

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14997

研究課題名(和文) Class A CpGオリゴDNAナノカプセルを用いた経口粘膜アジュバントの開発

研究課題名(英文) Development of oral mucosal adjuvant using Class A CpG ODN-nanocapsule

研究代表者

山本 祥也 (Yamamoto, Yoshinari)

広島大学・統合生命科学研究所(生)・助教

研究者番号：90825845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：感染症に対する経口粘膜アジュバントを創製するために、免疫グロブリンA(IgA)産生を増強する免疫機能性核酸(Class A CpG ODN)と胃酸や消化酵素からCpG ODNを保護するDNAナノカプセルを組み合わせたCpG-A1585capをマウスに経口投与し、アジュバント活性の検証と安全性試験を実施した。卵白アルブミン(OVA)経口感作マウスモデルにおいて、CpG-A1585capとOVAの共投与による糞便の分泌型IgA量の増加が認められたが、抗原特異的IgA量の増加は認められなかった。また、CpG-A1585capによる個体外観や体重、生化学的な変化は認められず、安全性が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症の制御には、粘膜面からの病原体の侵入を阻止することが重要な戦略として考えられている。代表的な経口粘膜アジュバントとしてコレラ毒素や大腸菌易熱生毒素が知られているが、その毒性による顔面神経麻痺のような副作用発現が臨床応用を妨げており、安全かつ効果的な経口粘膜アジュバントは実現できていない。その中で本研究は、CpG-A1585capによる腸管免疫増強作用を明らかにし、さらに安全性も実証した。経口粘膜アジュバントとして抗原特異的免疫応答にまで働きかける仕組みを検証するなどの課題は残るが、本研究成果によりCpG-A1585capを用いた新たな腸管免疫増強戦略を提案できるため、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：To develop an oral mucosal adjuvant against infection, CpG-A1585cap, a combination of an immunofunctional nucleic acid (Class A CpG ODN) that enhances immunoglobulin A (IgA) production and a DNA nanocapsule that protects the CpG ODN from stomach acid and digestive enzymes, was orally administered to mice. The adjuvant activity was verified and safety studies were conducted. In a mouse model of oral sensitization with egg white albumin (OVA), coadministration of CpG-A1585cap and OVA increased the amount of secretory IgA in the feces, but not antigen-specific IgA. In addition, no changes in individual appearance, body weight, or biochemistry were observed with CpG-A1585cap, confirming its safety.

研究分野：動物生命科学

キーワード：Class A CpGオリゴDNA DNanocap 経口粘膜アジュバント 免疫グロブリンA マウス

1. 研究開始当初の背景

CpG オリゴ DNA (CpG ODN) は、多彩な免疫機能性を発揮する細菌ゲノム DNA 配列由来の核酸素材である。これまでに CpG ODN を注射や鼻腔への滴下により投与することで、感染症やがんの予防・治療に対するアジュバント (免疫増強因子) として用いる研究が盛んに行われてきた (Scheiermann & Klinman, *Vaccine*, 2014)。一方、CpG ODN は胃酸や消化酵素により分解されると免疫機能性が失活されるため、全身面だけでなく粘膜面の防御免疫も誘導可能な経口粘膜アジュバントとしての実用例はない。

これまでの研究では、CpG ODN をカルシウム性ナノ粒子で包摂することで、CpG ODN の弱点である胃酸や消化酵素への耐性を付与した DNA ナノカプセル (DNanocap) の開発に成功した (Wang *et al.*, *Mol Ther.*, 2015)。また、Class A に属する CpG ODN が血液凝固や炎症を防ぐ血小板活性化因子分解酵素 (PAF-AH) の誘導を介して敗血症の重症化を予防すること (Yamamoto *et al.*, *Front Immunol.*, 2017) やリポ多糖誘導性の免疫グロブリン A (IgA) 産生を強力に増強することを見出している。そこで本研究では、感染症の制御に関して非常にユニークな免疫学的特性を有する Class A CpG ODN (CpG-A1585) を DNanocap に包摂した CpG-A1585cap を作成し、経口粘膜アジュバントとしての活性とその作用機構を検証した。また、代表的な経口粘膜アジュバントとして知られるコレラ毒素や大腸菌易熱性毒素には副作用があることから、本研究では CpG-A1585cap の安全性試験も実施した。

