

オリゴヌクレオチドのナノデリバリーシステムを用いた アレルギー予防食品素材の開発

下 里 剛 士

信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点 特任助教
(現 信州大学大学院農学研究科・総合工学系研究科 准教授)

緒 言

微生物由来のゲノム DNA や、その配列に基づき化学合成された、非メチル化 CpG オリゴ核酸 (CpG ODN) は、感染症、ガン、アレルギー、炎症性疾患の予防および治療などを目的としたワクチンアジュバント分子として期待されている^{1,2)}。2000年に CpG ODN の受容体として TLR9 が同定され³⁾、免疫系における CpG ODN の作用について飛躍的に理解が進んできている。さらに近年、免疫原性核酸による免疫活性化機構において、様々な核酸結合タンパクを介する機構が発見され、高等生物の有する複雑な自然免疫機構が明らかになりつつある。

また、塩基同士の結合部位をチオール基 (S 基) で修飾するホスホロチオエート結合を導入することで、ODN を分解から保護できることから、ODN 研究では一般的に S 化修飾 ODN が用いられている。これまでに S 化修飾 CpG ODN を用いて、様々な疾病予防試験が *in vivo* レベルで行われており、投与方法としては、①腹腔内投与 (i.p.)、②鼻腔に滴下などの手法が一般的で、③尾静脈注入による投与 (i.v.) 例もある。CpG ODN の投与量としては、100 µg 以上/マウス 1 匹といった報告が多い。

しかしながら、薬剤や食品素材の *in vivo* トライアル試験において通例となっている、経口投与による知見はほとんど報告が無く、CpG ODN の発見から 20 年を迎えようとしている中で、食品科学分野における価値を見出すまでには至っていない。すなわち、CpG ODN は優れた免疫機能を有しながら、経口的に摂取すると、胃酸や消化酵素の影響により分解されてしまうという最大の弱点があり、これまで経口投与による試験はほとんど行われてこなかった。

そこで、筆者らの研究グループは、ODN の経口投与において大きな障害となっている胃酸の問題をクリアするため、バイオマテリアル分野のベンチャー企業 (セ

ラジックス社) との連携によりナノ粒子を用いた ODN のカプセル化というアイデアの着想に至り、酸耐性を有する ODN マイクロカプセルの開発を進めてきた。ナノ粒子へオリゴ核酸を包摂することで、未だ解明されていないオリゴ核酸の経口投与による効果が得られれば、微生物由来の機能性 ODN を新たな機能性食品や飼料素材として提案できる。また、優れたワクチンアジュバントとして、医薬分野における利用性が大いに期待できる。我が国では、昨今の健康ブームから国の認証を受けた特定保健用食品に対する興味・関心が高まってきている。現在、健康食品および機能性食品 (特定保健用食品、栄養機能食品、サプリメント、機能性飲料・菓子など) の市場規模は、2 兆円にのぼる。オリゴ核酸は、ヒト腸内に豊富に存在する微生物細菌に由来することからも、消費者意識に配慮した新素材として、新しいマーケットを創造できる可能性が高い。本研究は、強力な免疫調節作用を有するオリゴ核酸を、ナノテクを駆使した経口デリバリーシステムの構築により新規機能性食品・飼料素材として提案するための基礎研究であり、21 世紀予防医学の時代に先駆け、農学分野から健康維持・増進のための新規な機能性素材開発のための基盤構築を目指すものである。

実験方法

1 ODN の合成

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

・ GpC ODN, ODN₁₆₁₂, 5'-G*C*T*A*G*A*G*C*T*T*A*G*G*C*T-3'⁴⁾

・ CpG ODN, MsST, 5'-C*A*G*G*A*C*G*T*T*G*T*A*T*C*A*C*T*G*A*A-3'⁵⁾

・ inhibitory ODN (iODN), iSG3, 5'-C*C*T*C*A*T*T*A*G*G*G*T*G*A*G*G*G-3'⁶⁾

以上の Phosphorothioate (PS) bond ODN を合成した。なお、* は PS bond を示している。

2 ODN-炭酸アパタイト粒子複合体 (ODNカプセル) の合成

ODN-炭酸アパタイト粒子複合体 (ODNカプセル) の合成は、有限会社セラジックス社に委託した。ODNのカプセル化については、契約の関係上ここに記載できないが、ナノサイズのカルシウム粒子に ODN が吸着し、マイクロサイズにまで成長させた上で、凍結乾燥させた (図 1A)。EDTA のような金属キレートには速やかに溶解するという化学的特徴がある (図 1B,C)。

