

乳酸菌オリゴDNAによる上皮細胞の炎症制御と経皮核酸素材への展開

信州大学農学部

下里 剛士

Research into the action 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) derived from these sequences maintain the immunomodulatory properties. To develop ODNs that retain 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. These edible ODNs retained their immunomodulatory activity when taken up by intestinal mucosal cells. We have also developed ODN particles for transdermal absorption. The ability to produce particles containing immunomodulatory ODNs opens the possibility of using ODN particles in studies involving mouse disease models. If the therapeutic efficacy of ODN particles can be achieved without parenteral injection, the cost, complexity and inconvenience of immunomodulatory therapy could be dramatically reduced. In addition, this approach may lead to the development of novel immunobiotic foods and cosmetics that will contribute to the prevention or suppression of many types of infectious, allergic, inflammatory, and autoimmune diseases.

1. 緒言

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 (ODN, DNA短鎖)が次々と見出されている。とくに、感染症・ガン・アレルギー・炎症性疾患の予防や治療を目的とした機能性核酸分子として研究が進められてきた。オリゴDNAを用いた臨床試験も進んでおり、「核酸医薬」領域で実現に向けた段階に突入した。これまでにODNを用いて、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.)、皮下投与 (s.c.)、鼻腔に滴下 (i.n.) などの手法が一般的で、尾静脈からの投与 (i.v.) 例もある。またオリゴDNAの投与量としては、マウス1匹あたり100-500 μ gといった報告が多い。すなわち、注射器を用いて、直接血管内部や組織内に注入する方法が採用されている。筆者は、注射に頼らない—食べる乳酸菌DNA—を掲げ、2015年、胃液に溶けず腸まで届くDNAナノカプセルの開発に成功した。本成果により、オリゴDNAを有効成分とする機能性食品や家畜飼料・ペットフードなどの開発に向けた展開が可能となった。残された投与ルートは経皮ルートであるが、オリゴDNAを経皮ルートから動物試験を実施した例は、以下3例に限定される。(i)コラーゲンタンパク質+オリゴDNAの混合液の創傷治

癒効果(マウス試験)¹⁾、(ii)コラーゲンタンパク質+オリゴDNAの混合液の創傷治癒効果(サル試験)²⁾、(iii)アセトン+オリゴDNAの混合液の抗腫瘍作用³⁾。いずれの報告も、大容量のオリゴDNAを傷口や炎症部位に直接塗布する手法が採用されており、オリゴDNAの簡便かつ経済的な経皮ルートはいまだ確立されていない。筆者は、オリゴDNAの経皮ルートの構築を目指し、コスメトロジーの概念を組み合わせたスキンケア素材の開発研究を行った。

2. 方法

2.1. ODN

ODNの合成はIntegrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA, USA)社に合成を外注委託した。

・GpC-ODN₁₆₁₂, 5'-G*C*T*A*G*A*G*C*T*T*A*G*G*C*T-3'⁴⁾
・CpG-ODN₁₅₅₅, 5'-G*C*T*A*G*A*C*G*T*T*A*G*C*G*T-3'⁵⁾
・CpG-ODN_{MsST}, 5'-C*A*G*G*A*C*G*T*T*G*T*A*T*C*A*C*T*G*A*A-3'⁶⁾

以上のPhosphorothioate bond (PS)-ODN、Phosphodiester bond (PO)-ODNをそれぞれ合成した。なお、*はPS bondを示している。

2.2. ODN-炭酸アパタイト微粒子の合成

ODN-炭酸アパタイト微粒子の合成は、Wangらの方法を参考に一部改変して作製した⁷⁾。すなわち、ODNを1mg/mLとなるよう滅菌PBSで希釈し、ODN溶液とした。次に、塩化カルシウム二水和物CaCl₂·2H₂O(ナカライテスク, Kyoto, Japan)を7.35g電子天秤で秤量し、50mLチューブに取り、ミリQ水でfinal 50mLにメスアップして1M CaCl₂とした。さらに、滅菌済み200mLビーカーにDMEM (Invitrogen, CA, USA)を26mL×チューブ4本分



