

タマゴアナフィラキシーを抑制する経口用オリゴ DNA 素材の開発

信州大学学術研究院農学系・准教授 下里 剛士

■ 緒言

近年、食物アレルギーの罹患率が増加している。食物アレルギーの症状は、軽度の皮膚および胃腸疾患から、重度の梗塞性ショックおよび死に至るまで広範である。食物アレルギーは、特定のアレルギーに対する曝露および感作後に、アレルギー特異的免疫グロブリン(Ig)E抗体を形成した個体に生じる。肥満細胞は、IgE 介在性アレルギー疾患の重要なエフェクター細胞である。活性化された肥満細胞は、ヒスタミンなどの顆粒関連化学メディエーター、ロイコトリエン(LT)などのアラキドン酸代謝物、インターロイキン(IL)-4、6、13などのTh2サイトカインおよび腫瘍壊死因子(TNF)- α を含む炎症性サイトカインなど3種の炎症誘発性メディエーターを放出する。これらのメディエーターはアレルギー反応の発症に重要とされている。そのためアレルギーの予防や治療を目的とし、上述したメディエーターを制御する様々な研究が行われてきた。

本研究では、卵白アルブミン(ovalbumin, OVA)によって誘導されるタマゴアレルギーに着目し、経口的な機能性素材によるアレルギー反応の制御を目的とした。そこで、筆者の研究グループがこれまで見出してきた免疫機能性オリゴ DNA を用いた実験計画を企画した。オリゴ DNA(ODN)は、免疫療法および免疫予防剤として広範囲の疾患の治療および予防に使用されている短い一本鎖合成 DNA 分子である。ODN による強力な抗アレルギー性サイトカインの誘導能を利用することで、アレルギー性炎症性疾患の予防・軽減方法が研究されている。筆者の研究グループでは、2009年に、乳業用乳酸菌ゲノム DNA に由来する ODN(MsST)を同定した¹⁾。さらに2013年には、OVA 感作マウスにおいて Th2 サイトカインの一つである IL-4 mRNA 発現量を有意に抑制する ODN, iSG3 を発見した²⁾。さらに、ODN を炭酸カルシウム粒子で包摂し、胃酸耐性能を付与した DNA ナノカプセル(DNanocap)の開発に成功している³⁻⁵⁾。そこで本研究では、将来 DNanocap を食品および家畜飼料素材としての利用するための基礎的知見を得ることを目的とした。具体的な方法としては、MsSTcap をマウス用粉末飼料に混合し、OVA アレルギー感作マウスに経口投与または自由摂取させた際の抗アレルギー作用について検証を行った。

■ 方法

1. マウスと OVA 感作マウスの作出

BALB/c マウス(4週齢、雌)を2週間の予備飼育後、6週齢から実験に使用した。すなわち7および9週齢に100 μ gのOVAと水酸化アルミニウム2mgを腹腔内注射することで感作した。動物実験は、信州大学の動物実験等実施規定に従って実施した(承認番号260060)。

2. DNanocap 特別配合飼料を用いた自由摂取試験

実験群として、無処理(NT)群、Normal-Feed(NF)群、MsSTcap-Feed(MF)群の3群を設定した。6週齢から4週間にわたり自由摂取させた。

3. 脾臓重量の測定

OVA 最終感作から1週間後、すなわち10週齢にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、脾臓を摘出し電子天秤により脾臓重量を測定した。

4. 定量的 PCR 法によるアレルギー関連マーカー遺伝子の発現解析

マウスの脾臓細胞を24穴プレートに2 \times 10⁶cells/wellで播き、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下で3hr培養した。その後、コントロールとしてのRPMI1640培地またはOVA(final 10 μ g/mL)で刺激し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下で72hr培養した。培養後、Total RNAを抽出し、cDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型として、マウス *beta-actin* プライマーとマウス免疫関連遺伝子プライマーを用いて定量的 PCR 法により発現解析を行った。

5. 血清 IgE 量の測定

最終感作から1週間後、心臓穿刺により採血を行った。ブロックインキュベータで24 $^{\circ}$ C、30min放置し、4 $^{\circ}$ C下に一晚置いた。翌日、遠心分離し(1,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C, 30min)、マイクロチップを用いて血清を回収した。次に、Mouse IgE ELISA Quantitation Kit(Bethy Laboratories, Montgomery, TX, USA)と

