Figure 1. Formation of Y-shaped oligodeoxynucleotide (Y-ODN). (a) Putative structure of Y-ODN, which was prepared with three ODNs (Y0a, Y0b, Y0c) with the halves of each ODN being partially complementary to a half of the other two ODNs. (b) Polacrylamide gel electrophoresis analysis of single-stranded (ss), double-stranded (ds) and Y-ODN. Each ODN was run on 21% polyacrylamide gel at 200 V for 2 hr. Lane 1, 20-bp DNA ladder (Takara Bio); lane 2, ssODN; lane 3, dsODN; lane 4, Y-ODN; lane 5, Y-ODN(CpG); lane 6, Y-ODN(CpG).

motifs, Y-ODN(CpG₃), was also prepared with Y0a(CpG₃), Y0b(CpG₃) and Y0c(CpG₃). Polyacrylamide gel electrophoresis of the newly designed Y-ODN(CpG) and Y-ODN(CpG₃) showed one major band with a mobility similar to that of Y-ODN (Fig. 1b, lanes 5 and 6, respectively), suggesting a Y-shape formation of these ODNs containing CpG motifs. The apparent sizes were estimated to be 7.02 ± 0.22 , 7.07 ± 0.40 and 7.09 ± 0.24 nm for Y-ODN, Y-ODN(CpG) and Y-ODN(CpG₃), respectively. Similarly, the sizes of ss-(Y0a) and dsODN were estimated to be 3.61 ± 0.68 and 6.86 ± 1.34 nm, respectively.

Cytokine release from RAW264.7 cells by ODNs

Y0a, one of the three ODNs consisting of the Y-ODN, was used as ssODN. A complementary ODN (r.Y0a) to Y0a was hybridized to obtain dsODN with four base overhangs at both 5' ends. Similarly, three kinds of dsODN were prepared by designing complementary ODNs to Y0b and Y0c. The mixture of these three kinds of dsODNs (dsODN × 3) contained exactly the same bases in the same structural configuration of four base overhangs at both 5' ends as Y-ODN, representing a good control to evaluate the effects of the Y-shape formation on the immunostimulatory activity of ODNs. Figure 2(a) shows the TNF- α concentration in the culture media of RAW264.7 cells. The addition of ssODN, dsODN or dsODN × 3 to RAW264.7 cells induced only weak secretion of TNF- α at concentrations of 2 and 6 μ g/ml. Increasing the concentration of these ODNs to 18 μ g/ml slightly increased TNF- α secretion to levels of up to 400 pg/ml. In marked contrast, large amounts of TNF- α were secreted from RAW264.7 cells after the addition of Y-ODN and the amounts varied in a concentration-dependent manner. Figure 2(b) shows the IL-6 concentration in the culture media. Again, Y-ODN induced significantly greater amounts of IL-6 secretion from cells than the other ODNs at all concentrations examined. These results indicate that Y-ODN has a stronger immunostimulatory activity than conventional ssODN or dsODN, even though there are no potent immunostimulatory CpG motifs in the sequence.

Stability of Y-ODN

Because the stability of ODN would affect their biological activity, the stability of dsODN and Y-ODN in 50% non-heat inactivated FBS solution was examined. Each ODN extracted was subjected to a PAGE analysis (Fig. 3a). The bands for 45-bp ODN, which was added to the mixtures just before extraction of ODNs, confirmed that the extraction efficiency of ODNs was almost identical in all samples. Both dsODN and Y-ODN were degraded with time in the FBS solution. A densitometric analysis of gel

