

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06031・19K21168

研究課題名(和文)オリゴDNAナノカプセルを用いた敗血症に対する機能性食品の創製研究

研究課題名(英文)Development of functional food for sepsis using oligodeoxynucleotide nano capsule

研究代表者

山本 祥也 (Yamamoto, Yoshinari)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・助教

研究者番号：90825845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症の改善因子である血小板活性化因子分解酵素(PAF-AH)をマウスにおいて誘導する免疫増強型機能性DNA(Class A CpG ODN, CpG-A)について、マウスからヒトレベルまでのPAF-AHの誘導能の有無と自由摂取による敗血症の予防効果を検証した。マウス脾臓細胞およびヒトマクロファージ(THP-1)細胞において、種々のCpG-A(CpG-A1585, CpG-A2216, CpG-A2336, CpG-AD35)の刺激によりPAF-AHの誘導効果が認められた。また、CpG-A1585の経口摂取により血清PAF-AHが増加し、一部の敗血症症状を改善することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症はヒトおよび家畜で共通して問題となっている致死率の高い疾患であり、臨床試験まで進む候補薬剤でもその効果は限定的であることから新たな機能性素材の開発が求められている。本研究では、CpG-AのPAF-AH誘導能がマウスだけではなく、ヒトにおいても認められることを見出し、ヒトの敗血症も軽減しうることを示唆した。また、CpG-Aを主成分として、敗血症の一部の症状を改善する機能性食品・飼料の開発に成功した。これらの成果により、CpG-Aを用いた敗血症の新たな予防戦略を提案でき、ヒトや家畜における健康の維持・増進に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Class A CpG Oligodeoxynucleotide (CpG-A) is immuno-functional material which can induce platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) known as effective factor of sepsis. The present study investigated whether CpG-A could induce PAF-AH on not only mouse' immuno cell but also human's immuno cell and free intake of CpG-A could prevent sepsis and its symptoms. Some CpG-A including CpG-A1585, CpG-A2216, CpG-A2336 and CpG-AD35 exhibited PAF-AH induction on mouse splenocyte and human macrophage cell line THP-1. free intake of CpG-A1585 increased serum PAF-AH activity and a part of septic symptoms like inflammation compared with mice that did not receive CpG-A.

研究分野：動物生命科学

キーワード：Class A CpG ODN DNAナノカプセル PAF-AH 機能性食品 敗血症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細菌のゲノム DNA 配列に基づき化学合成された CpG オリゴ DNA (CpG ODN) は、抗感染症、抗アレルギーや抗腫瘍作用といった様々な免疫機能性を有する素材である。CpG ODN は配列中の非メチル化したシトシン (C) とグアニン (G) の連続配列 (CpG モチーフ) の数やその側鎖の塩基を含めた組み合わせにより、A・B・C の 3 つの Class に分類されている。いずれの Class の CpG ODN も免疫細胞に存在する DNA 受容体 TLR9 によって認識され、多様な免疫応答を惹起することが知られている。

これまでの研究では、Class A に属する CpG ODN の 1 つである ODN1585 (CpG-A1585, ) がマウス脾臓細胞において、細菌の感染をきっかけに臓器障害が起きる状態である“敗血症”の発症に関わる血小板活性化因子の分解酵素 (PAF アセチルヒドロラーゼ; PAF-AH) を強力に誘導することを見出している。また、致死量のリポ多糖 (LPS) および PAF 投与により誘導される敗血症モデルマウスに CpG-A1585 を腹腔内投与 (i.p.) すると、敗血症症状を改善することを明らかにしている (Yamamoto *et al.*, *Front Immunol.*, 2017)。一方で、CpG ODN を“経口用素材”として敗血症の予防・軽減に用いた研究例はない。CpG ODN は経口的に摂取すると、胃酸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る。これに対し、CpG ODN をカルシウム性ナノ粒子に包摂することで強酸や消化酵素への耐性を付与した DNA ナノカプセル (DNanocap) が開発されている (Wang *et al.*, *Mol Ther.*, 2015)。そこで本研究では、敗血症を改善する CpG-A1585 と DNanocap を組み合わせることにより、経口的な CpG ODN の摂取により敗血症を改善する機能性食品の創製に着手した。また、CpG ODN は、CpG モチーフやその長さの特徴により、ヒト、マウス、ウシ用といった「種特異的な活性」を有することが報告されている。そのため、Class A CpG ODN をヒトや家畜において敗血症予防に利用するためには、ヒトあるいは家畜の種特異的な Class A CpG ODN を用いて、それぞれの種における PAF-AH の誘導能を検証する必要があるという考えに基づき、in vitro 細胞培養試験による検証を実施した。

### 2. 研究の目的

本研究は、PAF-AH を誘導する Class A CpG ODN を用いて敗血症を予防する機能性食品・飼料の創製を目指し、Class A CpG ODN の経口用ナノカプセル体を含む特別飼料を作成し、自由摂取による生体内での PAF-AH の誘導に必要な投与期間を検証した。同時に、実験的に誘導した 2 つの敗血症モデルを用いて、その予防効果について検証した。また、Class A CpG ODN の種特異的な活性の問題を克服するため、種々の Class A CpG ODN から、マウスおよびヒト免疫細胞において PAF-AH を誘導する Class A CpG ODN の探索を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウスおよびヒト細胞における Class A CpG ODN の PAF-AH 誘導解析