Regulation of Inflammation in Epithelial Cells by *Lactobacillus* Oligodeoxynucleotides and Development to Novel Transdermal Oligodeoxynucleotide Materials

Takeshi Shimosato

Faculty of Agriculture, Shinshu University

に当たる約100mL(+α)を取った。50mLチューブ4本にDMEMを26mLずつピペッターで正確に分注した。事前にウォーターバスを37℃に設定し温めておき、DMEM 26mLにODN溶液150μL(ODN量150μg)を加えた。ODN+DMEMと1M CaCl₂を37℃、5minウォーターバスで温めた後、ODN含有DMEMに1M CaCl₂を4mL加えた。37℃、5minウォーターバスで温めた後、3,000g×20min遠心分離し、アスピレーターで上清を丁寧に除去した。2mLの滅菌済みPBSで懸濁し、2mLチューブ(アズワン株式会社, Osaka, Japan)に回収した。8,000g×5min遠心分離し、ピペッターで上清を丁寧に除去した上で、-30℃冷凍庫に一晩静置した。翌日、フリーズドライヤーDC401(ヤマト科学株式会社)を用いて凍結乾燥した。作製したODN微粒子は-80℃にて保存した。特性解析として、1wt%リン酸カルシウム水分散液を調製し、1分間の超音波照射の後、粒径を測定した(FPAR-1000, 大塚電子株式会社, Osaka, Japan)。

2. 3. マウス細胞を用いた免疫機能解析

C57BL/6マウスを、頸椎脱臼により安楽死させ、脾臓細胞および腹腔マクロファージを回収した。細胞は、遠心分離(2,000rpm, 20℃, 5min)し、10mLのRPMI-1640培地(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)に10% fetal calf serum(FCS; Sigma), 100 U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, 25mM HEPES, 1.0mM sodium pyruvate, nonessential amino acids, 0.0035% 2-mercaptoethanolを加えたコンプリート培地に懸濁した。細胞懸濁液はセルストレイナー(日本BD, Tokyo, Japan)、メッシュサイズ40μmに通すことで凝集細胞を除去した。上記コンプリート培地にて2回洗浄後、細胞を回収し、カウンテス自動セルカウンター(Invitrogen)を用いてトリパンブルー染色法により生細胞数をカウントした。細胞を12well plate(Thermo Fisher Scientific, IL, USA)に2×10⁶ cells/wellで播き、37℃、5%CO₂条件下で3hr培養した。その後、GpC-ODN微粒子、CpG-ODN微粒子で刺激し、6hr後の細胞を回収した。Total RNAとPrime Script[®] RT reagent Kit (TaKaRa Bio, Kusatsu, Japan)を用い、逆転写反応によりcDNAを合成した。cDNAを鋳型としてマウスプライマーを用いて、リアルタイムPCR法により発現解析を行った。

2. 4. 共焦点レーザー走査顕微鏡による6FAM-ODN微粒子の取り込み解析

腹腔マクロファージをPBS, 6FAM-ODN微粒子(500μg/mL, containing 5μg/mL ODN)を用いて37℃、1h処理した。そして腹腔マクロファージに4%PFAを添加し室温で15min固定した。6FAM-ODN微粒子の取り込みを共焦点レーザー走査顕微鏡(FV1000D-IX81, Olympus, Tokyo,

Japan)により解析した。画像は、(Fluoview software Olympus)を用いて分析した。

2. 5. 走査型電子顕微鏡による粒子形態観察

ODN微粒子懸濁液をナノパーコレータ試料載台(JEOL, Tokyo, Japan)に35μL添加した。10mLシリンジ(TERUMO Corporation, Tokyo, Japan)を用いて液体を吸い、試料をよく定着させたのち、12-well plate(Nippon Genetics)に500μLずつ分注した2.5%グルタルアルデヒド(TAAB Laboratories Equipment, Ltd, Berks, UK)に1hr十分に浸すことで固定した。以降液体試薬による静置および洗浄は12-well plateに500μLずつ試薬を分注し行った。完全に脱水するため、100%エタノールにて30min静置し、100%エタノールを交換して静置する工程を2回行った。脱水完了後、t-ブチルアルコール(Nacalai Tesque)に浸し52℃、30minで2回静置し、-80℃で保管した。フリーズドライヤーDC401(Yamato Scientific)で凍結乾燥したのちオスミウムコーターNeoc-AN(Meiwafosis CO., Ltd., Tokyo, Japan)を用いてオスミウムコーティングを行い、卓上走査型電子顕微鏡JCM-7000F(JEOL, Tokyo, Japan)により観察した。

