

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580388

研究課題名(和文) 乳酸菌DNAのナノカプセル体を用いた新規食品および飼料素材開発のための基盤構築

研究課題名(英文) Development for novel food and feed using DNA Nanocapsules of Lactic acid bacteria as Oral Delivery Devices

研究代表者

下里 剛士 (Shimosato, Takeshi)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：00467200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：オリゴDNA(ODN・短いDNA断片)は、感染症の予防や抗アレルギー作用など優れた免疫機能が期待される機能性分子素材として知られている。これまでに様々な動物試験が行われ、その投与方法としては、腹腔内投与(i.p.)、鼻腔に滴下などの手法が一般的で、尾静脈からの投与(i.v.)例もある。しかしながら、薬剤や食品素材の動物試験において通例となっている、経口投与による報告例はほとんど無く、経口投与による価値を見出すまでには至っていない。本研究において、我々は、ODNのシンプルかつ、低コストな経口投与システムの構築を進め、「DNAナノカプセル(DNanocap)」の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Chemosynthetic immuno-functional oligodeoxynucleotides (ODNs) are also useful as adjuvants for vaccines against infectious agents, cancer, allergies, and inflammatory disorders. For medical purposes, ODNs have been administered in a variety of ways, including via intraperitoneal (i.p.), intravenous (i.v.), and subcutaneous (s.c.) routes. There are few reports of oral (i.e., intragastric [i.g.]) administration of ODNs as a drug or food material. Here, we successfully developed a simple and low-cost oral oligodeoxynucleotide (ODN) delivery system, named DNA nanocapsules (DNanocaps).

研究分野：動物生命科学

キーワード：DNAナノカプセル DNanocap 乳酸菌 経口

1. 研究開始当初の背景

近年、乳酸菌やビフィズス菌など有用微生物由来のゲノムDNA配列に基づき化学合成された、CpGオリゴDNA (CpG-ODN) は抗アレルギー、抗腫瘍や抗炎症性作用といった様々な機能性に関する研究が展開されてきた。シトシン (C) とグアニン (G) から成るCpGモチーフを含むCpG-ODNは、パターン認識受容体の一つであるToll like receptor 9 (TLR9) のリガンドとして広く知られている。免疫活性を持ったCpG-ODNにはその配列、構造、免疫活性の違いから、4つのクラスに分けられる。いずれのクラスのCpG-ODNもそれぞれの免疫細胞に存在するTLR9によって認識されると、B細胞の増殖、T細胞、NK細胞、単球、マクロファージ、DCを含む様々な免疫細胞の成熟・分化を誘導する。結果として、Th1細胞によるIFN 産生といった強力なTh1型の免疫反応が惹起される。

実際にワクチンアジュバントとして用いられるCpG-ODNは、抗腫瘍薬として様々な臨床試験が行われており、その有効性が証明されつつある。ODNのマウスにおける一般的な投与方法としては、腹腔内投与 (i.p.)、鼻腔に滴下、尾静脈からの静注投与 (i.v.) などがある。またCpG-ODNの投与量としては、100 µg 以上/マウス 1 匹といった報告が多い。残念ながら、CpG-ODNの経口投与により、腸管粘膜免疫を介する機能性に関する知見はほとんどない。すなわち、CpG-ODNは優れた免疫機能を有しながら、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り、これまで経口投与による試験はほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、“食べる”機能性ODNの実現に向けて「経口摂取により免疫機能性を発揮するDNA素材を提案したい」というアイデアに基づき、酸耐性を有する「DNAナノカプセル」の開発に着手した。とくにODNの経口投与において大きな障害となっている「胃酸の問題」をクリア

