Application toward Drug Delivery System Using β -1,3-Glucan

β -1,3-グルカンを用いた薬物送達システムへの応用

Maegawa, Yoshiya; Mochizuki, Shinichi; Miyamoto, Noriko; Sanada, Yusuke; and Sakurai, Kazuo

The University of Kitakyushu, 1-1, Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu, Fukuoka 808-0135, Japan

FAX: +81-093-695-3390, E-mail: sakurai@kitakyu-u.ac.jp

(Received on July 29, 2014, accepted on August 18, 2014)

Key Words: β -1,3-D-glucan, DDS, CpG-ODN, AS-ODN, SAXS

Abstract

A β -1,3-D-glucan called Schizophyllan (SPG) can form a novel complex with homo oligodeoxynucleotides (ODNs) via the combination of hydrogen bonding and hydrophobic interactions. Dectin-1 is a major receptor involved in the recognition of β -1,3-D-glucans and expressed on antigen presenting cells (APCs) including macrophages, dendritic cells, monocytes, neutrophils, and a subset of T cells. Therefore, the SPG/ODN complex can be used as APCs cell-specific delivery of antisense ODNs (AS-ODNs) or unmethylated CpG sequences (CpG-ODNs). In fact, AS-ODN/SPG complex protected mice from LPS-induced hepatitis and CpG-ODN/SPG complex induced high antibody titers when it was administered to cynomolgus monkeys as adjuvant of influenza vaccine. These results indicate that SPG can be an excellent drug delivery system carrier targeting APCs.

要 約

β -1,3-D-グルカンの一種であるシゾフィラン (SPG) はホモ配列のオリゴデオキシヌクレオチド (ODN) と水素結合や疎水性相互作用によって ODN/SPG 複合体を形成する。また、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞上には、 β -1,3-D-グルカンの受容体であるデクチン-1 が発現している。そのため、この複合体を用いることで、アンチセンス ODN (AS-ODN) や非メチル化 CpG 配列を持った ODN (CpG-ODN) を抗原提示細胞に特異的に送達することが可能になると考えられる。実際、AS-ODN/SPG 複合体をリポ多糖誘導型マウス肝炎モデルに投与したとき、炎症を抑えることができた。また、カンクイザルに CpG-ODN/SPG 複合体をインフルエンザワクチンのアジュバントとして投与したとき、高い抗体価を促すことができた。以上より、SPG は特に抗原提示細胞を標的とした薬物送達システムのキャリアとして有用であると考えられる。

A. Introduction

Drug delivery system (DDS) refers to the group of technologies for transporting pharmaceutical compounds to desired organs or cells, avoiding clearance due to kidneys or renal dialysis or degradation due to interactions with blood proteins before reaching its target (1). Development of good DDS is expected to enable targeting delivery of drugs, resulting in enhancement of clinical effect. We have focused on nucleic acid medicines consisting of therapeutic DNA or RNA, which are known as a new medicine in the next generation. The nucleic acid medicines are expected to enable effective medical treatment without side effects because they directly act on gene expression.

Schizophyllan (SPG), one of β -1,3-D-glucans family, can form complex with nucleic acids, and is recognized by antigen presenting cells (APCs). In this report, we introduce physical properties of the complex and the nucleic acid medicine delivery by use of this complex.

A. はじめに

薬物送達システム (DDS) は目的とする組織や細胞に薬を届けるまで、薬を分解や排出から防ぎながら輸送する技術のことをいう (1)。DDS の開発をすることで、あらゆる薬剤の局所的な送達が可能となり、さらなる薬理効果が期待される。なかでも、我々は次世代医薬として知られる核酸医薬に注目している。核酸医薬とは DNA や RNA 等の核酸から構成されるもので、遺伝子の発現に直接作用することにより、副作用のない効果的な治療が可能になると期待されている。

我々は、核酸との複合化能を有し、さらにそれ自体が抗原提示細胞への標的性も併せ持つ多糖で β -1,3-D-グルカンの一種であるシゾフィラン (SPG) について研究を行っている。本稿では、SPG が形成する核酸との複合体の物性と核酸医薬の送達について紹介をしたい。

Fig. 1. Repeating unit of schizophyllan (SPG) and poly(deoxyadenylic) (dA_x) and an illustration of their complexation and stoichiometric structures of the triple helix of SPG and the complex, denoted tSPG and dA_x/SPG .

B. Structural Analyst of SPG and Nucleic Acid/ SPG Complexes

B-1. Nucleic Acid /SPG Complexes

SPG is an extracellular polysaccharide produced by the fungus *Schizophyllum commune* Fries and consists of linearly linked β -1,3-D-glucose with one β -1,6-D-glucose side chain for every three main chain glucoses (2) (Fig. 1). It dissolves in neutral water as a rod-like triple helix (tSPG), whereas it disperses as a single chain (sSPG) in dimethyl sulfoxide (DMSO) and alkaline solutions (>0.25 N NaOH) (3–5). Recurrence (or renaturation) of tSPG is observed when the solution conditions of sSPG are changed to those favoring for tSPG such as pH=5–8 or DMSO/water $<4/1$ (weight). Although the local conformation for the renatured tSPG shows the same triple helix of the natural one according to X-ray diffraction patterns (6, 7), there were many branches or cross-links in terms of its overall morphology, depending on the renaturation concentrations (8). Interestingly, when some of single chain homopolynucleotides such as poly cytidylic acid [poly(C)] and poly deoxyadenylic acid [poly(dA)] are present in the renaturation process, a new complex is formed instead of the formation of tSPG (9, 10) (Fig. 1). Computational chemistry proved that the complex has an exact stoichiometric composition in which two main chain glucoses bind with one nucleotide, presumably with the combination of the hydrogen bonds and hydrophobic interactions (11). Later, it is shown that this complexation phenomena is generally observed for the β -1,3-D-glucan family including zymosan (12).

Among polynucleotides, poly(dA_x), where x is number of bases, shows the highest binding affinity to SPG, and when x exceeds about 40, the complexation yield come close to 100%. It was found

B. SPGおよび核酸／SPG複合体の構造解析

B-1. 核酸／SPG複合体

SPGは真菌類の一種である *Schizophyllum commune* Fries (和名：スエヒロタケ) によって産生される細胞外多糖であり、主鎖である β -1,3-D-グルコース3個に1個の割合で側鎖に β -1,6-D-グルコースを持っている(2) (Fig. 1)。SPGは水中において棒状の3重鎖(tSPG)として振る舞っているが、DMSO中やアルカリ水溶液中(>0.25 N NaOH)では1本鎖(sSPG)に解離する(変性)(3–5)。また、このsSPGはpH 5–8またはDMSO/water $<4/1$ (w/w)へと変化させることによりtSPGへと戻る(再性)。また、X線回折から再性tSPGの局所構造は天然のものと同様であると分かっているが(6, 7)、再性の際の濃度条件により、多数の分岐や架橋が生じることが分かっている(8)。さらに興味深いことに、塩基数がある一定以上のポリシトシン[poly(C)]やポリデオキシアデニン[poly(dA)]などのような1本鎖ポリホモ核酸がSPGの1本鎖から3本鎖に再性する過程に存在すると、本来形成すべきtSPGの代わりに新規な核酸／SPG複合体が形成することが分かった(9, 10) (Fig. 1)。また、この複合体は水素結合や疎水性相互作用などによって、一つの核酸残基に対して二つの主鎖グルコースになるような厳密な化学量論比で結合していると計算化学により裏づけされている(11)。最近では、 β -1,3-D-グルカン的一种であるサイモサンなどでも、ポリ核酸／多糖複合体を形成することが分かっている(12)。

ポリ核酸の中でもpoly(dA_x)はSPGと高い結合親和性を示し、核酸が40塩基以上でSPGと核酸の複合化反応の収率はほぼ100%になる。ここで示した x は塩基数である。また、

that the binding stability is further enhanced by phosphorothioation of the polynucleotide backbone of poly(dA), denoted by S-dA_x (13, 14).

Recently, it has been reported that particle shape is closely related to the interaction between the nanoparticles and the cells, and their physiological activity (15, 16). Therefore, it is necessary to understand physical properties of SPG in order to apply SPG as a DDS material. We examined dilute solution properties of SPG/poly(dA)_x complexes using size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS) and small-angle X-ray scattering (SAXS). Although scattering technique is a powerful tool for particles dispersed in solutions, this technique sometimes has difficulty to apply to complexes or aggregates that have size distribution. As described above, we achieved to obtain complex with exactly stoichiometric composition. The use of SEC enables us to carry out accurate molecular characterizations for each fractions by using scattering measurements.

The scattering results directly reflect *in situ* behavior of the complexes in solution, which cannot be obtained from microscopic study. These results are important to understand the physical property of the complexes, we believe, being necessary to apply the complexes to practical therapeutics use.

B-2. SEC-MALS to Determine Molecular Mass Dependence of the Radius of Gyration

We adopt the wormlike chain model to analyze the scattering data from the complexes. The wormlike chain model envisions the semiflexible polymers which have a certain chain stiffness, particularly suited to describe such as tSPG and double helix of DNA. The physical parameters to characterize the model are the persistence length (p) determined by the bending energy divided by the Boltzmann factor, the contour unit length (L), the molar mass per L (M_L), and the cross-sectional diameter of the worm-like cylinder (d). The persistence length is an indication of the chain stiffness; it goes to zero for the Gaussian chain and to infinity for the rigid rod limit. L is related to molecular weight of the chain by $L=M/M_L$, where M is molar mass. The values of M_L and d are well-related to the molecular dimension and the chemical structures (18–20). To obtain the parameters, we need the M dependence of the radius of gyration ($\langle S^2 \rangle^{1/2}$), which can be obtained with SEC-MALS.

