

<令和元年度助成>

腸管送達性に優れた食べる乳酸菌オリゴ DNA の創製研究

下里 剛士

(信州大学 バイオメディカル研究所)

細菌由来のゲノム DNA が免疫増強作用を有するという発見 (*Nature*, 374, 546-549, 1995) 以降、多彩な免疫機能を有するオリゴ DNA (合成一本鎖 DNA) が次々と見出されてきた。とくに申請者は、乳酸菌やビフィズス菌のゲノム DNA から、免疫調節作用を有するオリゴ DNA を多数発見している。様々なオリゴ DNA (合成 DNA 短鎖) が次々と発見されている一方で、その簡便かつ経済的な投与方法は確立されていない。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ほとんど無い。2015 年、筆者らは、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 (*Mol Ther*, 23, 297-309, 2015)。さらに注射投与量の 1/10 量に相当するオリゴ DNA をカプセル化し、繰り返し腸管に送達させることで、全身免疫系を制御できることを初めて示した。しかし、ODNcap 粒子径は 10 nm ~ 5 μm と大きさ、形態にバラツキがあり、腸管送達性と取り込み効率が最適化されていない。すなわち、腸管局所において効果を発揮する粒径サイズで ODNcap を均一化できれば、乳酸菌オリゴ DNA の合成にかかる大幅なコスト削減が達成され、機能性食品素材やサプリメントの開発に向けた展開が加速すると考えた。そこで本研究では、オリゴ DNA のコーティング基剤としてアルギン酸ナトリウム (Na) を採用し、高機能微粒子作成装置を用いて均一な形態と粒子径を有する ODNcap を得ることを目指した。また同微粒子を用いて、大腸炎モデ

ルマウスにおける投与試験を実施した。

材料と方法

- オリゴ DNA : 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 (MsST) は、株式会社ジーンデザイン (Osaka, Japan) に合成を委託した。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、ID35 は、株式会社ジーンデザイン (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 μm のマイクロフィルターに通して滅菌した。
- FDD 技術を応用した ODNcap の均一化 : 高機能微粒子作成装置 (ファルマバレーセンター、Shizuoka, Japan) を用いた微粒子作成技術の提供を受け、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、中間体 [アルギン酸ナトリウム-ODN] を得た。さらに [アルギン酸ナトリウム-ODN] を塩化カルシウム溶液に投入し、水に不溶で球体を呈する粒子体を得ることに成功した (図 1)。また、粒径は 1 ~ 5 μm とややバラツキがあるものの、均一な球体を示すことが明らかとなった。
- 大腸炎モデルマウスにおける ODNcap の予防的投与 : 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

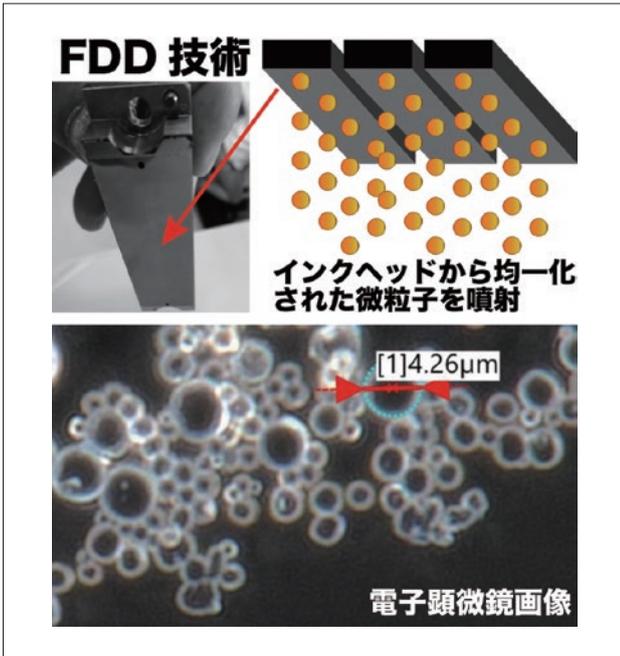


図1 FDD技術による経口用ODN微粒子の形状均一化

せることで急性大腸炎を誘導した。実験群は① NT群、② DSS群、③ Cap群、④ Free-ID35群（カプセル化無し）、⑤ ID35cap群（カプセル化有り）の5群を設定した（図2）。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。症状の重篤度は、毎日のDisease Activity Index (DAI) スコア

