

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03907

研究課題名(和文) 乳酸菌オリゴDNAを有効成分とする経口用ナノカプセルを用いた免疫調節機構の解明

研究課題名(英文) Study on the immune mechanism using oral nanocapsule with oligodeoxynucleotides from lactic acid bacteria

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) 10,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、腸内に豊富に存在する乳酸菌がもたらす腸管免疫調節作用について、ゲノムDNAとその断片であるDNAモチーフに着目して明らかにすることを目的とした。そのために、有効な分子素材として知られているオリゴDNAを用いて、研究代表者が開発に成功した経口用オリゴDNA微粒子(ODNcap)を基盤に、アレルギー性喘息モデルにおけるODNcap添加飼料の自由摂取試験を実施した。その結果、腸内細菌叢の構造と組成の変化を引き起こし、肺炎症の軽減作用が示された。今後、効率的に腸管に送達されるODN微粒子構造を明らかにすることで、家畜飼料のほか、機能性食品や創薬への展開が可能となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to clarify the immunomodulatory effects of lactic acid bacteria on the gut, by focusing on genomic DNA and DNA motifs as its fragments. For this purpose, we used oral delivery system of oligodeoxynucleotide (ODN) and we developed a special feed (ODNcap-F) that contains acid-resistant and CpG-ODN-embedded particles. We conducted a free feeding of ODNcap-F on allergen-induced airway inflammation in mice. As a result, ODNcap-F attenuated allergic airway inflammation and caused a change of structure and composition of the gut microbiota. The ability to deliver lactic acid bacteria ODNs by the oral routes considerably broadens their potential therapeutic utility.

研究分野：乳酸菌科学

キーワード：乳酸菌 オリゴDNA 免疫調節

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳酸菌やビフィズス菌など、プロバイオティクスを利用した発酵乳に対する人々の関心は高い。近年、乳酸菌の健康機能に関わる研究は、新たな生体調節作用を有する菌株の探索に加えて、有効菌体成分の同定・分析が飛躍的に進んでいる。このような背景を踏まえ、本研究では、乳酸菌の菌体成分の中からとくにゲノムDNAやODNに注目し、腸管に到達した乳酸菌由来の核酸成分がもたらす免疫調節機構の解明を目指した。

### 2. 研究の目的

細菌のゲノムDNA塩基配列を情報基盤として、様々な機能性ODNが発表されている。またそういったODNを用いて様々な動物試験が行われ、多くの知見が積み上げられている。ODN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。一方で、研究代表者は、食べる乳酸菌DNAの実現を目指し、ODNをカルシウム性微粒子に包摂した「経口用DNA微粒子 (ODNcap)」の開発に成功した<sup>1)</sup>。ODNcapの開発により、これまでに例のない乳酸菌由来ODNを有効成分とする食品や家畜の飼料素材としての利用性が拓かれた<sup>2,3)</sup>。そこでさらなるエビデンスの取得を目指し、ODNcapを有効成分とするマウス飼料を用いた喘息モデルマウスにおける自由摂取試験を実施した。また、急性大腸炎モデルマウスに対する予防的投与による、炎症抑制効果について調査を行った。

### 3. 研究の方法

(1) ODNcapは、Wangら<sup>1)</sup>およびYamamotoら<sup>4)</sup>の報告を参考に、2種類のClass B CpG-ODN (MsST: ヨーグルトスターター乳酸菌 *Streptococcus thermophilus* 由来<sup>5,6)</sup>; ID35: ヒト由来プロバイオティック乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG<sup>7)</sup>) を用いて調製した。