$\langle S^2 \rangle^{1/2}$ of a wormlike chain can be written by the following Benoit-Doty equation (21):

$$\langle S^2 \rangle^{1/2} = \left[\frac{pL}{3} - p^2 + \frac{2p^3}{L} \left\{ 1 - \frac{p}{L} (1 - e^{-(L/p)}) \right\} \right]^{1/2} \quad (1)$$

At the rod limit, $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ is also given by the following equation:

poly(dA) の主鎖骨格のリン酸基をホスホロチオエート化した S-dA_x によって、複合体の安定性が著しく上昇するということが分かってきた(13, 14)。

近年、ナノ粒子と細胞との相互作用やその後の生理活性には、ナノ粒子の形状などが深く関与していると報告されている(15, 16)。そのため、SPGにおいてもこれらの物性を理解しておくことはDDSとして用いていくにあたり不可欠である。そこで、中でも本章では多角度光散乱検出器と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC-MALS) や小角X線散乱 (SAXS) などの散乱の手法を用いて、複合体にすることでSPGの形状がどのように変化するのかについて紹介する。散乱実験は均質な粒子の解析に対して強力な解析手段となりうるが、一般的な複合体試料は組成比の均質化の困難やサイズ分布から散乱実験の苦手とするところである。上記のように我々は化学両論的な組成比を持つ複合体の形成に成功しており、散乱を用いて分子構造解析が可能である。

これらの手法を用いることで、顕微鏡では観察することのできない、溶液中における複合体のそのままの状態を正確に知ることができる。実際にヒトへの治療に応用するにあたって、このように複合体の物性を正確に理解することは非常に重要である。

B-2. SEC-MALSによる慣性半径の分子量依存性

溶液中の高分子の形状を知る手段の一つとして、ミミズ鎖モデルを用いて解析する方法がある。ミミズ鎖モデルはある固さを持つ鎖を想定しており、tSPGや二重鎖DNAのような半屈曲性高分子に適用可能である。このモデルにおいて、持続長(p)、単位経路長(L)当たりのモル質量(M_L)、鎖の断面直径(d)が鎖の特徴を反映する物理的なパラメータである。持続長は鎖の硬さを表しており、曲げエネルギーをボルツマン定数で除算して得られ、例えば、ガウス鎖ではゼロとなり、剛直な棒では無限大となる。経路長は $L=M/M_L$ と表すことができ、鎖の分子量と関係がある。ここでの M はモル質量である。また、 M_L と d の値は分子の大きさや化学構造に深く関連する(18–20)。このミミズ鎖モデルを用いた解析には慣性半径($\langle S^2 \rangle^{1/2}$)の分子量依存性の情報が必要となる。そこで、SEC-MALSを用いて粒子の大きさで分画しながら重量平均分子量(M_w)と $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ を連続的に得、ミミズ鎖モデルを用い形状を評価した。

Benoit-Dotyの式によると、ミミズ鎖の $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ は上述のパラメータより以下のような式で与えられる(21)。

$$\langle S^2 \rangle^{1/2} = \left[\frac{pL}{3} - p^2 + \frac{2p^3}{L} \left\{ 1 - \frac{p}{L} (1 - e^{-(L/p)}) \right\} \right]^{1/2} \quad (1)$$

また、剛直な棒状分子では、以下の式で与えられる。

$$\langle S^2 \rangle^{1/2} = \frac{M}{2\sqrt{3}M_L} \quad (2)$$

$$\langle S^2 \rangle^{1/2} = \frac{M}{2\sqrt{3}M_L} \quad (2)$$

SEC-MALS experiments give the set of $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ and M_w , and by fitting the data with the theoretical curves calculated from the equations, we can obtain the persistence length p .

The following samples were prepared; SPG with two M_w (4.5×10^5 , 1.1×10^6) and dA_x/SPG and S-dA_x/SPG complex (dA₆₀/SPG, dA₁₀₀/SPG, S-dA₆₀/SPG, S-dA₁₀₀/SPG, and poly(dA)/SPG, where subscript numbers are the number of the bases, and poly(dA) have 250–350 bases. $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ is plotted against M_w for all samples in Fig. 2, compared with the individual static light scattering measurements of tSPG by Kashiwagi *et al.* (4) including the data of scleroglucan (22). Since SPG and scleroglucan have the same chemical structure but different fungus sources, both data points agree with each other. Since there was no significant difference between dA₆₀/SPG and dA₁₀₀/SPG for both DNA types, these were not discriminated.

Compared with the M_w of tSPG at the same $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ values, M_w of dA₆₀/SPG was shifted toward the larger M_w side and S-dA₆₀/SPG was further shifted. The slope of dA₆₀/SPG is almost parallel with that of tSPG, while that of S-dA₆₀/SPG was slightly decreased. The slope formed by the data points reflected structure of molecular chain, and indicated rigid rod when the slope is larger and closer to $\langle S^2 \rangle^{1/2} \propto M_w$. At low- M_w regions, $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ dependence of molecular weight is mainly determined by M_L , as expressed by Eq. (2) because dA₆₀/SPG which have large slope could be assumed to rod. Therefore, the shift can be interpreted by increase of M_L .

SEC-MALS から、各 M_w ごとの $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ が得られ、そして式(1)から計算した理論線で実験点を再現することで持続長 p を得ることができる。

用意した試料は M_w の異なる二つの tSPG (M_w : 4.5×10^5 , 1.1×10^6) と dA_x および S-dA_x/SPG 複合体 (dA₆₀/SPG, dA₁₀₀/SPG, S-dA₆₀/SPG, S-dA₁₀₀/SPG, poly(dA)/SPG) であり、下付きの数字は塩基数を表している。また、poly(dA) の塩基数は 250–350 である。Fig. 2 は各試料の分子量 M_w に対して $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ をプロットしたものである。また、柏木らが分子量分別し、静的光散乱測定から個別に得た tSPG (4) や、スクレログルカン (22) も比較として載せている。スクレログルカンは SPG とは異なる菌から産生された多糖であるが、化学構造が同じである。これらの tSPG、スクレログルカンの実験点は全て同一曲線状に乗った。DNA の長さの異なる複合体 dA₆₀/SPG と dA₁₀₀/SPG からはほぼ同一の M_w と $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ が得られた。

$\langle S^2 \rangle^{1/2}$ の値が同じ tSPG に対して dA₆₀/SPG の実験点は M_w が増加する方向へ移動しており、S-dA₆₀/SPG ではさらに移動している。また、dA₆₀/SPG の実験点の傾きは tSPG とほぼ同じであったが S-dA₆₀/SPG はわずかに小さくなった。この実験点の傾きは、高分子鎖全体の構造を反映しており、傾きが大きく $\langle S^2 \rangle^{1/2} \propto M_w$ に近いほど剛直な棒を表している。低分子量の領域において dA₆₀/SPG は傾きが十分大きく、棒状の分子と仮定できるため式(2)で記述でき、このとき $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ の分子量依存性は M_L のみで決まる。したがって、dA₆₀/SPG の曲

Fig. 2. Comparison of the measured and reported $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ for tSPG and scleroglucan with those of the complexes of dA₆₀/SPG, dA₁₀₀/SPG, S-dA₆₀/SPG, S-dA₁₀₀/SPG, and poly(dA)/SPG. The solid lines fitted to the data are calculated from the Benoit–Doty equation with the indicated parameters.

The solid lines fitted to the data points of tSPG and scleroglucan were calculated from Eq. (1) with $p=150\text{ nm}$ and $M_L=2000\text{ nm}^{-1}$. As Nakamura *et al.* (23) showed, the data points were well reproduced by the wormlike chain model in the range of 2 orders of the magnitude of $\langle S^2 \rangle^{1/2}$. Assuming that poly(dA)/SPG has the same M_L wormlike chain parameters with dA₆₀/SPG and dA₁₀₀/SPG, from the fitting data with Eq. (1), we can obtain the best combination of $p=56\pm 5\text{ nm}$ and $M_L=2200\pm 100\text{ nm}^{-1}$. This result shows that M_L is increased by the complexation and the chain becomes more flexible.

For S-dA₆₀/SPG and S-dA₁₀₀/SPG, M_w dependence of $\langle S^2 \rangle^{1/2}$ was about $\langle S^2 \rangle^{1/2} \propto M_w^{0.7}$ at low- M_w regions, and thus it couldn't be assumed to rod and used Eq. (2) unlike tSPG or dA_x/SPG. Therefore, we determined that $p=25\pm 6\text{ nm}$ and $M_L=1900\pm 150\text{ nm}^{-1}$ from solid line given by Eq. (1) at all- M_w regions. Since we do not have the larger molecular mass data ($M_w > 10^6$) for S-dA_x/SPG, the error inevitably enlarges. Although the large error for fitting, the M_L values more than 2000 nm^{-1} could not fit the data with any combination of p .

The allowable range for the determination was found to be $20\text{--}30\text{ nm}$ for p and $1800\text{--}2000\text{ nm}^{-1}$ for M_L ; the calculated lines with $p=27\text{ nm}$ and $M_L=1950\text{ nm}^{-1}$ and $p=22\text{ nm}$ and $M_L=1850\text{ nm}^{-1}$ are depicted in the figure for comparison. The results of the determined parameters are summarized in Table 1.

To sum up the fitting analysis, dA_x/SPG showed a larger M_L than tSPG, whereas S-dA_x/SPG decreased M_L . If one-third of tSPG is replaced by dA or S-dA without conformational changes, M_L would be increased by 1.15 and 1.17 times, respectively. The decreased M_L suggests that this assumption is not correct and the complexation may stretch the pitch of the triple helix of the com-

plex. The movement of M_L is increased by the complexation. From Eq. (1), the theoretical line is, $p=150\text{ nm}$, $M_L=2000\text{ nm}^{-1}$ and tSPG or scleroglucan's experimental points are within the range of 2 orders of the magnitude of $\langle S^2 \rangle^{1/2}$. Also, poly(dA)/SPG, dA₆₀/SPG, dA₁₀₀/SPG have the same parameters with wormlike chain model and it is assumed that, $p=56\pm 5\text{ nm}$, $M_L=2200\pm 100\text{ nm}^{-1}$ and from Eq. (1), the theoretical line is experimental points. This result shows that the complexation leads to the formation of a complex body, and M_L is increased, and the chain becomes more flexible.

