A New Polynucleotide-Polysaccharide Complex and its Application to Functional Oligonucleotide Delivery

多糖、核酸による複合体形成と機能性核酸デリバリーへの応用

Anada, Takahisa ^a; Sakurai, Kazuo ^a; and Shinkai, Seiji^b

^aDepartment of Chemical Process & Environments, The University of Kitakyushu, 1-1, Hibikino, Wakamatu-ku, Kitakyushu, Fukuoka 808-0135, Japan, fax: +81-93-695-3390, ^bFaculty of Engineering, Department of Chemistry & Biochemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu university, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581 Japan
FAX: 81-92-642-3611, E-mail: seijitcm@mbx.nc.kyushu-u.ac.jp

Key Words: *Schizophyllan, β -(1-3)- Glucan, Renaturation, Complexation, Oligonucleotide*

Abstract

Schizophyllan (SPG) is a polysaccharide that belongs to the β -(1-3) glucan family and adopts a triple-helical conformation in water. When SPG dissolves in dimethyl sulfoxide (DMSO), the triple helix is dissociated to three random coils. When water is added to the DMSO solution (renaturation), the single chain of SPG (s-SPG) collapses owing to both hydrophobic interaction and hydrogen bonding formation, and eventually aggregation takes place with increasing the water content. When this renaturation process is carried out in a mixture containing s-SPG and a single-stranded polynucleotide, a macromolecular complex is formed, consisting of two s-SPG chains and one polynucleotide chain. This novel complexation was examined with circular dichroism, UV spectroscopy, and gel electrophoresis. We applied to this complex to deliver functional oligonucleotides such as antisense DNA and CpG motifs. The biological functions of these oligonucleotides were extremely enhanced owing to the complexation.

要 約

天然多糖シゾフィラン (SPG) は β -1,3-グルカンの一種であり、水中で三本鎖状態をとっているがジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させると、三本鎖がほどけて一本鎖ランダムコイル状態となる。この DMSO 溶液を水に置換すると、SPG 一本鎖が疎水性相互作用と水素結合形成により折りたたまれ再び三本鎖状態へと戻る (再生)。我々はこの再生過程に一本鎖核酸が共存すると二本の SPG 鎖と一本の核酸鎖からなる高分子複合体を形成することを見出した。この多糖/核酸複合体形成を円偏光二色性、UV スペクトル及びゲル電気泳動により確認した。さらに、SPG 複合体形成を利用してアンチセンス DNA や CpG DNA などの機能性核酸の細胞内デリバリーを行い、これら機能性核酸の活性が複合化によって大幅に増強されることを見出した。

A. Introduction

Polysaccharides are abundant natural sources which can offer a wide variety of useful products to human beings. Most of them are used as bulk chemicals, such as coating, gelling, and binding agents, food additives. Recently, gene delivery has attracted attention as a fine chemical application of polysaccharides. This is because polysaccharides are normally biodegradable and give less stress to biological systems when they are used as the delivery material. Currently, viral vectors are most commonly used for gene delivery because of their high transfection efficiency. However, they all induce an immunological response to some extent and have been pointed out as a safety issue that is ascribed to insertional mutagenesis (1, 2). On the other hand, non-viral-based gene delivery systems have a great advantage because of the absence of infectious or mutagenic capability. Therefore, the future of gene therapy depends on the emergence of good non-viral vectors, although most of them

A. はじめに

多糖は人々の生活の中でコーティング剤、ゲル化剤、食品添加剤などとして広く有効利用されている天然資源である。また、多糖は生分解性で、生体へのストレスを与えないことから、近年、遺伝子導入に利用されファインケミカルとしての応用が注目されている。現在、遺伝子治療においてウイルスベクターはその効率の良さから広く用いられている。しかしながら、免疫反応の惹起や、ランダムな染色体組込みによる発がんの問題など安全性に問題が残されている (1,2)。一方、非ウイルス性ベクターは病原性、変異原性のないことが利点となっており、将来の遺伝子治療を担うベクターとして期待されているが依然発展途上の段階である (3)。実際に非ウイルス性ベクターには多くの解決すべき問題点が残されており、特にトランスフェクション効率の低さは大きな欠点である。ポリエチレンジオキサン

are still under development (3). In fact, non-viral vectors have many problems to be overcome; among others, its poor transfection is a serious drawback. Synthetic polycations, such as polyethyleneimine (4, 5), poly(L-lysine) (6), and cationic lipid (7-9) have been studied as a gene or oligodeoxynucleotide (ODN) carrier. However, one drawback of these cationic polymers and lipids is its inherent cytotoxicity.

