

# 乳酸菌オリゴ DNA の腸管送達系の構築と免疫制御に関する研究

下里 剛士 (信州大学大学院農学研究科)

shimot@shinshu-u.ac.jp

オリゴ DNA (ODN) は、含まれる塩基配列により多彩な免疫機能が発揮される機能性核酸素材である。これまでに、ODN の投与による抗感染症、抗腫瘍、抗炎症、抗アレルギー作用といった様々な免疫機能に関する研究が行われてきた。本稿では、ODN の腸管送達系「DNA ナノカプセル」の構築について紹介する。また、DNA ナノカプセルの経口投与により、腸管局所に到達した ODN が発揮する全身免疫系の制御について述べる。

## はじめに

1995 年、Nature 誌において病原細菌由来ゲノム DNA による免疫賦活作用が報告された。以来、微生物由来のゲノム DNA や、その配列に基づき化学合成されたオリゴ DNA (ODN) は、感染症・ガン・アレルギー・炎症性疾患の予防や治療を目的とする機能性核酸分子として研究が進められてきた。とくに、シトシン (C) とグアニン (G) の連続配列からなる CpG コア配列を含む「CpG-ODN」は、パターン認識受容体の一つである Toll like receptor 9 (TLR9) に認識され、細胞内シグナリング経路が活性化される。CpG-ODN は、TLR9 を介して B 細胞の増殖、Th1 細胞によるインターフェロン (IFN)  $\gamma$  の産生、T 細胞・ナチュラルキラー細胞・単球・マクロファージ・樹状細胞を含む、様々な免疫細胞の成熟や増殖活性を高め、強力な免疫反応を惹起する。従って、CpG-ODN は、ワクチンアジュバントとしての利用が期待されている。

私は、乳酸菌やビフィズス菌に代表されるプロバイオティクスの腸管免疫調節作用に注目し、プロバイオティクス由来のイムノジェニクス (immunogenics, 免疫調節因子) の化学構造や免疫活性発現機序の解明を目指し、研究を行ってきた<sup>1,2)</sup>。とくに、プロバイオティクス由来のゲノム DNA や、DNA 断片の化学合成配列を用いた免疫活性試験により、免疫増強効果を有する ODN の同定に成功している<sup>3-6)</sup> (表)。また、ODN 特有の免疫活性や、その活性阻害配列の探索を行うことで、優れた免疫機能を有する ODN の構造に興味深い知見を得ている<sup>4,7)</sup>。

## 乳酸菌およびビフィズス菌由来免疫機能性ODN配列

ODN名称	菌株名	5'-sequence-3'
OLLB7	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NIAIB6	CGGCACGCTCACGATTCTTG
ID35	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC53103)	ACTTTCGTTTTCTGCGTCAA
BL7	<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	GCGTCGGTTTTCGGTGCTCAC
AT5ACL	<i>Lactobacillus gasseri</i> JCM1131 <sup>T</sup>	TATAATTTTTACCAACTAGC
LGAT243	<i>Lactobacillus gasseri</i> OLL2716	TTAACAATTTTTACCCAAGA
MsST	<i>Streptococcus thermophilus</i> (ATCC19258)	CAGGACGTTGTATCACTGAA

ODN は、これまでに様々な動物試験を経て、多くの知見が積み上げられてきた。一部、臨床試験にまで進んでいる ODN も存在する。マウスの系における ODN の投与方法として、腹腔内投与、皮内・筋注投与、静脈投与など、注射器を用いる手法が一般的である。しかしながら、ODN は、経口的に摂取すると、胃液や消化酵素の影響により分解されてしまうという弱点があり、経口投与による実績はほとんど無い。一部、大容量（注射投与の 100 倍量など）での経口投与例は存在するが、コストの面から、ODN を有効成分とする経口機能性素材としての価値を見出せずにいた。