S-dA₆₀/SPG, S-dA₁₀₀/SPG of low molecular weight region's molecular weight dependence is about $\langle S^2 \rangle^{1/2} \propto M_w^{0.7}$ and rod-like molecule and it is assumed that it is not possible to use Eq. (2) for tSPG or dA_x/SPG. Therefore, we determined that $p=25\pm 6\text{ nm}$ and $M_L=1900\pm 150\text{ nm}^{-1}$ from solid line given by Eq. (1) at all- M_w regions. Since we do not have the larger molecular mass data ($M_w > 10^6$) for S-dA_x/SPG, the error inevitably enlarges. Although the large error for fitting, the M_L values more than 2000 nm^{-1} could not fit the data with any combination of p .

The range of molecular weight is narrow for p and M_L is relatively narrow range ($p: 20\text{--}30\text{ nm}$, $M_L: 1800\text{--}2000\text{ nm}^{-1}$) and $p=27\text{ nm}$, $M_L=1950\text{ nm}^{-1}$ or $p=22\text{ nm}$, $M_L=1850\text{ nm}^{-1}$ and it was determined. These are summarized in Table 1.

From the results, dA_x/SPG is larger M_L than tSPG. On the other hand, S-dA_x/SPG's M_L is smaller than tSPG's. If one-third of tSPG is replaced by dA or S-dA without conformational changes, M_L would be increased by 1.15 and 1.17 times, respectively. The decreased M_L suggests that this assumption is not correct and the complexation may stretch the pitch of the triple helix of the complex. p is determined from the results of SAXS and combined with the results of SAXS.

Table 1. Wormlike chain parameters.

		p (nm)	M_L (nm ⁻¹)	d or d_h	References
tSPG	SEC-MALS ^a	150±30	2000±50		(4)
	Viscometer	200±30	2150±150	2.6±0.2	(24)
	SAXS	170±20		2.6±0.1	(25)
	XRD		2000	1.86	(6)
	MD		1951	2.65	(11)
dA _x /SPG	SEC-MALS	56±3	2200±50		
	Viscometer	40±2	2000±50	2.2±0.3	
	SAXS	55±5		2.4±0.1	
	MD		2170	3.05	(26)
S-dA _x /SPG	SEC-MALS	25±5	1900±100		
	Viscometer	18±2	1900±50	2.4±0.3	
	SAXS	35±10		2.5±0.1	
	MD		2050	2.94	(26)

^a We reanalyzed the data combined with tSPG and scleroglucan, adding our SEC/MALS data, and obtained $p=130\text{ nm}$ and $M_L=1950\text{ nm}^{-1}$.

plex. We will discuss about p in conjugation with the results obtained from SAXS in the next section.

B-3. SAXS to Determine Persistence Length (p) and Cross-Sectional Diameter of the Cylinder (d)

SAXS measurements give $I(q)$ corresponding to the scattering angle 2θ , where q is the magnitude of scattering vector defined by $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ with wavelength λ and the scattering angle of 2θ . $I(q)$ is explained by the scattering function so-called form factor represents local structure of polymer chains. Nakamura and Norisuye (23) developed the expression for the scattering function of a wormlike chain including p , L , d like the model of the previous section. We obtained these parameters from comparison of the experimental value from SAXS and theoretical line, and compared with the result of SEC-MALS.

Figure 3a presents SAXS profiles of tSPG, dA₆₀/SPG, and S-dA₆₀/SPG. All the data showed the relation of $I(q) \propto q^{-1}$ in $0.1 < q < 1.0$ region, which relation is expected for rigid thin rods, and the intensity deviated upward at the low q and downward in the high q regions. The former deviation is ascribed to chain flexibility and the later downward deviation is caused by the finite size of the cross-section of the chain. From these deviations, p and d of the wormlike chain can be determined, respectively.

To compare the data with the Norisuye–Nakamura theory, we replotted the data as the Holtzer plot, and Fig. 3b presents that of dA₆₀/SPG, for example. The right plot shows the entire q range, and the low- q range was enlarged in the left panel. By fitting the data with the Norisuye–Nakamura theory, p and d can be determined to be $d = 2.4 \pm 0.2$ nm and $p = 55 \pm 5$ for this case. For the other samples, the parameters were determined, and all of the results

B-3. SAXSによる持続長 (p) と断面直径 (d) の決定

SAXS測定から、散乱角度 2θ に対応した散乱強度 $I(q)$ が得られる。ここで、 q は散乱ベクトルの絶対値であり、波長 λ と散乱角 2θ のとき、 $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ で与えられる。この $I(q)$ は高分子鎖の局所構造を反映した散乱関数で説明でき、この散乱関数は通常形状因子と呼ばれる。中村、則末(23)によりミズ鎖における散乱関数が導出されており、前項と同じく p, L, d を含む関数で表すことができる。そこで、SAXSから得られた実験値と理論線の比較からこれらの変数を求め、SEC-MALSから得られた結果と比較した。

Figure 3a は tSPG、dA₆₀/SPG、S-dA₆₀/SPG の SAXS の測定結果である。すべての試料において、 $0.1 < q < 1.0$ の領域で $I(q) \propto q^{-1}$ の関係を示し、これは剛直な棒状構造を示唆している。また、低 q の領域では上方に、高 q の領域で下方に強度が直線から外れていっている。前者は鎖の柔らかさを反映しており、後者は鎖の断面直径を反映している。これらの直線からのずれから、 p や d をそれぞれ決定することができる。

則末–中村の理論線と実験点をわかりやすく比較するために、Holtzer plotでプロットし直したものをFig. 3bに示す。ここでは一例としてdA₆₀/SPGのものを示している。Fig. 3bの左図は q の全範囲で、右図に左図の低 q の範囲を拡大したものを示した。則末–中村の理論から、 $d = 2.4 \pm 0.2$ nm、 $p = 55 \pm 5$ nmと決定した。ほかの試料においても同様に d と p を決定し、Table 1にまとめた。SAXS測定から得られたtSPGやS-dAx/SPGの p の値はSEC-MALSで求めた p の値よりわずかに大きくはなったが、dAx/SPGでは同じであった。また、

Fig. 3. Small-angle X-rays scattering profiles after being extrapolated to the zero concentration for tSPG dA₆₀/SPG, and S-dA₆₀/SPG (a); Holtzer plots for the SAXS data of dA₆₀/SPG, compared with the Norisuye–Nakamura theory with different parameters (b).

are summarized in Table 1. The p values determined from SAXS are slightly larger than those from SEC-MALS for tSPG and S-dA_x/SPG, where as it is the same for dA_x/SPG, although they are in agreement within error range. The d value of dA_x/SPG was slightly smaller than tSPG and S-dA_x/SPG.

Although we abbreviate detail (27), we obtained wormlike chain parameters such as p using the Yamakawa theory (18, 20, 28) applied to molecular weight dependences of the intrinsic viscosity for tSPG and the complexes. In addition, our previous study showed these parameters from molecular dynamics (MD) (11, 26) and X-ray diffraction (XRD) (6). We summarized them in Table 1. All parameters which obtained from SEC-MALS, SAXS, the intrinsic viscosity and our previous study had similar values.

From the p values obtained from SEC-MALS and SAXS, we found that the chain flexibility was changed almost 25% upon complexation for dA_x/SPG and to 15% for S-dA_x/SPG. When a few of short dA chains were complexed with two sSPG chains, the obtained complex has several nicks. Therefore, this decreasing of stiffness can be due to the nick of the complexes or much flexibility of dA chain compared with tSPG. The changes of M_L and d indicate that the helical pitch of the chain is elongated or stretched along the axis direction upon the complexation.

We found that the flexibility of SPG is changed by complexation with the ODNs from physical parameters of the wormlike chain model obtained from scattering measurements. This information would be useful to application of complex to DDS.

C. Nucleic Acid Medicines Delivery Using SPG

We demonstrated that therapeutic oligodeoxynucleotides (ODNs), such as antisense (AS-ODNs) or unmethylated CpG (CpG-ODNs), coupled with dA (or S-dA) were complexed with SPG and delivered to APCs. In our previous report, We demonstrated therapeutic ODNs delivery using RGD modified SPG (29). RGD is short peptide sequence having high cell permeability (30). However, in 2001, Gordon *et al.* found a major β -1,3-glucan receptor called Dectin-1, expressed on the surface of APCs such as murine peritoneal macrophages and dendritic cells (31, 32). We presume that then therapeutic ODNs/SPG complex can be recognized by Dectin-1 and induce the uptake of the bound therapeutic ODNs without chemical modification such as ligand. If this hypothesis is correct, it can be possible to specifically deliver therapeutic ODNs into the APCs with Dectin-1. After this chapter, we introduce SPG having specificity for APCs as DDS carrier.