および Day 10 に採取した大腸の長さ、により解析した。

結果と考察

腸管は、栄養の吸収と老廃物の分泌をサポートすると同時に、管腔からの抗原の侵入を防ぐバリア機能を有している。このバリア機能の破綻は、炎症性腸疾患（IBD）や慢性肝疾患などを含む広範の疾患に関連していることが明らかとなっている。近年、IBD患者において腸内微生物叢が変化し、腸管上皮との相互作用レベルが向上していることが分かっている。IBDモデルマウスにおけるCpG-ODNによるTLR9刺激では、シグナル伝達経路を活性化させ、I型IFNの産生をすることにより保護的な役割を果たし、大腸炎の症状を緩和することが報告されている。またDSS投与2時間前にClass B CpG-ODNを皮下注射した場合、結腸炎症の臨床的、生化学的、および組織学的スコアを改善し、結腸の前炎症性サイトカインおよびケモカインの誘導を抑制した。そこで本研究では有効性が示唆されたClass B CpG-ODNを皮下投与や腹腔内投与ではなく、痛みやストレスの少ないDNanocapを用いた経口投与によるブライミング効果を調査した。具体的には、ID35capを2日間投与した後に、DSS入り飲料水を自由摂取

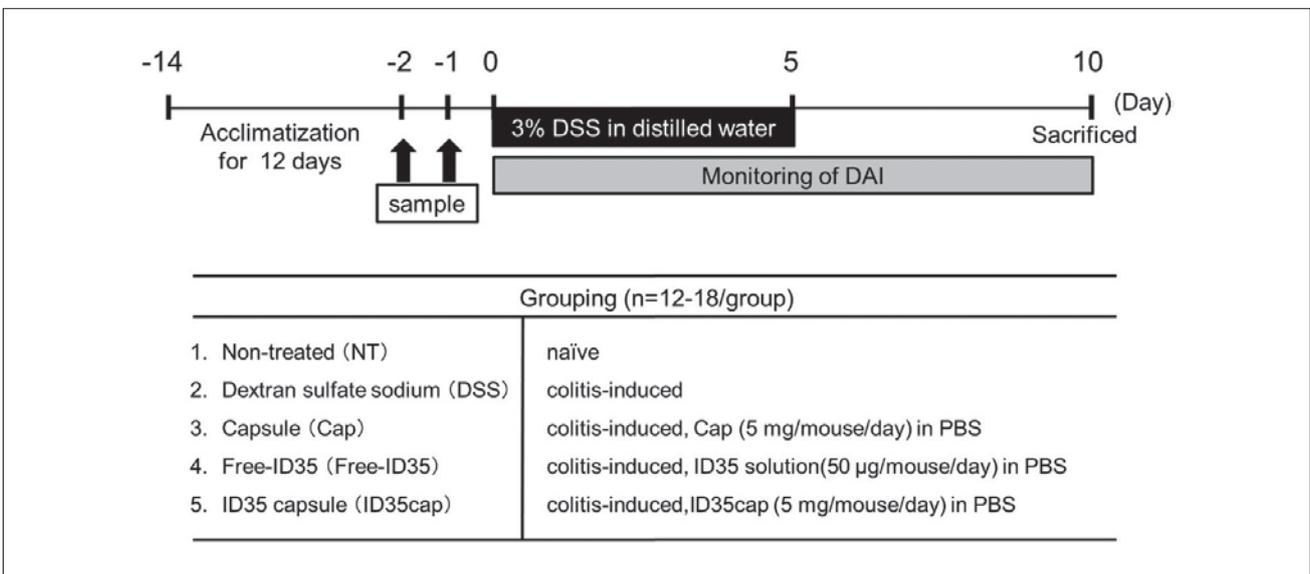


図2 DSS誘導大腸炎モデルマウスの作出と投与スケジュール

させることによって大腸炎モデルマウスを作出し IBD 症状の抗炎症効果について検証した。

DSS 誘導大腸炎マウスは、IBD の基礎研究分野において最も頻繁に用いられるモデル動物である。DSS を含んだ飲料水の投与は、投与プロトコルに応じて急性または慢性大腸炎を発症する。DSS を投与された動物は体重減少や軟便または下痢の徴候を示し、時に直腸出血を起こす。DSS 投与による大腸炎の発症および炎症反応の解析方法としては、ヘマトキシリン/エオジン染色による結腸組織学的損傷（陰窩構造の喪失、炎症性細胞浸潤、筋肉肥厚、杯細胞枯渇、陰窩膿瘍）のスコア化や ELISA 法や RT-PCR を用いた IL-1 β 、IL-6 および TNF- α などの急性炎症性のサイトカインの定量、炎症の代用マーカーであるミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性試験などが挙げられる。DSS 誘導大腸炎の洗練されたモデル動物は、IBD の重要な特徴を反映しており、IBD 治療薬をテストするのに非常に適していると言える。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

