

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03125

研究課題名（和文）経口用乳酸菌オリゴDNA微粒子の最適化と腸管上皮を起点とする免疫制御機構の解明

研究課題名（英文）The Optimization of Oral Lactobacillus Oligodeoxynucleotide Microparticles and the Elucidation of Immune Regulation Mechanisms via Intestinal Epithelium

研究代表者

下里 剛士（Shimosato, Takeshi）

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：00467200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アレルギー性喘息モデルマウスに対して、乳酸菌オリゴDNAの経口用微粒子（ODNcap）含有飼料を給餌し、その効果について検証を行った。主な成果として、ODNcapはアレルギー性気道炎症を抑え、気道抵抗の改善をもたらし、杯細胞の過形成を抑制した。また、肺静脈心筋細胞の傷害を抑制することを発見した。加えて、ODNcapが介在する効果には気道抗菌ペプチドと腸内微生物叢が関与していることを明らかにした。将来、感染症、アレルギー性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患を予防または抑制する食品や飼料素材の開発につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、アレルギー性気管支炎の病態は、肺静脈心筋細胞の傷害を伴うことを発見し、乳酸菌オリゴDNA微粒子（ODNcap）の摂取は、この傷害を軽減することを見出した。これらの結果は、ODNcapが腸管を起点とする腸肺相関に関与していることを示唆している。今後は、ODNcapの有効性、安全性、治療可能性、および作用機序を検証するためのさらなる研究が必要である。乳酸菌オリゴDNAを有効成分とする気道炎症に対する予防薬や、機能性素材（食品素材や核酸医薬）の開発に役立つ知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：Previously, we developed acid-resistant particles (ODNcap) as an oral delivery device for ODNs. When taken up by intestinal mucosal cells, these edible ODNs retained their immunomodulatory activity. The ability to produce particles containing immunomodulatory ODNs opens the possibility of using ODNcaps in mouse disease model studies. This study showed that free feeding of an ODNcap-feed prophylactically attenuates allergic airway inflammation, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in an asthma model. Using transcriptomics-driven approaches, we demonstrated that injury of pulmonary vein cardiomyocytes accompanies an allergen inhalation challenge but is inhibited by ODNcap feeding. We also showed the participation of an airway antimicrobial peptide and gut microbiota in the ODNcap-mediated effects. This approach may lead to developing novel foods and feeds that will prevent or suppress many types of infectious, allergic, inflammatory, and autoimmune diseases.

研究分野：動物生産科学

キーワード：乳酸菌 オリゴDNA 微粒子 腸管

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、乳酸菌の菌体成分の中からとくにゲノムDNAやオリゴDNAに注目し、腸管局所に到達した乳酸菌由来の核酸成分が腸肺軸を介してもたらず作用機構の解明を目指すものである。オリゴDNAの投与方法として、注射器を用いて直接血管や組織内に注入する方法が一般的であるが、オリゴDNAには、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限定される。研究代表者らは、オリゴDNAの経口ルートの開拓を目指し、オリゴDNAを独自技術でコーティングし、胃液に溶けず腸まで届くDNA微粒子 (ODNcap) の開発に成功した¹⁾。また、これまでに得られている知見から、腸管粘膜を標的とするODNcapは、従来行われてきたオリゴDNA注射投与とは、本質的に異なる作用機序を有する可能性が示唆されている。そこで本研究は、ODNcapが小腸局所を起点とするアレルギー制御機構の解明を目指し、気管支喘息モデルマウスにおける投与試験を実施した。

2. 研究の目的

本研究は、優れた免疫調節作用を有する乳酸菌オリゴDNAの利用性を拡充するための基礎研究であり、腸管上皮を起点とするアレルギー制御機構について、小腸パイエル板を起点とする肺組織トランスクリプトーム解析と、腸内および気道菌叢の変動に焦点を当て、その全容解明を目的とした。得られたメタデータを統計解析し、組織内外で変化のあった事柄およびその相関を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