Schizophyllan (SPG) is an extracellular β -(1-3)-D-glucan, having one α -6-1-linked glucose residue as the side chain, produced by the fungus *Schizophyllum commune* (10, 11). Chemical structure of SPG is shown in Fig. 1. Norisuye *et al.* (12, 13) extensively studied dilute solution properties of SPG and found that it dissolves in water as a triple helix. The triple helix is stabilized by intermolecular hydrogen bonds among the three glucan chains. The triple helix is destroyed by dissolving it in dimethylsulfoxide (DMSO) to yield three single chains (s-SPG). When water is added to the DMSO solution (renaturation), the triple helical structure can be partially retrieved through this process. Recently, Sakurai and Shinkai demonstrated that s-SPG forms a macromolecular complex with some polynucleotides, when those polynucleotides are present during the renaturation process (14). It is known that SPG is a non-toxic polymer, and has been used as an antitumor medicine for clinical cure for almost 20 years in Japan. The present review summarizes some characteristic features of this novel polysaccharide-polynucleotide complex and application to DNA carrier for antisense and immunostimulant oligonucleotides.

B. Polysaccharide/Polynucleotide Complex

B-1. Spectroscopic Changes upon Complexation (14-16)

Figure 2 compares the circular dichroic (CD) spectra between the polynucleotides and their mixtures with s-SPG at 5 °C, where $[\theta]$ is the molecular ellipticity. For the mixture of poly(A) and s-SPG (poly(A) + s-SPG), addition of s-SPG increases the CD intensity at around 260 nm by more than double, for poly(C) + s-SPG, the addition increases the peak at 275 nm by about 1.5 times and generates a new peak around 245 nm. Since s-SPG itself has no absorption in the 230-320 nm region, the change in CD can be ascribed to conformational changes of the polynucleotides. Furthermore, it is interesting that difference in the base molecule shows the distinctive difference in the CD spectral changes. Based on these facts, we conclude that the

(4,5)、ポリ(L-リジン)(6)などの合成カチオン性高分子やカチオン性脂質(7-9)が非ウイルス性遺伝子、オリゴヌクレオチド(ODN)キャリアーとして研究されているが、これらのカチオン性導入剤は細胞毒性が高いことが問題点となっている。

シゾフィラン (SPG) は *Schizophyllum commune* 菌から産生される α -6-1-結合で側鎖を有する β -1,3-グルカンである (10, 11)。SPG の化学構造を図 1 に示す。Norisuye ら (12, 13) は SPG 希釈溶液について広く研究を行い、水中で三本鎖らせん構造をとって溶解していることを確かめた。この三重らせんは三本のグルカン鎖間の分子間水素結合により安定化されているが、DMSO 中ではらせんが解け、一本鎖 (s-SPG) となる。DMSO 溶液に水を添加していくと三重らせん構造が部分的に復元する (再生)。最近、Sakurai と Shinkai はこの再生過程に一本鎖核酸が共存すると一本鎖 SPG と核酸が高分子複合体を形成することを発見した (14)。SPG は毒性がなく日本で 20 年にもわたり抗腫瘍薬として臨床で用いられていることから安全性が保証されている高分子である。そこで我々は多糖/核酸複合体をアンチセンス療法や免疫賦活治療のための DNA キャリヤーへの応用をおこなっている。本報ではこの多糖/核酸複合体の性質と DNA デリバリーにおける我々の最近の研究成果について述べる。

B. 多糖/核酸複合体

B-1. 複合体形成に伴うスペクトル変化 (14-16)

図 2 に 5°C における核酸と s-SPG 混合溶液の円二色性偏光 (CD) スペクトルを示す。 $[\theta]$ はモル楕円率を示す。poly (A) と s-SPG 混合溶液 (poly(A) + s-SPG) では、s-SPG 添加によって 260 nm 付近の CD 強度が 2 倍以上に増加した。poly(C) + s-SPG においては 275 nm のピークが約 1.5 倍増加し、245 nm 付近に新たなピークが出現した。s-SPG 自体には 230-320 nm 領域に吸収がないことから CD 変化は核酸構造の変化に伴うものである。また、核酸塩基の違いにより異なる CD スペクトル変化を示すことは興味深い結果である。前述の結果をまとめると、CD

Fig. 1. Chemical structure of schizophyllan.

Fig. 2. Comparison of the CD spectra at 5 °C between the single-stranded polynucleotides and their mixtures with s-SPG. $V_w = 0.92$, $C_{\text{poly}(X)} = 0.007 - 0.008$ g/dL, and $C_{\text{s-SPG}} = 0.06 - 0.07$ g/dL. The dotted and solid lines indicate the CD spectra for the polynucleotides and their mixtures with s-SPG, respectively. Here V_w means the water volume fraction of DMSO/water mixtures.