LEGEND MAX™ Mouse OVA specific IgE ELISA Kit (Biolegend, San Diego, CA, USA) を用いて、OVA 特異的 IgE の発現解析を行った。

■ 結果

1. マウス脾臓組織の重量に及ぼす影響

OVA 最終感作の一週間後において、BALB/c 雌マウスを安楽死させ、脾臓を摘出し、脾臓重量を比較した。NF 群と比較して MF 群において脾臓重量の有意な増加が見られた ($P=0.00484$) (図 1)。

2. マウス脾臓組織における IL-4mRNA の発現解析

OVA 最終感作の一週間後において、BALB/c 雌マウスから脾臓を摘出した。細胞培養系において、OVA を再感作した後、Total RNA を抽出した。OVA 刺激条件下で、NF 群と比較し MF 群において有意差が見られなかった ($P=0.354$) (図 2)。

3. マウス血清中における IgE の発現解析

自由摂取試験終了後、マウスの血清における IgE の量を ELISA 法により測定した。NF 群と比較し MF 群において有意差が見られなかった ($P=0.579$) (図 3)。

4. マウス血清中における OVA 特異的 IgE の発現解析

自由摂取試験終了後、マウスの血清における OVA 特異的な IgE の量を ELISA 法により測定した。NF 群と比較し MF 群において有意差が見られなかった ($P=0.984$) (図 4)。

■ 考察

人間の諸活動は、食により維持されている一方で、食生活の乱れが生活習慣病や寿命に影響を及ぼしている。この生活習慣病の増加や死亡原因の変化を考えると、「医食同源」という考え方が想起される。例えば薬膳などにも利用される生姜は体温上昇、発汗および解毒作用などの効果を持っており、食材の中にも生体に影響を与えるものは数多く存在している。また近年、保健効果についての科学的根拠が示された機能性食品に対する消費者からの関心も高まっている。本研究では、DNanocap を食品および家畜飼料素材としての利用するための基礎研究として、マウス用粉末飼料に DNanocap を混合した特別配合飼料を用いた自由摂取試験を行った。すなわち本研究は、DNanocap 飼料の自由摂取に伴う免疫系に与える影響を調査した初めての研究として位置づけられる。

具体的には、DNanocap 特別配合飼料をタマゴアレルギーモデルマウスに自由摂取させ、抗アレルギー作用を検証した。脾臓は血流から抗原を集め血液中の病原体に対する自然免疫応答に関与し、免疫応答に比例して肥大化することが報告されている。先行研究であるアトピー性皮膚炎モデルマウスによる MsSTcap の経口投与群においても、対照群に対し重量の有意な増加が確認された。続いて血清 Total IgE および OVA 特異的 IgE に着目した。IgE は抗原侵入部位の所属のリンパ節に存在する形質細胞、炎症部位で胚中心由来の形質細胞で作られる。そして抗原がマスト細胞表面の IgE に結合するとヒスタミンが放出されアレルギーを引き起こす。食物アレルギーは、I 型食物アレルギーとしても知られ、アレルゲン特異的 IgE 抗体の存在を特徴とする。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。本研究の結果から、NF 群と比較して MF 群では有意な脾臓重量の増加が確認されたが、IL-4mRNA 発現量、血清 Total IgE および OVA 特異的 IgE において、NF と MF 群間で有意な差は確認されなかった。IL-4mRNA は MF 群の OVA 再刺激において発現量が大きく分けて二つに分布しており、また血清 OVA 特異的 IgE においても値の分散が見られた。これらを総合すると 4 週間の投与期間では、MsSTcap による免疫作用は誘導初期のため、マウスによって効果の差が表れ始めた時期だと考えられた。本仮説を証明するため、今後、自由摂取期間や DNanocap 含有量の検討が課題である。