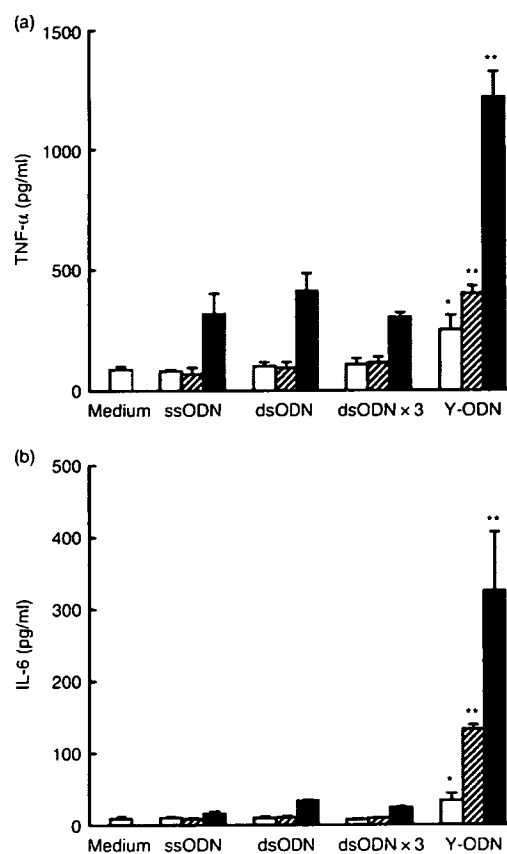


Figure 2. Secretion of cytokines from RAW264.7 cells after addition of oligodeoxynucleotide (ODN). Concentrations of (a) tumour necrosis factor- α (TNF- α) and (b) interleukin-6 (IL-6) in culture media were measured at 8 hr (TNF- α) or 24 hr (IL-6) after addition of each ODN to RAW264.7 cells at varying concentrations: (open bars) 2 μ g/ml; (hatched bars) 6 μ g/ml; (closed bars) 18 μ g/ml. Results are expressed as the mean \pm SD of three determinations. The experiment shown was a representative of three experiments with similar results. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from single-stranded ODN (ss-ODN), double-stranded ODN (ds-ODN) and dsODN × 3 at the same concentration.

bands was performed in four identical experiments and the remaining amounts of dsODN and Y-ODN were plotted against the incubation time (Fig. 3b). Y-ODN showed a similar profile of degradation to dsODN, at least for the first 4 hr. Thereafter, it tended to be degraded more quickly than dsODN. Similar results were obtained when these ODNs were added to a solution containing DNase I (data not shown). These findings indicate that Y-ODN is degraded at a similar or slightly faster rate than dsODN under the conditions examined.

Cellular uptake of ODNs in RAW264.7 cells

To investigate whether the enhanced immunostimulatory activity of Y-ODN is mediated by an increased cellular

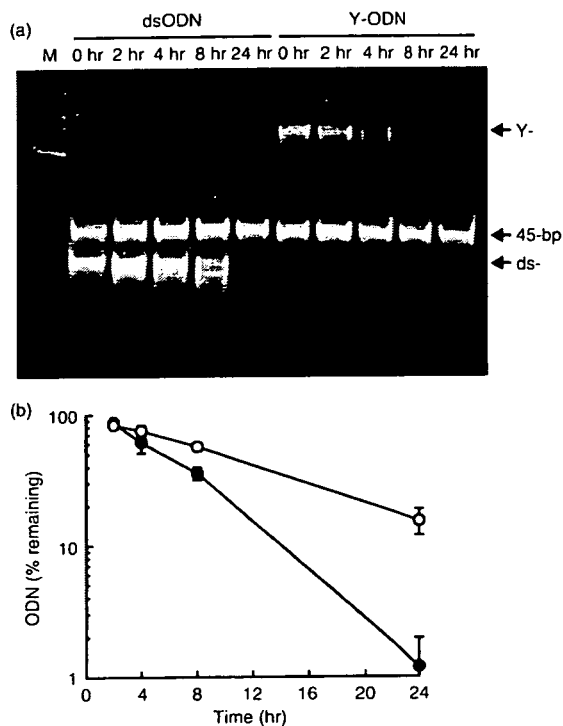


Figure 3. Stability of double-stranded oligodeoxynucleotide (dsODN) and Y-shape ODN (Y-ODN) in 50% non-heat inactivated fetal bovine serum (FBS). (a) The dsODN and Y-ODN were incubated in 50% non-heat inactivated FBS at 37° for the indicated times and the reaction was terminated by adding ethylenediaminetetraacetic acid. ODNs extracted were run on 21% polyacrylamide gel at 200 V for 2 hr and stained with ethidium bromide. 'M' represents 20-bp DNA ladder (Takara Bio). (b) The amounts of ODNs on the gel were estimated by Cool Saver. The remaining amounts of dsODN (○) and Y-ODN (●) were plotted against the incubation time. Results are expressed as the mean ± SD of four determinations.