3 カプセル化によるODN保護作用の検証

反応に用いる Naked ODN および ODN カプセル中の ODN 濃度は $5\mu\text{g}$ とした。ODN $5\mu\text{g}$ を 0.6mL チューブにとり、DNA 分解酵素、強酸 (pH2.0)、強アルカリ (pH12.0)、高温・高圧処理 (オートクレーブ, 121°C , 20min) で処理した。その後、 50mM EDTA によりカプセルを溶解し、3% アガロースゲルにて電気泳動に供した。

4 ODNカプセルの免疫特性解析

C57BL/6 マウス、4 週齢、雄 マウスは日本エスエルシー株式会社より購入し、6 週齢から実験に使用した。C57BL/6 マウスを、頸椎脱臼により安楽死させ、脾臓を摘出、脾臓細胞を調製した。マウス脾臓細胞を 12well plate に 2×10^6 cells/well で播き、 37°C 、5% CO_2 条件下で 3hr 培養した。その後、GpC ODN、GpC ODNカプセル、CpG ODN、CpG ODNカプセル ($3.0\mu\text{M}$) で刺激し、6 hr 後の細胞を回収した。マウス脾臓細胞から Total RNA を回収し、Total RNA と Prime Script[®] RT reagent Kit 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 β -actin プライマーとマウス IL-6 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。

結果

1 ODNカプセルのアガロースゲル電気泳動最適濃度の検討

アガロースゲル電気泳動に用いる ODN の最適濃度を検討した。PS-ODN の濃度を $25\mu\text{g/well}$ から $0.008\mu\text{g/well}$ まで次々と 1/5 段階希釈し、3% アガロースゲルを

用いて電気泳動に供した。泳動後、ゲルは SYBR gold で 15min 染色し、ゲルイメージャーにより観察した。検出されたバンドの大きさ、および濃さから判断して ODN の最適濃度は $5\mu\text{g/well}$ とした。次に、Ca イオンのキレート剤として EDTA を用いてカプセル成分を崩壊させ、ODN が溶出する濃度を検討した。Final 250mM から 0.4mM まで EDTA を次々と 1/5 段階希釈し、ODNカプセルを処理した。処理後、3% アガロースゲルを用いて

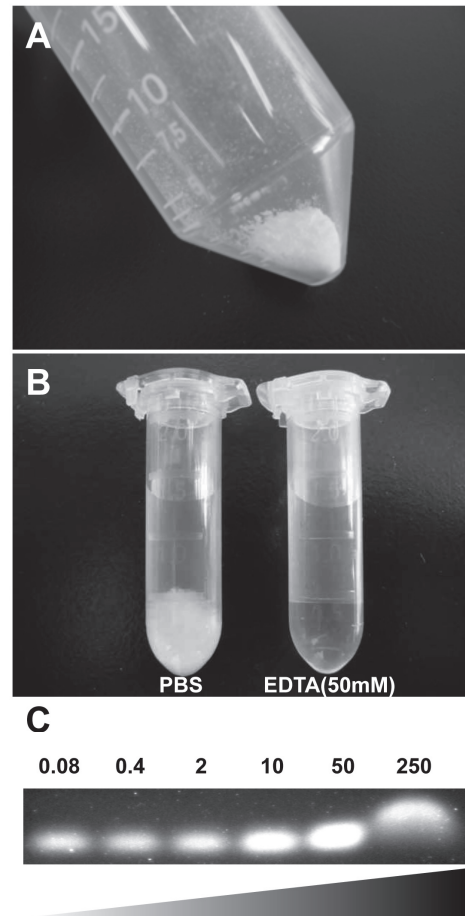


図 1 A. ODN カプセル (凍結乾燥品) 画像, B. ODN カプセル/PBS 懸濁画像と EDTA (50mM) 溶解画像, C. ODN 溶解条件の検討. ODN カプセルが溶解し、ODN が溶出する EDTA 濃度の検討を行った。EDTA を 250, 50, 10, 2, 0.4, 0.08mM になるよう段階希釈し、3% アガロース電気泳動を行った。ODN は一本鎖 DNA であることから、一般的なエチジウムプロマイドによる染色ではなく、一本鎖核酸を染色することができる SYBR Gold を用いて染色した。