マウス脾臓細胞あるいはヒトマクロファージ (THP-1) 細胞と Class A CpG ODN の in vitro 共培養試験を実施した。Class A CpG ODN にはマウス TLR9 特異的な CpG-A1585 およびヒト TLR9 特異的な 3 種の Class A CpG ODN (ODN2216; CpG-A2216、ODN2336; CpG-A2336、D35; CpG-AD35) を用いた。CpG ODN の陰性コントロールとして ODN1612 (Ctrl1612) を用いた。まず、7 週齢 BALB/c マウスより脾臓を採取し、脾臓細胞を調製した。この脾臓細胞に 4 種の Class A CpG ODN を刺激・培養し、PAF-AH に関連する Paf-ah2 の遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR により解析した。次に、THP-1 細胞をあらかじめ PMA によりマクロファージに分化させ、4 種の Class A CpG ODN を刺激・培養し、Paf-ah2 の遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR により解析した。同時に、培養上清における PAF-AH 活性について、PAF-AH アッセイキットを用いて測定した。

#### (2) CpG-A1585cap の自由摂取試験に伴う経時的な PAF-AH 活性誘導能の解析

マウス用飼料に CpG-A1585cap を混和した特別飼料を調製し、5 週齢 BALB/c マウスに 4 および 8 週間自由摂取させた。試験群には、CpG-A1585cap 1mg/マウス飼料 1g で調製した特別飼料を用いた (CpG-A1585cap-feed; 1585CF 群)。陰性対照には、CpG-A1585 を含まない cap 含有特別飼料 (Cap-feed; CF 群) と cap を含まない通常飼料 (Normal-feed; NF 群) を摂取させた。試験開始から終了までの体重変化と接触量の測定を行なった。また、試験終了後、マウスの血清中の PAF-AH 活性を測定した。

#### (3) エンドトキシン致死モデルを用いた CpG-A1585cap の自由摂取試験

5 週齢 BALB/c マウスに 8 週間、CF と 1585CF を自由摂取させた後、LPS の i.p. によりエンドトキシンショックを誘導し、予防効果を検証した。エンドトキシンショックの誘導後、生存性試験および体温変化の測定を実施した。また、血清中の炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- $\alpha$ ) の産生量について ELISA 法を用いて定量した。

#### (4) 播種性血管内凝固症候群モデルを用いた CpG-A1585cap の自由摂取試験

5 週齢 ICR マウスに 8 週間、CF と 1585CF を自由摂取させた後、PAF の i.p. により播種性血管内凝固症候群 (DIC) を誘導し、予防効果を検証した。DIC の誘導後、生存性試験を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウスおよびヒト細胞における Class A CpG ODN の PAF-AH 誘導解析

脾臓細胞では、Ctr1612 と比較して、CpG-A1585 と CpG-A2336 の刺激により有意な Paf-ah2 遺伝子発現量の増加が認められた(図1)。また、THP-1 細胞では、生理食塩水(PBS)および Ctr1612 と比較して、CpG-A1585 と CpG-A2216 で強力な Paf-ah2 遺伝子発現量と PAF-AH 活性の増加が認められた(図1)。以上より、Class A CpG ODN のいくつかの種類では、種特異的な活性ではなく、配列依存的に PAF-AH を誘導することが考えられた。

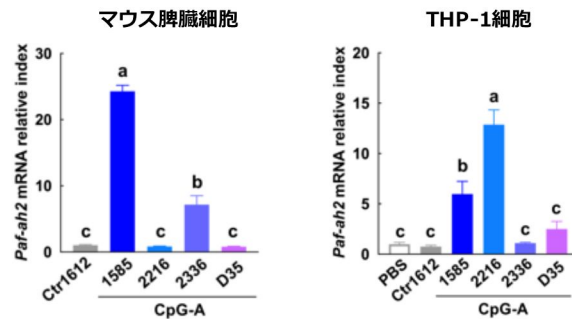


図1. マウス脾臓細胞およびヒトTHP-1細胞におけるClass A CpG ODNのPAF-AH遺伝子発現量の誘導効果

##### (2) CpG-A1585cap の自由摂取試験に伴う経時的な PAF-AH 活性誘導能の解析

4 および 8 週間のいずれの自由摂取期間においても、NF 群、CF 群および 1585CF 群の間に体重変化および摂食量の差は認められなかった。NF 群および CF 群と比較して、1585CF 群では 4 および 8 週齢における血清 PAF-AH 活性の有意な増加が認められた(図2)。申請当初の計画では、12 週間の CpG-A1585cap の自由摂取期間を設定していたが、以上の結果より、8 週間までの CpG-A1585cap の自由摂取で十分な PAF-AH の誘導が出来たと判断し、以後の試験では自由摂取期間を 8 週間と設定した。