(2) 喘息モデルマウスは、Wuらの報告<sup>8)</sup>を参考に作出した。すなわち、BALB/c(4週齢, メス)マウスを予備飼育後、OVAを水酸化アルミニウムゲルとともに、42、49、56日目に腹腔内投与し、63~69日目にネブライザーを用いてエアロゾル化した2% OVAを閉鎖環境下で30分間吸入させることで作出した。なお42日目(OVA感作前)と63日目(OVA感作後)に尾静脈から採血を行った。また、70日目にマウスを安楽死させ、血液と気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取した。マウス糞便DNAより16S V3-V4領域について次世代シーケンサーを用いて配列を決定し、QIIME2パイプライン(ver. 2019.1)を用いて解析を行った。なお、喘息モデルを用いた実験群として、以下の4群を設定した。

①NT群(感作無, Non-treated (NT) 群) / ②Ctrl-F群(感作有, control-feed 群) /

③Cap-F群(感作有, Capsule-feed (Cap) 群) / ④ODNcap-F群(感作有, ODNcap-feed 群)

実験期間としては、70日間の自由摂取期間を設け、ODNcap-F群では、ODNcap 1mg/マウス飼料1gで特別飼料を調製し、マウスの体重と摂食量を毎週一回測定した。

(3) 大腸炎モデルマウスは、Shigemoriらの報告<sup>9)</sup>を参考に作出した。すなわち、C57BL/6(7週齢, メス)マウスを12日間予備飼育した後、3%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を含む滅菌水を5日間自由飲水させることで急性大腸炎を誘導した。実験群は①NT群②DSS群、③Cap群、④Free-ID35群(粒子化無し)、⑤ID35cap群(粒子化有り)の5群を設定した。Free-ID35およびCap、ID35capは、急性大腸炎を誘導する2日前からそれぞれID35溶液50 µg/dayまたはCap、ID35capを各5 mg/dayで2日間、ゾンデ法により経口投与を行った。炎症症状の重篤度は、毎日のDisease Activity Index (DAI)スコア、体重変化率、大腸の長さ、ヘマトキシリン・エオジン染色による病理組織学的解析を実施した。

#### 4. 研究成果

(1) 抗原（アレルゲン）特異的 IgE の存在は、アレルギーの重大な危険因子であると考えられ、診断マーカーとしても役立つとされる。今回の ODNcap-F 群では、Ctrl-F 群と比較して、IgE および OVA 特異的 IgE 量が有意に減少した。すなわち、喘息モデルマウスにおいて、ODNcap-F の自由摂取により、血清中におけるアレルギーマーカーとして IgE の指標が有意に減少した（図 1）。IgE の存在は、そのアレルゲンに対応するアレルギーの重大な危険因子であることから、アレルギーモデルマウスが ODNcap 特別配合飼料を摂取することで、アレルギー関連マーカーとして IgE が減少することが実証された。