電気泳動に供した。泳動後、ゲルは SYBR gold で 15min 染色し、ゲルイメージャーにより観察した (図 1C)。検出されたバンドの大きさ、および濃さから判断して、カプセルのバーストに用いる EDTA 濃度は 50mM とした (図 1C)。

2 カプセル化によるODNの保護作用

DNaseによる耐性試験では、DNaseI (100U/mL)で37°C,16hr処理した結果、Naked ODNと比較してODNカプセルはより濃いバンドが検出された。強酸による耐性試験では、HCl溶液 (pH2.0)で37°C,16hr処理した結果、完全に壊れたNaked ODNと比較してODNカプセルはバンドが検出された。強アルカリによる耐性試験では、NaOH溶液 (pH12)で37°C,16hr処理した結果、Naked ODNと比較してODNカプセルは同レベルのバンドが検出された。高温・高圧による耐性試験では、121°C,15min (オートクレーブ)処理した結果、バンドが検出されなかったNaked ODNと比較してODNカプセルはバンドが検出された (図2)。

3 ODNカプセルの免疫特性解析

C57BL/6雄マウスから脾臓細胞を調製し、CpG ODN、コントロールとしてGpC ODN、GpC ODNカプセル、CpG ODNカプセルで6時間培養後、リアルタイムPCR法を用いて炎症性サイトカインであるIL-6を測定した。GpC ODNと比較して、CpG ODNではnakedもcapsuleもIL-6の発現増加が見られた (図3A)。さらに、免疫抑制型ODNのiSG3カプセルは、

CpG ODNにより誘導されたIL-6 mRNAの発現を有意に抑制した (図3B)。

考 察

ODNやsiRNA、さらにはプラスミドDNA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。とくに (1) DNaseによる分解からODNを保護する (2) ODNの生体内における滞留時間を延ばす (3) ODNのエンドサイトーシスによる取り込み効率の向上 (4) 標的細胞にODNを届ける (5) 長い時間をかけてODNをゆっくりと運搬体の外へと放出する (6) ODN量を抑えることによるコストダウン、以上のようなODNの優れた運搬媒体が検討されている。本研究ではODNの経口投与を目指すことから、以上の検討課題に加え、胃酸を想定した強酸試験を評価項目に加えた。