CD spectral changes can be ascribed to a specific interaction between the glucose unit of s-SPG and the nucleic base unit of the polynucleotides, is not ascribed to “ionic” hydrogen bonding with the phosphate unit. Fig. 3 compares the temperature dependence of $[\theta]_{\text{max}}$ between polynucleotides and their complexes, where $[\theta]_{\text{max}}$ is the CD intensity as the top of the positive band. As seen in the figure, there is an abrupt decrease in $[\theta]_{\text{max}}$ around 32 and 54 °C for poly(A)/s-SPG and poly(C)/s-SPG, respectively. Furthermore, above each critical temperature, the mixture’s $[\theta]_{\text{max}}$ merges in the same values of the corresponding polynucleotide itself. These features show that s-SPG/polynucleotide complexes are formed only at lower temperatures and they dissociate upon heating. The abrupt decrease is associated with autoaccelerative dissociation of the complexes. It is interesting that this abrupt decrease is similar to the well-known melting behavior of double helix DNAs.

B-2. Base Molecule Specificity (16, 17)

We demonstrated that SPG shows nucleotide specificity in the complex formation. None of poly(G), poly(U), poly(I), poly(dG), and poly(dC) shows complexation in neutral and non-salt aqueous solution. However, the addition of alkaline cations induce complexation between poly(U) and s-SPG. The complex stability strongly depends on both the cation species and the salt concentration. Among others, potassium can induce the complexation most sensitively. Therefore, we can control the complexation in an on-off manner by changing the KCl concen-

Fig. 3. Temperature dependence of $[\theta]_{\text{max}}$ for the polynucleotides and their mixtures with s-SPG.

スペクトル変化は核酸リン酸基とのイオン性結合によるものではなく、s-SPG のグルコースユニットと核酸塩基間の特異的相互作用によるものであることが示唆される。図3は核酸とその複合体における正のモル楕円率極大値 ($[\theta]_{\text{max}}$) の温度依存性である。poly(A)/s-SPG 複合体、poly(C)/s-SPG 複合体はそれぞれ32 °C、54 °C付近で急激な $[\theta]_{\text{max}}$ の減少が見られ、臨界温度以上では $[\theta]_{\text{max}}$ がそれぞれの核酸のみの場合とほぼ同じ値となった。これらの特徴は s-SPG/核酸複合体は低温域のみで形成され、加熱によって解離することを示している。つまり、 $[\theta]_{\text{max}}$ の急激な減少は協同的な複合体解離現象に伴うものであり、このような $[\theta]_{\text{max}}$ 変化はよく知られている二本鎖核酸の融解に伴うものと同じ現象である。

B-2. 核酸塩基特異性

SPG 複合体形成はすべての核酸で起こるものではなく、塩基特異性が見られる。poly(G)、poly(U)、poly(I)、poly(dG) 及び poly(dC) は中性、無塩水溶液中で複合体を形成しない。しかしながら、poly(U) の場合にはアルカリ金属イオンの添加によって s-SPG と複合体を形成することがわかった。この複合体の安定性は金属イオンの種類と塩濃度に強く依存し、カリウムイオン濃度に最も敏感である。つまり、KCl 濃度を変化させることで

Fig. 4. Switching the complexation by adding KCl and cryptand alternatively. The poly(U) and s-SPG molar concentrations were 2.6×10^{-4} and 6.4×10^{-4} M, respectively.

tration. Since cryptand [2,2,2] is a well known strong ligand for potassium, we can control the free potassium cation concentration in the system by adding cryptand. Fig. 4 demonstrates that the complexation is almost reversibly switched on and off by alternatively adding KCl and cryptand.

We found that poly(C), poly(A), poly(dA), and poly(dT) can form a complex with s-SPG. According to the previous work (18), poly(G), poly(dG), poly(U), poly(dC), and poly(I) form inter- or intra- molecular interactions, thus the hydrogen-bonding sites in the bases are already used. In contrast, poly(C), poly(A), poly(dA), and poly(dT) do not form such an intramolecular aggregation, therefore, their hydrogen-bonding sites are unoccupied. This correspondence evidences that the hydrogen-bonding interactions are essential to induce the interaction between polynucleotide and s-SPG.

B-3. Properties of Polynucleotide/SPG Complex

<Stoichiometry (16)> We determined the stoichiometry for the poly(A), poly(dA), and poly(C) complexes. The results indicate that the complexation is undergone in a highly stoichiometrical manner and the stoichiometric number suggests that two main-chain glucoses and one nucleotide base are bound with each other, in other words, two s-SPG chains and one polynucleotide chain form a triple helix.

<Nuclease resistance (19)> The polynucleotides bound in the complex are more stable against the nuclease-mediated hydrolysis than the naked polynucleotides. The kinetic study of the enzyme reaction showed that the simple Michaelis-Menten relation is held and the maximum velocity for the complex is one-sixth as small as that of the naked polynucleotide.

