

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780238  
 研究課題名（和文）ナノ粒子を用いた抗アレルギー-DNA ワクチンの腸管粘膜系における免疫応答機構の解明  
 研究課題名（英文）Study on the anti-allergic DNA vaccines with nanoparticle in gut mucosal immune system  
 研究代表者  
 下里 剛士（SHIMOSATO TAKESHI）  
 信州大学・ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点・助教  
 研究者番号：00467200

研究成果の概要（和文）：本研究では各種食物アレルギー（鶏卵、ソバ、牛乳）の原因アレルゲン分子の遺伝子情報に基づき、哺乳細胞発現ベクターを用いた DNA ワクチンを構築した。また、牛乳アレルギーモデルマウスを作出し、牛乳アレルギー-DNA ワクチンを処理することで、抗アレルギー作用を誘導することに成功した。さらに、新たな知見として食物アレルギー-DNA ワクチンによる炎症抑制効果が示唆され、DNA ワクチン開発における新たな展開が期待された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed the DNA vaccine based on the genetic information of the food allergen molecules (egg, Sova, and milk). We demonstrated that the DNA vaccine induced anti-allergic activation on the milk allergic model mice. In addition, we found that DNA vaccine induced the anti-inflammatory effects in the mice splenocytes. Exploiting this property may also prove useful in the design and production of new physiologically functional vaccine.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：DNA ワクチン、食物アレルギー、食品免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では若年層を中心に、国民のおよそ 1/3 がなんらかのアレルギーを発症しており、大きな社会問題に発展している。そこで、我が国における急務な課題として、今まさにア

レルギー予防・改善に関する研究が必要であると考えた。

強力なプロモーターとその下流にコードされた抗原タンパク遺伝子を持つ pDNA を利用した DNA ワクチンは、感染症、アレルギー

予防などへの応用が期待され、生産コストの面からも優れた次世代ワクチンとして注目されている。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るようになった。しかし、ワクチン分子の、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細胞まで運搬されるデリバリーシステムの構築が今後の課題となっていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、食物アレルギー抗原をコードしたプラスミド DNA (pDNA) を用いた DNA ワクチンの腸管免疫細胞における作用機序を解明し、また、ワクチンキャリアーとしてナノ粒子に注目し、免疫刺激性 DNA をアジュバントとする DNA ワクチンの新たなデリバリーシステムの構築を目的とする。そこで以下の3点に注目し、研究を行った。

(1) 食品アレルギーの原因物質として卵白オボアルブミン (OVA)、 $\beta$ ラクトグロブリンおよびソバアレルギー遺伝子をクローニングする。

(2) pDNA 単体での免疫刺激性とアジュバント効果について TLR9 を介する免疫応答に注目し分子生物学的手法により解析する。また、細胞内において食物アレルギー抗原が発現誘導される事によるワクチン効果についても同様に解析する。

(3) pDNA を腸管免疫細胞に運搬するデリバリーシステムの構築を行う。とくにカチオン性脂質などのナノ粒子と pDNA 複合体の構築を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子バンクからの遺伝子情報に基づき、牛乳アレルギー ( $\beta$ ラクトグロブリン  $\beta$ -Lac)、ソバアレルギー 16kDa 分子 (BW16)、

および鶏卵アレルギー (卵白アルブミン (OVA)) 遺伝子を化学合成、またはクローニングし、発現ベクターへのサブクローニングを行った。また、DNA シーケンスにより遺伝子配列の確認を行った。

(2) マウスより調製した脾臓細胞および腸管粘膜系のパイエル板細胞に対して p $\beta$ -Lac および空ベクターである pDNA で処理した。また、牛乳アレルギーモデルマウスから脾臓細胞を調製し、DNA ワクチンで処理した。それぞれについて免疫関連遺伝子発現を定量的 PCR 法により解析した。

## 4. 研究成果

哺乳類発現用ベクター pcDNA6/His-A のマルチクローニングサイト (1020-1035) へ  $\beta$ -Lac、BW16 および OVA 遺伝子を組み込み、DNA ワクチンを構築した。シーケンス解析により変異・欠損のないことを確認した。

とくに本研究では、 $\beta$ -Lac を水酸化アルミニウムアジュバントとともにマウス腹腔内に感作することで、 $\beta$ -Lac アレルギーマウスを作出し、p $\beta$ -Lac の抗アレルギー効果を検討した。 $\beta$ ラクトグロブリンで感作しなかったマウス由来脾臓細胞では、p $\beta$ -Lac 処理により IL-1 $\beta$ 、IFN $\alpha$ 、IFN $\gamma$  および IL-33 の発現が誘導された。 $\beta$ ラクトグロブリンで感作したマウスから調製した脾臓細胞を用いた実験系では、p $\beta$ -Lac 処理により IL-6 および IFN $\gamma$  の発現が強く誘導された。IL-12 の発現は pDNA と同程度誘導された。pDNA と同様に、p $\beta$ -Lac により IL-13、IL-17 および IL-33 の発現が抑制された。本研究において、感作したマウス脾臓細胞において IFN $\gamma$  が強く誘導されると同時に IL-13、IL-17 および IL-33 発現が抑制され、Th2 系に偏ったアレルギーの状態を改善する可能性が示唆された。また、新たな知見として本研究により

pDNAによるIL-17の抑制効果が示されたことから、プラスミドDNAが、Th17関連の炎症反応の抑制効果を有している可能性が示唆され、DNAワクチン開発における新たな展開が期待された。