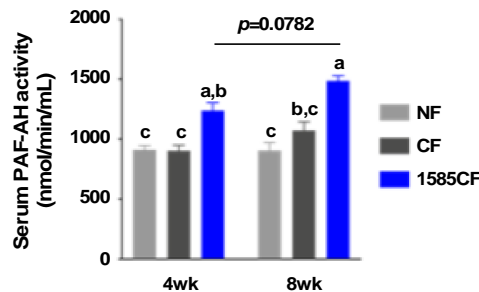


図2. CpG-A1585capの自由摂取による血清PAF-AH活性の変化

##### (3) エンドトキシン致死モデルを用いた CpG-A1585cap の自由摂取試験

1585CF 群では、エンドトキシンショック誘導後の生存率および体温低下の改善効果は認められなかったが、CF 群と比較して、1585CF 群では LPS により誘導される血清の IL-6 および TNF- $\alpha$  産生量の減少傾向が認められた(図3)。以上より、CpG-A1585 の自由摂取は、炎症のような敗血症の一部の症状を改善することが示唆された。

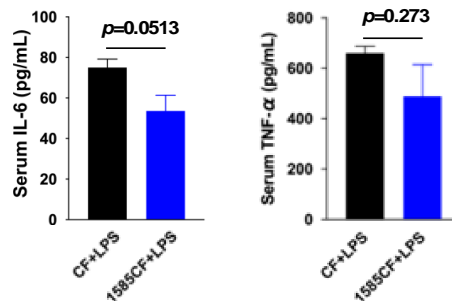


図3. エンドトキシンショックにおける血清炎症性サイトカイン産生量

##### (4) 播種性血管内凝固症候群モデルを用いた CpG-A1585cap の自由摂取試験

1585CF 群では、DIC 誘導後の生存率および体温低下の改善効果は認められなかった。

研究期間全体を通じて、CpG-A1585 以外の Class A CpG ODN にも PAF-AH 誘導が備わってい

ることがわかり、またその誘導効果はマウスのみならずヒト細胞においても発揮されることが明らかになった。また、CpG-A ナノカプセルの自由摂取は生体レベルでも PAF-AH を誘導し、敗血症の炎症応答を改善することが明らかにしたが、今回の試験では生存率などの敗血症症状の改善には至らなかった。これらの課題に対し、今後は、Class A CpG ODN の投与の量や期間についての検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Namai Fu, Yamamoto Yoshinari, Sato Takashi, Ogita Tasuku, Shimosato Takeshi	4. 巻 89
2. 論文標題 Recombinant mouse calcitonin gene-related peptide secreted by Lactococcus lactis inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1707 ~ 1711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chaen Yuta, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 64
2. 論文標題 Naringenin promotes recovery from colonic damage through suppression of epithelial tumor necrosis factor- production and induction of M2-type macrophages in colitic mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrition Research	6. 最初と最後の頁 82 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nutres.2019.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hung Tran Van, Wanatanbe Jun, Yonejima Yasunori, Hisa Keiko, Yamamoto Yoshinari, Suzuki Takuya	4. 巻 52
2. 論文標題 Exopolysaccharides from Leuconostoc mesenteroides attenuate chronic kidney disease in mice by protecting the intestinal barrier	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Functional Foods	6. 最初と最後の頁 276 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2018.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nigar Shireen, Yamamoto Yoshinari, Okajima Takuma, Sato Takashi, Ogita Tasuku, Shimosato Takeshi	4. 巻 89
2. 論文標題 Immune synergistic oligodeoxynucleotide from Lactobacillus rhamnosus GG enhances the immune response upon co-stimulation by bacterial and fungal cell wall components	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1504 ~ 1511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 御手洗綾、山本祥也、鈴木卓弥
2. 発表標題 グァーガム摂取による腸管上皮SOCS1上昇は抗生物質投与により消失する
3. 学会等名 第51回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤谷俊亮、山本祥也、鈴木卓弥
2. 発表標題 慢性腎臓病における腸管バリア損傷の分子機序の探索
3. 学会等名 第51回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野智裕、山本祥也、鈴木卓弥
2. 発表標題 乾癬モデルマウスは腸管のバリア損傷と炎症を引き起こす
3. 学会等名 第51回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荻田佑、山本祥也、深澤知夏、三上彩音、下里剛士
2. 発表標題 Flavonifactor plautiiの経口投与によるTh2免疫応答の抑制効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ZAYADORJ TSEND-AYUSH、安倍暢大、山本祥也、荻田佑、下里剛士
2. 発表標題 乳業用乳酸菌由来オリゴDNAによるCXCL5誘導作用
3. 学会等名 日本畜産学会第125回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本祥也、石丸絢也香、鈴木卓弥
2. 発表標題 微生物由来オリゴDNAを用いた生体防御機能を増強する機能性食品・飼料素材の開発
3. 学会等名 超異分野学会 益田フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本祥也、石丸絢也香、鈴木卓弥
2. 発表標題 A型オリゴDNAの自由摂取による生体防御機能への影響
3. 学会等名 第52回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----