比較しても 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（図 3、図 4、図 5）。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。今後の課題としては CpG-ODN による免疫調節のメカニズムの解明と腸内細菌への影響、および ODNcap 投与時期の検討などが考えられる。本研究が、IBD に苦しむ人達の有用な予防・治療を実現するための知見となることを期待する。

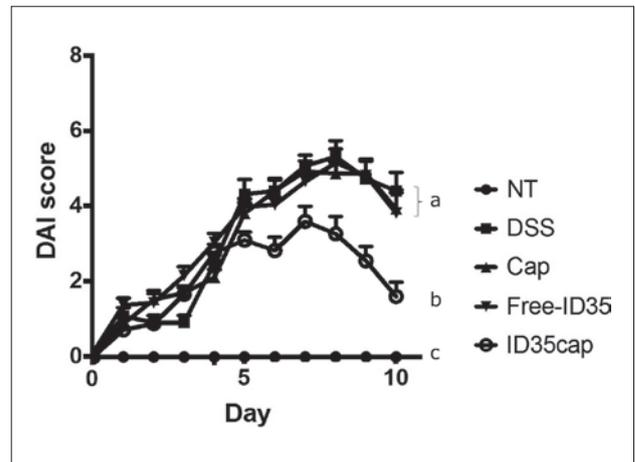


図 3 DAI スコアによる大腸炎症状のスコアリング
統計解析的に有意差 ($P < 0.05$) のあったものを異符号で示した。
n=12 ~ 18

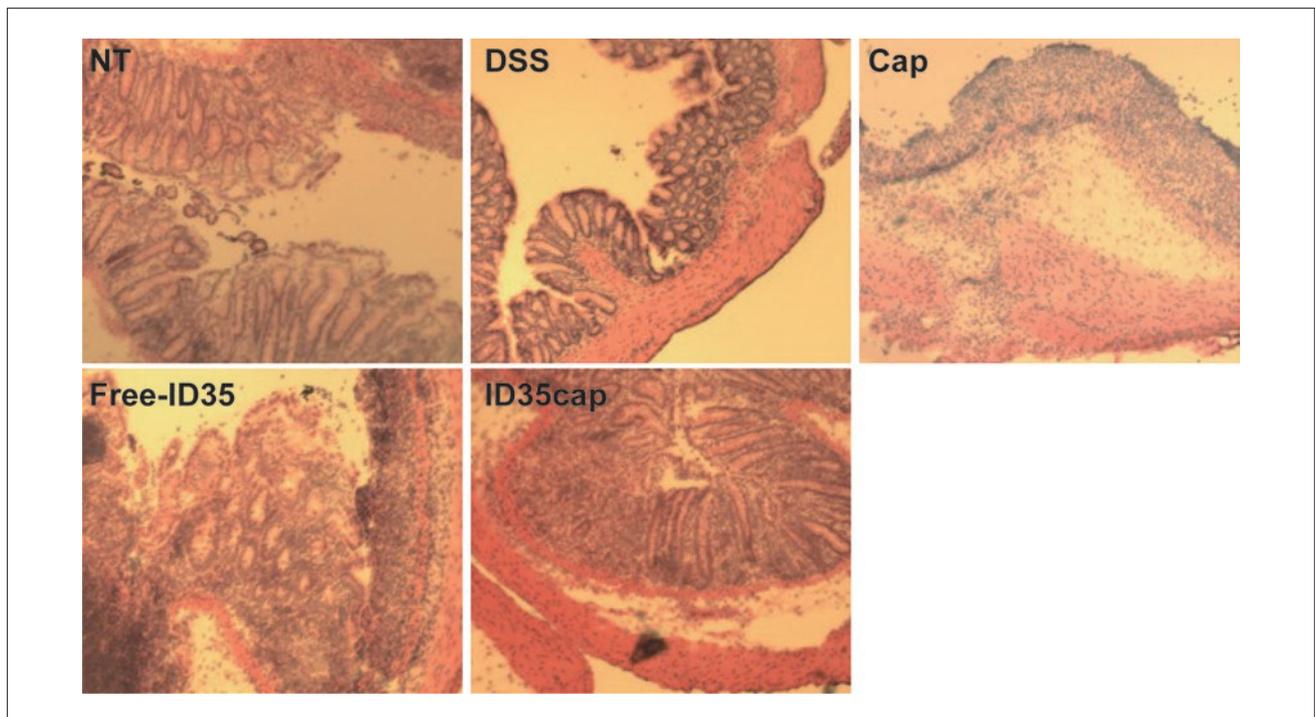


図 4 大腸組織染色画像
Day10 に安楽死させたマウスから得た大腸の組織を得た。各群の DAI スコアおよび大腸の長さが平均値に近いものを 1 個体選出し切片作製および染色を行い観察した。

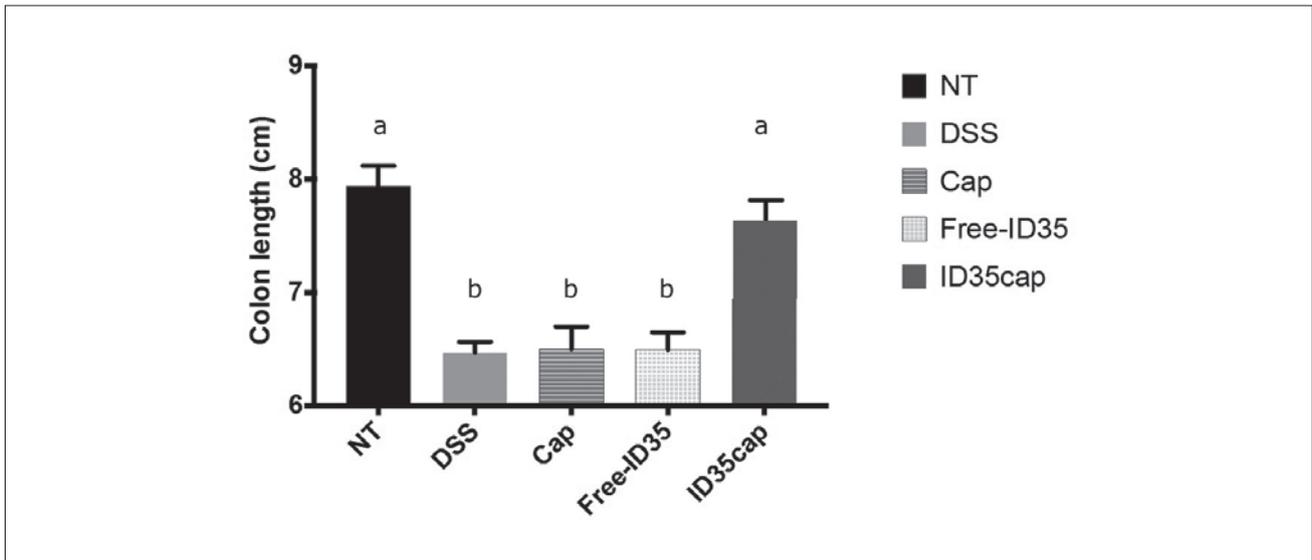


図5 大腸長の測定

Day10にマウスを安楽死させたのち大腸の長さを炎症組織損傷の指標として調べた。統計解析的に有意差 ($P < 0.05$) のあったものを異符号で示した。n=12 ~ 18

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

Development of edible lactobacillus ODNs with intestinal delivery properties

Takeshi SHIMOSATO

Institute for Biomedical Sciences, Shinshu University

Research into the actions of probiotics against infectious and inflammatory diseases and allergies has recently attracted considerable attention in both the medical and food sciences. My research group has identified immunomodulatory DNA sequences from immunoregulatory probiotics (immunobiotics) and confirmed that several synthetic oligodeoxynucleotides (ODNs) that are derived from these sequences maintain their immunomodulatory properties. To develop ODNs that retain their functionality after oral administration, my research group attempted to produce acid-resistant ODN particles by encapsulating ODNs in carbonate apatite particles (ODNcaps) using a cell transfection method with carbonate apatite particles. 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 studies involving mouse disease models. If the therapeutic efficacy of ODNcaps can be achieved without parenteral injection, the cost, complexity, and inconvenience of immunomodulatory therapy could be reduced dramatically. In addition, this approach may lead to the development of novel immunobiotic foods and feeds that will prevent or suppress many types of infectious, allergic, inflammatory, and autoimmune diseases.