ーするため、カルシウム性ナノ粒子を用いたODNのカプセル化というアイデアの着想に至った。

2. 研究の目的

ODN、siRNA、プラスミドDNAなど、核酸成分の細胞へのトランスフェクションには、カチオン性リポソームなどの脂質分子が利用されている。しかしながら、脂質性のトランスフェクション試薬は非常に高価であることから、近年では、代替手法としてポリケタル粒子、金ナノ粒子、カーボンナノチューブや四塩化ケイ素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(1) DNA分解酵素による消化からODNを保護する(2) ODNの生体内における滞留時間を延ばす(3) ODN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(4) 標的細胞にODNを安定的に届ける(5) 長い時間をかけてODNをゆっくりと運搬体の外へと放出する(6) ODN量を抑えることによる低コスト化など、ODNの優れた運搬媒体(キャリアー)が検討されている。本研究ではODNの経口投与を目指すことから、胃酸を想定した人工胃液耐性試験を評価項目に加えた。さらに本研究では、消化器系における免疫組織の代表であるパイエル板をターゲットとし、腸管粘膜における機能性ODNの経口デリバリーシステムの確立と標的細胞の同定を目的とした。またアレルギー感作マウスに経口投与を実施し、腸管粘膜を介する全身免疫応答効果について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

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(*Biochem Biophys Res Commun.*, 409, 745-747, 2011)を、*in vivo*スケールに改良した手法の開発を行った。本手法は、負の電荷を帯びたODNを、正の電荷を帯びた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るものである。さらにDNAナノカプセルとカプセル化していないODNを、DNA分解酵素(DNase I)、強酸(pH 2.0)および人工胃液(pH 1.71)、強アルカリ(pH 12.0)、超音波(55W, 60min)、高温・高圧(121, 15min)条件下で処理した。カプセルは主にカルシウムからなることから、カルシウムイオンのキレート剤としてEDTAを50mM添加することで崩壊させ、ODNを溶出させた。また、一本鎖DNAであるODNの染色は、SYBR Goldを用いて染色し、300nmのUVトランスイルミネーターを用いて検出することで、カプセル内のODNの安定性を評価した。さらにDNAナノカプセルを用いてマウス脾臓細胞を刺激し、IL-6 mRNAの発現量についてリアルタイムPCR法により定量解析した。

*in vivo*実験では、4週齢BALB/cマウスに無蛍光飼料(iVid#2)を4週間自由摂取させ、試験前日より24時間絶食させた。その後、PBS、6FAM蛍光ラベルした6FAM-ODN(10 µg/匹)および6FAM-ODNナノカプセル(1 mg/匹、ODN換算量: 10 µg)を経口ゾンデ法により投与した。投与4時間後、マウスを安楽死させ、十二指腸直下の空腸よりパイエル板を摘出した。凍結包埋法によりパイエル板組織切片を作成し、核をDAPIにより染色した後、共焦点レーザー顕微鏡により6FAM-ODNを追跡した。次に、6週齢BALB/cマウスにCpG-ODNナノカプセル(5 mg/Day/匹、ODNナノカプセル5mg中のODN量: 50 µg)を3日間連続的に経口投与した。最終投与から一晩絶食させた後、空腸パイエル板を摘出し、IFN- mRNA発現量をリアルタイムPCR法により測定した。マウス脾臓細胞および腹腔マクロファージ細胞を調製し、フローサイトメトリー法によりODNナノカプセルの取り込み量を解析し、IL-6 mRNA発現量をリアルタイムPCR法により測定した。さらに、アレルギー感作マウスに各種ODNナノカプセル(1 mg/Day, ODNナノカプセル1 mg中のODN量: 10 µg)を週5回、計4週間経口投与した。投与終

了後、マウスを安楽死させ、脾臓重量の測定、脾臓組織におけるIL-33 mRNA発現量をリアルタイムPCR法により測定した。また、脾臓細胞におけるIL-33⁺細胞の割合について、フローサイトメトリー法により解析した。