<Chain exchange reaction (20)> When the s-SPG/polynucleotide complex meets the corresponding complementary

複合体形成を on-off で制御することが可能である。クリプタンド [2, 2, 2] はカリウムイオンと強く錯形成することから、クリプタンドを添加することで系中のフリーのカリウムイオン濃度をコントロールすることができる。従って、クリプタンドと KCl を poly(U)/s-SPG 複合体溶液中へと添加すると図 4 に示すように複合体形成を可逆的にスイッチングすることが可能である。

一方、poly(C)、poly(A)、poly(dA)、poly(dT) は s-SPG と複合体を形成する。これまでの研究によって (18)、複合体を形成しない poly(G)、poly(dG)、poly(U)、poly(dC)、poly(I) は分子間相互作用によって塩基中の水素結合サイトが占有されていることが示されている。一方、poly(C)、poly(A)、poly(dA)、poly(dT) の場合はそのような分子内相互作用を起こさず、水素結合サイトが空いていることが示されている。これらの構造的特徴は複合体形成と一致を示しており、核酸と s-SPG の相互作用誘起に水素結合性相互作用が重要であることを示唆している。

B-3. 核酸/SPG 複合体の性質

<化学量論比 (16)> poly(A)、poly(dA) 及び poly(C) との複合体形成における化学量論比を見積もった。その結果、二個の主鎖グルコースと一個の核酸塩基が結合する、つまり、複合体形成は二本の s-SPG と一本の核酸鎖による三本鎖形成であることがわかった。

<ヌクレアーゼ耐性 (19)> 複合体中に核酸が取り込まれることによってヌクレアーゼによる核酸加水分解に対して抵抗性を示すようになる。ミカエリス-メンテン式から酵素反応を解析した結果、反応速度は核酸のみの場合に比べて約六分の一程度になっていることを確かめている。

<鎖交換反応 (20)> 複合体中の核酸と相補的な配列を持つ核酸が系中に存在する場合、例えば s-SPG/poly(dT) 複合体と

sequence, for example, s-SPG/poly(dT) meets poly(dA), the complex dissociates immediately and hybridization takes place. In contrast, the complex was unaffected upon addition of noncomplementary strands.

C. Application to a Novel DNA Carrier

SPG has the potential to become a DNA carrier because of its nontoxic nature and the features of the complex as described above. Hereinafter, we report our recent results of evaluating the performance of SPG as an antisense oligonucleotide (AS ODN) or CpG DNA carrier.

C-1. Chemical Modification of SPG

SPG has no ability to bind to plasma membranes to induce endocytosis or other uptake processes. Therefore, we need to modify the SPG chain with a functional group which can induce uptake of DNAs. It is essentially important to introduce the functional groups only to the SPG side chain. This is because the β -(1-3)-D-glucan main chain is necessary to form the complex with polynucleotides or AS ODNs (21, 22), thus it is better to keep the main chain intact during the reaction. Fig. 5 (I) shows a reaction scheme (23, 24) in which we adopted peptides, or amine derivatives. The key step is oxidation of the side chain glucose by periodate anion (IO_4^-), which leads to cleavage of the pyranose ring and converts each end to the formyl terminate. When we attached amines, the formyl group of SPG reacted with the amino group (ii in the figure) and the subsequent reduction (iii) of the resultant Schiff base produced the final products. When we introduced the peptides to the side chain, we applied a conventional method using the addition of N-terminal cysteine to the unsaturated bond in the maleimide moiety (v and vi in Fig. 5).

C-2. Delivery of Antisense Oligonucleotide (AS ODN)

The principles and mechanisms of antisense therapy are

poly(dA) があると、複合体はすぐに解離し、核酸二本鎖形成が起こる。非相補的核酸が共存してもこのような鎖交換反応は起こらない。

C. DNA キャリヤーとしての応用

SPG はその安全性と上述した複合体特性から DNA キャリヤーとして有望である。そこで我々は SPG のアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS ODN) 及び CpG DNA キャリヤーへの応用を図っている。

C-1. SPG 化学修飾

SPG には細胞膜に結合し、エンドサイトーシスやその他の経路による取り込みを誘起する性質がない。そのため複合体の取り込みを誘起するような機能性官能基を SPG 鎖に修飾する必要がある。 β -1,3-グルカン主鎖はポリヌクレオチドや AS ODN との複合体形成に関与することから (21, 22)、主鎖よりも側鎖への化学修飾を行う方が複合体形成を阻害しないと考えられる。そこで図 5 (i) に示すようなペプチドやアミン誘導体を導入するための側鎖選択的的化学修飾法を確立した (23, 24)。まず、過ヨウ素酸 (IO_4^-) による側鎖グルコースの酸化反応によりピラノース環を解裂させ、ホルミル基へと変換する。そして、アミンを側鎖へ化学修飾する場合、SPG 側鎖のホルミル基とアミン誘導体のアミノ基を反応させることでシッフ塩基を形成させ (ii)、還元を行う (iii) ことで側鎖アミン誘導体を得ることができる。ペプチドを側鎖へ修飾する場合には、側鎖へマレイミド基を導入した後、ペプチド末端に導入したシステインのチオール基と反応させる (v 及び vi) ことで導入可能である。