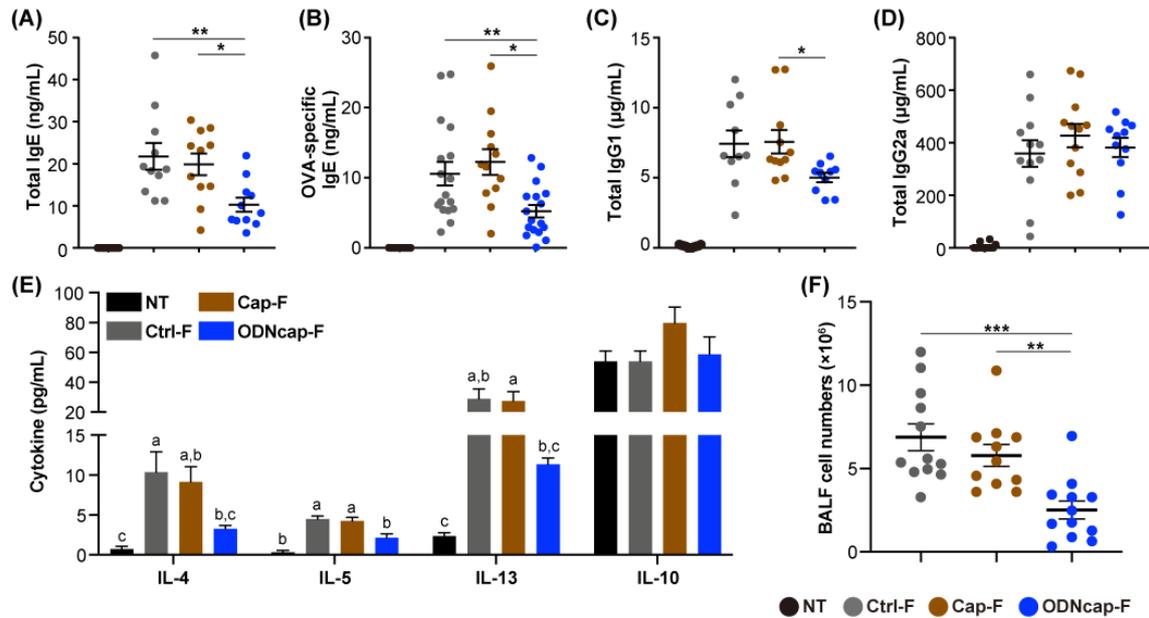


図1. ODNcap-Fの自由摂取が気管支肺胞洗浄液（BALF, Day 70, N = 10-12）中のOVA誘発性炎症に及ぼす影響。(A) 総IgE, (B) OVA特異的IgE, (C) 総IgG<sub>1</sub>, (D) 総IgG<sub>2a</sub>, および各種サイトカインのレベルをELISA法により測定した (E)。(F) 全BALF細胞をトリパンブルー染色により計数した。\*\*\*, P < 0.001; \*\*, P < 0.01; \*, P < 0.05 by one-way analysis of variance and Tukey's test.

(2) 糞便サンプルにおける16Sメタゲノム解析の結果、ODNcap自由摂取群において、バクテロイデス門/フィルミクテス門の割合が対照群と比較して有意に減少した。加えて、アレルギー性炎症に関与する腸内細菌を同定する目的から、細菌群の比率と血清および肺胞洗浄液中の抗原特異的IgE量について相関性を分析した結果、28種の細菌群を発見した。食餌に含まれる乳酸菌ODN微粒子が、自由摂取により腸管局所に送達され、喘息に伴う肺炎の制御に寄与する腸内菌叢の変化をもたらした作用機序については、新たな計画として調査を継続する。

(3) マウス体重の変化率の結果より、DSS 群、Cap 群、Free-ID35 群と比較して、ID35cap 群において体重の減少率が抑制された。DAI スコアにおいても、DSS 群、Cap 群、Free-ID35 群と比較して、ID35cap 群において有意な減少が認められた。炎症状態における組織損傷の指標である大腸の長さの結果より、DSS 群、Cap 群、Free-ID35 群と比較して ID35cap 群において、大腸の短縮は著しく軽減した（図 2, 図 3）。また、病理組織学的解析からも陰窩構造の破壊などが軽減した。本研究において、ID35cap の炎症誘導前投与は、DSS 群および Free-ID35 群と比較し、DSS に誘導される体重減少率、DAI スコアの増加、大腸の短縮および病理

学的病変を顕著に軽減した。また Cap 群と比較して DAI スコアの増加、大腸の短縮および病理学的病変の軽減が観察された。すなわち ID35cap の経口的にプライミングすることで、DSS 誘導急性大腸炎を軽減することが明らかになった。また作用機序の一端として、炎症性サイトカインの発現量を制御することで、症状を軽減することが示唆された<sup>6)</sup>。