- オリゴDNA微粒子の作成：エンドトキシンフリー、ホスホロチオエート (*) 化クラス B CpG-ODNs (乳業用乳酸菌由来MsST^{2,3)}) は、GeneDesign, Inc. (Osaka, Japan) に合成を委託した。合成オリゴDNAはNuclease Free Waterを用いて溶解し、孔径0.22 μ mのマикроフィルタに通して滅菌した。Wangら¹⁾の報告を参考にODNcapの作成を行った。また、高機能微粒子作成装置 (ファルマバレーセンター) を用いて、球状粒子のオリゴDNA微粒子の試作を行った。コーティング基剤として、アルギン酸ナトリウムを採用し、水溶性のアルギン酸ナトリウムとオリゴDNAを高機能微粒子作成装置により均一に射出後、ドライヤーにより粒子化し、アルギン酸ナトリウム-ODN複合体微粒子を得た。
- 動物試験：卵白アルブミン (OVA) 1 μ gを水酸化アルミニウムゲル2mgに懸濁し、マウス腹腔内へと投与することで感作を行った。その後、OVAを超音波式ネブライザを用いて気道に曝露することによって気管支喘息を誘導した。実験群として、Non-treatment (NT) 群、Control-feed (Ctrl-F) 群、Capsule-feed (Cap-F) 群、ODNcap-feed (ODNcap-F) 群の4群を設定した。Cap-FおよびODNcap-F群では、CapもしくはODNcap 1mg/マウス飼料1gで特別飼料を調製した。70日目にマウスを安楽死させ、肺組織を回収した。
- メタコリンに対する気道過敏性の評価：マウスを麻酔下で気管切開し、人工呼吸器 (flexiVent; SCIREQ) に接続して、以前に確立された手順に従ってメタコリンに対する反応性を評価した⁴⁾。その後、マウスをネブライザーで噴霧したメタコリン (0、3、10、30mg/mL) に曝露し、スナップショット法を用いて各メタコリン負荷後に呼吸器系抵抗 (Rrs) 値をモニターした。すべてのデータはflexiWareソフトウェア (ver.7.6) を用いて解析した。

- 肺切片の作成と免疫組織化学的解析：肺は10%ホルマリンで固定され、パラフィンワックスに包埋した後、5 μ mの厚さに切片化した。切片はヘマトキシリン・エオシン（HE）染色または過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色を用いて染色した。HE染色切片では組織病理学的評価を行い、PAS染色切片では杯細胞の過形成を評価した。
- 肺組織におけるトランスクリプトーム解析：回収した肺組織から全RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析に基づくトランスクリプトーム解析を行った。アレイ解析のデータは、Agilent Feature Extraction software (ver. 11.0) (Agilent)を用いて解析した。発現データの統計的有意性は、local-pooled-error検定とfold changeを用いて決定した。すべてのデータ解析はRソフトウェア (ver.3.2.1) を用いて行った⁵⁾。

4. 研究成果

(1) 気道炎症は、喘息の主要な特徴であるAHR（Airway hyperresponsiveness）の主要な病態であると考えられている。杯細胞の過形成と線維化を伴う気道リモデリングは、AHRの病態に起因している。PAS染色による気管支の観察から、杯細胞の過形成と粘液の過剰生産はCtrl-FとCap-Fで同様に認められ、ODNcap-Fでは有意に減弱した。なお気管支周辺では、 α -SMA抗体に対する反応性は全群で同程度であったことを踏まえ、本モデルでは線維化が進行していないことが示唆された（図1）。