C-2. アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS ODN) デリバリー

アンチセンス療法の原理とメカニズムは、(1) AS ODN を

Reagents and conditions: (i) NaIO_4 , H_2O , 4 °C, 2 days, (ii) amine or amino acid, DMSO, rt, 2 days, (iii) NaBH_4 , DMSO, rt, 1 day, (iv) 28% NH_3 aq., NaBH_3CN , DMSO, rt, 4 days, *N*-succinimidy1-3-maleimidopropionate, DMSO, rt, 1 day, (vi) peptide, DMSO, rt, 2 days.

Fig. 5. Reaction scheme to introduce the functional groups into the side chain of s-SPG.

(i) to deliver AS ODNs to cells, (ii) to induce cellular uptake of AS ODNs, (iii) to release AS ODNs to cytosol, (iv) to bind to a particular mRNA to make a DNA/RNA duplex, and (v) to make RNase H cleave the target mRNA so as to inhibit the protein expression (25–27).

We carried out an *in vitro* antisense assay combining melanoma cell lines and a phosphorothioate AS ODN/unmodified SPG complex to depress *c-myc* mRNA. Here, *c-myc* is a proto-oncogene encoding a nuclear transcription factor, and its over-expression usually leads to cancer. 5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC(dA)₄₀-3' phosphorothioate was used as an antisense-*c-myc* (AS-*c-myc*). To bind to s-SPG, poly(dA)₄₀ was attached at the 3' end of this sequence. We found that the AS ODN bound to the complex reduces cell growth more efficiently than that of naked AS ODN. There are two reasons for the enhanced efficiency. One is that the complex can prevent the bound AS ODN from binding to albumin or other serum proteins, with the result that more AS ODN can be ingested by cells. The other reason is that the bound AS ODN is protected against DNase-mediated hydrolysis (28). However, the uptake efficiency of unmodified SPG itself is not so high; therefore, we modified SPG side chain with a functional group that can induce passive cellular ingestion (29). We attached amines, amino acids, an arginine-glycine-aspartic acid tripeptide (RGD) which can bind to an integrin

細胞へ送達し、(2)細胞内へ取り込ませる。(3)サイトゾル中への AS ODN の放出、(4)標的となる mRNA と AS ODN による DNA/RNA 二重鎖形成、(5)DNA と二本鎖を形成している RNA を特異的に切断する RNase H により標的 mRNA の分解が起こり、タンパク質発現が阻害される (25–27)。

まず、未修飾 SPG と *c-myc* 遺伝子に対するホスホロチオエート AS ODN を複合化させ、メラノーマ細胞を用いた *in vitro* アンチセンスアッセイを行った。*c-myc* は転写因子をコードする癌原遺伝子であり、その過剰発現は癌を引き起こすことが知られている。そこでこの *c-myc* に対するホスホロチオエート型 AS ODN (AS-*c-myc*) を用いアッセイを行った。配列は SPG と複合体を形成させるために 3' 末端に poly(dA)₄₀ を付加した 5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC(dA)₄₀-3' を用いた。その結果、SPG と複合化させることにより、AS ODN だけの場合と比べてより効果的に癌細胞の増殖を抑制できることがわかった。これは複合体を形成することで培地中に含まれるアルブミンなどの血清タンパク質の AS ODN に対する非特異吸着や DNase による加水分解を抑制したためだと考えられる (28)。

しかしながら、未修飾 SPG の細胞への取り込みはあまり高くない。そこで細胞導入効率をあげるために SPG 側鎖へ機能性官能基を修飾した (29)。機能性官能基としてアミン、アミノ酸、インテグリンレセプターに結合するアルギニン-グリシン-ア

Fig. 6. Comparison of the cell growth, including the Lipofectin and unmodified s-SPG system, assayed for the A375 cell lines. The cell numbers were determined with Cell Counting Kit-8® (Dojindo, Japan), after we administrated AS-*c-myc* with various carriers and incubated the cells for 3 days. The AS-*c-myc* doses were 12.5, 25, and 50 mg/ml (unfilled bar, hatched bar and filled bar, respectively). The cell growth is defined by the number of cells normalized by that of the control (without any addition of AS-*c-myc* nor s-SPG, (i)). The s-SPG/AS-*c-myc* molar ratio was fixed at 1:1. Abbreviation: N; 2-aminoethanol, SP; spermine, APPD; N,N'-bis(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine, R; Arginine, S; Serine, R8; octa-arginine peptide, RGD; arginine-glycine-aspartic acid tripeptide, where the numbers in the parenthesis indicate the modification level of SPG side chain.