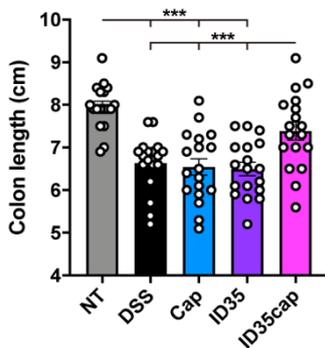


図2. ID35含有粒子 (ID35caps) を用いた経口プライミングが、DSSによって誘発された大腸の組織傷害に及ぼす影響<sup>7)</sup>。10日目に動物を安楽死させ、大腸の長さを測定してDSS誘発組織傷害を評価した。グラフの棒とエラーバーは平均値±平均の標準誤差 (n=18)、丸は個々の測定値を示す。\*\*\*, P < 0.001 by one-way analysis of variance and post hoc Tukey's test

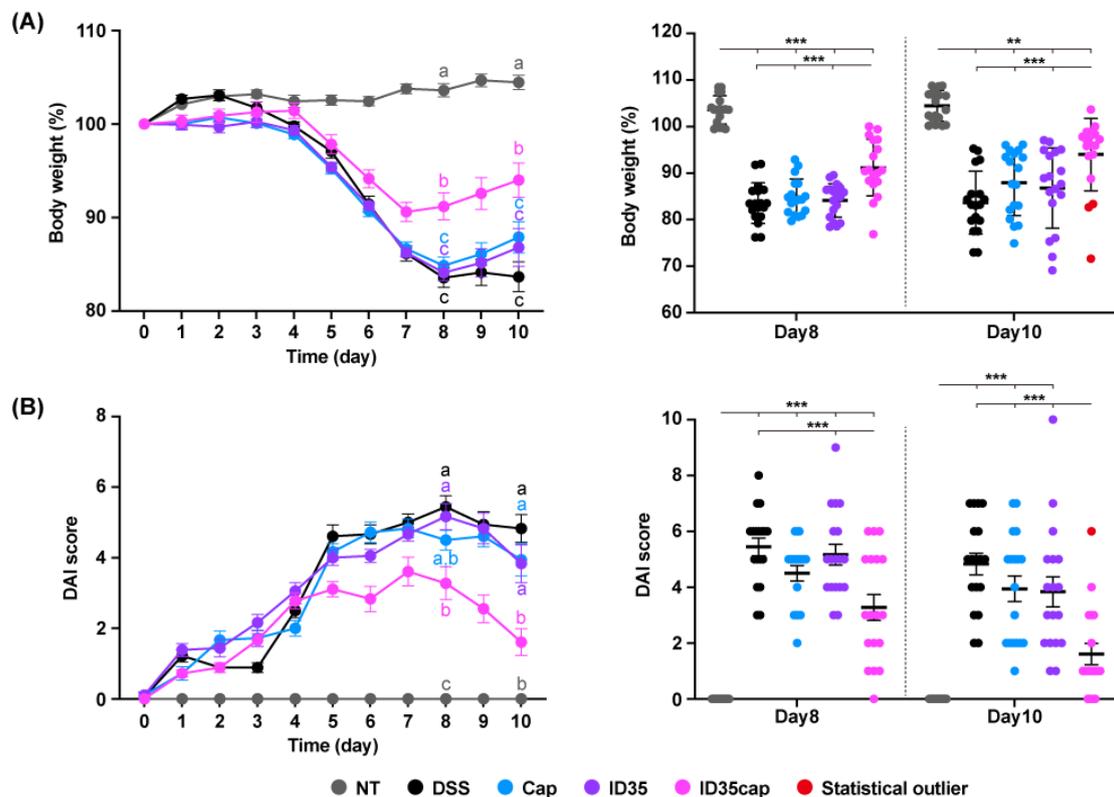


図3. ID35含有粒子 (ID35caps) による経口プライミングが、DSS誘発急性大腸炎の症状に及ぼす影響<sup>7)</sup>。(A) 体重変化率 (B) 疾患活動指数 (DAI) スコアをDay0からDay10まで1日1回モニタリングした。8日目と10日目のデータを用いて統計解析を行い、全グループ間の差の有意性を判定した。a, b, c表記は有意差を表す (P < 0.01 by one-way analysis of variance and Tukey's test)。\*\*\*, P < 0.001; \*\*, P < 0.01 by one-way analysis of variance with post hoc Tukey's test。データは、各パネルの左グループの平均値±標準誤差 (n = 18) で示す。各パネルの右グラフの丸印は、8日目と10日目の各測定値を示す。