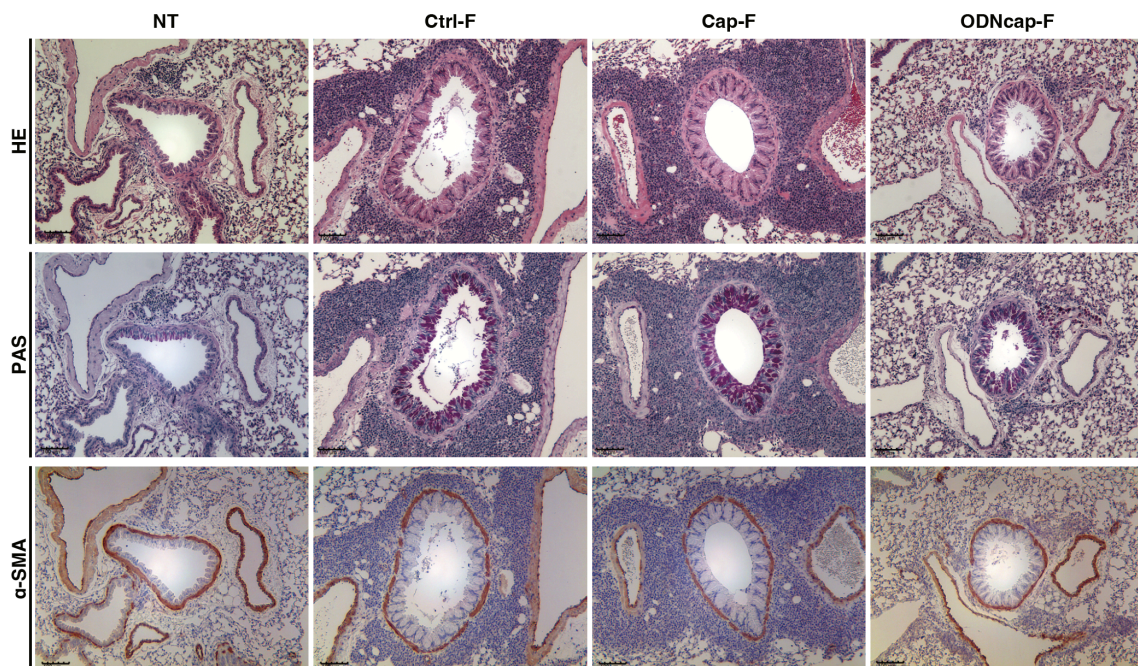


図1. ODNcap-Fはアレルギー性気道炎症および気管支杯細胞過形成を抑制した。HE染色切片の代表像および過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色切片の代表像を示した。(n = 6, bar=100 μ m)

(2) 肺機能測定装置を用いて、各マウスの上気道に対する気道抵抗値を評価した（図2）。Ctrl-FのRrs, Rn, G, Hの値は上気道によって用量依存的に顕著に増加した。その結果、これらの指標の曲線下面積（AUC）はNTと比較してCtrl-Fで有意に増加した。また、ODNcap-F、Cap-FではCtrl-Fに比べ、AUC (Area under curve) が有意に減少した。また、ODNcap-FではCap-Fと比較してRrsの有意な抑制が観察された。

(3) 喘息モデルマウスにおけるODNcap-Fの抑制作用機序を明らかにするため、DNAマイクロアレイ解析を用いて肺トランスクリプトームを解析した。結果として、差次的に発現した108遺伝子を同定することに成功した。興味深いことに、遺伝子オンロジー解析では、心筋収縮に関連する遺伝子 (*Myh6*, *Myl4*, *Myl1*, *Tcap*, *Tnni3*, *Tnnt2*, *Ttn*, *Nppa*, *Tnnt3*) が、Ctrl-F、Cap-F、またはその両方と比較して、ODNcap-Fで有意に発現上昇していることが示された。さらに解析を進めると、心筋で優先的あるいは高発現している遺伝子 (*Myl7*⁶⁾、*Myom2*⁷⁾、*Sln*⁸⁾、*Pgam2*⁹⁾、*Cox8b*¹⁰⁾、*Myh7b*¹¹⁾、*Fabp3*¹²⁾) もODNcap-Fで発現量が促進されていることが明らかとなった (図3)。対照的に、これらの転写産物の発現量は、NTと比較してCtrl-Fで減少した。