3. 結果

本研究は、感染症、アレルギーなどの予防や治療に有効なODN化粧品、医薬品の創製へと繋げる基盤研究として、ODN微粒子を作成する技術の開発研究を実施した。

3. 1. ODN-炭酸アパタイト微粒子の特性解析

核酸成分の細胞へのトランスフェクションには、主にカチオン性脂質などが採用されている。近年では、新たに金ナノ粒子、カーボンナノチューブ、生分解性ポリケタル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(a)分解酵素による消化から核酸を保護する(b)核酸の生体内における滞留時間を延ばす(c)核酸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(d)標的細胞に核酸を安定的に届ける(e)長い時間をかけて核酸をゆっくりと運搬体の外へと放出する(f)核酸量を抑えることによる低コスト化など、優れた運搬媒体が検討されている。本研究では、Wangらの開発した炭酸アパタイト粒子を用いた微粒子作成技術を改良し、その特性解析を行った。ODN-炭酸アパタイト微粒子は、ODNを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たものである。その粒子は直径100nm-150μmのナノ-マイクロサイズであることが示された(図1)。

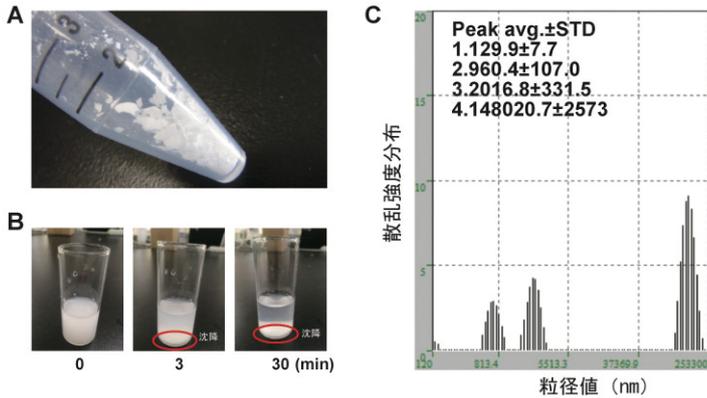


図1 ODN-炭酸アパタイト微粒子(A)の特性解析。リン酸カルシウム水分散液を調製し、1分間の超音波照射(B)を行い、粒径を解析した(C)

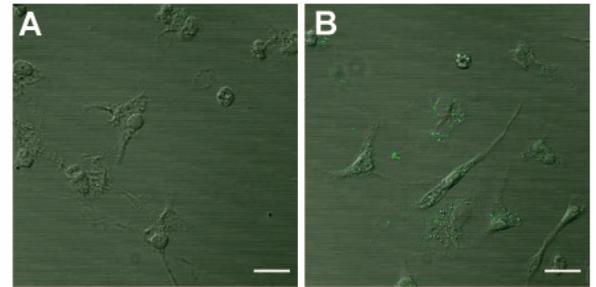


図2 腹腔マクロファージ細胞における6FAM-ODNおよび6FAM-ODNカプセルの取り込み解析 (Bar = 5μm) 無処理細胞(A), ODN微粒子処理細胞(B)