■ 要約

オリゴ DNA (ODN) は、感染症・アレルギー・ガンおよび炎症性疾患など、疾病の予防や軽減効果が期待される機能性核酸素材である。我々の研究グループでは、ODN をカルシウム性ナノ粒子に包摂することで、胃酸に分解されず腸まで届く DNA ナノカプセル (DNanocap) の開発に成功している。そこで本研究では、将来 DNanocap を食品や家畜飼料素材として利用することを目的に、DNanocap をマウス用粉末飼料に混合し、アレルギー感作マウスの自由摂取による抗タマゴアレルギー作用について検証した。DNanocap として、乳業用乳酸菌ゲノム DNA に由来する ODN のナノカプセル体 (MsSTcap) を用いた。試験では、BALB/c マウスを NT、Normal-Feed (NF) および MsSTcap-Feed (MF) 群に群分けした。アレルギー感作は、7 および 9 週齢目にタマゴアレルギーの原因抗原として知ら

れる OVA と水酸化アルミニウムゲルを含む PBS を 200 μ L 腹腔内投与することで作出した。10 週齢目に脾臓および血液(血清)を採取し、脾臓重量および各免疫マーカーについて解析した。結果として、NF 群と比較して、MF 群は脾臓重量の有意な増加が見られた。一方で、IL-4mRNA 発現量、血清 Total IgE および OVA 特異的 IgE では有意な差は見られなかった。これらの結果より、MsSTcap の自由摂取により、全身免疫を担う脾臓に影響を及ぼしているが、アレルギーを軽減させるレベルまでには至っていなかったことが考えられた。今後は、アレルギー症状を抑制できるレベルでの DNanocap 配合飼料を開発する必要がある。

■ 文 献

1. Shimosato, T, Fujimoto, M, Tohno, M, Sato, T, Tateo, M, Otani, H, and Kitazawa, H. (2010). CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochem Biophys Res Commun* 394:81-86.
2. Ito, Y, Shigemori, S, Sato, T, Shimazu, T, Konomi, H, Otani, H, and Shimosato, T. (2013). Class I/II hybrid inhibitory oligodeoxynucleotide exerts Th1 and Th2 double immunosuppression. *FEBS Open Bio* 3:41-45.
3. Klinman, DM, Sato, T, and Shimosato, T (2016). The use of nanoparticles to delivery immunomodulatory oligonucleotides. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 8:631-637.
4. 下里剛士 (2015). 月刊 BIOINDUSTRY : 機能性オリゴ DNA の経口投与を可能にする「DNA ナノカプセル」の開発. *株式会社シーエムシー出版* 32:61-65.
5. Wang, Y, Yamamoto, Y, Shigemori, S, Watanabe, T, Oshiro, K, Wang, X, Wang, P., Sato, T., Yonekura, S., Tanaka, S., Kitazawa, H. and Shimosato, T. (2015). Inhibitory/suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis in mice. *Mol Ther* 23: 297-309.