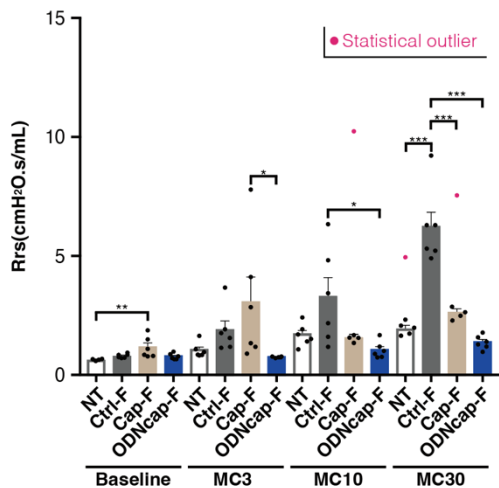


図2. ODNcap-Fはメタコリンに対する気道反応性を減弱させた。70日目に、麻酔をかけたマウスを人工呼吸器に接続し、様々な濃度のメタコリン (0~30mg/mL) を吸入させ、気道抵抗値 (Rrs) を測定した (n=6)。データは平均値±平均値の標準誤差で示した。

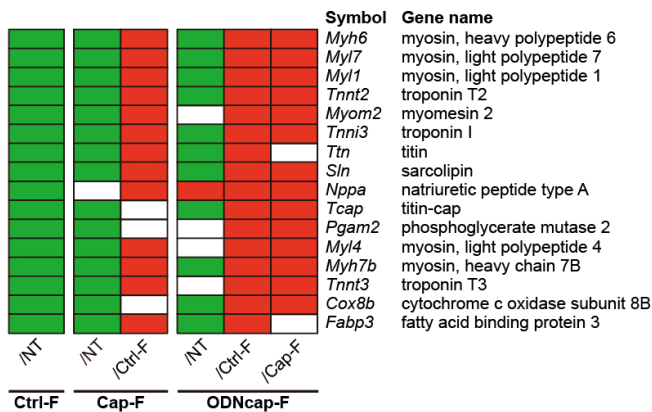


図3. 肺におけるトランスクリプトーム解析。肺は70日目に採取し、DNAマイクロアレイ解析に供した。実験群間の心筋関連遺伝子の発現の違いを可視化したパネルを示した。緑と赤のボックスは、それぞれ有意に発現低下したものと発現上昇したもので、有意差のないものは白Boxで示した。

(4) オリゴDNAの投与は、喘息を含む様々な疾患の予防や治療に有効であることが、多くの動物実験や臨床研究で報告されている。しかし、疾病予防を目的とした健常者への長期的・継続的な注射投与は負担が大きい。そこで、疾患に対する免疫反応を効率的に誘導できるオリゴDNAを有効成分とする経口製剤の開発が望まれている。本研究では、経口用オリゴDNA微粒子であるODNcapを含む特別飼料を調製した。ODNcap-Fを70日間自由摂取させたところ、喘息モデルマウスにおいて、メサコリンに対するAHR、気管支杯細胞過形成が減弱することを明らかにした。この知見は、ODNcapの経口摂取がアレルギー性喘息の発症予防に役立つことを示唆している。オリゴDNAは、医薬分野において実用化に最も近い中分子核酸化合物の一つとされている。近年急速に開発が進められている核酸医薬は、開発途上と言われている。これまで注射器により投与されてきたオリゴDNAを、経口的なルートから安定的に機能性を発揮できる可能性を示すことができれば、オリゴDNAの利用性が飛躍

的に拡大するだろう。本研究の成果から、「食べるオリゴDNA」という新たな特色を打ち出し、経口的なルートから手軽にオリゴDNAを摂取できる新たな道筋を示すことができる。以上、本研究は、ヒトのみならず家畜動物も含めた健康維持・増進のための新素材の開発を通じて、農学分野と医薬・ナノテク分野の融合領域として新たな核酸医薬におけるイノベーションを目指す成果である。