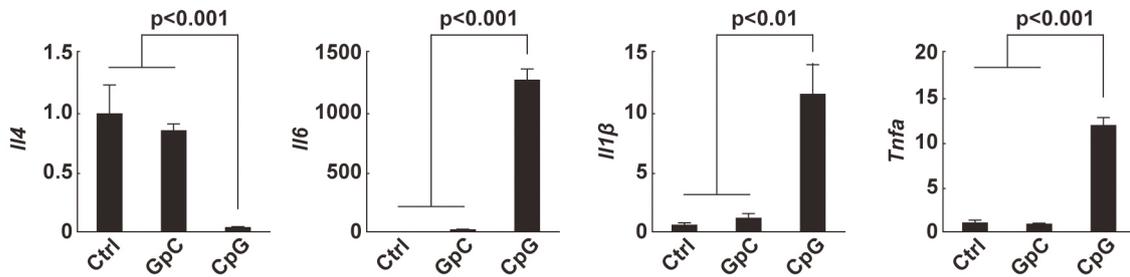


図3 ODN微粒子で処理したマウス脾臓細胞におけるIl4, Il6, Il1β, Tnfa mRNAの発現解析

3. 2. ODN微粒子の取り込み解析

マウス腹腔マクロファージ細胞を調製し、6FAM-ODN微粒子を用いて取り込み解析を*in vitro*で行った。SP細胞をPBSおよび6FAM-ODN微粒子で処理し、蛍光標識を追跡した。コントロールにおいて、16.01%, 9.83%, 16.88%であった蛍光値に対し、6FAM-ODN微粒子における値は66.64%, 69.64%, 64.36%を示した。共焦点レーザー顕微鏡による解析の結果からも、6FAM-ODN微粒子を取り込む腹腔マクロファージ細胞が観察された(図2)。生体防御システムの最前線に分布するマクロファージおよび樹状細胞は、抗原を取り込み後、抗原提示して免疫応答を誘導することが知られている。すなわち、腹腔マクロファージにおけるODN微粒子の取り込みは、能動的に行われている可能性が示唆された。

3. 3. ODN微粒子の免疫特性解析

C57BL/6雄マウスから脾臓細胞を調製し、コントロール(Ctrl)としてPBS、GpC-ODN微粒子、CpG-ODN微粒子で6時間培養後、リアルタイムPCR法を用いて、IL-4, IL-6, IL-1βと炎症性サイトカインであるTNF-αを測定した。GpC-ODN微粒子と比較して、CpG-ODN微粒子ではIl1β, Il6, Tnfaの発現増加が見られた。一方で、Il4については強力に抑制された(図3)。

3. 4. ODN微粒子を塗布したマウス耳介における影響

これまでに乳業用乳酸菌*Streptococcus thermophilus*ゲノム配列中より同定したCpG-ODNが、マウスの脾臓細胞培養系においてIFNγおよびIL-33を強く誘導することを発見している^{8,9)}。4週間にわたる連続投与試験を実施した後、マウスより耳介を採取し、耳介組織切片(パラフィン切片)を作成した。HE染色により、濃い紫色で染色されている箇所が表皮(Epidermis)である。光学顕微鏡下において、各群より表皮の厚さを5ポイント測定した。Ctrl群およびGpC-ODN微粒子群と比較して、CpG-ODN微粒子群において有意に高い数値となり、皮膚の肥厚が細胞組織レベルで観察された(図4)。