4. 研究成果

DNAナノカプセルの粒子サイズは走査型電子顕微鏡による解析で50-200nmであることが示された。

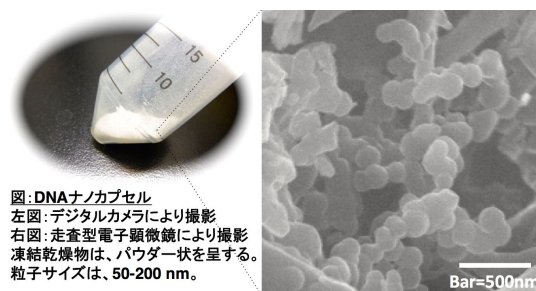


図: DNAナノカプセル
左図: デジタルカメラにより撮影
右図: 走査型電子顕微鏡により撮影
凍結乾燥物は、パウダー状を呈する。
粒子サイズは、50-200 nm。

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、オートクレーブ処理にも耐えることが明らかとなった。とくに、胃酸を想定した強酸による耐性試験では、人工胃液(pH 1.71)で37, 16時間処理した結果、完全に分解が進んだNaked ODN(カプセル化していないフリーのODN)と比較して、DNAナノカプセルではODNの存在を示すシグナルが検出された。このことは、DNAナノカプセルは胃酸による消化に耐え、十二指腸、小腸へとデリバリーされる可能性が高まったことを示している。しかし、カプセル化によりODNの免疫機能が失われているかどうか確認する必要が生じた。そこで、マウスから脾臓細胞を調製し、CpG-ODNとしてMsST, MsSTナノカプセル、コントロールとして免疫機能を有さない $10DN_{1612}$, ODN_{1612} ナノカプセルを用いて6時間培養後、リアルタイムPCR法を用いて炎症性サイトカインであるIL-6のmRNAレベルを測定した。その結果、 ODN_{1612} と比較して、Naked MsST、MsSTナノカプセルともにIL-6の発現増加が見られた。このことは、ODNが完全にカルシウム粒子によっ

て覆われていないことを示唆している。すなわち、DNAナノカプセルは、細胞培養液中において、粒子表面に存在するODNが、免疫細胞を直接刺激したともとの考察された。

DNAナノカプセルが細胞培養系における試験において、免疫機能性を有していたことから、経口投与による免疫活性に興味を持たれた。とくにDNAナノカプセルを経口摂取した場合における全身系の免疫応答に与える影響について調査した。我々は、*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 および IL-33 を強く誘導することを発見している。そこで、アレルギー感作マウスへの MsST ナノカプセルの投与試験を実施し、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 ナノカプセルは、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、パイエル板における IFN を誘導したことから、免疫機能性を維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 mRNA および IL-33⁺細胞の割合の上昇も見られた。すなわち、経口投与した MsST ナノカプセルは腸管粘膜を介して、全身免疫系における IL-33 産生を制御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 MsST ナノカプセルを用いた実験で、強力にマクロファージを活性化させることを見出し、今後は機能性 ODN の標的細胞へのデリバリーとナノ粒子材料の設計により、腸管マクロファージを標的とする高機能、高活性なワクチンアジュバントとして有用であると考えられる。

本研究は、予防医学の時代に先駆け、農学分野から健康維持・増進のための新規な機能性素材の開発を目指すものとして位置づけられる。本研究で確立された ODN の腸管経口デリバリーシステムは、将来、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、ODN 塩基配列の検討と、ナノ粒子材料の改良を進めることで、高機能 ODN カプセルが開発されることに期待したい。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Wang Y, Yamamoto Y, Shigemori S, Watanabe T, Oshiro K, Wang X, Wang P, Sato T, Yonekura S, Tanaka S, Kitazawa H, Shimosato T. Inhibitory/suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis in mice. *Molecular Therapy*. 23(2), 297-309, 2015.

DOI: 10.1038/mt.2014.239

Ito Y, Shigemori S, Sato T, Shimazu T, Hatano K, Otani H, Kitazawa H, Shimosato T. Class I/II hybrid inhibitory oligodeoxynucleotide exerts Th1 and Th2 double immunosuppression.

FEBS Open Bio. 3:41-45, 2013.