receptor (30), and the arginine-rich peptide (R8) which induces a cellular uptake (31). Fig. 6 shows the A375 cell growth after culture for 3 days, comparing all combinations of AS-c-myb and every carrier, including Lipofectin and unmodified s-SPG system. As shown in Fig. 6, dramatic depression in the cell growth is observed when AS-c-myb was administrated as the RGD and R8 peptide attached s-SPG complex (xiv, xv). At 50 mg/ml dose, the cell growths are depressed to 24 % for R8(0.5)-SPG and 17 % for RGD(1.3)-SPG. The drastic depression can never be ascribed to the cytotoxicity of either phosphorothioates AS-c-myb or the peptide attached s-SPG. It should be emphasized that the very small amount of the modification level seems enough to enhance the cellular uptake efficiency. This work has thus clarified that SPG can act as a new potential candidate for AS ODN carriers.

C-3. Delivery of CpG DNA (32)

ODNs containing unmethylated CpG sequence (CpG DNA) have been shown to stimulate a cell-mediated immune response for mammals (33). This immune response is considered to be a defense system that mammals have evolved based on the fact that unmethylated CpG sequence emerges more frequently in bacterial DNA than in mammalian DNA. Considerable attention is devoted to this response because CpG DNA can be an extraordinarily effective adjuvant for many vaccines against infection agents, cancer antigens, and allergens. CpG DNA can be recognized by Toll-like receptor 9 (TLR-9) (34). Ahmad-Nejad *et al.* (35) demonstrated that TLR-9 is localized intracellularly, predicting that if we can efficiently deliver CpG DNA to endosome and/or lysosome, the immune response can be enhanced and controlled artificially.

We synthesized spermine (SP), RGD peptide, R8 peptide, and cholesterol (Chol) modified s-SPG according to the method illustrated in Fig. 5. The complexation was carried out between phosphorothioate CpG DNA 5'-TCCATGACGTTTCCTGATG-(dA)₄₀-3' (the immunostimulatory sequence; PuPuCGPyPy is underlined) (36) and chemically modified s-SPG. As shown in Fig. 7, when we exposed the murine macrophage-like cell J774.A1 to CpG DNA/chemically modified SPG complexes, dramatic enhancement in the cytokines (IL-6 (a), IL-12 (b), and TNF- α (c)) secretion was observed. The secretion increased 5–10 times from the naked dose and 100 times from the background. This performance promises that SPG can be an excellent carrier for CpG DNA.

D. Conclusion

This review reported the mechanism and properties of a novel polysaccharide/polynucleotide complex and showed potentiality to apply the complex to a functional ODN carrier. Although not presented here, we have extended application to a plasmid carrier (37, 38). Moreover, the complexation behavior of SPG is applicable to another field, such as analytical chemis-

スパラギン酸 (RGD) ペプチド (30)、細胞膜親和性を有するオリゴアルギニン (R8) ペプチド (31) を修飾した。図 6 にこれら化学修飾 SPG と未修飾 SPG、市販導入試薬である Lipofectin を AS-c-myb と複合化させ、A375 細胞へ導入した三日後の細胞増殖率を示す。図より、RGD や R8 のペプチドを修飾した SPG と AS-c-myb を用いることで大幅なアンチセンス効果の向上を示すことがわかった (xiv, xv)。50 mg/ml AS-c-myb を導入した場合、R8 (0.5)-SPG (カッコ内の数字は修飾率) で 24 %、RGD (1.3)-SPG で 17 % まで細胞増殖を抑えた。このような大幅な抑制効果はホスホロチオエート型 AS-c-myb やペプチド修飾 SPG の細胞毒性によるものでないことを確認している。この実験により、側鎖へのわずか数 % の化学修飾を行うことで細胞導入効率を向上させることがわかり、SPG は新規 AS ODN キャリヤーとして非常に有用であることが確かめられた。

C-3. CpG DNA デリバリー (32)

メチル化されていない CpG 配列を有する ODN (CpG DNA) は哺乳動物の細胞性免疫を活性化することが報告されている (33)。哺乳類の DNA よりも細菌類の DNA にメチル化されていない CpG 配列が多く存在するということから、このような免疫応答は外敵に対する防御機構であると考えられている。CpG DNA は感染、癌、アレルギーなどに対する多くのワクチンの強力なアジュバント (補助剤) として注目を集めている。CpG DNA は Toll-like receptor 9 (TLR-9) に認識されることが報告されている (34)。TLR-9 は細胞膜ではなく細胞内に局在する (35) ことから CpG DNA をエンドソーム/リソソーム経由で細胞内へ送達することができれば、免疫応答を増強し、人為的にコントロールすることが可能である。