2. 研究の目的

マウスへと経口投与された CpG-A1585cap のアジュバント活性からその作用機序を解明することを目的とした。また、CpG-A1585cap の経口投与に伴う急性毒性を検証し、安全性を評価した。これらの試験により、CpG-A1585cap を用いた感染症に対する経口粘膜アジュバントの創製を目指した。

3. 研究の方法

(1) OVA 経口感作モデルを用いた CpG-A1585 のアジュバント活性の検証と機構の解明

5mg CpG-A1585cap と 1mg 卵白アルブミン (OVA) を含む生理食塩水 (PBS) を週 1 回、計 3 回マウス (6 週齢、雌性) に経口投与した。陰性対照には OVA と共に同量のカプセル単独 (cap) と PBS をそれぞれ与えた。また、OVA と共にカプセル化していない 50 μ g の CpG-A1585 を投与する群も設定した。35 日目まで糞便を回収し、OVA 特異的および分泌型 IgA 量を ELISA 法で定量した。また、36 日目にマウスを解剖後、回収した血清における OVA 特異的および総 IgG 量を定量した。

加えて、OVA と共に PBS、cap、CpG-A1585cap を経口投与する群を用意し、経口投与の 7、14 および 21 日目でマウスを解剖した。各種腸管洗浄液および盲腸内容物を採取し、分泌型 IgA 量を ELISA 法で定量した。同時に、採取したパイエル板、回腸および盲腸から総 RNA を抽出し、cDNA を合成後、IgA 誘導関連免疫因子の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。

(2) CpG-A1585cap の体内動態と分布解析

6FAM 標識した CpG-A1585 を包摂した DNanocap (6FAMCpG-A1585cap) を 1mg 含む PBS をマウスへと経口投与し、1、3 および 7 日後にマウスを解剖した。陰性対照には cap を用いた。腸管パイエル板、腸間膜リンパ節、肝臓、脾臓、腎臓の凍結固定標本を作成し、蛍光顕微鏡を用いて各臓器・組織における 6FAM の有無を観察した。

(3) CpG-A1585cap の安全性評価

OECD テストガイドラインに基づく急性毒性試験を実施した。マウス (8 週齢、雌性) に PBS、cap および CpG-A1585cap を 2,000mg/kg (1,000mg/kg \times 2 回、2 時間間隔) で経口投与した。投与から 14 日目までの間、1 日 1 回マウスの個体外観の観察、体重変動・飲水量および摂取飼料量を調査した。また、14 日後に採血し、タンパク質量、アルブミン/グロブリン比、クレアチニン量、カルシウム量を分析した。さらに、肺、心臓、胸腺、肝臓、脾臓および腎臓における重量を測定後、HE 染色による傷害の有無を観察した。

4. 研究成果

(1) OVA 経口感作モデルを用いた CpG-A1585 のアジュバント活性の検証と機構の解明

PBS あるいは同量の cap を与えたマウスと比較して、CpG-A1585cap を与えたマウスにおける糞便 OVA 特異的 IgA 量および血清 OVA 特異的 IgG 量の増加は認められず、抗原特異的免疫応答に対するアジュバント活性は認められなかった。一方で、CpG-A1585cap を与えたマウスにおける糞便中の分泌型 IgA 量は、経口投与の 14 日目に有意に増加し、35 日目まで効果が持続した。CpG-A1585 を与えたマウスでは、21 日目で一過的に分泌型 IgA 量が増加したが、その後は元に戻り、CpG-A1585cap と同様の効果は認められなかった。

加えて、この機構を解析したところ、7 および 14 日目に解剖した CpG-A1585cap 摂取マウスの盲腸において、分泌型 IgA 量の増加が認められた。加えて、各種腸管組織における分泌型 IgA 関連因子の遺伝子発現量をリアルタイム定量 PCR 法で解析したが、上述した結果との相関は認められなかった。