3. 5. 高機能ODN微粒子および乳化剤の開発

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

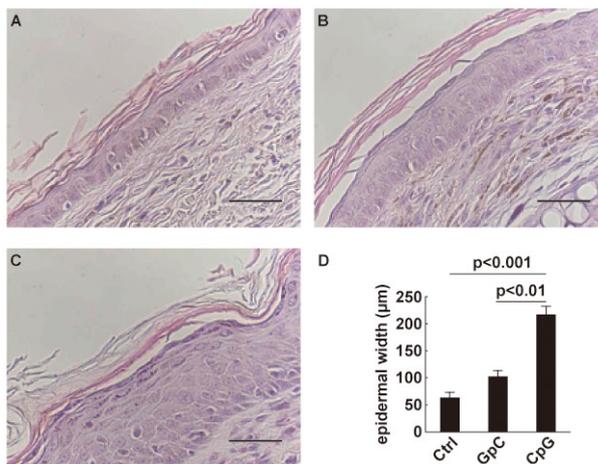


図4 マウス耳病理組織切片の観察 Bar = 200μm

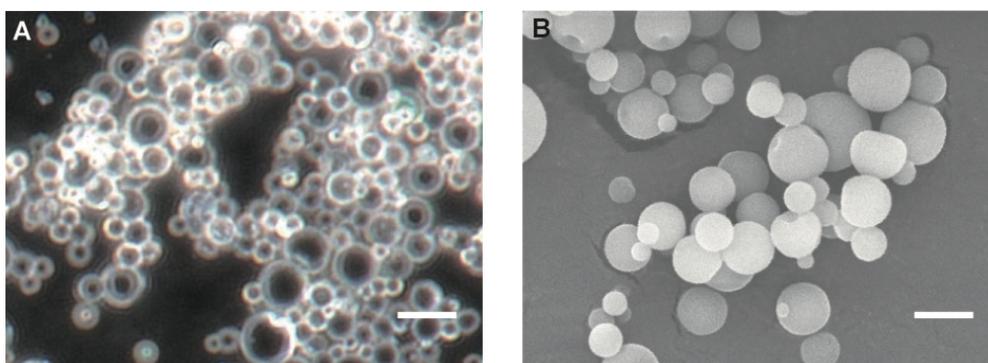


図5 球状を示す ODN 微粒子の走査型電子顕微鏡画像 (Bar = 5μm)

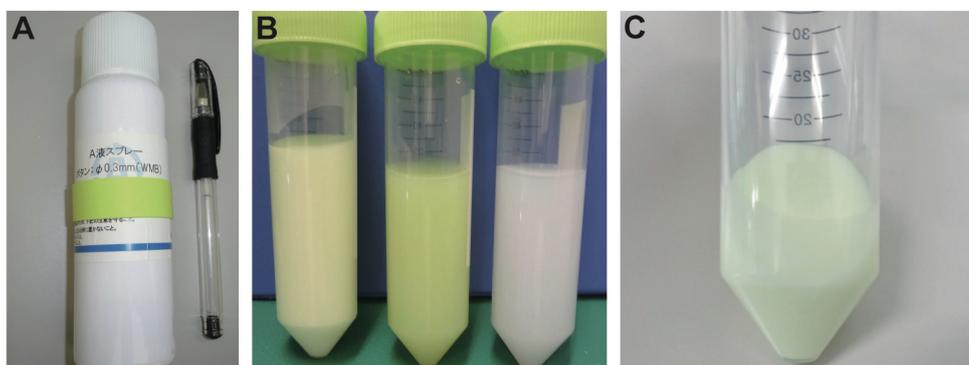


図6 ODN 微粒子噴霧用スプレー (試作品) (A), ODN ヒアルロン酸ナトリウム乳化液 (B, C)

(図5)。

また、噴霧型ODN微粒子の作成を目指し、ODN粒子体の調製液をエアゾール缶に充填した試作品を作製した。さらに微粒子の乳化、分散、破碎技術を駆使して、経皮投与を目的としたODNの粒径均一化に取り組んだ。1%ヒアルロン酸ナトリウムに混合したODNに対して乳化処理(ナノヴェイタ-電動式C-ES, 三重ナノテク生産技術センター)を繰り返すことで、均一に分散した乳化ODN微粒子の開発に成功した(図6)。

4. 考察

ODN や miRNA (micro RNA)、siRNA (small interfering RNA)、さらには plasmid DNA (pDNA) 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長年利用されてきた。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、ポリケタル粒子、金ナノ粒子、カーボンナノチューブ (CNT) 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期待されている。これらすべて *in vitro* 細胞培養系レベルでの transfection を想定したデリバリーシステムであるが、最近では、siRNA や CpG ODN の *in vivo* デリバリーシステムが検討されている。Titta らは、界面活性ポリオール (Pluronic F-127) とプロピレンスルフィドより合成したナノ粒子 (NPs) と CpG ODN の複合体 (NP-CpG) を用いて、メモリー型細胞傷害性 T 細胞 (メモリー CD8⁺T 細胞) の再活性化を強力に誘導することを発見した。また、マウスフットパッドへの皮下投与 (*intradermal injection, i.d.*) によって、ガン細胞の移植に対してマウスの生存率を高め、抗ガン作用を示すことを明らかにした¹⁰⁾。Fan らは、カーボンナノチューブ (CNT) と CpG ODN の複合体 (CNT-CpG) の皮内投与 (*subcutaneous injection, s.c.*)、頭蓋内投与 (*intracranial, i.c.*) が、同じく抗ガン作用を示すことを報告している¹¹⁾。その他、プロタミン-CpG ODN、脂質性リン酸カルシウム-pDNA など様々な核酸キャリアが提案されている。しかしながら、核酸分子は安定性に乏しく、腸管粘膜への経口送達は、いまだ課題とされているが、筆者は、これまでに胃酸耐性を有する ODN ナノカプセル (ODNcap) の開発に成功した⁷⁾。本成果を踏まえ、本研究で作成した改良型 ODN 微粒子は、これまで様々な核酸分子キャリアが提案されている中で、大幅なコストカットを達成した。一方で、包摂率が約 70 % であることから、さらなる包摂効率の改善が望まれる。