まず初めに、ODNカプセルのアイデアを達成する

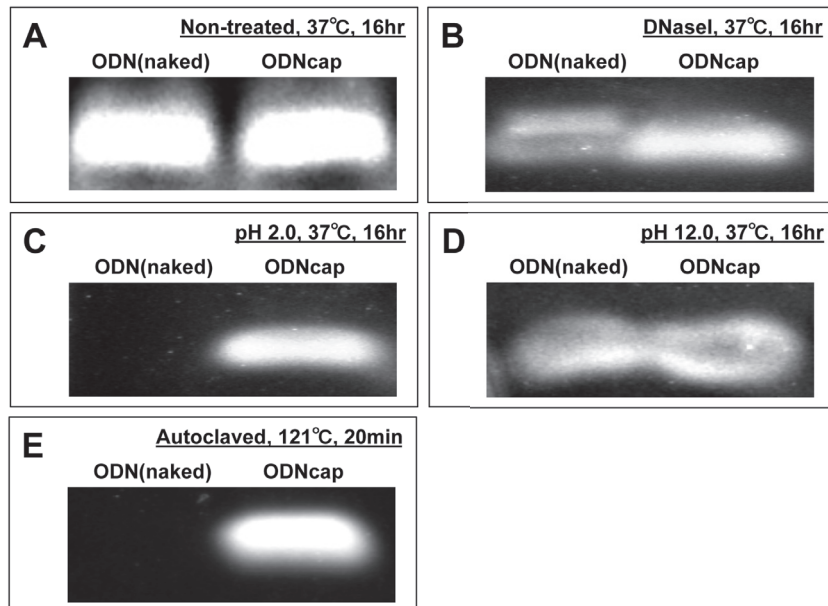


図2 カプセル化によるODN保護作用の検証. A. 無処理, B. DNaseI処理 (100U/mL, 37°C, 16hr処理), C. 強酸処理 (HCl溶液 (pH 2.0)で37°C, 16hr処理), D. 強アルカリ処理 (NaOH溶液 (pH 12.0)で37°C, 16hr処理), E. 高温・高圧処理 (オートクレーブ, 121°C, 20min処理)。処理後、50mM EDTAによりカプセルを溶解し、3%アガロースゲルにて電気泳動に供した。ODN(naked):カプセル化していないODN, ODNcap:カプセル化ODN。

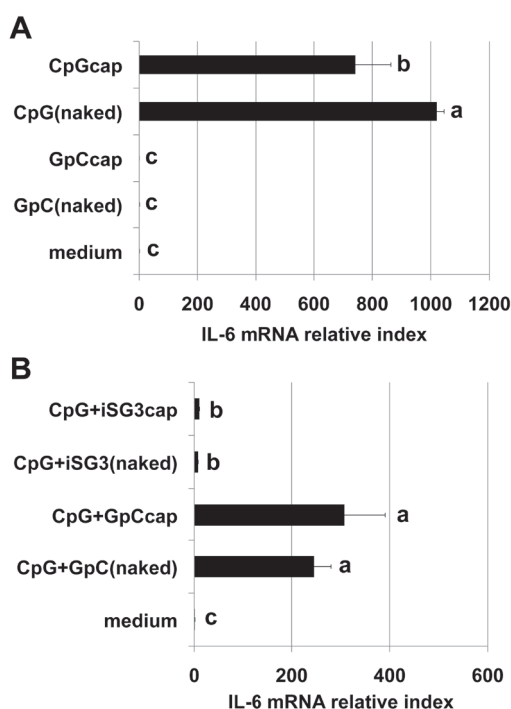


図3 マウス脾臓細胞における CpG ODN カプセル (A) および免疫抑制型 (iSG3) ODN カプセル (B) による刺激による IL-6 の発現解析。GpC: ODN₁₆₁₂ (免疫刺激性の無いコントロール ODN)⁴⁾、Cap: カプセル, ODN (naked): カプセル化していない ODN, ODNcap: ODN カプセル、CpG: *Streptococcus thermophilus* 由来 ODN (免疫刺激性有り)⁵⁾、iSG3⁶⁾: 免疫抑制型 ODN. 異なる英文字で示された記号 (i.e. a, b, c) は有意差あり (P<0.01) を示す。

ため、遺伝子導入用ナノ粒子「アパキャリー1」の開発実績があるベンチャー企業セラジックス社との交渉を開始した。さらに、横浜市立大学医学部付属病院 佐藤隆博士を加えた研究チームでディスカッションを重ね、理論上 [10 µg ODN]/[mg 複合体] で炭酸カルシウム粒子に包摂することが可能であるとの結論に達した。納品形体は、乾燥パウダー1グラムとし、試験の際には PBS 等のバッファーで洗浄・再分散させた後、実験に用いることとした。粒子の合成には、[試薬調製→エマルジョン作成→溶媒留去→光散乱によるサイズ測定→粒子の洗浄と乾燥→納品]の流れで、打ち合わせ期間も含めて約3ヶ月間を要した。以上の過程を経て、コントロール ODN (ODN₁₆₁₂; 免疫系に対する影響のない ODN) と乳酸菌由来 CpG ODN (免疫系に対する刺激性を有するもの) を、炭酸アパタイト粒子に包摂することに成功した。最終収量は、コントロール ODN カプセル、CpG ODN カプセルともに約 1.0 g で、それぞれ 10 mg の DNA を包摂することに成功した。同カルシウム粒子-ODN 複合体を、「ODN カプセル」と名付け、カプセル化による ODN の保護作用について詳細に解析を進めた。