C-1. Treatment with the AS-ODN/SPG Complex Protects Mice from LPS/ α -GalN-Induced Hepatitis

AS-ODNs have proved potentially efficacious in the treatment of various diseases caused by disorders of gene expression.

dA_x/SPGの d 値はtSPGやS-dA_x/SPGと比較して少し小さくなっていた。

詳細は省略するが(27)、山川理論(18, 20, 28)を用いてSPGと複合体の粘度に対する分子量依存性を調べ、粘度測定からも各変数を得た。また、先行研究の分子ミュレーション(MD)(11, 26)やX線回折(XRD)(6)からも各変数が得られておりこれらも併せてTable 1にまとめた。我々のSEC-MALS、SAXS、粘度から得た結果、および先行研究から個々に得られ変数はいずれもよい一致を示した。

SEC-MALSやSAXSから得られた p から、複合体にすることでdA_x/SPGは15%、S-dA_x/SPGは25%鎖が柔らかくなることが分かった。いくつかの短いdAまたはS-dAが2本のsSPGと複合体を形成するとき、部分的に三重らせんにならない節目が生じる。そのため、柔軟性の増加は鎖に節目ができたことやtSPGよりも柔らかいdAまたはS-dAが組み込まれたためであると考えられる。 M_L や d の変化は、鎖が複合体の軸方向に伸び、らせんの間隔が広がったことを示唆している。

散乱の測定から得られたミズ鎖モデルの変数により、SPGと核酸とから成る複合体の柔軟性はtSPGと比較して増加することが分かった。これらの情報はDDSに複合体を用いていくにあたり重要な知見となりうる。

C. SPGを用いた核酸医薬の送達

我々はアンチセンス配列や非メチル化CpG配列のように治療効果を持ったオリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN or CpG-ODN)にdA(またはS-dA)を結合させ、SPGと複合体を形成させることで核酸医薬の送達を行っている。過去にはSPGに細胞透過性の高い短いペプチド配列であるRGDペプチド(30)をSPGに化学修飾させることで、ODNの送達を行っていた(29)。ところが2001年に、ゴードンらがマウスの腹腔マクロファージや樹状細胞などのような抗原提示細胞の表面に、デクチン-1と呼ばれる β -1,3-グルカンを認識する受容体を発見した(31, 32)。そこで我々は、リガンド等の化学修飾を施さず、ODN/SPG複合体がデクチン-1によって被認識されることで、抗原提示細胞内に取り込まれるのではないかと考えた。もしこの仮説が正しければ、デクチン-1を発現する抗原提示細胞へのODNの特異的な送達が可能になる。本章からは、抗原提示細胞への特異性を持ったSPGのDDSキャリアとしての可能性を紹介していきたい。

C-1. AS-ODN/SPG複合体を用いたマウスLPS/ α -GalN誘導肝炎の治療

アンチセンス-オリゴデオキシヌクレオチド(AS-ODN)は遺伝子発現によって引き起こされる様々な病気を治療する

Although the concept of antisense therapy was proposed more than two decades ago (33), the lack of an appropriate delivery tool to protect AS-ODNs from enzymatic degradation and non-specific adsorption remains the major obstacle to practical use. Therefore, in order to overcome this problem, we prepared AS-ODN/SPG complex comprising from AS-ODNs and SPG as a novel DDS carrier. In this section, we introduce the possibility of as AS-ODN carriers using SPG.

AS-ODN hybridizes with its target mRNA having genetic code and then inhibits protein translation by blocking further decoding by ribosomes or by cleaving of the DNA/RNA-hybridized part by RNase H-mediated degradation (34). We evaluated whether complexed AS-ODN can form DNA/RNA-hybridize.

We prepared AS-ODN/SPG complex from SPG and phosphorothioate AS-ODN with the (dA)₆₀ tail for TNF- α (AAC CCA TCG GCT GGC ACC AC-dA₆₀). We denote it by AS-dA₆₀/SPG. Cy5-labeled RNA was mixed with the FITC-labeled AS-dA₆₀/SPG, and the mixture was analyzed by agarose gel electrophoresis (Fig. 4a). When the sense RNA was treated with the AS-dA₆₀/SPG, a new smeary Cy5 band (indicated by arrow) appeared at a larger molecular weight than the original RNA (Fig. 4a right), coinciding with the complexed FITC (Fig. 4a left). This fact indicates that the complexed AS-dA₆₀ can hybridize with RNA and, importantly, can do so without being dissociated from SPG. These results also indicated that the parts of therapeutic ODNs forming heterosequence are not embedded into the helix.

We evaluated lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF- α suppression (35) by the AS-dA₆₀/SPG complex. The complex suppressed TNF- α secretion in dose-dependent manner, while the naked dose did not cause any suppression (Fig. 4b). The suppression was appreciable even at 10 nM, lower than the dose usually reported for antisense assays *in vitro* (36).

Fulminant hepatitis induced by LPS/D-galatosamine (LPS/D-GalN) strongly involved in Kupffer cells which are one of liver non-parenchymal cells (NPCs) (37). The pharmacokinetics of the AS-dA₆₀/SPG complex showed specific incorporation into NPCs expressing Dectin-1 rather than parenchymal cells (PCs). Therefore, we found that the complex was incorporated into cells through the Dectin-1 (Fig. 4c).

Finally, we evaluated whether the treatment with the AS-dA₆₀/SPG complex protects mice from LPS/D-GalN induced hepatitis (38). In mice, LPS/D-GalN gave 80% mortality within 12h. Interestingly, treatment with complex gave 80% survival, but then naked dose gave no improvement. The complex significantly reduced the serum levels of TNF- α at 1h compared with that treated with PBS (Fig. 4d). Histological analysis of the livers from mice treated with LPS/D-GalN showed serious damage, death of a large amount

可能性を秘めている。このアンチセンス療法の概念は20年以上前から存在するが(33)、AS-ODNを酵素分解や非特異的な吸収から防ぐ適切な輸送手段に課題があることが、これまで実用化への障害となっていた。そこで、我々はこの課題を克服するべくAS-ODNとSPGからなるAS-ODN/SPG複合体を新たなDDSキャリアとして作製した。この項では、SPGを用いたAS-ODNキャリアとしての可能性を紹介する。

AS-ODNはターゲットとなる遺伝情報を持つmRNAと二重鎖を形成することで、リボソームがそれを読み取られることを防ぎ、このDNA/RNAの二重鎖がRNase Hによって切り取られることによってタンパク質翻訳を阻害することが知られている(34)。そこで、まずSPGとの複合体を形成しているAS-ODNにおいてもDNA/RNAの二重鎖を形成するか評価した。

AS-ODN/SPG複合体はSPGとdA₆₀を結合させたTNF- α のAS-ODN (AAC CCA TCG GCT GGC ACC AC-dA₆₀)を用いて作製した。以下AS-dA₆₀/SPGとする。Fig. 4aはCy5を修飾したRNAとFITCを修飾したAS-dA₆₀を混ぜ、アガロースゲル電気泳動により評価したものである。センス鎖RNAに複合体を加えたときRNAのみのときよりも高分子量側 (Fig. 4a right)、また、複合体と同じ位置 (Fig. 4a left) に新たにスメアなバンドが現れるようになった。このことから、複合体はRNAと二重鎖を形成することができ、それはSPGから解離することなく行われていることが分かった。同時に、ヘテロ配列で構成される核酸はSPG鎖の中には組み込まれないということを示唆している。

次に、リポ多糖体 (LPS) で細胞を刺激して産生させたTNF- α (35) をAS-dA₆₀/SPG複合体が抑制するかの評価を行った。Fig. 4bから、AS-dA₆₀単体の添加ではTNF- α の抑制効果が見られないが、複合体を用いることで添加量依存的にTNF- α の産生を抑制した。この抑制効果は一般的に用いられるアンチセンスの量よりも少ない10 nMでも見られた(36)。

LPS/D-ガラクトサミン (LPS/D-GalN) 投与で誘導される劇症肝炎では肝臓の非実質細胞中のマクロファージであるKupffer細胞が強く関与することが知られている(37)。そこで、AS-dA₆₀/SPG複合体を肝炎を誘発させたマウスに投与し、その体内動態を調べたところ、複合体はデクチン-1を発現しない実質細胞よりも発現する非実質細胞により多く取り込まれた。そのため複合体はデクチン-1を介して取り込まれているということが分かった (Fig. 4c)。

最後に、LPS/D-GalNでマウスに肝炎を誘発させ(38)、それに対するAS-dA₆₀/SPG複合体の治療効果を評価した。LPS/D-GalNをマウスに投与した後、何も薬剤を投与しない群 (PBS) では12時間以内に80%の死亡が確認され、AS-dA₆₀単体をマウスに投与した群においても同様の結果が得られた。しかし興味深いことに、複合体を投与した群では80%の生存が確認された。またこのとき、PBSと比べてわずか1

Fig. 4. Hybridization between complexed AS-dA₆₀ with a mRNA analogue. The electrophoresis images after being mixed with FITC-AS-dA₆₀ and Cy5-labeled sense TNF- α RNAs. The sense TNF- α RNA was incubated with FITC-AS-dA₆₀ and FITC-AS-dA₆₀/SPG in PBS 2 h 37°C. Cy5 from RNA and FITC from AS-dA₆₀ were observed. The arrow indicates the band for sense TNF- α RNA hybridized with AS-dA₆₀/SPG (a). Silencing TNF- α secretion determined with ELISA due to AS-dA₆₀ administration to LPS-stimulated peritoneal macrophages for different dose conditions. AS-dA₆₀ dose dependence of the silencing (b). AS-dA₆₀/SPG-mediated TNF- α inhibition on the progression of LPS/D-GalN-induced fulminant hepatitis. At 30 min after incubation with 0.5 μ M FITC-labeled AS-dA₆₀/SPG or AS-dA₆₀/SPG, the fluorescence intensities were measured for the cell lysates of liver PCs and NPCs (c). TNF- α level in the serum was measured at 1 h after LPS/D-GalN administration. The blood was obtained by retro-orbital bleeding. n and c represent naked AS-dA₆₀ and AS-dA₆₀/SPG administration, respectively. * p <0.05, ** p <0.01 (d). A representative liver histology of LPS/D-GalN-induced hepatitis in mice injected with PBS, AS-dA₆₀, or AS-dA₆₀/SPG (5 mg/kg). At 6 h after LPS/D-GalN injection, the livers were stained with H & E. Original magnification $\times$ 200 (e).

of cells, and severe hemorrhage (Fig. 4e). The naked dose did not give any improvement. In contrast, the livers of mice treated with the complex did not show any of these abnormalities. These histological results are consistent with the survival test and the reduction of the serum TNF- α .

AS-dA₆₀/SPG complex was incorporated into cells through the Dectin-1 and suppressed inflammation, and improved survival rate of mice. These results show that the SPG complex can be used to deliver AS-ODN into APCs.