uptake, the uptake of F-dsODN, F-dsODN × 3 and F-Y-ODN was examined in RAW264.7 cells. The uptake of these F-ODNs was greater at 37° than at 4° (data not shown) in all cases examined. A fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was performed in three identical experiments and the mean fluorescence intensity (MFI) was measured at each concentration of ODN. MFI (37°–4°) was plotted against the concentration of ODN (Fig. 4). The MFI of cells treated with F-Y-ODN was significantly ($P < 0.05$) greater than the MFI of those treated with other F-ODN preparations, suggesting that an increased cellular uptake of Y-ODN contributes to the enhanced immunostimulatory activity of Y-ODN.

Cytokine release from RAW264.7 cells by CpG ODNs

Activation of RAW264.7 cells by the newly designed Y-ODN(CpG) and Y-ODN(CpG₃) was examined under

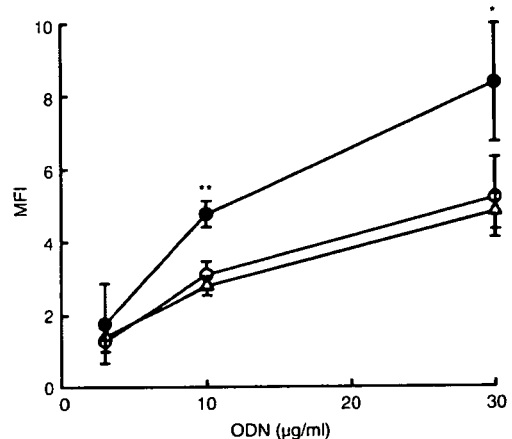


Figure 4. Uptake of fluorescein-labelled oligodeoxynucleotide (ODN) in RAW264.7 cells. Cells were incubated with fluorescein-labelled double-stranded ODN (dsODN) (○), dsODN × 3 (△) or Y-ODN (●) for 1 hr at 4° or 37°, and the amounts of ODN associated with cells were measured by flow cytometry. The mean fluorescence intensity (MFI) was plotted against the concentration of ODN. Results are expressed as the mean ± SD of three determinations. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from dsODN and dsODN × 3.

the same conditions as above. Y0a(CpG₃), an ODN containing a potent CpG motif, was selected as ssODN with a CpG motif, ssODN(CpG₃). Then, dsODN(CpG₃) and dsODN(CpG₃) × 3 were prepared as described above. Again, dsODN(CpG₃) × 3 had the same sequence as Y-ODN(CpG₃). Contrary to ODNs with no potent immunostimulatory CpG motifs, any preparation of ODNs containing CpG motifs showed a marked secretion of TNF-α in a concentration-dependent manner (Fig. 5a). Approximately six-fold higher amounts of TNF-α were released from RAW264.7 cells treated with Y-ODN(CpG₃) compared with those treated with dsODN(CpG₃) × 3. The IL-6 concentration in the culture media was also measured, and similar results were obtained (Fig. 5b). All ODN preparations contained trace amounts of LPS, up to 2.5 EU/mg DNA, when measured by a *Limulus* test (Wako, Tokyo, Japan). To exclude the effects of contaminated LPS on cytokine release, polymyxin B was added to ssODN and Y-ODN(CpG₃). The addition of polymyxin B to Y-ODN(CpG₃) slightly reduced the level of TNF-α released from RAW264.7 cells (Table 2). However, the level was much greater than those obtained with the medium + LPS/polymyxin B or ssODN + LPS/polymyxin B, suggesting that contaminated LPS has little effect on the ODN-mediated cytokine release from RAW264.7 cells. These results suggest that the immunostimulatory activity of the CpG motif-containing ODNs can be significantly increased by the Y-shape formation. In addition, increasing the number of potent CpG motifs in Y-ODN is a useful approach to increasing the immunostimulatory activity of Y-ODN.