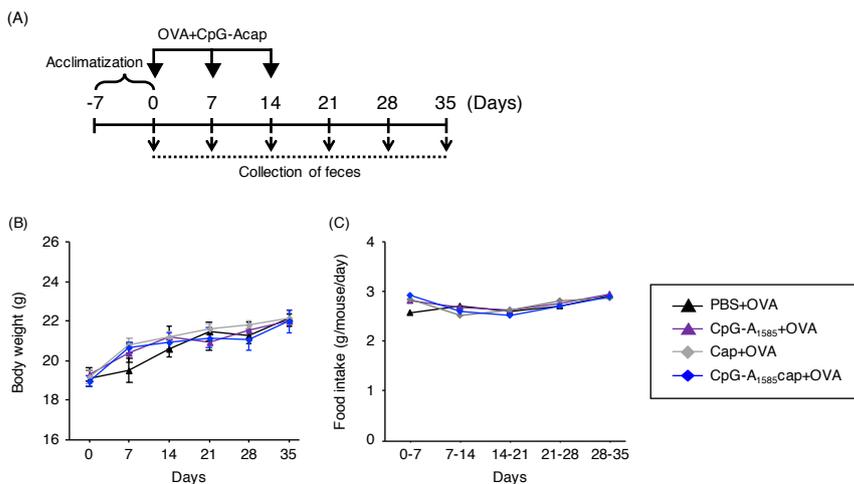


図 1. OVA 経口感作モデルへの CpG-A1585cap の経口投与試験における (A) 試験スケジュール、(B) 体重変化および(C) 摂食量の変化

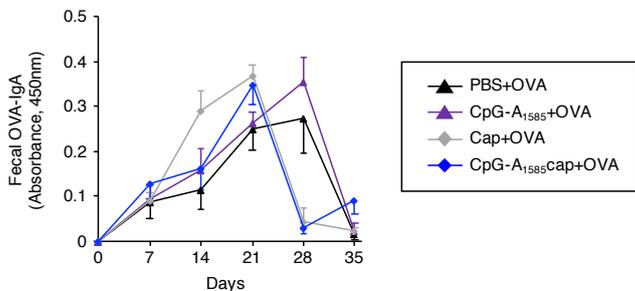


図 2. OVA 経口感作モデルへの CpG-A1585cap の経口投与試験における糞便中の OVA 特異的 IgA 量の変化

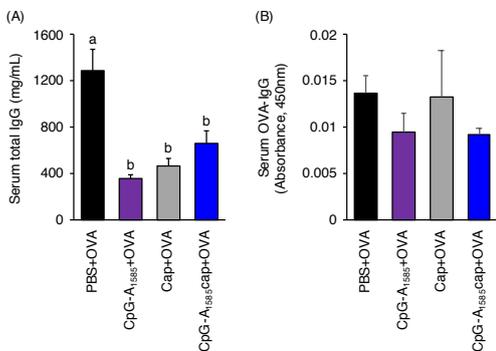


図 3. OVA 経口感作モデルへの CpG-A1585cap の経口投与試験における糞便中の(A) OVA 特異的 IgG 量、および(B) 総 IgG 量の変化

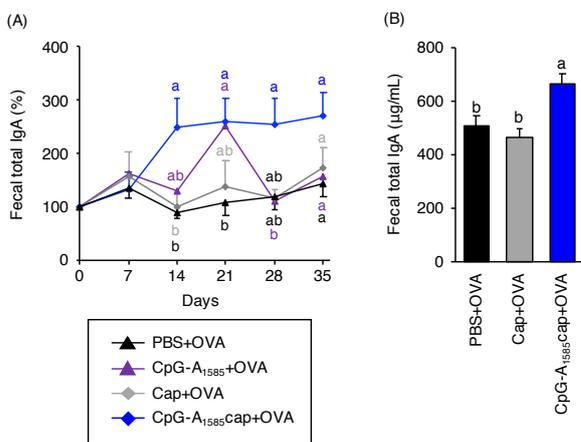


図 4. OVA 経口感作モデルへの CpG-A1585cap の経口投与試験における糞便中の(A) 分泌型 IgA 量の変化、および(B) 35 日目における分泌型 IgA 量の比較