そこで我々はスベルミン (SP)、RGD ペプチド、R8 ペプチド、コレステロール (Chol) 修飾 SPG を図 5 に示した方法で合成し、CpG DNA 細胞内導入を行った。CpG DNA はホスホロチオエート型 5'-TCCATGACGTTTCCTGATG-(dA)₄₀-3' (下線は免疫刺激配列; PuPuCGPyPy を示す) (36) を使い、これと化学修飾 SPG の複合化を行った。図 7 に示すように、マウスマクロファージ様細胞 J774.A1 を用いた場合、化学修飾 SPG との複合化によって CpG DNA のみの場合と比べ 5–10 倍、無添加の場合よりも 100 倍もの大幅なサイトカイン (IL-6 (a)、IL-12 (b)、and TNF- α (c)) の分泌が観測された。以上の結果より SPG は CpG DNA キャリヤーとしても有用であることが確かめられた。

D. まとめ

本総説では新規な多糖/核酸複合体形成のメカニズムとその性質について述べ、ODN キャリヤーとして応用可能であることを示した。ここでは述べるができなかったが、ODN キャリヤーとしての知見をもとに遺伝子 (プラスミド) キャリヤーとしての応用も図っている (37, 38)。さらに SPG 複合体形成は分析

try, and material science. For example, we have developed an mRNA separation system using SPG appended columns (39), and mRNA detection systems using fluorescence polarization (40), and Limulus G test (41). More recently, we found that SPG can entrap single walled carbon nanotubes (42). We believe that SPG can be one of the fundamental materials which support nanotechnology from a molecular level.

化学や材料科学など様々な分野への応用が可能である。例えば、SPG 修飾カラムを用いた mRNA 分離システム (39)、蛍光偏光解消 (40) やリムルス G テスト (41) を利用した mRNA 検出システムの開発である。また、最近、SPG が単層カーボンナノチューブに巻き付くことも見出している (42)。以上より、SPG の性質を利用することで多岐の分野にわたる応用が可能であり、さらなる展開が期待できる。