C-2. IL-12 Production Due to Administration of the CpG-ODN/SPG Complex

The innate immune system has the remarkable ability to distinguish subtle differences between pathogenic and host molecules with the aid of Toll-like receptors (Toll-Like Receptors: TLRs) (39, 40). In particular, TLR9 is located in the endocytosis compartments of APCs, and lowering the pH at the late endocytosis can

時間でTNF- α の血清レベルが著しく減少していることが分かった (Fig. 4d)。さらに、マウスの肝臓の組織的解析から、PBSやAS-dA₆₀単体をマウスに投与した群では、細胞の壊死が目立ち、出血も起こしていたが、複合体を投与した群ではそれらが観察されなかった (Fig. 4e)。これら組織学的な結果は、マウスの生存率の上昇やTNF- α の減少を示した結果を裏づけるものである。

以上より、AS-dA₆₀/SPG複合体はデクチン-1を介して細胞内に取り込まれ、炎症を抑制し、マウスの生存率を向上させることができた。このことから、SPGは抗原提示細胞特異的なAS-ODNのキャリアとして有用であると考えられる。

C-2. CpG-ODN/SPG複合体の添加によるIL-12の産生

自然免疫機構は、トール様受容体 (Toll-Like Receptor: TLR) を用いることで、自己と病原性の分子のわずかな違いを区別し、認識している (39, 40)。とりわけ、TLR9は抗原提示細胞のエンドサイトーシスに存在し、後期エンドサイトーシスでのpHの低下により、非メチル化CpG配列を持ったODN (CpG-ODN) と結合する (41, 42)。近年、CpG-ODN

lead TLR9 to bind ODN having unmethylated CpG sequences (CpG-ODNs) (41, 42). A recent study has shown that dimerization of TLR9 is critical to its activation by CpG-ODN (43). After the activation, NF- κ B is recruited through a MyD88-dependent pathway, and eventually, a Th1 response is initiated, following the production of various cytokines including IL-12. The optimal CpG motifs for murine TLR9 are defined as an unmethylated CpG dinucleotide flanked by two 5' purines and two 3' pyrimidines, *i.e.*, Pu-Pu-C-G-Py-Py (44). Methylation of the cytosine or sequence inversion from CpG to GpC does not activate TLR9 at all, indicating that this recognition is highly sensitive to molecular structure (45). In the past 10 years, the molecular mechanism of CpG-ODN/TLR9 interactions has gradually become understood. In accordance with this, clinical trials of CpG-ODN have been conducted for allergies, asthma, cancers, and certain infectious diseases (46). In this section, we introduce DDS for CpG-ODN as one of the immune adjuvant.

Fig. 5a compares polyacrylamide gel electrophoresis patterns between CpG-dA₆₀ (TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-dA₆₀) and its mixture with SPG. With increase of [mG]/[dA], the naked CpG-dA₆₀ band faded away. Here [mG] and [dA] mean the molar concentration of the main-chain glucose of SPG and the dA base of CpG-dA₆₀ respectively. The ratio of complexation determined by fluorescence contrast was 56% in lane 2, 78% in lane 3, 96% in lane 4, and 100% in lane 5–8, respectively.

Peritoneal macrophages express TLR9 and induce IL-12 by stimulation with CpG-ODN (47). We added the complexes with various compositions to the peritoneal macrophages (48), and measured the amount of secreted IL-12 with ELISA (Fig. 5b). In the range of [mG]/[dA]=0–1.0, the production slightly increased with increase of the amount of SPG, and dramatically enhanced

によるTLR9の活性化には、TLR9の2量化が必要不可欠ということが明らかにされている(43)。この後、MyD88依存経路によりNF- κ Bが誘導され、IL-12などの様々なサイトカインを産生するTh1反応が引き起こされる。マウスにおけるTLR9の最適なCpGモチーフは、非メチル化されたCG配列の5'側に2つのプリン、3'側に二つのピリミジンを持つPu-Pu-C-G-Py-Py(44)の配列であるとされている。これはメチル化されたシトシンや、CpGの配列を入れ替えたGpC配列ではTLR9は全く活性化されないため、TLR9によるCpG-ODNの認識は分子構造に高い選択性を持っていると分かる(45)。10年程前から、CpG-ODNとTLR9の相互作用の分子機構は、徐々に解明されてきた。これに従い、CpG-ODNを用いた臨床試験はアレルギー、ぜんそく、がん、ある種の感染症などで行われている(46)。この項からは、免疫アジュバントであるCpG-ODNを用いたDDSについて紹介したい。

Fig. 5a は CpG-dA₆₀ (TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-dA₆₀) と SPG の組成比を変えて混合し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて比較したものである。[mG]/[dA] が増加するに従って CpG-dA₆₀ のバンドが消えていることが分かる。ここで、[mG] は SPG の主鎖グルコース、[dA] は CpG-dA₆₀ 中の dA のモル濃度である。蛍光強度から算出した複合体の存在比は、レーン 2 では 56%、レーン 3 では 78%、レーン 4 では 96%、レーン 5–8 では 100% であった。

腹腔マクロファージは TLR9 を発現しており、CpG-ODN により IL-12 を産生する(47)。そこで、SPG と CpG-dA₆₀ の組成比を様々に変化させて腹腔マクロファージ(48) に添加し、ELISA を用いて IL-12 の産生量を測定した (Fig. 5b)。[mG]/[dA]=0–1.0 の範囲で、IL-12 の産生量は SPG の量を増やすことにより増加し、[mG]/[dA]=2 では著しく増加した。[mG]/[dA]=5 で、複合体は CpG-dA₆₀ 単体と比較して約 7 倍も多くの IL-12 を産生したが、SPG の量をさらに増加させると産生量は減少した。興味深いことに、細胞への取り込み量が [mG]/[dA]=1 と 5 の間で CpG-dA₆₀ 量がわずかにしか異ならないにもかかわらず、細胞からの IL-12 の産生量は著し

Fig. 5. Complexation of CpG-dA₆₀ and SPG confirmed by 12% polyacrylamide gel with SYBR Gold stain. [CpG-dA₆₀] indicates the number of CpG-dA₆₀ molecules included in one complex that is calculated from [mG]/[dA]. The upper illustrations show how the SPG and CpG-dA₆₀ molecules exist in the solutions; at [mG]/[dA]<2, there is free CpG-dA₆₀ and the complex is fully loaded with CpG-dA₆₀, while at [mG]/[dA]>2, there is uncomplexed SPG and the complex has fewer CpG-dA₆₀ (a). The complex composition dependence (CpG-dA₆₀: 0.5 μ M) of IL-12 production from the murine peritoneal macrophages after incubation for 24h. The abbreviation (ND) means “not detectable” (b).

at $[mG]/[dA]=2$. At $[mG]/[dA]=5$, the complex induced about 7-fold higher production than that of naked CpG-dA₆₀, and the production decreased with further increase of amount of SPG. Interestingly, between $[mG]/[dA]=1$ and 5, there is a significant difference in the IL-12 production from cells, while the amount of CpG-dA₆₀ taken up by the cells differed only slightly among them (13).

From chapter B, we showed that the complex is more flexible than SPG. Our recent study has shown that the flexibility of the polymer containing CpG-ODN is a key to induce the large amount of IL-12 (17). Once one CpG branch binds to one TLR9 dimer, the SPG is locked adjacently to the vesicle surface where other TLR9 dimers are present. When the structure is flexible enough to turn, the second binding can easily occur, and the adjacent second binding seems to be critical for the allosteric effect. At $[mG]/[dA]<2$ in Fig. 5b, the complex is considered to have the maximum number of CpG-dA₆₀ due to the CpG-dA₆₀-rich composition. On the other hand, at $[mG]/[dA]>2$, most of the complexes have fewer CpG-dA₆₀ than that at $[mG]/[dA]<2$ due to the SPG-rich composition. With increasing $[mG]/[dA]$, the flexibility of the complex is considered to increase. The complex with rigid structure could be difficult to access the adjacent TLR9 dimers, while the complex with flexible structure could access them easily. Therefore, the cytokine secretion drastically increased at $[mG]/[dA]>2$ because of the easy accessibility of the complex to TLR9 dimers. These results suggested the existence of a particular higher-order structure to activate TLR9 more efficiently.

We found that SPG is highly effective even in the delivery of adjuvant. In the next section, we introduce therapeutic effect by CpG-ODN/SPG complex against mice and cynomolgus monkeys.

C-3. A Potent Adjuvant for Influenza Vaccine in Murine and Nonhuman Primate Models

There are at least four types of CpG-ODN, each of which has different backbone, sequence and immunestimulatory properties (49). In particular, K-type (also called B) CpG-ODN (K3) contains nonpalindromic multiple CpG motifs, and strongly activates B cells to produce IL-6 and plasmacytoid dendritic cell to maturation but barely produces IFN- α (50, 51). In this section, we introduce the demonstration using K3 among CpG-ODNs.