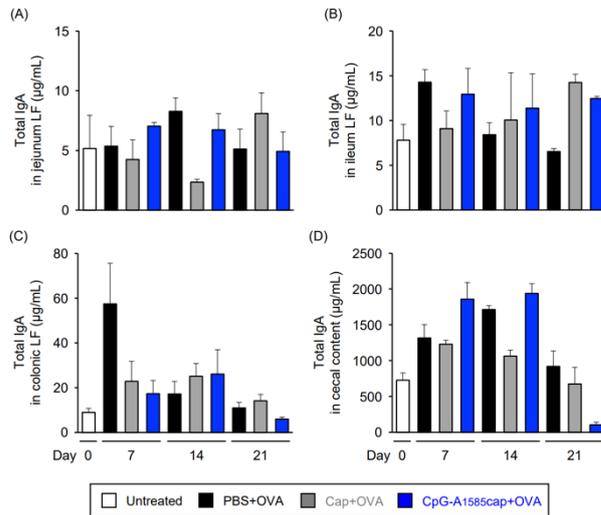


図 5. OVA 経口感作モデルへの CpG-A1585cap の経口投与試験における腸管洗浄液 ((A) 空腸、(B) 回腸、(C) 大腸) および(D) 盲腸内容物中の分泌型 IgA 量の変化