<引用文献>

- 1) Wang Y, et al. Inhibitory/suppressive Oligodeoxynucleotide Nanocapsules as Simple Oral Delivery Devices for Preventing Atopic Dermatitis in Mice. *Mol Ther* (2015) 23(2):297–309. doi: 10.1038/mt.2014.239
- 2) Yamamoto Y, et al. Development of a simple IgE-independent anaphylactic model using buckwheat antigen and B-type CpG oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus*. *Anim Sci J* (2009) 87(5): 710-717. doi: 10.1111/asj.12479
- 3) Shimosato T, et al. CpG Oligodeoxynucleotides Induce Strong Up-Regulation of Interleukin 33 via Toll-Like Receptor 9. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) 394(1):81–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.110
- 4) Yumoto K, et al. Nasally Administered Lactococcus Lactis Secreting Heme Oxygenase-1 Attenuates Murine Emphysema. *Antioxidants*. Vienna, Austria (2020) 9 (11):11049. doi: 10.3390/antiox9111049
- 5) R Core Team. “R: A Language and Environment for Statistical Computing”. In: R Foundation for Statistical Computing (2016). Available at: <https://www.R-project.org/>.
- 6) Kubalak SW, et al. Chamber Specification of Atrial Myosin Light Chain-2 Expression Precedes Septation During Murine Cardiogenesis. *J Biol Chem* (1994) 269(24):16961–70. doi: 10.1016/S0021-9258(19)89483-8
- 7) Fagerberg L, et al. Analysis of the Human Tissue-Specific Expression by Genome-Wide Integration of Transcriptomics and Antibody-Based Proteomics. *Mol Cell Proteomics* (2014) 13(2):397–406. doi: 10.1074/mcp.M113.035600
- 8) Vangheluwe P, et al. Sarcolipin and Phospholamban mRNA and Protein Expression in Cardiac and Skeletal Muscle of Different Species. *Biochem J* (2005) 389(Pt 1):151–9. doi: 10.1042/bj20050068
- 9) Omenn GS, Cheung SC. Phosphoglycerate Mutase Isozyme Marker for Tissue Differentiation in Man. *Am J Hum Genet* (1974) 26(3):393–9.
- 1 0) Hüttemann M, et al. Mice Deleted for Heart-Type Cytochrome C Oxidase Subunit 7a1 Develop Dilated Cardiomyopathy. *Mitochondrion* (2012) 12(2):294–304. doi: 10.1016/j.mito.2011.11.002
- 1 1) Warkman AS, et al. Developmental Expression and Cardiac Transcriptional Regulation of Myh7b, a Third Myosin Heavy Chain in the Vertebrate Heart. *Cytoskeleton* (2012) 69(5):324–35. doi: 10.1002/cm.21029
- 1 2) Heuckeroth RO, et al. Analysis of the Tissue-Specific Expression, Developmental Regulation, and Linkage Relationships of a Rodent Gene Encoding Heart Fatty Acid Binding Protein. *J Biol Chem* (1987) 262(20):9709–17. doi: 10.1016/S0021-9258(18) 47992-6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okajima, T., Shigemori, S., Namai, F., Ogita, T., Sato, T. & Shimosato, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Free feeding of CpG-oligodeoxynucleotide particles prophylactically attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 738041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.738041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shigemori, S., Namai, F., Ogita, T., Sato, T. & Shimosato, T.	4. 巻 91
2. 論文標題 Oral priming with oligodeoxynucleotide particles from Lactobacillus rhamnosus GG attenuates symptoms of dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	佐藤 隆 (Sato Takashi) (70510436)	信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・特任教授 (13601)	
研究分担者	重盛 駿 (Shigemori Suguru) (90803487)	信州大学・先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所・助教（特定雇用） (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	荻田 佑 (Ogita Tasuku) (50738010)	信州大学・学術研究院農学系・助教 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関