### ODN の腸管送達系の構築

DNA や RNA など、核酸成分の細胞へのトランスフェクションには、主にカチオン性脂質などが利用されている。近年では、新たに金ナノ粒子、カーボンナノチューブ、生分解性ポリケタルナノ粒子と核酸成分との結合・包接技術が開発され、哺乳類細胞への新たな遺伝子導入技術として開発が進められている。とくに (a) 分解酵素による消化から核酸を保護する (b) 核酸の生体内における滞留時間を延ばす (c) 核酸のエンドサイトーシスによる取り込み効率を向上させる (d) 標的細胞に核酸を安定的に届ける (e) 長い時間をかけて核酸をゆっくりと運搬体の外へと放出する (f) 核酸量を抑えることによる低コスト化など、優れた運搬媒体が検討されている。2011 年、私の研究グループは、注射に頼らない「食べる ODN (Edible ODN)」の実現を目指し、研究に着手した。そして 2015 年、Chowdhury らの開発した炭酸アパタイト粒子を用いた細胞への遺伝子導入手法を、*in vivo* スケールに改良した手法を確立し、ODN を包摂・包埋した「DNA ナノカプセル」の開発に成功した<sup>8, 9)</sup>。DNA ナノカプセルは、ODN をカルシウムイオンに吸着させ、ナノサイズにまで成長させたものである。その粒子は直径 50-200nm のナノサイズであることが示された (図 1)。



**図1. DNAナノカプセル (引用文献8)**

**左写真：デジタルカメラにより撮影**

**右写真：走査型電子顕微鏡により撮影**

さらに、DNA ナノカプセルは、人工胃液、DNA 分解酵素に対して、優れた DNA 保護作用を示した。とくに、胃液を想定した強酸による人工胃液耐性試験では、完全に分解が進んだフリーの ODN と比較して、DNA ナノカプセルでは ODN の存在を示す強いシグナルが検出された。このことは、DNA ナノカプセルは胃液による消化に耐え、十二指腸、小腸へと到達する可能性が高まったことを示している。その後の研究により、DNA ナノカプセルが、細胞培養系における試験において、免疫機能性を有することが証明された。

## DNA ナノカプセルによる全身免疫系の制御

私の研究グループでは、乳業用乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* ゲノム配列中より同定した CpG-ODN (MsST と命名) が、マウスの脾臓細胞培養系において IFN $\gamma$  および IL-33 を強く誘導することを発見している<sup>6)</sup>。そこで、アレルゲン感作マウスへの MsST カプセルの投与試験を実施し、腸管パイエル板における局在性、免疫賦活作用、さらに採取した脾臓および脾臓細胞を用いて全身免疫への影響を調べた。その結果、MsST カプセルは、胃酸による消化に耐え、小腸粘膜に到達し、パイエル板に取り込まれることが明らかとなった。また、パイエル板組織において IFN $\gamma$  を誘導したことから、免疫機能性を保持していることが示された。さらに、4 週間にわたる連続投与試験を実施した結果、脾臓が著しく肥大し、脾臓細胞における IL-33<sup>+</sup>細胞割合の上昇も見られた<sup>8)</sup>。すなわち、経口投与した MsST カプセルは腸管粘膜を介して、全身免疫系における IL-33 産生を誘導していると考えられる。以上のことから DNA ナノカプセルは、パイエル板上皮に到達後、すみやかに濾胞内部に取り込まれ、免疫細胞を刺激・活性化することで、免疫機能性を発揮することが証明された。さらに免疫抑制型 DNA ナノカプセルの経口投与により、マウスにおけるアトピー性皮膚炎の発症を予防することを発見した<sup>8)</sup> (図 2)。以上のことは、腸管に到達した ODN により、全身免疫系が活性化されたことを世界で初めて示したものである。