現在、上皮細胞培養系を用いて、粒子化、乳化 ODN 微粒子による抗炎症効果について検証を進めている。今後は、ヌードマウスを用いた塗布試験も計画しており、経皮的に浸透した ODN の皮内における分布状況について経時的に解析を行う予定である。ODN の経皮投与は、前人未達の投与ルートである。併行して実施した ODN 微粒子の粒度分布の狭小化により、気管支関連リンパ組織 (BALT) や腸管関連リンパ組織 (GALT) への送達性と取り込み効率の向上が期待された。経気道投与方法の構築にあたっては、ODN 微粒子体調整液を充填したエアゾール缶の試作を行い、最適なデバイス構築に向けた研究開発を開始しており、将来的には呼吸器アレルギー疾患や呼吸器悪性疾患、さらには呼吸器感染症に対する吸入核酸医薬の研究開発につながる成果と考える。また核酸医薬の耐胃酸性の問題は、炭酸アパタイトを基材とすることで克服されたことから、ODN 炭酸アパタイト粒子体を作成し、ファルマバレーセンターとの協働による高機能微粒子作成装置を用いることで、狭い粒度分布が再現され、経口摂取後の GALT への送達・取り込み向上が期待された。このように、ODN 微粒子体の特性を明らかにし、経口、経気道に加えて、経皮ルート開発に向けた道筋を見出した。以上本研究は、抗炎症作用の知られた ODN を有効性成分とする、スキンケア化粧品等の開発に向けた取り組みとして位置づけられる。

(引用文献)

- 1) T. Sato, M. Yamamoto, T. Shimosato, D. M. Klinman, Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9. *Wound Repair Regen* 18, 586-593 (2010).
- 2) M. Yamamoto, T. Sato, J. Beren, D. Verthelyi, D. M. Klinman, The acceleration of wound healing in primates by the local administration of immunostimulatory CpG oligonucleotides. *Biomaterials* 32, 4238-4242 (2011).
- 3) H. Ikeuchi, T. Kinjo, D. M. Klinman, Effect of suppressive oligodeoxynucleotides on the development of inflammation-induced papillomas. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 752-757 (2011).
- 4) S. Klaschik, I. Gursel, D. M. Klinman, CpG-mediated changes in gene expression in murine spleen cells identified by microarray analysis. *Mol Immunol* 44, 1095-1104 (2007).
- 5) T. Sato, T. Shimosato, A. Ueda, Y. Ishigatsubo, D. M. Klinman, Intrapulmonary Delivery of CpG Microparticles Eliminates Lung Tumors. *Mol Cancer Ther* 14, 2198-2205 (2015).
- 6) S. Nigar *et al.*, Synergistic oligodeoxynucleotide strongly promotes CpG-induced interleukin-6 production. *BMC Immunol* 18, 44 (2017).
- 7) Y. Wang *et al.*, Inhibitory/suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis in mice. *Mol Ther* 23, 297-309 (2015).
- 8) T. Shimosato *et al.*, CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 81-86 (2010).
- 9) T. Shimosato *et al.*, Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus lacZ*. *Anim Sci J* 80, 597-604 (2009).
- 10) A. de Titta *et al.*, Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 19902-19907 (2013).
- 11) H. Fan *et al.*, Intracerebral CpG immunotherapy with carbon nanotubes abrogates growth of subcutaneous melanomas in mice. *Clin Cancer Res* 18, 5628-5638 (2012).