(4) 本研究は、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。乳酸菌ODNの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塩基配列の検討と微粒子材料の改良を進め、経口用ODN微粒子がもたらす腸管上皮を起点とする免疫調節作用の解明研究を継続する。

<引用文献>

- 1) Wang *et al.*, Inhibitory/Suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis in mice, *Molecular Therapy*, 23(2), 297-309, 2015.
- 2) Klinman *et al.*, The use of nanoparticles to delivery immunomodulatory oligonucleotides, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(4), 631-637, 2016.
- 3) 下里剛士, 乳酸菌オリゴDNAを腸まで届ける経口用ナノカプセルの開発, JATAFFジャーナル, vol. 6, No. 3, pages 27-33, 2018.
- 4) Yamamoto *et al.*, A glucose carbonate apatite complex exhibits in vitro and in vivo anti-tumour effects, *Scientific Reports*, 5, 7742, 2015.
- 5) Shimosato *et al.*, Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus* lac Z. *Animal Science Journal*, 80, 597-604, 2009.
- 6) Shimosato *et al.*, CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 81-86, 2010.
- 7) Shigemori *et al.*, Oral priming with oligodeoxynucleotide particles from *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates symptoms of dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice, *Animal Science Journal*, 91(1):e13468, 2020.
- 8) Wu *et al.*, Immunomodulatory effects of IL-12 secreted by *Lactococcus lactis* on Th1/Th2 balance in ovalbumin (OVA)-induced asthma model mice. *International Immunopharmacology*, 6(4):610-615, 2006.
- 9) Shigemori *et al.*, Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice, *Microbial Cell Factories*, 14(1), 189, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nigar, S. & Shimosato, T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Cooperation of Oligodeoxynucleotides and Synthetic Molecules as Enhanced Immune Modulators	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Nutrition	6. 最初と最後の頁 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnut.2019.00140	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takeshi Shimosato, Suguru Shigemori, Tasuku Ogita
2. 発表標題 Oral delivery of probiotic ODN particles modulate the host immune system
3. 学会等名 TASP2019[The 2nd International Conference on Tropical Animal Science and Production]（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 重盛駿, 萩田佑, 下里剛士
2. 発表標題 乳酸菌オリゴDNAを有効成分とする経口用微粒子がもたらす急性大腸炎の予防効果
3. 学会等名 日本畜産学会第126回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下里剛士
2. 発表標題 イムノバイオティクス由来核酸成分を用いた経口用微粒子の創製と機能性食品・飼料素材への展開
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下里剛士
2. 発表標題 敗血症の重症化を抑えるオリゴDNAのプライミング効果
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第186回例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okajima Takuma, Yamamoto Yoshinari, Ogita Tasuku, Shimosato Takeshi
2. 発表標題 Free-feeding of DNA nanocapsules containing CpG oligodeoxynucleotide from Streptococcus thermophilus
3. 学会等名 IDF World Dairy Summit 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>信州大学農学部分子生命工学研究室  <a href="http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/lab/shimolab/">http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/agriculture/lab/shimolab/</a>          信州大学バイオメディカル研究所生体分子イノベーション部門  <a href="https://www.shinshu-u.ac.jp/institution/ibs/department/igscm.html">https://www.shinshu-u.ac.jp/institution/ibs/department/igscm.html</a></p>
---

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	荻田 佑  (Ogita Tasuku)  (50738010)	信州大学・学術研究院農学系・助教    (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	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)	
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	渡邊 敬文  (Watanabe Takafumi)  (50598216)	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