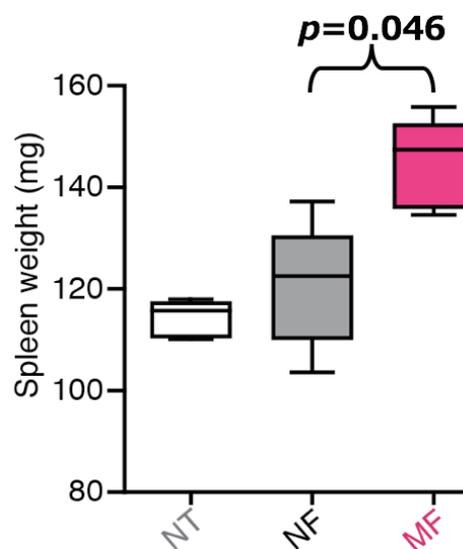


図 1. 脾臓重量に与える影響

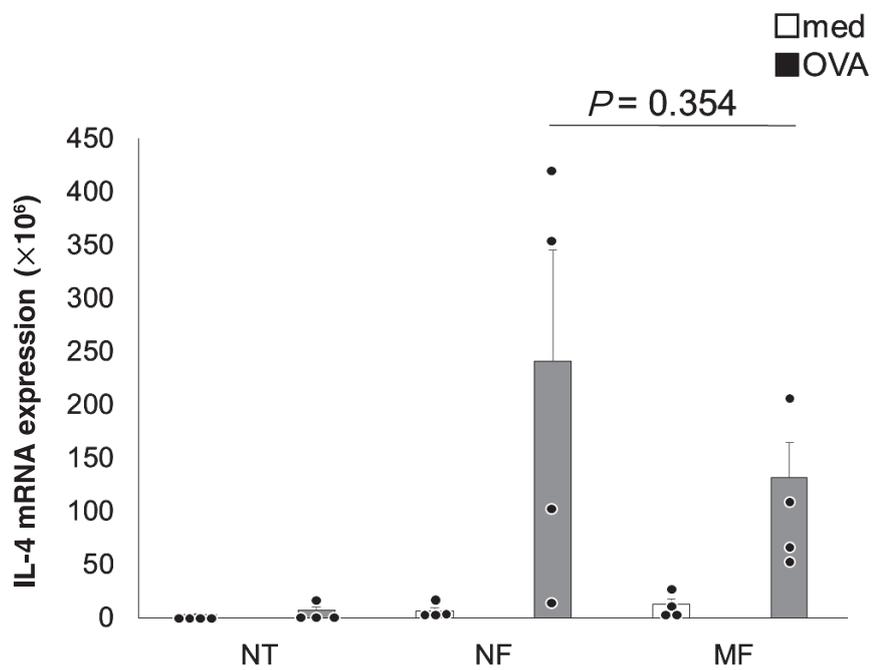


図2. アレルギー関連マーカー遺伝子(IL-4)遺伝子発現量に与える影響

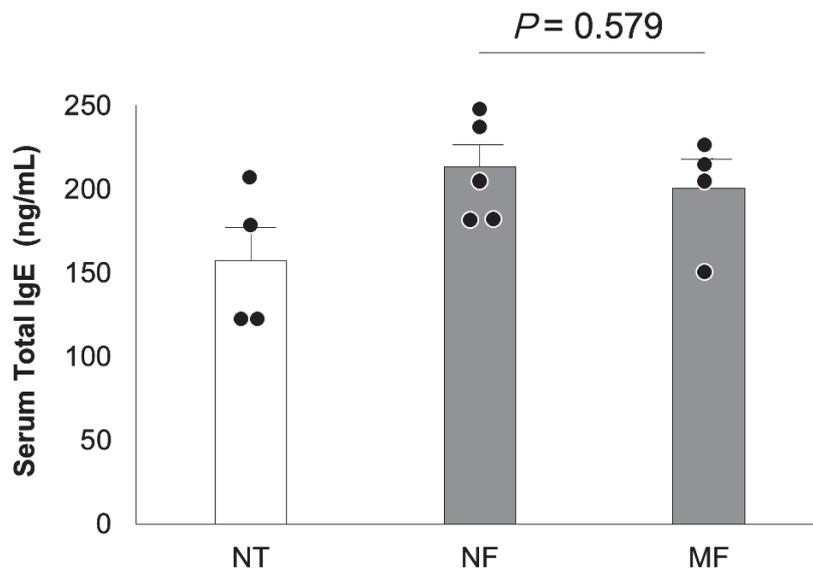


図3. DNanocap 配合飼料の自由摂取が OVA アレルギーモデルマウスにおける血清中 IgE 産生量に与える影響

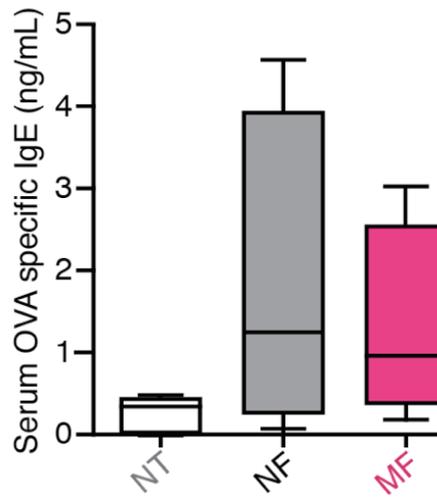


図 4. DNanocap 配合飼料の自由摂取が OVA アレルギーモデルマウスにおける血清中 OVA 特異的 IgE 産生量に与える影響