We compared the adjuvant effects of K3 (ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC), K3-dA₄₀, and K3-dA₄₀/SPG in a murine immunization model. When wild type mice immunized with LPS free chicken ovalbumin protein (OVA) alone or OVA with each K3-derived adjuvant, K3-dA₄₀/SPG induced significantly higher humoral immune responses and stronger T-cell responses than that induced by K3. Of note, tetramer assays revealed a significantly greater number of OVA-specific CD8 T-cells (Fig. 6a). CD8 T-cells become cytotoxic T lymphocyte (CTL) by activation (52). We

く異なっている (13)。

B章より、我々はSPGが核酸との複合体を形成することで柔軟性が増すということを明らかにした。また、近年の我々の研究でCpG-ODNを含んだポリマーの柔軟性が大量のIL-12を産生するために極めて重要だと明らかにしている (17)。SPGから何個か分岐したCpGの中の1個が一つのTLR9に結合すると、SPGはTLR9の2量体が存在する小胞表面に隣接して固定される。構造が回転できるように柔軟なとき、2個目のCpGの結合は容易に起こることができ、それによりアロステリック効果が引き起こされと考えられる。Fig. 5bで $[mG]/[dA]<2$ のとき、CpG-dA₆₀の数はSPGに対して豊富な構成比であるため一つの複合体中に存在するCpG-dA₆₀は最大数であると考えられる。一方で、 $[mG]/[dA]>2$ のとき、複合体は構成比に占めるSPG割合が多くなってしまいうため、 $[mG]/[dA]<2$ のときに比べ、複合体中に存在するCpG-dA₆₀の量が少なくなっている。そのため、 $[mG]/[dA]$ が増加すれば複合体の柔軟性は増加していくと考えられる。柔らかい構造の複合体は1個目以降のCpGがTLR9の2量体に接近することが容易であるに対して、固い構造の複合体は接近することが難しくなる。したがって、 $[mG]/[dA]>2$ でIL-12の産生が著しく増加したのは、複合体がTLR9の2量体へより接近しやすくなったためだと考えられる。これらの結果は、TLR9を活性化させる特定の高次構造の存在がより効果が高くなるということを示唆している。

以上より、SPGはアジュバントの送達においても高い効果を発揮することが分かった。次の項では、CpG-ODN/SPG複合体を用いてマウスやカニクイザルに対する、治療効果について紹介する。

C-3. マウスや霊長類のインフルエンザワクチンモデルにおけるアジュバントとしての有用性

CpG-ODNには少なくとも四つの種類があり、それぞれで異なった骨格や配列、また免疫刺激の特性が異なる (49)。なかでも、K (またはB) タイプ CpG-ODN (K3) は非回文的な複数のCpGモチーフを含んでおり、IL-6を産生するB細胞を強く活性化させ、わずかなIFN- α 産生を伴う形質細胞様樹状細胞の成熟化を促すことが知られている (50, 51)。本項からは、CpG-ODNの中でもK3を用いた実験を紹介する。

我々はマウスの免疫モデルにおけるK3 (ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC) とK3-dA₄₀、K3-dA₄₀/SPGのアジュバント効果を比較した。野生型のマウスにLPSの入っていないチキン卵白アルブミン (OVA) 単体と、各K3アジュバントをさらに加えたものとで免疫すると、K3-dA₄₀/SPGを用いたものではK3と比べ、高い液性免疫反応やT細胞応答を誘導した。注目すべきは、OVA特異的CD8 T細胞が著しく増加しているということである (Fig. 6a)。ここで、CD8 T細胞は活性化することにより細胞障害性T細胞 (CTL) となる (52)。

also observed very strong *in vivo* cytotoxic T CTL activity against coadministered protein antigens lacking any covalent conjugation (53). This strong CTL induction by K3-dA₄₀/SPG was reproduced by peptide vaccination (Fig. 6b). These results clearly indicate that K3-dA₄₀/SPG is a more prominent adjuvant than K3 alone.

We sought the adjuvant effect of K3-dA₄₀/SPG by using more clinically relevant influenza vaccination models in both mice and nonhuman primates. When mice were immunized with ether-treated hemagglutinin antigen-enriched virion-free split vaccine (SV) plus the indicated adjuvant, K3-dA₄₀/SPG demonstrated superior adjuvant effects to K3 when antibody responses and T-cell responses were compared. More importantly, SV plus K3-dA₄₀/SPG immunization resulted in a 100-fold greater antibody response, even compared with vaccination using a whole (virion) inactivated vaccine (WIV) (0.2 µg per mouse), which contains viral RNA as a built-in adjuvant (54). Interestingly, SV plus K3-dA₄₀/SPG strongly induced both CD8 and CD4 T-cell responses. CD4 T-cells are well known for various helper roles such as activation of CD8 T-cells. Strikingly, K3-dA₄₀/SPG conferred 100% protection against lethal PR8 virus challenge at the dose of which only 10% of WIV-vaccinated mice survived (Fig. 6c). These results strongly support the notion that K3-dA₄₀/SPG works as a potent adjuvant for protein

さらに、マウスでの *in vivo* 試験において化学結合などを施さずにただ加えたタンパク質抗原に対して、強いCTL活性を観察することができた(53)。また、K3-dA₄₀/SPGによるCTLの強い誘導はペプチドにおいても見られた (Fig. 6b)。これらの結果は、K3-dA₄₀/SPGはK3単体と比較してより優れたアジュバントであることを示唆している。

我々はマウスと霊長類について、より臨床的なインフルエンザワクチン接種モデルを用いて、K3-dA₄₀/SPGのアジュバントとしての効果を評価した。エタノール処理を施しウイルス構造を崩したヘマグルチニン抗原豊富なスプリットワクチン (SV) とアジュバントを混ぜたものをマウスに免疫したとき、K3-dA₄₀/SPGにおける抗体やT細胞の応答はK3に比べて高い効果を示した。また、SVにK3-dA₄₀/SPGを加えた免疫は、アジュバントの役割を果たすウイルスRNAを含む全粒子ワクチン (WIV) (54) を用いたときと比較して、100倍も高い抗体産生を促した。興味深いことに、SVにK3-dA₄₀/SPGを加えてマウスを免疫したものは、CD8やCD4 T細胞の応答を強く誘導した。ここで、CD4 T細胞はCD8 T細胞を活性化させるなどの補助的な役割を担う。さらに、WIVでマウスを免疫したときの10分の1しかK3-dA₄₀/SPGを免疫投与していないにもかかわらず、致死性のPR8ウイルスに対してマウスを100%生存させることができた (Fig. 6c)。これ

Fig. 6. K3-dA₄₀/SPG acts as a potent vaccine adjuvant by simple mixture with antigen. Adjuvant activities of K3-dA₄₀/SPG were analyzed. C57BL/6 mice were immunized s.c. with ova protein antigen and various adjuvants. OVA₂₅₇₋₂₆₄ specific tetramer were monitored (d17) after immunization (d0 and d10) with OVA (100 µg) with or without K3 (10 µg) or K3-dA₄₀/SPG (10 µg) (a). Immunization with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (10 µg) with or without adjuvant as indicated (b). K3-dA₄₀/SPG acts as an influenza vaccine adjuvant in mice and nonhuman primates. C57BL/6J mice were immunized with SV (0.1 µg), whole inactivated vaccine (WIV) (0.2 µg), or SV (0.1 µg) plus K3-dA₄₀/SPG (10 µg) at days 0 and 14. Fourteen days after the final immunization, mice were challenged with a 10-LD₅₀ dose of influenza virus A/PR/8 (H1N1). Changes in mortality were monitored for the next 20 d (c). Cynomolgus monkeys were immunized with SV (5 µg) plus K3 (5 nmol) or SV plus K3-dA₄₀/SPG (5 nmol) at days 0 and 14. Serum samples were collected at -2, 2, 4, 6, 8, and 110 wk. Antigen-specific serum anti-body titers were measured by ELISA (d). *p<0.05 (Mann-Whitney *U* test).

or protein-based vaccines in a murine model.

We extended this finding to a nonhuman primate model using the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Each group of three cynomolgus monkeys was immunized with SV plus K3 or K3-dA₄₀/SPG at days 0 and 14. Serum antibody titers were then monitored for 8 wk. The SV plus K3-dA₄₀/SPG induced significantly higher antibody titer at 2 wk postimmunization, and titer levels remained high for at least another 6 wk (Fig. 6d left). Although antibody titers were reduced at 110 wk after immunization, the K3-dA₄₀/SPG group had higher antibody titers than the K3 group (Fig. 6d right).

We found that K3-dA₄₀/SPG adjuvant induced antigen specific immune response. The protective potency of K3-dA₄₀/SPG as an influenza vaccine adjuvant was demonstrated *in vivo* in both murine and non-human primate models. Taken together, these results suggest that K3-dA₄₀/SPG is a prominent vaccine adjuvant.

D. Preparation of a Novel DDS Materials with SPG

SPG can make a complex with ODN (9, 10) and be recognized by APCs (31, 32). On top of that, SPG can entangle hydrophobic column (55, 56). This section, we introduced new particles using these properties of SPG.

D-1. Crosslinked K3-dA₄₀/SPG Nanoparticle

According to recent studies (13, 57), there is a particular range in size suitable for cellular uptake. Although it depends on cells and endocytosis pathways, its range is normally a few hundred nm (15). Comparing with these sizes, the present K3-dA₄₀/SPG is relatively small when we used SPG with the molecular weight of 150K (*ca.*, 10–20nm in diameter). Therefore the preparation of larger particles with K3-dA₄₀/SPG would enhance performance or add further functionality to the present system. One way to make a large particle is to use K3-dA₄₀ portions as a crosslinking point (Fig. 7a).

We mixed complementary CpG (cK3)/SPG and K3-dA₄₀/SPG at the same molar ratio and examined this mixture (denoted Nanoparticle) with dynamic light scattering (*ca.* 150nm in diameter) (58). Here, cK3-dA₄₀ sequences are GAG AAC GCT CGA GAG TCG AT-dA₄₀, respectively. Figure 7b compares the cytokine (Interleukin 6; IL-6) secretion level determined with ELISA. As expected, cK3-dA₄₀/SPG did not cause IL-6 secretion at all. The nanoparticle showed the highest immune response; three and thirty times larger than K3-dA₄₀/SPG and K3-dA₄₀ itself, respectively.