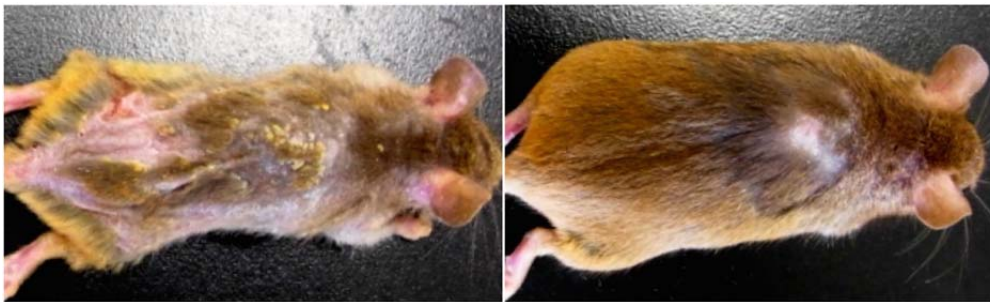


図2. アトピー性皮膚炎モデルマウスに対して、免疫抑制型DNAナノカプセルを70日間経口投与した結果、優れた抗アレルギー作用を示した(引用文献8)。

左写真：コントロールマウス

右写真：免疫抑制型DNAナノカプセル投与マウス

本論文は、ODN 発見者のクリンマン博士(米国国立癌研究所, NCI: National Cancer Institute)の解説を受けており、記事の中で—ODN の経口投与により臨床的有効性が示されたら、免疫治療の費用、不便さは激減するだろう—と紹介された<sup>10)</sup>。すなわち、経口投与の利点とは、注射器を必要とせず、簡便・低コストで、治療のリスクや苦痛が少ないことである。本研究で確立された腸管送達系は、医薬分野のみならず、様々な機能性食品や家畜飼料の開発分野において有益な技術である。今後は、使用目的に応じて ODN を使い分け、DNA ナノカプセルの経口投与試験を進めていく予定である。本研究成果の将来性は、動物試験の結果如何にかかっており、DNA ナノカプセルが経口機能性素材として利用される日が訪れることに期待したい。

## おわりに

近年、腸管関連リンパ組織 (GALT) を主とした粘膜免疫学の発展により、粘膜免疫系の制御を目的とした経口型ワクチンの開発研究が盛んに行われている<sup>2)</sup>。粘膜免疫システムを介した抗原の経口投与は、粘膜局所のみならず、全身の免疫応答を誘導できる。さらに、

注射投与に比べて簡単で、安全性および経済的にも優れている。しかし、ワクチンやアジュバント分子の、腸管粘膜上皮および免疫細胞における作用機序の解明と、腸管送達系の構築が課題となっている。DNA ナノカプセルを応用し、ODN が胃や腸管など消化管を介して安定的に腸管粘膜に届けられれば、様々な疾病の予防・軽減に寄与する機能性サプリメントなどの創製が期待できる。また、ヒト腸内に豊富に存在する乳酸菌やビフィズス菌など、プロバイオティクスに由来する ODN を用いれば、消費者意識に配慮した新素材として提案できる可能性が高い。本研究は、ODN の腸管送達系の構築により、農学分野から健康維持・増進のための新たなワクチンアジュバントや機能性食品・家畜飼料素材の創製を目指す基礎研究として位置づけられる。

## 謝辞

受賞に際し、本賞にご推薦いただきました日本農学アカデミーの中村 宗一郎 先生（信州大学農学部長）に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進める上で、多くのご指導を賜りました北澤 春樹 先生（東北大学大学院農学研究科・准教授）、佐藤 隆 先生（横浜市立大学附属病院・講師）、信州大学農学部教職員の皆様、研究室スタッフの皆様に心より御礼申し上げます。

## 引用文献

1. Shimosato T. and Kitazawa H.: PROBIOTICS: IMMUNOBIOTICS AND IMMUNOGENICS —Immunogenics: immunoestimulatory oligodeoxynucleotides from probiotics—, CRC Press 336-353 (2013).
2. 下里剛士・北澤春樹：アジュバント研究開発の新展開—プロバイオティック乳酸菌を利用した経口ワクチン—, シーエムシー出版, 100-106 (2011).
3. Shimosato T., Kitazawa H., Katoh S., Tohno M., Iliev ID., Nagasawa C., Kimura T., Kawai Y. and Saito T.: Biochem Biophys Res Commun 326:782-787 (2005).
4. Shimosato T., Kimura T., Tohno M., Iliev ID., Katoh S., Ito Y., Kawai Y., Sasaki T., Saito T. and Kitazawa H.: Cell Microbiol 8:485-495 (2006).
5. Shimosato T., Tohno M., Sato T., Nishimura J., Kawai Y., Saito T. and Kitazawa H.: Anim Sci J 80:597-604 (2009).
6. Shimosato T., Fujimoto M., Tohno M., Sato T., Tateo M., Otani H. and Kitazawa H.: Biochem Biophys Res Commun 394:81-86 (2010).
7. Ito Y., Shigemori S., Sato T., Shimazu T., Hatano K., Otani H., Kitazawa H. and Shimosato T.: FEBS Open Bio 3:41-45 (2013).
8. Wang Y., Yamamoto Y., Shigemori S., Watanabe T., Oshiro K., Wang X., Wang P., Sato T., Yonekura S., Tanaka S., Kitazawa H. and Shimosato T.: Mol Ther 23:297-309 (2015).
9. 下里剛士：月刊 BIOINDUSTRY—機能性オリゴ DNA の経口投与を可能にする「DNA ナノカプセル」の開発—, シーエムシー出版, 32:61-65 (2015).
10. Klinman DM.: Mol Ther -Commentary-, 23:222-223 (2015)