DOI: 10.1016/j.fob.2012.11.002

[学会発表] (計 13 件)

WANG YEQIN, 山本祥也, WANG PENGFEI, 大城和士, 重盛駿, 下里剛士, 乳酸菌オリゴDNAナノカプセルの経口投与による全身免疫系の活性化作用, 日本畜産学会第119回大会, 2015年3月29日, 宇都宮, 大会要旨集page238

山本祥也, 重盛駿, 大城和士, WANG YEQIN, WANG PENGFEI, 下里剛士, 乳酸菌オリゴDNAを用いたアナフィラキシーショックモデルマウスの作出, 日本畜産学会第119回大会, 2015年3月29日, 宇都宮, 大会要旨集page116

Yoshinari Yamamoto, Suguru Shigemori, Pengfei Wang, Yeqin Wang, Takeshi Shimosato, Strong immunostimulatory activity of oligodeoxynucleotide motifs from lactic acid bacteria, Proceedings of the 16th AAAP Congress, インドネシア, ジョグジャカルタ, 2014年11月12日, Vol. 2, page 854-857

WANG YEQIN, 重盛駿, 大谷元, 下里剛士, 乳酸菌由来オリゴ核酸のナノ粒子包摂体を用いた経口デリバリーシステムの構築, 日本畜産学会第118回大会, つくば, 2014年3月28日, 大会要旨集page175

山本祥也, WANG PENGFI, WANG YEQIN, 重盛駿, 下里剛士, 乳酸菌 CpG オリゴ核酸を用いたアナフィラキシーショックモデルマウスの作出, 平成 26 年度日本酪農科学シンポジウム, 2014年9月12日, 東京, Vol. 63(2) page105

WANG YEQIN, 山本祥也, WANG PENGFI, 重盛駿, 下里剛士, 乳酸菌オリゴ核酸ナノカプセルの標的細胞の同定, 平成 26 年度日本酪農科学シンポジウム, 2014年9月12日, 東京, Vol. 63(2) page111
Wang Xinyu, Wang Yeqin, 大谷元, 下里剛士, 乳酸菌オリゴ核酸ナノカプセルの特性解析, 平成 26 年度日本酪農科学シンポジウム, 2014年9月12日, 東京, Vol. 63(2) page105

Ito Yusuke, Shigemori Suguru, Otani Hajime, Kitazawa Haruki, Shimosato Takeshi, Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from yogurt starter bacteria *Streptococcus*

thermophilus, strongly induces interleukin 33., IDF World Dairy Summit 2013, 2013年10月29日, 横浜
WANG YEQIN, WANG XINYU, 重盛駿, 大谷元, 下里剛士, 乳酸菌オリゴ核酸の経口デリバリーシステムの構築, 平成 25 年度日本酪農科学シンポジウム, 岡山, 2013年9月13日, Vol. 62(2) page59
重盛駿, 伊藤雄亮, 大谷元, 下里剛士, 乳酸菌オリゴ核酸の誘導する免疫反応を抑制するDNAモチーフの探索, 日本畜産学会第117回大会, 2013年9月9日, 新潟, 大会要旨集page106

下里剛士, 王叶沁, 重盛駿, 大谷元, 乳酸菌由来CpGオリゴ核酸カプセルの経口投与によるアトピー性皮膚炎症状に及ぼす影響, 日本畜産学会第117回大会, 2013年9月9日, 新潟, 大会要旨集page106

下里剛士, 秋場菜央, 重盛駿, 大谷元, 乳酸菌由来オリゴ核酸のマイクロカプセル化とその特性解析日本畜産学会第116回大会, 2013年3月30日, 広島, 大会要旨集page216

伊藤雄亮, 重盛駿, 秋場菜央, 王叶沁, 大谷元, 下里剛士, 乳酸菌オリゴ核酸カプセルの特性解析, 平成 24 年度日本酪農科学シンポジウム, 2012年8月17日, 東京, Vol. 61(2) page182

〔その他〕
ホームページ等
<http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/shimolab/cn21/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下里 剛士 (SHIMOSATO, Takeshi)
信州大学・学術研究院農学系・准教授
研究者番号: 00467200

(2) 研究分担者

米倉 真一 (YONEKURA, Shinichi)
信州大学・学術研究院農学系・助教
研究者番号: 40443113