#### 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7件)

1. Shimosato T, Fujimoto M, Tohno M, Takashi Sato, Tateo M, Otani H, Kitazawa H, CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. Mar; 394, 81-86.

2. Nagasawa C, Nishimura-Uemura J, Tohno M, Shimosato T, Kawai Y, Ikegami S, Oda M, Saito T, Kitazawa H, Oral Administration of Phosphorylated Dextran Regulates Immune Response in Ovalbumin-Immunized Mice. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 23(1) 106-115, 2010.

3. Sekimura Y, Nao Onodera, Minami Banno, Hata I, Hamano K, Shimosato T, Hajime O, Preparation of goat milk anti-Saccharomyces cerevisiae immunoglobulin G (IgG)-rich fraction and immunological functions of mice orally administered a mixture of the antigen and its specific IgG-rich fraction. *Milk Science*. 58(3):119-128, 2009

4. Shimosato T, Tohno M, Sato T, Nishiura J, Kawai Y, Saito T, Kitazawa H, Identification of a potent

immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus lacZ*, *Animal Science Journal*. 80, 597-604, 2009.

5. Shimazu T, Tohno M, Katoh S, Shimosato T, Aso H, Kawai Y, Saito T, Kitazawa H, Utilization of the porcine system to study lymphotoxin- $\beta$  regulation in intestinal lymphoid tissue, *Biochemical Genetics*. 2009 Feb;47(1-2):126-36.

6. Sato T, Shimosato T, Alvord WG, Klinman DM. Suppressible oligodeoxynucleotides inhibit silica-induced pulmonary inflammation. *Journal of Immunology* 2008 Jun 1;180(11):7648-54.

7. Iliev ID, Tohno M, Kurosaki D, Shimosato T, He F, Hosoda M, Saito T. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTCGTTT motif from *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses OVA-specific IgE production in mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 2008 Apr;67(4):370-6.

[学会発表] (計8件)

1. 下里剛士, 藤本恵、遠野雅徳、大谷元、北澤春樹、*Streptococcus thermophilus* 由来DNAによる抗炎症免疫応答の誘導、日本畜産学会第112回大会、2010年3月28-30日

2. 須賀正喜、荻田佑、下里剛士、大谷元、ビール酵母とその牛乳IgGの急性毒性に関する検討、日本畜産学会第112回大会、2010年3月28-30日

3. 下里剛士、舘尾万里子、遠野雅徳、大谷元、

者育成拠点・助教  
研究者番号：00467200

北澤春樹、*Streptococcus thermophilus* 由来 DNA 刺激によるサイトカイン遺伝子の発現特性、日本畜産学会第 111 回大会、2009 年 9 月 27 日

4. 下里剛士、藤本恵、大谷元、北澤春樹、 $\beta$  ラクトグロブリン遺伝子をコードした DNA ワクチンの構築とその機能解析、平成 21 年度日本酪農科学シンポジウム、2009 年 8 月 31 日

5. 島津朋之、遠野雅徳、下里剛士、麻生 久、川井泰、齋藤忠夫、北澤春樹、ブタ腸管上皮細胞におけるイムノバイオティクスの抗炎症機構、日本畜産学会第 110 回大会、2009 年 3 月 27 日

6. 遠野雅徳、島津朋之、下里剛士、麻生久、齋藤忠夫、北澤春樹、ブタ NOD1 および 2 を介する可溶性ペプチドグリカンフラグメントの免疫刺激活性とそのリガンド構造特性、日本畜産学会第 110 回大会、2009 年 3 月 27 日

7. 下里剛士、遠野雅徳、西村順子、川井泰、齋藤忠夫、北澤春樹、*Streptococcus thermophilus lacZ* からの強免疫刺激性 DNA モチーフの発見、日本畜産学会第 110 回大会、2009 年 3 月 27 日

8. 下里剛士、遠野雅徳、川井泰、齋藤忠夫、北澤春樹、プロバイオティック乳酸菌由来 AT オリゴヌクレオチドの 2 次構造特性と TLR9 結合領域の解明、日本食品免疫学会第 4 回学術集会、2008 年 5 月 13 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

下里 剛士 (SHIMOSATO TAKESHI)  
信州大学・ファイバーナノテク国際若手研究