The result of Fig. 7b is rather surprising in terms of the following reason. K3-dA₄₀ is recognized by TLR9 and induces the immuno response only when they are present in the single strand. In fact, when we applied K3-dA₄₀/cK3-dA₄₀ double strand to the same cells, there was no secretion observed. It is most likely that

らの結果から、K3-dA₄₀/SPGはマウスにおいてアジュバントとして機能していることが分かった。

次は霊長類モデルとしてカンクイザルを用いた系で評価した。異なるカンクイザルの群に0日目と14日目に、SVにK3またはK3-dA₄₀/SPGを加えたものを免疫した。血清抗体価は8週間にわたって追跡した。SVにK3-dA₄₀/SPGを加えたものは2週間で著しく抗体価が増加し、少なくともその後6週間は維持された (Fig. 6d left)。免疫をしてから110週目で抗体価は減少したが、K3-dA₄₀/SPGはK3の投与群よりも高い抗体価を示した (Fig. 6d right)。

以上より、K3-dA₄₀/SPGを用いたアジュバントは抗原特異的に免疫応答を促すことが分かった。また、マウスや霊長類モデルにおけるインフルエンザワクチンアジュバントとしての非常に高いワクチン効果を発揮した。このことから、K3-dA₄₀/SPGはワクチンアジュバントとしても非常に有用であることが分かる。

D. SPGを用いた新規DDS材料の作製

SPGは今まで紹介してきた、ODNとの複合化能(9, 10)や抗原提示細胞への被認識能(31, 32)のほかに疎水性の物質を包摂(55, 56)することができる。この章では、SPGのこれらの性質を利用した、新規粒子について紹介したいと思う。

D-1. K3-dA₄₀/SPG架橋ナノ粒子

近年の研究で(13, 57)、粒子が細胞に取り込まれる最適な大きさが明らかにされている。それは、細胞やエンドサイトーシス経路に依存はするが、一般的に数百ナノメートルだと言われている(15)。一方で、我々が現在用いている分子量が150KのSPGを用いた場合、K3-dA₄₀/SPGの大きさは10–20nmであり、最適だと言われている粒子サイズに比べて小さい。したがって、より大きなK3-dA₄₀/SPGを作製することができれば、細胞内への粒子の取り込み量を増やし、さらなる薬理効果を得ることが期待できる。粒子サイズを増加させる方法の一つとして、我々はK3-dA₄₀の一部を架橋点にした粒子を作製しようと考えた (Fig. 7a)。

架橋ナノ粒子は、K3-dA₄₀/SPGと相補鎖配列を持つcK3-dA₄₀/SPGを等モルで混ぜ作製した。動的光散乱測定により、架橋ナノゲルの粒子サイズは150nmを示し、これまで用いていたK3-dA₄₀/SPGのサイズよりも増加していることが分かった(58)。cK3-dA₄₀の配列は (GAG AAC GCT CGA GAG TCG AT)-dA₄₀である。Fig. 7bはインターロイキン6 (IL-6)の産生量をELISAにより比較し評価したものである。予想通り、cK3-dA₄₀/SPGでは全くIL-6は産生されなかった。そして、最も高い免疫応答を促したのは架橋ナノ粒子であり、K3-dA₄₀/SPGの3倍、K3-dA₄₀の30倍のIL-6の産生量であった。

K3-dA₄₀は1本鎖で存在するときのみTLR9に被認識され、免疫反応を促す。実際に、K3-dA₄₀/cK3-dA₄₀の二重鎖を添加したとき、サイトカインの産生は起こらなかった。また、

Fig. 7. Schematic illustrations of (i) the two types of the binary complexes; K3-dA₄₀/SPG and cK3-dA₄₀/SPG and (ii) formation of ternary complex (or nanoparticle) with crosslinking through hybridization between K3 and cK3 portions (a). Comparison of IL-6 secretion induced by stimulation of the crosslink nanoparticle, K3-dA₄₀ itself and K3-dA₄₀/SPG at 20 nM by K3-dA₄₀. The white bar indicates 2000 nM with K3-dA₄₀ (b).

Fig. 8. Illustration of the CH-CDex and SPG nanogel formation due to the cholesterol/SPG interaction and of ingestion of protein (a); Fluorescence intensity of R-BSA taken up by D-RAW cells (b).

some of the K3-dA₄₀ portions in the nanoparticles are hybridizing with cK3-dA₄₀ portions to form the crosslinking. Therefore, there should be less chance to stimulate TLR9 for the nanoparticle than K3-dA₄₀/SPG. Therefore, the net amount of immuno-active K3-dA₄₀ in the nanoparticle was half of K3-dA₄₀/SPG because we fixed the total amount of K3-dA₄₀ for this comparison.

Therefore, the crosslinked complex is expected to enhance the adjuvant effect such as influenza vaccine, because it is suitable size for cellular uptake compared with SPG.

D-2. Dual-Sugar Nanogel

Akiyoshi *et al.* proposed that the nanogel made from cholesterol-hydrophobized pullulan (59–61) or dextran (CH-CDex) (62) can encapsulate various proteins. The cholesterol moieties attached on the side chains of those polysaccharides can play a role of temporal physical cross-link points and these dynamical hydrophobic domains can ingest proteins dispersing in aqueous phase. Recently, they demonstrated that their cholesterol-bearing nanogel similar to CH-CDex can be used as an efficient carrier for cancer vaccination (63).

According to Numata *et al.*, when there are hydrophobic compounds such as cholesterol, aromatic polymers (55), or carbon

このナノ粒子はいくつかのK3-dA₄₀とcK3-dA₄₀が二重鎖を形成し架橋することにより形成されている。そのため、K3-dA₄₀の一部が架橋に用いられることで、K3-dA₄₀/SPGに比べK3-dA₄₀がTLR9を刺激する頻度が少なくなるはずである。以上のことから、核酸量を固定してサンプルを調整した、ナノ粒子はK3-dA₄₀/SPGの半分しか、K3-dA₄₀による免疫活性能力を持っていないはずである。それにもかかわらず、IL-6の産生量が増加していることは、たいへん興味深い。

今後、SPGのサイズを大きくしたこの架橋複合体を用いることで、インフルエンザワクチンなどのアジュバント効果をより高めることができると期待できる。

D-2. 二つの糖鎖を組み合わせた糖鎖ナノゲル

秋吉らは、コレステロールを修飾したプルラン(59–61)やデキストラン(CH-CDex)(62)がナノゲルを形成し、様々なタンパク質を内包することを見いだした。親水性の多糖の側鎖についたコレステロール基は物理架橋点となり、動的な疎水領域を形成することにより、水中でタンパク質を取り込み、放出する。近年、がんワクチンのキャリアとしてCH-CDexのようなコレステロール修飾ナノゲルの応用が進んでいる(63)。

沼田らは、SPGの再性の過程で、コレステロールや芳香族ポリマー(55)、カーボンナノチューブ(56)などの疎水物質が存在するとそれらをSPGが包摂することを見いだした。

nanotubes (56) in renaturation, SPG chains entangle them. This fact implies that if CH-CDex is present in the SPG renaturation process, SPG/CH-CDex nanogel can be formed (Fig. 8a). We can presume that such a nanogel might be able to ingest proteins due to CH-CDex and be recognized by APCs due to SPG, which should have advantage in cancer vaccination because the protein delivering target cells are APCs.

We confirmed that SPG/CH-CDex nanogel is formed and cholesterol/SPG integration was the major driving force of the complexation using field flow fractionation (FFF) (64). And then, we examined whether rhodamine attached BSA (R-BSA)/CH-CDex/SPG can be ingested into a Dectin-1 expressing cell line (D-RAW) made from mouse leukemic monocyte macrophage cell line (RAW) (Fig. 8b). When we applied R-BSA/CH-CDex/SPG to D-RAW, the cellular ingestion showed the highest level among others. For comparison, we added mixture of the triple helix of SPG and R-BSA/CH-CDex, it showed the same level as R-BSA/CH-CDex. These results indicated that R-BSA is ingested by SPG-Dectin-1 specific interaction.

Taken together, this study suggests that our nanogel can be used for various vaccinations or medicines carrier because it can deliver antigens to APCs.

E. Conclusions and Future Perspective

In this study, we introduced the characterization and the availability of the complex comprising of SPG and nucleic acid. From the examinations using CpG-ODN/SPG or AS-ODN/SPG, we could obtain the significant therapeutic efficacies. In the future, we would like to apply to the other treatments such as cancer vaccine.

References

1. Park, K. (2013) *ACS Nano* **7**, 7442–7447.
2. Tabata, K., Ito, W., Kojima, T., Kawabata, S., and Masaki, A. (1981) *Carbohydr. Res.* **89**, 121–135.
3. Norisuye, T., Yanaki, T., and Fujita, H. (1980) *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **18**, 547–558.
4. Kashiwagi, Y., Norisuye, T., and Fujita, H. (1981) *Macromolecules* **14**, 1220–1225.
5. Sato, S., Sakurai, K., Norisuye, T., and Fujita, H. (1983) *Polym. J.* **15**, 87–92.
6. Deslandes, Y., Marchessault, R. H., and Sarko, A. (1980) *Macromolecules* **13**, 1446–1471.
7. Chuah, C. T., Sarko, A., Deslandes, Y., and Marchessault, R. H. (1983) *Macromolecules* **16**, 1375–1382.
8. Stokke, B. T., Elgsaeter, A., Brant, D. A., and Kitamura, S. (1991) *Macromolecules* **24**, 6349–6351.
9. Sakurai, K., and Shinkai, S. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4520–4521.
10. Sakurai, K., Mizu, M., and Shinkai, S. (2001) *Biomacromolecules* **2**, 641–650.
11. Miyoshi, K., Uezu, K., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2004) *Chem. Biodivers.* **1**, 916–924.
12. Anada, T., Okada, N., Minari, J., Karinaga, R., Mizu, M., Koumoto, K., Shinkai, S., and Sakurai, K. (2006) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 1301–1304.
13. Minari, J., Mochizuki, S., Matsuzaki, T., Adachi, Y., Ohno, N., and Sakurai, K. (2011) *Bioconjug. Chem.* **22**, 9–15.
14. Mochizuki, S., and Sakurai, K. (2010) *Bioorg. Chem.* **38**, 260–264.
15. Gratton, S. E., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., and DeSimone, J. M. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 11613–11618.
16. Mitragotri, S., and Lahann, J. (2009) *Nat. Mater.* **8**, 15–23.
17. Minari, J., Mochizuki, S., and Sakurai, K. (2008) *Oligonucleotides* **18**, 337–344.
18. Yamakawa, H., and Fujii, M. (1973) *Macromolecules* **6**, 407–415.