References

- Verma, I. M., and Somia, N. (1997) *Nat. Genet.* **389**, 239–242
- Anderson, W. F. (1998) *Nature* **392**, 25–30
- Ledley, F. D. (1995) *Hum. Gene Ther.* **6**, 1129–1144
- DeLong, R., Stephenson, K., Loftus, T., Fisher, M., Alahari, S., Nolting, A., and Juliano, R. L. (1997) *J. Pharm. Sci.* **86**, 762–764
- Boussif, O., Lezoualch, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7297–7301
- Clarenc, J. P., Degols, G., Leonetti, J. P., Milhand, P., and Lebleu, B. (1993) *Anticancer Drug Des.* **8**, 81–94
- Chirila, T. V., Rakoczy, P. E., Garrett, K. L., Lou, X., and Constable, I. J. (2002) *Biomaterials* **23**, 321–342
- Caplen, N. J., Kinrade, E., Sorgi, F., Gao, X., Grunert, D., Geddes, D., Coutelle, C., Huang, L., Alton, E. W. F. W., and Williamson, R. (1995) *Gene Ther.* **2**, 603–613
- Wheeler, C. J., Felgner, P. L., Tsai, Y. J., Marshall, J., Sukhu, L., Doh, S. G., Hartikka, J., Nietupski, J., Manthorpe, M., Nichols, M., Plewe, M., Liang, X., Norman, J., Smith, A., and Cheng, S. H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11454–11459
- Yanaki, K., Ito, W., Kojima, W., Norisuye, T., Takano, N., and Fujita, H. (1983) *Biophys. Chem.* **17**, 337–342
- Tabata, K., Ito, W., Kojima, T., Kawabata, S., and Misaki, A. (1981) *Carbohydr. Res.* **89**, 121–135
- Norisuye, T., Yanaki, T., and Fujita, H. (1980) *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **18**, 547–558
- Norisuye, T., and Yanaki, T. (1982) *Polym. J.* **15**, 389–396
- Sakurai, K., and Shinkai, S. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4520–4521
- Mizu, M., Kimura, T., Koumoto, K., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2001) *Chem. Commun.* 429–430
- Sakurai, K., Mizu, M., and Shinkai, S. (2001) *Biomacromolecules* **2**, 641–650
- Sakurai, K., Iguchi, R., Koumoto, K., Kimura, T., Mizu, M., Hisaeda, Y., and Shinkai, S. (2002) *Biopolymers* **65**, 1–9
- Saenger, W. (1984) *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, Chapter 13
- Mizu, M., Koumoto, K., Kimura, T., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2004) *Biomaterials* **25**, 3109–3116
- Koumoto, K., Mizu, M., Sakurai, K., Kunitake, T., and Shinkai, S. (2004) *Chemistry & Biodiversity* **1**, 520–529
- Kimura, T., Koumoto, K., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2000) *Chem. Lett.* 1242–1243
- Koumoto, K., Kimura, T., Kobayashi, H., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2001) *Chem. Lett.* 908–909
- Koumoto, K., Kimura, T., Mizu, M., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2001) *Chem. Commun.* 1962–1963
- Numata, M., Matsumoto, T., Umeda, M., Koumoto, K., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2003) *Bioorganic Chem.* **31**, 163–171
- Uhlmann, E., and Peyman, A. (1990) *Chem. Rev.* **90**, 543–584
- Stein, C. A., and Cheng, Y. C. (1993) *Science* **261**, 1004–1012
- Stein, C. A., and Krieg, A. M. (1998) *Applied Antisense Oligonucleotide Technology*, Wiley-Liss, New York
- Mizu, M., Koumoto, K., Anada, T., Karinaga, R., Kimura, T., Nagasaki, T., Shinkai, S., and Sakurai, K. (2004) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **77**, 1101–1110
- Matsumoto, T., Numata, M., Anada, T., Mizu, M., Koumoto, K., Sakurai, K., Nagasaki, T., and Shinkai, S. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1670**, 91–104
- Colin, M., Harbottle, R. P., Knight, A., Komprobst, M., Cooper, R. G., Miller, A. D., Turgnan, G., Capeau, J., Coutelle, C., and Brahimi-Horn, M. C. (1998) *Gene Ther.* **5**, 1488–1498
- Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., and Ueda, K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 2437–2443
- 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
- Krieg, A. M. (2003) *Nat. Med.* **9**, 831–835
- Henmi, 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
- Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., and Wagner, H. (2002) *Eur. J. Immunol.* **32**, 1958–1968
- Aramaki, Y., Yotsumoto, S., Watanabe, H., and Tsuchiya, S. (2002) *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 351–355
- Nagasaki, T., Hoji, M., Uno, T., Satoh, K., Koumoto, K., Mizu, M., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2004) *Bioconjugate Chem.* **15**, 249–259
- Anada, T., Matsunaga, H., Karinaga, R., Koumoto, K., Mizu, M., Nakano, K., Shinkai, S., and Sakurai, K. (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 5655–5659
- Kimura, T., Koumoto, K., Mizu, M., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2002) *Chem. Lett.* 1240–1241
- Karinaga, R., Mizu, M., Koumoto, K., Anada, T., Shinkai, S., and Sakurai, K. (2004) *Chemistry & Biodiversity*, **1**, 634–639
- Anada, T., Koumoto, K., Mizu, M., Karinaga, R., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2003) *Anal. Sci.* **19**, 1567–1568
- Numata, M., Asai, M., Kaneko, K., Hasegawa, T., Fujita, N., Kitada, Y., Sakurai, K., and Shinkai, S. (2004) *Chem. Lett.* **33**, 232–233

Received on October 31, 2004, accepted on December 28, 2004

Profile of the Authors

Takahisa Anada has been a post doctoral fellow in the SORST Project (Japan Science and Technology Corporation (JST)), and working in Kazuo Sakurai's laboratory in The University of Kitakyushu from April, 2003. He graduated from the Faculty of Engineering of Kyushu University, and received his Ph.D. in 2003. His main research interests are development of gene carriers using polysaccharides.

★★★★★★★★★

Kazuo Sakurai is a professor of the Dept. of Chemical Processes and Environments, Faculty of Environmental Engineering, The University of Kitakyushu. After finishing the master course of the Dept. of Macromolecular Science, Osaka University, he worked at the central research center of Kanebo Ltd until 1999, involved in application to conductive polymers to batteries, DDS, a new polyester resin containing fluorene. He spent three years at Prof. MacKintosh's Lab in UMass, Amherst in USA from 1990–93. During that time, he learned SAXS and polymer blends. He received his Ph.D. from the Graduate School of Macromolecular Science, Osaka University in 1996. After the collapse of the Kanebo research center, he joined Prof. Shinkai's project (ICORP, JST) and moved to his present position in 2002. His major research interest covers topics from small-angle X-ray scattering from soft materials, polymer blends, polysaccharides, DNA DDS, to active carbons.

★★★★★★★★★

Seiji Shinkai was born in 1944 in Fukuoka, Japan, and received his Ph.D. in 1972 from Kyushu University, where he became a lecturer soon afterwards. After postdoctoral work at the University of California, Santa Barbara with Thomas C. Bruice, he joined Kyushu University in 1975 and became a full professor there in 1988. He has launched a SORST Project (Japan Science and Technology Corporation (JST)) related to sugar-based gene manipulators from March 2002. His research interests focus on host-guest chemistry, molecular recognition, sugar sensing, allosteric functions, organogels, sol-gel transcription, polysaccharide-polynucleotide interactions, etc.