カプセル化により、すべての評価項目において優れた ODN 保護作用が認められた。とくに、胃酸を想定した強酸 (pH 2.0) による耐性試験では、HCl 溶液 (pH 2.0) で 37°C, 16hr 処理した結果、完全に分解が進んだ Naked ODN と比較して、ODN カプセルでは ODN を示すシグナルが検出された。このことは、ODN カプセルは胃酸による消化に耐え、十二指腸、小腸へとデリバリーされる可能性が高まったことを示している。しかし、カプセル化により ODN の免疫機能性が失われていないかどうか確認する必要が生じた。そこで、マウスから脾臓細胞を調製し、CpG ODN およびコントロールとして GpC ODN、GpC ODN カプセル、CpG ODN カプセルで 6 時間培養後、リアルタイム PCR 法を用いて炎症性サイトカインである IL-6 を測定した。その結果、GpC ODN と比較して、CpG ODN では naked も capsule も IL-6 の発現増加が見られた。このことは、ODN が完全にカルシウム粒子によって覆われていないことを示唆している。また、ODN カプセルを作成する際、負の電荷を帯びた ODN を、正の電荷を帯びたナノサイズのカルシウム粒子の表面に吸着させ、その後ゆっくりと 37°C で

マイクロレベルにまで成長させたため、一つ一つの粒子がマイクロサイズであることが、電子顕微鏡画像からも明らかとなった。すなわち、ODN カプセルは、細胞培養液中において溶解することなく、粒子表面に存在する ODN が、免疫細胞を直接刺激したものと考えられる。

本研究で開発した ODN カプセルは、様々な ODN 配列に対応したカプセル調合が可能である。CpG ODN が免疫細胞を刺激し、免疫全体のベースラインを上げる働きがあることに対して、近年研究が進みつつある免疫抑制型 ODN は、免疫全体のベースラインを下げる働きがある⁶⁾。すなわち、使用目的に応じて ODN を使い分け、様々な疾病モデルマウスを想定し、今後は ODN カプセルの経口投与試験を進めていく必要がある。また、蛍光ラベルした蛍光 ODN カプセルを用いて、経口投与試験を実施し、ODN カプセルの腸管粘膜内における挙動、局在性、さらには標的細胞を明らかにする必要もある。ODN カプセルの将来性は、今後の *in vivo* 試験の結果如何にかかっており、ODN カプセルが優れた機能性素材として利用される日が訪れることに期待したい。

要 約

【目的】 微生物ゲノムDNA配列に基づき化学合成されたオリゴ核酸 (ODN) は、様々な疾病の予防および治療を目的としたワクチンアジュバントとして期待されている。しかし、ODNを経口摂取すると、胃酸の影響により分解されるという最大の弱点がある。本研究では、炭酸アパタイトナノ粒子へODNを包摂した耐酸性 ODNカプセルを作出し、ODNの経口投与試験に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。【方法】 Naked

ODN (Phosphorothioate ODN, S化修飾ODN) と ODNカプセルをDNA分解酵素、強酸、強アルカリおよびオートクレーブにて処理し、カプセル内のODNの安定性について電気泳動に供することで評価した。さらに、ODNカプセルとNaked ODNを用いてマウス免疫細胞を刺激し、IL-6遺伝子の発現量について定量的PCR法により解析した。【結果】 Naked ODNと比較してODNカプセルは、DNA分解酵素、オートクレーブ処理に対して非常に高い耐性を示し、強酸処理により緩やかに分解された。すなわち理論上、安定的に腸管局所にデリバリーされる可能性が高まった。さらに、CpG ODNカプセルは、Naked CpG ODNと同様にIL-6 mRNAの発現量を増加させたことから、カプセル化により免疫刺激性は失われないことが明らかとなった。

謝 辞

本研究は公益財団法人三島海運記念財団の平成 24 年度「学術研究助成金」により行われました。研究助成を賜りました公益財団法人三島海運記念財団ならびに関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1) A. M. Krieg, et al.; *Nature* 374,546-549,1995.
- 2) D.M. Klinman; *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 249-258, 2004.
- 3) H. Hemmi, et al.; *Nature* 408,740-745, 2000.
- 4) T. Sato, et al.; *Wound Repair Regen.*, 18, 586-593, 2010.
- 5) T. Shimosato, et al.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 394, 81-86, 2010.
- 6) Y. Ito, et al.; *FEBS Open Bio*, 3, 41-45, 2013.