Peyer's patch

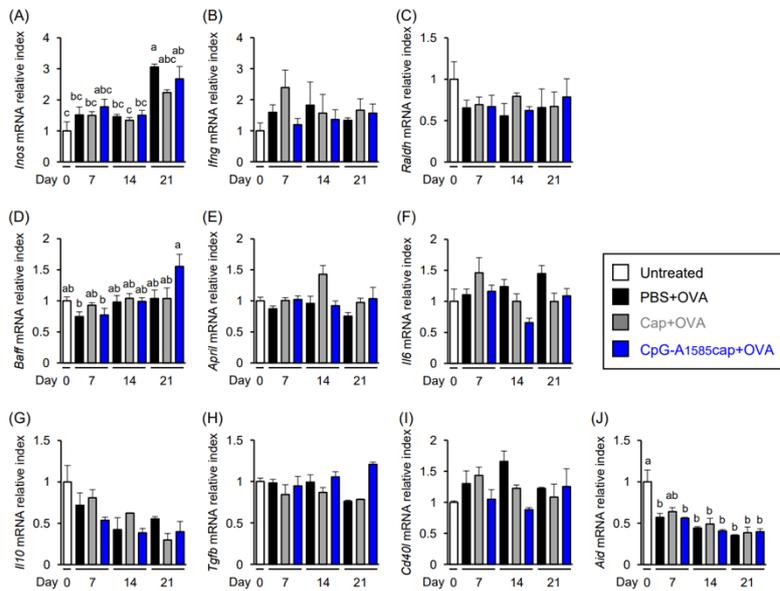


図 6. OVA 経口感作モデルへの CpG-A1585cap の経口投与試験におけるパイエル板の IgA 産生関連因子遺伝子発現量の変化

Ileum

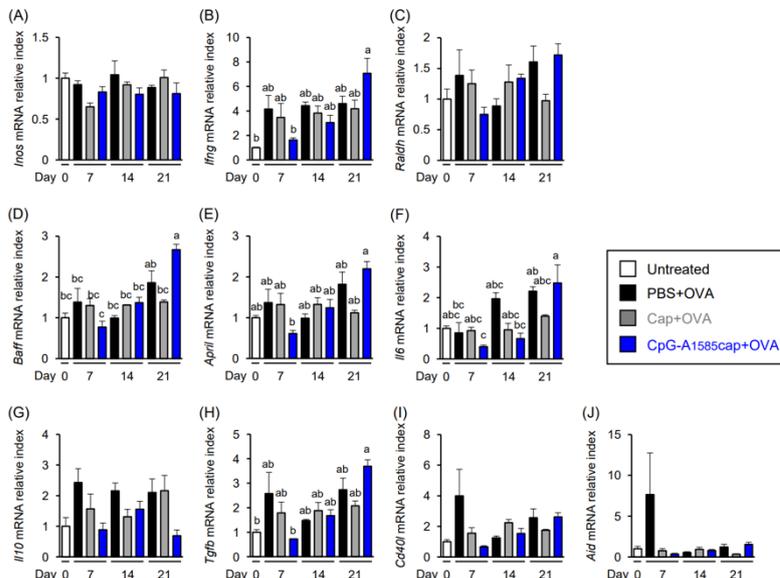


図 7. OVA 経口感作モデルへの CpG-A1585cap の経口投与試験における回腸の IgA 産生関連因子遺伝子発現量の変化

Cecum

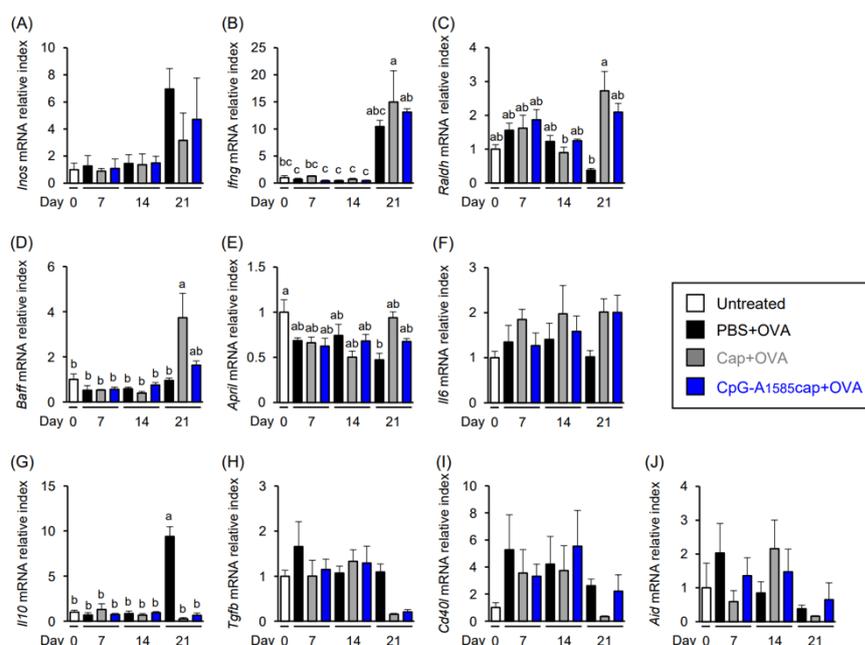


図 8. OVA 経口感作モデルへの CpG-A1585cap の経口投与試験における盲腸の IgA 産生関連因子遺伝子発現量の変化

(2) CpG-A1585cap の体内動態と分布解析

作成した臓器・組織標本において 6FAM の有無を観察したが、バックグラウンドが高く 6FAM 標識 CpG-A1585 との見分けがつかなかったため、期待した成果を得ることができなかった。

(3) CpG-A1585cap の安全性評価

CpG-Acap の急性毒性の検証を実施ところ、個体外観、体重・飲水量・飼料量、血液の生化学的分析項目、各組織における傷害の有無に変化は見られなかった。

研究期間全体を通じて、CpG-A1585cap には腸管における抗原特異的な免疫応答のアジュバント活性は認められなかったが、OVA 抗原との共投与により分泌型 IgA 産生が増加し、かつ最終投与以降も持続することがわかった。また、急性毒性試験では、CpG-A1585cap による安全性が認められた。そのため、CpG-A1585cap は腸管免疫を増強する新たな機能性素材として活用できることが示唆された。今後は、分泌型 IgA 産生を誘導する CpG-A1585cap を用いて感染症等の疾患予防効果を検証すると共に、引き続き、抗原特異的な免疫応答を誘導するのに必要な投与期間や投与量など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2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Ichikawa Kennosuke, Matsuzaki Mei, Ezaki Ryo, Horiuchi Hiroyuki, Yamamoto Yoshinari | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Screening of Optimal CpG-Oligodeoxynucleotide for Anti-Inflammatory Responses in the Avian Macrophage Cell Line HD11 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Poultry Science | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.2023002 | 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 Yamaguchi Tomofumi, Yasui Kenta, Fujii Sotaro, Ichikawa Kennosuke, Suzuki Takuya, Sambongi Yoshihiro, Yamamoto Yoshinari | 4. 巻 134 |
| 2. 論文標題 Lentilactobacillus hilgardii H-50 strongly inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mouse splenocytes via its specific surface layer proteins | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jambio/lxad021 | 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 該当する |

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|