ここで、もし SPG の再性の過程で非常に疎水的なコレステロール基が側鎖に修飾された CH-CDex が存在すれば、その側鎖を SPG が包摂して融合化した SPG/CH-CDex ナノゲルができるのではないかと考えられる (Fig. 8a)。また、それは CH-CDex によるタンパク質の送達、SPG による抗原提示細胞への被認識を併せ持ったがんワクチンとしての優位性を持つことが期待できる。

流動場分画法 (FFF) により、SPG/CH-CDex ナノゲルが形成されていること、またそれがコレステロール基と SPG による疎水的な作用により生じていることが分かった (64)。そこで、このナノゲルに Rhodamine 修飾 BSA (R-BSA) を内包させ、デクチン-1 を過剰発現させたマウス白血病単球マクロファージ (D-RAW) への取り込み量に変化が生じるか評価した。Fig. 8b から、R-BSA/CH-CDex/SPG を D-RAW 細胞に添加したとき、ほかの添加群と比較してより多く取り込まれることが分かった。一方で、CHCDex/R-BSA に三重鎖の SPG を加えた系 (SPG+CHCDex/R-BSA) では、CHCDex/R-BSA との変化がなかった。これらの結果から、R-BSA の取り込みの違いはデクチン-1 を介した特異的な相互作用によるものだと考えられる。

以上より、抗原提示細胞への抗原の特異的な送達が可能なこのナノゲルは、様々なワクチンや薬剤のキャリアとして期待できる。

E. 結論と今後の展望

本稿では SPG と核酸からなる複合体の物性、および核酸医薬送達キャリアとしての有用性を紹介した。核酸医薬として知られる CpG-ODN や AS-ODN を用いた実験では、SPG を送達キャリアとして用いることで非常に良い治療効果が得られることが分かった。今後は、現在注目されているがんワクチンなどへの応用をしていきたい。

19. Yamakawa, H., and Fujii, M. (1974) *Macromolecules* **7**, 649–654.
20. Yamakawa, H., and Fujii, M. (1974) *Macromolecules* **7**, 128–135.
21. Benoit, H., and Doty, P. (1953) *J. Phys. Chem.* **57**, 958–963.
22. Yanaki, T., Kojima, T., and Norisuye, T. (1981) *Polym. J.* **13**, 1135–1143.
23. Nakamura, Y., and Norisuye, T. (2004) *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **42**, 1398–1407.
24. Yanaki, T., Norisuye, T., and Fujita, H. (1980) *Macromolecules* **13**, 1462–1466.
25. Sakuragi, M., Takeda, Y., Shimada, N., and Sakurai, K. (2008) *Polym. Bull.* **61**, 107–117.
26. Okobira, T., Uezu, K., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2011) *Kobunshi Ronbunshu* **68**, 711–718.
27. Sanada, Y., Matsuzaki, T., Mochizuki, S., Okobira, T., Uezu, K., and Sakurai, K. (2012) *J. Phys. Chem. B* **116**, 87–94.
28. Yamakawa, H., and Yoshizaki, T. (1980) *Macromolecules* **13**, 633–643.
29. Mizu, M., Koumoto, K., Anada, T., Matsumoto, T., Numata, M., Shinkai, S., Nagasaki, T., and Sakurai, K. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8372–8373.
30. Eto, K., Puzon-McLaughlin, W., Sheppard, D., Sehara-Fujisawa, A., Zhang, X. P., and Takada, Y. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34922–34930.
31. Brown, G. D., and Gordon, S. (2001) *Nature* **413**, 36–37.
32. Brown, G. D. (2006) *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 33–43.
33. Zamecnik, P. C., and Stephenson, M. L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 280–284.
34. Kurreck, J. (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 1628–1644.
35. Beutler, B., Krochin, N., Milsark, I. W., Luedke, C., and Cerami, A. (1986) *Science* **232**, 977–980.
36. LaCasse, E. C., Cherton-Horvat, G. G., Hewitt, K. E., Jerome, L. J., Morris, S. J., Kandimalla, E. R., Yu, D., Wang, H., Wang, W., Zhang, R., Agrawal, S., Gillard, J. W., and Durkin, J. P. (2006) *Clin. Cancer Res.* **12**, 5231–5241.
37. Thompson, K., Maltby, J., Fallowfield, J., McAulay, M., Millward-Sadler, H., and Sheron, N. (1998) *Hepatology* **28**, 1597–1606.
38. Lehmann, V., Freudenberg, M. A., and Galanos, C. (1987) *J. Exp. Med.* **165**, 657–663.
39. Janeway, C. A. Jr., and Medzhitov, R. (2002) *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216.
40. Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–376.
41. Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000) *Nature* **408**, 740–745.
42. Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T., and Golenbock, D. T. (2004) *Nat. Immunol.* **5**, 190–198.
43. Latz, E., Verma, A., Visintin, A., Gong, M., Sirois, C. M., Klein, D. C., Monks, B. G., McKnight, C. J., Lamphier, M. S., Duprex, W. P., Espevik, T., and Golenbock, D. T. (2007) *Nat. Immunol.* **8**, 772–779.
44. Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., and Klinman, D. M. (1995) *Nature* **374**, 546–549.
45. Krieg, A. M. (2002) *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 709–760.
46. Krieg, A. M. (2006) *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 471–484.
47. Suzuki, K., Suda, T., Naito, T., Ide, K., Chida, K., and Nakamura, H. (2005) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 707–713.
48. Willment, J. A., Lin, H. H., Reid, D. M., Taylor, P. R., Williams, D. L., Wong, S. Y., Gordon, S., and Brown, G. D. (2003) *J. Immunol.* **171**, 4569–4573.
49. Vollmer, J., and Krieg, A. M. (2009) *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 195–204.
50. Verthelyi, D., Ishii, K. J., Gursel, M., Takeshita, F., and Klinman, D. M. (2001) *J. Immunol.* **166**, 2372–2377.
51. Hartmann, G., and Krieg, A. M. (2000) *J. Immunol.* **164**, 944–953.
52. Marshall, N. B., and Swain, S. L. (2011) *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 954602.
53. Kobiyama, K., Aoshi, T., Narita, H., Kuroda, E., Hayashi, M., Tetsutani, K., Koyama, S., Mochizuki, S., Sakurai, K., Katakai, Y., Yasutomi, Y., Saijo, S., Iwakura, Y., Akira, S., Coban, C., and Ishii, K. J. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 3086–3091.
54. Koyama, S., Aoshi, T., Tanimoto, T., Kumagai, Y., Kobiyama, K., Tougan, T., Sakurai, K., Coban, C., Horii, T., Akira, S., and Ishii, K. J. (2010) *Sci. Transl. Med.* **2**, 25ra24.
55. Numata, M., Asai, M., Kaneko, K., Bae, A. H., Hasegawa, T., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 5875–5884.
56. Numata, M., Hasegawa, T., Fujisawa, T., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2004) *Org. Lett.* **6**, 4447–4450.
57. Mochizuki, S., and Sakurai, K. (2011) *J. Control. Release* **151**, 155–161.
58. Miyamoto, N., Mochizuki, S., and Sakurai, K. (2014) *Chem. Lett.* **43**, 991–993.
59. Akiyoshi, K., Deguchi, S., Moriguchi, N., Yamaguchi, S., and Sunamoto, J. (1993) *Macromolecules* **26**, 3062–3068.
60. Nishikawa, T., Akiyoshi, K., and Sunamoto, J. (1994) *Macromolecules* **27**, 7654–7659.
61. Nishikawa, T., Akiyoshi, K., and Sunamoto, J. (1996) *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6110–6115.
62. Ozawa, Y., Sawada, S., Morimoto, N., and Akiyoshi, K. (2009) *Macromol. Biosci.* **9**, 694–701.
63. Nochi, T., Yuki, Y., Takahashi, H., Sawada, S.-i., Mejima, M., Kohda, T., Harada, N., Kong, I. G., Sato, A., Kataoka, N., Tokuhara, D., Kurokawa, S., Takahashi, Y., Tsukada, H., Kozaki, S., Akiyoshi, K., and Kiyono, H. (2010) *Nat. Mater.* **9**, 572–578.
64. Maegawa, Y., Mochizuki, S., Sanada, Y., Akiyoshi, K., and Sakurai, K. (2014) *Chem. Lett.* **43**, 652–654.

Profile of the Authors

Yoshiya Maegawa has studied chemistry and biochemistry in master's course of "The University of Kitakyushu." He graduated from the Department of Chemistry and Biochemistry in 2013. He is currently performing his work focusing on the preparation of the bioconjugate composed of nucleic acids and peptides for the development of DDS.

Shinichi Mochizuki has studied chemistry and biochemistry at "The University of Kitakyushu." In 2008 he obtained a Ph.D. degree from Kyushu University and joined the group of Kazuo Sakurai as a Postdoctoral fellow at The University of Kitakyushu. His research focus is the development of innovative adjuvant using polysaccharides for cancer and virus vaccines.

Noriko Miyamoto has studied biochemistry at "The University of Kitakyushu." In 2014 she obtained a Master course degree then and has gone to Doctor course. She is currently performing her work focusing on the development of the adjuvant delivery using polysaccharide for a cancer vaccine.

Yusuke Sanada has studied chemistry and polymer chemistry at "The University of Kitakyushu". In 2011 he obtained a Ph.D. degree from Osaka University and joined the group of Kazuo Sakurai as a Postdoctoral fellow at The University of Kitakyushu. His major research interest is structural analysis of the polymers and polymeric assemblies using synchrotron X-ray scattering and light scattering.

Kazuo Sakurai has studied chemistry and biochemistry at "The University of Kitakyushu". In 1984 he finished his master's degree at Osaka University and worked Kanebo Inc. In 1990–1993 he joined the group of W. J. MacKnight at University of Massachusetts, Department of Polymer Science. In 1995 he obtained Ph.D. degree from Osaka University. In 2000 he joined Japan Science and Technology Corporation as a PRESTO fellow. In 2001 he became professor at "The University of Kitakyushu." His research focus is the development of DDS using polysaccharides and micelles, and analysis of soft materials using synchrotron radiation.